

博士論文（要約）

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

山田 紗依子

要約

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、非常に common な慢性炎症性関節疾患である。RA は polygenic な疾患であり、遺伝的寄与は 50－60%とされ、喫煙・口腔内/気管支/腸内細菌叢・歯周炎などの環境要因を背景に、免疫寛容が破綻し、RA の発症にいたるとされる。

RA の実臨床における治療の中で認識され、問題となってきたのは、治療反応性が悪い症例(difficult-to-treat (D2T))である。薬剤の有効性に広く使用されている基準である ACR コアセットでは、臨床所見の 50%以上の改善を得られた場合”ACR 基準 50%以上の改善あり”として ACR50 と呼ぶ。ACR50 の達成率は、methotrexate(MTX) 初回導入例では、MTX 単剤の場合 40.5%、生物学的製剤(infliximab(IFX)、etanercept(ETN)、adalimumab(ADA)、tocilizumab (TCZ)、abatacept (ABT)、rituximab (RTX))もしくは tofacitinib (TOFA)との組み合わせの治療の場合 56-67% だった。MTX 治療抵抗例に対する MTX と他の従来型合成疾患修飾性抗リウマチ薬 (conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs: csDMARDs) もしくは生物学的製剤(IFX、ETN、ADA、TCZ、ABT、RTX)もしくは TOFA との組み合わせの治療の場合、27-70%であった。すなわち、生物学的製剤を使用しても、所見の 50%以上の改善は半数程度の症例でしか得られていない現状がある。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が、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、次世代の治

療の標的そのものともいえる。

RA の治療抵抗性の機序は十分にわかっていない。これまで、治療抵抗性予測因子として、抗 CCP 抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody : ACPA)の産生に関わることが知られる shared epitope (SE)を有する HLA-DRB1 allele、リウマトイド因子 (rheumatoid factor: RF) や ACPA 陽性、1 型インターフェロン (interferon: IFN) gene signature などが挙げられてきた。しかし、治療抵抗性の機序の全容、特に、どの細胞が治療抵抗性に関与しているかは明らかでなかった。

T 細胞については、Naïve T cell の多い早期 RA 患者では MTX による寛解率が高いとされるなど、T 細胞の状態と RA の予後との関連が示唆されている。一方で、RA の予後に関わるのは T 細胞だけではなく、B 細胞についても、RA との関連が示唆されている。ACPA を含め自己抗体産生における B 細胞の不可欠な役割が知られている。また RA 再燃数週間前の B 細胞の活性化が示されており、自己抗体に依存しない B 細胞の機序についても示唆されているが、まだ不明点が多い。さらに、RA 滑膜の樹状細胞(dendritic cell: DC)の接着分子の発現は DMARDs 治療反応性に相関し見られなくなるとする既報などがあり、DC と RA の治療反応性にも関連が示唆されるが、詳細は明らかでない。

つまり、RA の発症や再燃には、T 細胞だけでなく B 細胞や DC との関連も示唆されているが、RA の治療抵抗性においてどのサブセットが重要か、網羅的な解析はこれまでなされていない。

本研究では、RA 患者と健常人 (healthy control: HC) の末梢血の免疫細胞を、サブセットごとに、トランスクリプトームプロファイルを包括的に評価することで、治療抵抗性を予測可能なサブセット、遺伝子パスウェイを特定することを目的とした。具体的には、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 55 例およびボランティアの HC 39 例を対象に、フローサイトメトリーを用いて免疫細胞 18 サブセットに分取し、それぞれについて RNA-seq を行った。

RA の疾患活動性の臨床評価指数である clinical disease activity index (CDAI) は、圧痛関節数、腫脹関節数、患者 VAS、医師 VAS の和として算出される。今回、複数の既報に準じ、治療抵抗性の指標として、治療から 6 か月の経過で CDAI が 50% 以上改善した群を治療反応群、CDAI の改善が 50% 未満の群を治療抵抗群と定義した。

まず ABT 治療群を対象に、発現変動遺伝子 differentially expressed genes (DEGs) 解析を行い、治療反応群と抵抗群にわけて、ABT 治療前後での DEGs をそれぞれ評価した。得られた DEGs に対し、サブセットごとに Reactome Pathway 解析を行い、特定のサブセットで特に発現変動している遺伝子の特徴を評価した。結果、ABT 治療による発現変動遺伝子は治療抵抗群よりも反応群で多く見られ、臨床的な有効性と免疫細胞の遺伝子発現変化の量は対応する関係にあることが示唆された。治療反応群では、特に、CD4⁺T 細胞の各サブセットや Unswitched memory B cells (USM B cells) に多くの DEGs が検出され、これらが治療効果と関連した免疫細胞であることが示唆された。ABT 治療反応群では、ABT 治療による USM B cells におけるユビキチン合

成経路の発現変動が見られた($p = 0.013$)。RA 群では USM B cells におけるユビキチン/プロテアソーム系の活性化があり、ABT 反応群ではこれが二次的に抑制される可能性がある。

次に、治療前の RA 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)の発現量と治療 6 か月時点の治療抵抗性との相関を解析した。結果、治療抵抗性 RA 患者の治療前末梢血では、USM B cells のミトコンドリア pathway 関連 module および形質細胞様(plasmacytoid: p)DC におけるある亜分画の signature gene を含む module の発現の亢進を認めた ($p = 0.00014, 0.00045$)。その亜分画についての既報を用いて deconvolution して得られた亜分画の存在比率は、pDC のこの module の ME と有意に相関しており ($r=0.70, p = 9.003e-08$)、この module は pDC 中の亜分画の細胞割合を反映すると考えられた。すなわち、pDC として分取された細胞の中にある亜分画が混在しており、治療抵抗例で治療前にこれらの細胞が増加している可能性が考慮された。実際に、本研究の一部 dataset のフローサイトメトリーのデータを対象に、その亜分画を gating したところ、治療前の DC に対する亜分画の割合は、有意でないものの、治療反応群に比べ治療抵抗群で多い傾向にあった ($p = 0.10$)。

治療抵抗例での治療前末梢血におけるその亜分画の増加について、検証コホートとして、PREDICTABA study と称し、評価した。東京大学医学部附属病院アレルギー・

リウマチ内科および共同研究機関 4 施設（がん・感染症センター都立駒込病院膠原病科、東京都立墨東病院リウマチ膠原病内科、東京都健康長寿医療センター膠原病・リウマチ内科、あずまりウマチ・内科クリニック）通院中の成人日本人 RA 患者のうち、1 剤以上の csDMARDs 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症例を対象とした。ABT 治療前の末梢血を染色し、CyTOF によるマスサイトメトリー解析を実施した。亜分画を gating し、その細胞数と ABT 治療反応性の相関を評価したところ、治療抵抗群では、治療前末梢血における特定の亜分画の細胞割合が有意に増加していることが確認された（ $p = 0.0059$ ）。

最後に、特に、B 細胞については、BCR レパトア解析を行った。すべてのサブセットの diversity index を対象に、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行ったところ、特定の一つのサブセットの Gini Index と治療抵抗性との最も強い関連が示唆され、治療抵抗性 RA 患者の治療前末梢血では、特定の一つのサブセットが polyclonal に活性化していることが示唆された。

本研究では、新規治療前の症例の末梢血免疫細胞 18 サブセットのトランスクリプトームを評価した結果、治療前の pDC における特定の亜分画の増加や USM B cells におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現亢進、B 細胞の特定のサブセットの polyclonal な活性化から、治療抵抗性を予測し得ることを示した。本研究の結果は、関節リウマチの層別化治療を可能にしえる。