

## 論文の内容の要旨

論文題目 関節リウマチの免疫細胞プロファイリングによる治療予後関連遺伝子ネットワークの探索

氏名 山田 紗依子

関節リウマチ (RA) は、慢性の炎症性関節疾患であり、進行性の関節破壊に至り得る。現在、根治は困難であり、疾患活動性と関節破壊の抑制を目的に、疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs)、生物学的製剤、もしくはこれらの併用による長期治療を要する。寛解の可能性を高め、不可逆的な関節破壊を防ぐために、早期診断と適時の治療介入が重要とされる。

RA の治療において、治療反応性の予測を含めた層別化医療が強く望まれている。一方で、実臨床において問題となるのは、治療反応性が悪い、治療抵抗性の症例である。すなわち、患者の層別化により治療抵抗例を早期に認識し、これに対し適切な治療を行うことこそ、新規治療の標的そのものともいえるが、RA の治療抵抗例の機序は十分にわかっていない。

本研究では、治療抵抗性と関与する細胞とその経路の特定を目的とした。末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を 18 種の免疫細胞種 (サブセット) 別に分離し、各細胞サブセットで RNA-sequencing (RNA-seq) を行うことで、トランスクリプトームを包括的に評価した。

対象は、東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科通院中の成人日本人 RA 患者およびボランティアの健常人 (healthy control: HC) とした。前向き試験とし、RA 患者については、ACR/EULAR 関節リウマチ分類基準 2010 を満たす、新規治療導入前の症例を対象とし、新規治療導入前および治療導入 6 か月後に末梢血を採取した。RA の疾患活動性の臨床指標である CDAI が、治療開始から 6 か月の経過で 50%以上改善した群を治療反応群、CDAI 改善が 50%未満であった群を治療抵抗群と定義した。HC としては、既往歴がなく、サプリメントを含め薬剤内服がない者を対象とした。

結果、RA 55 例、HC 39 例を解析対象とし、性別・採血時年齢には両群間に有意差を認めなかった。

まず、得られた RNA-seq データについて、Differentially expressed genes (DEGs)解析を行った。尤度比検定を行い、false discovery rate (FDR) 0.05 未満の遺伝子を DEGs とした。治療前 RA 55 例と HC 39 例を比較した結果、多岐のサブセットにわたる多数の遺伝子の発現の違いを認めた。次に、abatacept (ABT) 治療群 22 例のうち、治療反応群 8 例 (うち 5 例を治療 6 か月後に再検)、治療抵抗群 10 例 (うち 8 例を治療半年後に再検) について治療前後での DEGs 解析を行った結果、ABT 治療抵抗性患者では DEGs の数自体が少なかった。ABT 治療反応群では、少ないながらも、Unswitched memory B cells (USM B) や CD4+ T cells の各サブセットで DEG が検出され、Reactome Pathway 解析では、USM B cells ではユビキチン合成経路、Th17 cells ではキネシン関連経路の発現亢進が示唆された。

次に、治療前 RA 症例に対し、weighted correlation network analysis (WGCNA)を行った。細胞サブセットごとに発現変動が相関する遺伝子群を module と呼び、各 module の発現の代表値である Module Eigengene (ME)の発現量と臨床情報の変数との相関を解析した。すべてのサブセットのすべての module を対象に、治療 6 か月時点の治療抵抗性との関連において最も重要な module を同定する手段として、機械学習の一種である Random Forest を実施した。結果、上位から USM B turquoise module、Plasmacytoid dendritic cells (pDC) lightcyan module の順に、治療抵抗性との関連が順位付けられた。

