

論文の内容の要旨

論文題目 末梢血免疫担当細胞トランスクリプトーム解析による混合性結合組織病に伴う間質性肺炎の病態機序の解明

氏名 石上（前田） 淳子

混合性結合組織病 (Mixed Connective Tissue Disease: MCTD) は、全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE)、強皮症 (Systemic Sclerosis: SSc)、多発筋炎・皮膚筋炎 (Polymyositis / Dermatomyositis: PM/DM) などの複数の自己免疫疾患の特徴を併せ持ち、抗核抗体・抗 U1-RNP 抗体が高力価陽性であることが特徴とされる。間質性肺炎 (interstitial lung disease: ILD) の合併率が高く予後規定因子となるが、その病態形成機序は明らかになっていない。治療法としてはプレドニゾロン (prednisolone: PSL) を主体として免疫抑制薬が主に用いられるが、今日においても治療抵抗性の病態が存在することより、その詳細な病態解明と新たな創薬標的分子の同定が望まれている。本研究では MCTD-ILD の病態解明を目的とし、MCTD 患者および健常人の末梢血より免疫担当細胞 26 種を分取し、遺伝子発現データと臨床情報の統合的解析を行った。複数の免疫担当細胞サブセットにおける遺伝子発現データと臨床情報の統合的解析を行うため、まず重み付け遺伝子発現ネットワーク解析 (Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)) を用いた。WGCNA は、遺伝子発現プロファイルから発現パターンが類似したもので「共発現ネットワーク」を構築し、階層的クラスタリングにより遺伝子 module として発現パターンの類似した遺伝子群をグループ化する手法である。本手法を用いることにより、ここで規定される遺伝子 module と臨床情報の相関を検出することが可能となる。続いて WGCNA で同定された各遺伝子 module と臨床所見との関係を全サブセットにおいて比較するために複雑 network 解析も併せて行った。その結果、MCTD の有無、ILD の有無、関節炎の有無に関連する 65 の module が一つの community に含まれ、これら CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、NK 細胞、樹状細胞、Monocyte、B 細胞などのサブセットにおいて遺伝子発現が関連する質的な変化が MCTD-ILD の病態に関与していると考えられた。

自己免疫疾患発症機序において、各種の免疫担当細胞が関与しているが、膠原病関連間質性肺炎 (connective tissue disease related ILD: CTD-ILD) 発症機序においても多くの知見が積み重ねられてきている。SSc や関節リウマチ (Rheumatic Arthritis: RA)、SLE に合併した ILD の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage: BAL) および末梢血中の制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) では Th1 や Th2 の炎症性サイトカイン産生や増殖に対する抑制能が低下しているとの報告がある。近年、SSc-ILD では末梢血中の Treg が増加し transforming growth factor- β (TGF- β) 産生を介して向線維化に機能している可能

性が報告されており、CTD-ILD の病態への Treg の関与が示唆されてきている。

Treg は胸腺由来の thymus-derived Treg (tTreg) と末梢由来の peripherally Treg (pTreg) に分類される。tTreg は CD4⁺CD25⁺ Treg に代表され、坂口らにより 2003 年にマスター制御遺伝子として forkhead box P3 (Foxp3) 遺伝子を発現することが同定された。Treg は cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) を介して抗原提示細胞の T 細胞への結合を阻害し免疫応答を抑制したり、interleukin (IL) -10 や TGF-β などの抑制性サイトカインを放出したりすることで制御的に機能し、免疫学的恒常性維持において重要な役割を担っている。

しかしながらその後の研究にて、FOXP3 は Treg に特異的なものではなく、免疫抑制能を持たないエフェクター T 細胞においても IL-2 や TGF-β、レチノイン酸などの特定の物質存在下で一過性に発現し、免疫抑制能を獲得しうるということが報告され、FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ T 細胞は不均一な集団であることがわかってきた。CD4⁺CD25⁺ T 細胞は、

CD45RA⁺Foxp3^{lo} resting Treg (Fraction I)、CD45RA⁺Foxp3^{hi} activated Treg

(aTreg)、CD45RA⁺Foxp3^{lo} non-suppressive T 細胞 (Fraction III: Fr. III) の 3 つのサブグループに分類され、中でも Fr. III はサイトカイン産生を介して疾患に対して促進性に作用するサブセットであると考えられている。特発性間質性肺炎 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) 患者やシェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SjS) -ILD 患者の気管洗浄液中で Fr. III が増加しており、TGF-β1 を介して繊維化を促進していることを示唆する。このように、CTD-ILD 病態形成において Fr. III は中心的役割を果たす免疫担当細胞サブセットであることが示唆されており、本検討では Fr. III に着目した。

上述の MCTD の有無、ILD の有無、関節炎の有無に関連する 65 の module には Fr. III の 3 つの遺伝子 module が含まれており、中でも Blue module は Treg の機能に主に関わる FOXP3 を含有しており、重要な遺伝子 module と考えられた。同 module に含まれる遺伝子群の pathway 解析の結果、signal transducer and activator of transcription 3

(STAT3) pathway の活性化と関連する遺伝子が多く含まれた。STAT3 pathway と線維化病態の関与については多くの報告があり、IL-6 signal の下流で STAT3 が作用することで SSc の皮膚硬化や、SSc モデルマウスである tight skin 1 (TSK-1) マウスにおける線維化に関与し、STAT3 阻害により皮膚硬化の改善が得られるとの報告や、ブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘導間質性肺炎モデルにおいて Jak2 阻害薬による間接的な STAT3 阻害により肺線維化マーカーの低下を認めるとの報告がある。また、IPF 患者の PD-1⁺CD4⁺ T 細胞が STAT3 を介して IL-17A や TGF-β を産生し肺線維化の病態に関与しているとの報告や、活動期の CTD-ILD の末梢血中 FOXP3⁺ Treg の減少に伴う細胞障害型 T 細胞 (NK 細胞や CD8⁺ T 細胞) の増加が IL-6 過剰産生を誘導し、IL-6/STAT3 経路を介して線維化を促進するという報告もある。以上の結果からは、FOXP3 を含む Fr. III の Blue module は MCTD-ILD の病態形成と関連している可能性が高い着目すべき module であることが示唆された。

