

論文の内容の要旨

論文題目 全身性エリテマトーデスの免疫細胞種網羅的トランスクリプトームデータに基づく患者層別化解析

氏名 中野正博

全身性エリテマトーデス (SLE: systemic lupus erythematosus) は遺伝的、環境的要因がその発症に複雑に関与する全身性自己免疫疾患であり、症例によって非常に多様な臨床症状や自己抗体プロファイルを呈することが特徴である。本疾患患者の生命予後は副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤の登場により大きく改善したものの、感染症をはじめとする治療関連有害事象や臓器障害蓄積に伴う患者の生活の質の低下をいかに軽減するかが長期的な課題である。したがって今後は個々の症例の発現遺伝子や分子レベル等での層別化に基づく治療最適化 (precision medicine) が必要と考えられている。SLE は type I interferon (IFN) を病態の本軸とし、自然免疫、適応免疫を司る種々の細胞が病態に寄与することが知られているが、この種々の免疫担当細胞の質的または量的な関与の差異が SLE の多彩な臨床症状を形成していると考えられる。そこで今回我々は種々の疾患活動性と臓器病変を有する SLE 89 例、健常人 55 例において 27 種の免疫担当細胞を fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて分取し、各々の RNA-sequencing (RNA-seq) data を臨床情報と合わせて網羅的に解析することで SLE 症例の詳細な層別化を試みた。はじめに SLE 症例と健常人の発現変動遺伝子 (DEGs) を評価したところ、SLE 症例において(1) 細胞種横断的な type I IFN signal、(2) B 細胞サブセットや骨髄系樹状細胞 (mDC: myeloid dendritic cells) における抗原提示、(3) memory B 細胞や形質芽細胞 (plasmablast) での小胞体ストレス (ER stress)、(4) 好中球や low-density granulocytes (LDG) における脱顆粒反応 (degranulation)、といった既報において SLE 病態で重要とされる signal に関わる遺伝子群の発現亢進を確認した。

次に病態の本軸と考えられる type I IFN signal 強度に基づく階層的クラスタリングを試みたところ、SLE 症例は大きく 4 群に層別化された。細胞種間の比較では type I IFN signal は好中球や単球といった骨髄球系統で高い一方、plasmablast や naive CD4, naive CD8 T 細胞等では相対的に低いことも明らかとなった。臨床的な観点では、近年の SLE の治療指標とされる lupus low disease activity state (LLDAS) を達成しながらも type I IFN signal が高度に残存する症例が一定数存在すること、type I IFN signal 強度のみでは多くの臨床像が弁別困難であることも確認され、SLE 症例の詳細な層別化には type I IFN response genes 以外の遺伝子群の評価が重要と考えられた。

そこで我々は SLE の高疾患活動性症例 (HDA: high disease activity) と低疾患活動性症例 (LDA: low disease activity) の DEGs を評価することで、active SLE を特徴づける遺伝子群 (activity signatures) の同定を試みた。Activity signatures はリンパ球の中でも特に type 1 helper T (Th1) 細胞、effector memory (EM) CD8 T 細胞, effector memory re-expresses CD45RA (TEMRA) CD8 T 細胞、natural killer (NK) 細胞で多く、次いで好中球や単球といった骨髄球系統で多く検出された。次に各々の免疫細胞種で発現変動を示す遺伝子群を俯瞰するため、全細胞種の上位 100 個の DEGs に関して細胞種ごとの発現変動パターンをもとに細胞種横断的に階層的クラスタリングを施行した。type I IFN response genes は全ての細胞種において active SLE で発現亢進していることが確認された。細胞種特異性という見地からは、Th1, EM CD8, TEMRA CD8, NK 細胞の DEGs の多くが overlap し、これらは転写因子 E2F が制御する細胞周期関連遺伝子群であることが明らかとなった。また、骨髄球系統の activity signatures では細胞接着や補体貪食関連の遺伝子群を多数認めた。

さらに我々はこれらの activity signatures が特定の臓器病変を特徴づけるかどうかを解析した。我々はループス腎炎 (LN: lupus nephritis) の有無で症例を大別し、各々での活動性 (active) 対 非活動性 (inactive) 症例の DEGs を評価した。LN 以外の active SLE に

においては、上述の Th1, EM CD8, TEMRA CD8, NK 細胞の細胞周期関連遺伝子群に加え、単球系統のケモカイン関連遺伝子群が発現亢進している傾向を認めた。一方で active LN では、骨髄球系統の補体貪食関連遺伝子が優位に発現亢進していた。末梢血の flow cytometry では active LN 症例において CD16 陽性単球 (intermediate, non classical monocytes) が増多しており、また既報を参照した cell adhesion / phagocytosis signature scores を算出した比較でも active LN 症例では特にこれらの signature が末梢血レベルにおける単球サブセットで発現亢進していることを確認した。

また、我々は特定の自己抗体プロファイルを特徴づける遺伝子発現パターンの同定も試みた。抗 U1-ribonucleoprotein (RNP) 抗体陽性例では、細胞種横断的な type I IFN signal の亢進に加えて、unswitched memory B 細胞における ER stress やプロテアソーム分解に関わる遺伝子群の発現亢進を認め、SLE の自己抗体産生機序として胚中心 (germinal center) を介さない extrafollicular antibody response の重要性が示唆された。

最後に、我々は active SLE の DEGs として細胞の遊走に関わるケモカイン関連遺伝子が多数検出されたことに注目し、SLE の臨床像を特定の免疫細胞間におけるケモカインネットワークという見方で捉えられ得るか、検討を行った。全細胞種のケモカイン受容体発現を相関行列をもとにクラスタリングし、各々のクラスターごとに構成遺伝子を用いた signature scores を算出し臨床像との関連を評価したところ、単球と樹状細胞のフラクタルカイン受容体 CX3CR1 と単球の CXCR1/2 を含むクラスター (CXC-2) と、Th1, TEMRA CD8, NK 細胞の CX3CR1 を含むクラスター (CXC-8) が各々疾患活動性 (SLEDAI-2K: The systemic lupus erythematosus disease activity index 2000) と相関を認め、特に前者は関節炎と、後者は血清補体低下と関連した。また CXC-2 は単球のサイトカイン産生指標としての NFκB signal と強い相関を示した一方、cell adhesion / phagocytosis signal とは比較的弱い相関に留まり、LN における phagocytic monocytes とはやや異なる phenotype の単球 (inflammatory monocytes) が関節滑膜等の局所に遊走す

る可能性が示唆された。一方で CXC-8 は Th1, EM CD8, TEMRA CD8, NK 細胞で亢進していた細胞周期 signal と強い相関を示し、これらの細胞種が特に LN 以外の病態で増殖を経て局所浸潤していくメカニズムが想定された。

今回、SLE 症例の免疫細胞網羅的トランスクリプトーム解析から、SLE の種々の臨床像を特徴づける細胞種特異的な遺伝子発現パターンを複数同定するに至った。またそれらの病態と細胞遊走に関わる SLE のケモカインネットワークの一端が明らかとなった。今後より詳細な層別化解析を行うことで、症例ごとの遺伝子プロファイルに基づく SLE の治療戦略最適化の実現や新規治療標的の同定に繋げることが期待される。