USM B turquoise module のすべての遺伝子について、Reactome pathway 解析を実施したところ、ミトコンドリア関連遺伝子（ミトコンドリア翻訳の伸長・終了・開始）に伴う pathway が上位に推定された。細胞内ミトコンドリア代謝の亢進は B 細胞の活性化を反映しており、すなわち、治療抵抗性症例では USM B cell の活性化が示唆された。

pDC lightcyan module に対し Reactome pathway 解析を実施したところ、免疫、特に自然免疫やサイトカインシグナルに関連する遺伝子に関連する pathway が上位に推定された。ところで、2017 年 See P らが、末梢血中の CD123+CD33+CD45RA+DC 前駆体を pre DC と定義した(See P et al, Science 2017)。pre DC は従来 pDC とされてきた細胞に含まれ、pDC と多くのマーカーを共有しながら conventional (c) DC 1, cDC2 へ分化することが示された。また、この論文では、これまで pDC が有すると考えられてきた、IL-12 産生能および Naïve CD4 T cells 刺激能は、pre DC 固有の能力である可能性を示唆された。この論文にて pre DC を特徴づけるとされた遺伝子と本 module の遺伝子は 13 個が一致しており ( $p < 2.2e-16$ )、この論文の RNA-seq データを deconvolution して得られた pre DC 存在比率は、pDC lightcyan module の ME と有意に相関を認めた ( $r=0.70$ ,  $p = 9.003e-08$ )。すなわち、pDC lightcyan module は pDC 中の pre DC 割合を反映すると考えられた。また、同年 Villani AC らが定義した、pDC のうち AXL, SIGLEC1, SIGLEC6 の発現を特徴とし、T 細胞を強力に活性化する DC 亜分画 (AS DC) についても(Villani AC et al, Science 2017)、pre DC と同一の細胞集団をさすと考えられ、この論文の RNA-seq データを deconvolution して得られた AS DC の存在比率と pDC lightcyan module の ME も、有意な相関を認めた ( $r = 0.66$ ,  $p = 5.402e-07$ )。すなわち、pDC として分取された細胞の中に pre DC (AS DC) が contamination しており、治療抵抗例で pre DC が増加している可能性が考慮された。

実際に、治療前 RA 症例のうち 18 例を対象に、See P らの論文に準じて pre DC を gating し、DC に対する pre DC の細胞割合を評価したところ、有意でないものの、治療反応群にくらべ治療抵抗群で多い傾向にあった ( $p = 0.10$ )。また治療抵抗群で cDC1 の有意な増加を認めた ( $p=0.04$ )。

Validation cohort として、当科および共同研究機関 4 施設の共同研究として、成人日本人 RA 患者のうち、1 剤以上の従来型合成(cs)DMARDs の効果が不十分のため通常の医療判断で ABT による治療を開始する、生物学的製剤の導入が 3 剤目以内である患者 24 例を対象に、マスマイトメトリー解析を行い、治療前末梢血中の pre DC の細胞割合を評価した。結果、治療抵抗

群では、治療前末梢血における pre DC の細胞割合が有意に増加していた ( $p = 0.0059$ )。すなわち、RA、特に治療抵抗性症例では、治療前に、pre DC が増加、そして cDC1 への分化が亢進し、CD4+T 細胞刺激能が亢進し、これが治療抵抗性の背景となっている可能性がある。pre DC から cDC1 への分化の抑制により、治療抵抗性 RA の治療につながる可能性がある。

さらに、RNA-seq データにおける B 細胞 5 サブセットを対象に、BCR レパトア解析を行い、産生されるレパトアの多様性と治療抵抗性の関係について、サブセットごとの評価を試みた。結果、Plasmablast の polyclonality と治療抵抗性との最も強い関連が示唆された。

以上から、RA における治療抵抗性の機序について、増加した pre DC により CD4+T 細胞が刺激され、これと独立に、ミトコンドリア pathway 関連遺伝子を介して活性化した USM B cells から、Plasmablast が polyclonal に分化・活性化する可能性を、一つの仮説として考えた。

今回我々は、網羅的な免疫細胞サブセット別の RNA-seq を行うことで、治療前 RA の 6 か月後の治療抵抗性について、末梢血の USM B cells のミトコンドリア関連遺伝子を介した活性化や pre DC の増加、さらに plasmablast の polyclonal な活性化から、予測可能性を見出した。特に RA における pre DC の増加については、ABT 治療を受けた validation cohort におけるマスサイトメトリー解析の結果でも、治療抵抗性との関連を支持していた。これらの結果は、RA の治療の層別化における本研究の有用性を示唆すると考える。