Nintedanib は米国で 2014 年に IPF の治療薬として承認され、本邦でも 2015 年に承認された低分子チロシンキナーゼ阻害薬である。Distler らは 2019 年に米国、カナダ、中国、日本、ドイツ、フランス、英国を含む世界 32 カ国以上の SSc 患者 576 人を対象とした SENSICIS 試験において、SSc における ILD の肺機能低下を Nintedanib が抑制することが報告しており、米国 Food and Drug Administration (FDA) が同剤を SSc-ILD 治療薬としての優先審査対象に指定するなど、特発性のみならず CTD-ILD においても注目を集めている。興味深いことに Blue module において FOXP3 遺伝子以外に、Nintedanib の制御するシグナル伝達系に含まれる fibroblast growth factor receptor-like 1 (*FGFRL1*) 遺伝子も認められた。FGFRL1 は FGFR1-4 を含む FGFR ファミリーの一つで、近年 FGFR5 として発見された分子である。FGFRL1 は他の FGFR と同様、細胞外に FGF ligand 等が結合する Ig like domain を 3 つ有し、FGF2、3、4、8、10、22 を ligand として機能するが、FGFR1-4 と異なり細胞内のチロシンキナーゼドメインを有さない。また他の FGFR に結合することも知られ、デコイレセプターとしての機能を持つと考えられていた。しかし近年、FGFRL1 は脾臓細胞において ligand-independent に extracellular signal-related kinase (ERK) 1/2 signal を活性化することが報告され、また tumor necrosis factor (TNF) α や interferon (IFN) γ 、IL-18 などの炎症性サイトカインにより脾臓細胞における発現が亢進することも報告されており、免疫応答シグナルへの直接的な関与も有する可能性が示唆されているが詳細な機能、役割は不明なままである。

本検討では、Fr. III の *FOXP3* 遺伝子と *FGFRL1* 遺伝子発現において、*FGFRL1* 発現が、*FOXP3* および、*CD25* をコードする *IL2RA* 発現と負に相関するという、興味深い結果が得られた。これらの結果より、*FGFRL1* 発現が増強すると Treg としての抑制性機能が低下することが示唆された。しかしながら、現時点においては *FGFRL1* が *FOXP3* を制御するのか、またその逆なのかは不明なままである。今後は、*FGFRL1* 遺伝子のウイルスベクターを用いた過剰発現系や siRNA などを用いたノックダウン系を用いた検討を進める予定である。

次に間質性肺炎モデルとして BLM 誘発間質性肺炎モデルを使用し、上述知見に関する検証実験も行った。その結果、予想された如く BLM 投与により間質性肺炎病変局所である肺組織に CD4⁺Fgfr1⁺ T 細胞が浸潤していることを見出した。BLM 投与による肺線維化メカニズムには TGF- β 1 が関与していることが知られている。TGF- β 1 は Tgfb1 欠損マウスが自己抗体産生や多臓器への炎症細胞浸潤を認め生後約 4 週で致死的となることより、免疫制御機構において重要な役割を果たしていると考えられているが、細胞外マトリクスの産生を促進して線維化を誘導することも知られており、糖尿病腎症や肺線維症、強皮症など多くの線維性疾患で TGF- β 1 の発現亢進により、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリクスの発現誘導や、細胞外マトリクス分解蛋白質の発現制御などを介して線維化が進行することが報告されている。今回肺組織に浸潤した CD4⁺Fgfr1⁺ T 細胞も *Tgfb1* を高発現しており、肺線維化病態発症起点において CD4⁺Fgfr1⁺ T 細胞の産生する

TGF- β 1 が関与していることが示唆された。今後は *Fgfr1* の CD4⁺ T 細胞における機能解析が必要であり、*Fgfr1* 遺伝子 intron 2 を loxp site で挟んだ *Fgfr1* floxed マウスを既に作成しており、CD4 Cre マウスとの交配を行うことで T 細胞特異的 *Fgfr1* コンディショナルノックアウトマウスを用いた実験を行う予定としている。

以上、MCTD 患者 16 名と健常人 57 名より抽出した 26 種の免疫担当細胞サブセットについて、その遺伝子発現と臨床情報の統合的解析を行なうことで、MCTD-ILD の発症に関連し *FOXP3* 遺伝子を含む遺伝子 module の同定を行った。さらに、同遺伝子 module に含まれる自己免疫疾患におけるその機能が不明であった *FGFRL1* 遺伝子に着目し、同遺伝子が CD4⁺CD25⁺ non-Treg Fr. III サブセットにおける *FOXP3* 遺伝子および CD25 をコードする *IL2RA* 遺伝子発現と負に相関するという知見を得た。さらに、BLM 投与マウスモデルを用いて、CD4⁺*Fgfr1*⁺ T 細胞が肺繊維化病変局所において誘導されること、また誘導された CD4⁺*Fgfr1*⁺ T 細胞が向線維化作用を有する *Tgfb1* を高発現することを同定した。これらの結果は、MCTD における ILD 病態形成起点において、CD4⁺*Fgfr1*⁺ T 細胞が産生する TGF- β 1 が重要な役割を果たしていることを示唆しており、MCTD の予後決定因子である ILD 発症機序解明および新規治療法開発の礎となる可能性を内包していると考えられた。