

## 論文の内容の要旨

論文題目 1 細胞分泌実時間イメージング法を用いた、細胞間相互作用による滑膜線維芽細胞の病的形質獲得の解析

氏名 高橋 (波多野) 悠

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、遺伝的素因や環境因子を背景に発症し、滑膜の炎症と骨軟骨破壊を特徴とする自己免疫疾患である。RA の発症早期から、関節内では多様な免疫細胞や間葉系細胞が細胞間接着や液性因子を介して相互に活性化し、炎症環境を構成する。間葉系細胞の中でも、滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts; SFs) は滑膜の主要な構成因子であり、IL-6 を代表とする免疫調節因子や基質分解酵素を発現することで、関節における炎症の惹起と持続に寄与する。近年、single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 解析により、SFs において、機能的に異なる複数の亜集団が存在することが示唆された。特に、IL-6 を高発現する SFs の亜集団の一部は、血管内皮細胞に由来する NOTCH3 signaling により誘導されることが報告されたが、その他の機序は十分に解明されていない。我々は、関節内で SFs が主要な産生源となる炎症性メディエーターとして、最も代表的な IL-6 に着目し、接触する免疫細胞の種類による SFs の IL-6 発現パターンを、1 細胞分泌実時間イメージング法 (live-cell imaging of secretion activity; LCI-S) を用いて解析した。

LCI-S は sandwich immunoassay と全反射照明蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscope; TIRF) を応用した手法である。観察対象の蛋白質に対する捕捉抗体を固定した chip に細胞を播種し、検出抗体を添加する。その chip を温度、CO<sub>2</sub> 濃度が管理された環境下で培養しながら、TIRF を用いて chip 底面から約 100 nm の範囲までに発生するエバネッセント場にて励起し、検出抗体から発せられた蛍光を観察する。この方法により、未接着の検出抗体による非特異的な蛍光を抑制しつつ、細胞からの分泌蛋白や細胞間距離を、1 細胞レベルでリアルタイムかつ継時的に観察可能となる。

はじめに、非凍結滑膜から未分画の細胞懸濁液を調整し、LCI-S を用いて観察した。その結果、SFs と免疫細胞が接触した直後に検出される「cell-to-cell interaction 誘導性の IL-6 分泌 (接触性分泌)」と、浮遊細胞との接触なく検出される「cell-to-cell interaction 非依存性の IL-6 分泌 (非接触性分泌)」を認め、非接触性分泌に比べて接触性分泌の方が、IL-6 分泌が有意に長時間持続した ( $p=0.002$ )。しかし、この実験系では、debris や赤血球などが観察の妨げになることや、細胞種の正確な同定が困難であったことから、次に、滑膜細胞懸濁液から flow cytometry (FCM) により SFs 及び免疫細胞を分取し、共培養する実験系を検討した。その結果、sorting buffer に添加されるキレート剤 (EDTA) や細胞への圧負荷等により、SFs の viability が低下することが判明した。その上、滑膜細胞中の免疫細胞割合は検体差が大きく、各細胞分画を目標数確保できない検体が生じた。最終的に、滑膜細胞

から CD14 magnetic-activated cell sorting (MACS) ビーズによる negative selection を経て純化した SFs と、FCM により分取した同一患者の PBMC 由来免疫細胞を共培養することにした。

その結果、SFs 単独培養と、CD4<sup>+</sup> T cell、CD8<sup>+</sup> T cell、B cell と SFs との共培養を比較すると、累積 IL-6 分泌量に有意な差は認められなかった。時系列情報を解析し単位時間あたりの IL-6 分泌量に着目したところ、いずれの培養条件においても、観察開始時から観察される IL-6 分泌（初期分泌）を認めた。免疫細胞と SFs を共培養した条件では、初期分泌のみならず、免疫細胞との cell-to-cell interaction 後に IL-6 分泌が確認された。つまり、LCI-S を用いることで、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法に代表されるような蛋白の累積分泌量では評価が困難な、1 細胞レベルでの詳細な発現変化を解析できると考えられた。

LCI-S を用いて SFs と免疫細胞の cell-to-cell interaction、および IL-6 分泌を解析する際、膨大な画像データから、各観察フレームにおける細胞の位置や形態情報を自動認識する手段が不可欠であった。そのため、SFs 及び免疫細胞のマスク画像の作成が課題となった。特に、SFs は、形態が多様かつ複雑に変化し、従来の手法ではマスク画像の作成が困難である。この問題に対処するため、主に 2 点の工夫を行った。第一に、SFs の位置を自動認識するため、deep learning による画像認識の一手法である pyramid scene parsing network (PSPNet) を本研究の画像データに合わせて fine tuning した。その結果、SFs に関して average IoU (intersection over union) 0.69 と高精度での認識を可能とした。第二に、免疫細胞の表面抗原の染色に使用する蛍光色素の組み合わせを FCM と顕微鏡撮影時のフィルター条件の両方を考慮し選定した。これにより、FCM に使用した蛍光抗体を顕微鏡撮影時の観察にも使用し、免疫細胞のマスク画像作成に活用することができた。上述の工夫により、SFs と免疫細胞の両方のマスクが重複するピクセルがある場合、cell-to-cell interaction がある、と自動判定することが可能になった。

この方法を用いて、SFs 単独培養と、CD4<sup>+</sup> T cell、CD8<sup>+</sup> T cell、B cell と SFs の共培養、また、CD4<sup>+</sup> T cell の亜分画である follicular helper T cell (Tfh)、type 1 helper T cell (Th1) と SFs の共培養の IL-6 分泌を解析した。その結果、免疫細胞 (CD4<sup>+</sup> T cell、CD8<sup>+</sup> T cell、B cell) と SFs を共培養した well のうち、免疫細胞と cell-to-cell interaction した SFs が存在するか否かと、IL-6 分泌の有無に関連性があるか否かをカイ二乗検定したところ、有意に関連性を認めた ( $p=2.75\times 10^{-5}$ )。その上、SFs と免疫細胞の cell-to-cell interaction 後 2 時間と interaction 前 2 時間の IL-6 分泌量の差を培養条件間で比較したところ、CD4<sup>+</sup> T cell は B cell や CD8<sup>+</sup> T cell と比較し、また、Tfh は Th1 と比較し cell-to-cell interaction 後の IL-6 分泌量が多い傾向があった。

本研究により、1) SFs からの IL-6 分泌が免疫細胞との cell-to-cell interaction により誘導されること、2) このような接触性の IL-6 分泌は、非接触性の分泌と比較し長時間持続すること、3) 接触する免疫細胞の種類により IL-6 分泌量が異なる傾向があることが明らかと

なった。また、複雑な形態をとる SFs の LCI-S データの解析に、PSPNet を活用することで大量な画像データの処理の自動化に成功した。

RA の病態における CD4<sup>+</sup> T cell の重要性は既知だが、どの亜分画が RA の病態において特に重要であるかについては、多くの議論がある。Tfh については、リンパ濾胞において B 細胞の成熟と活性化、抗体産生を制御する機能が知られているが、Tfh の SFs に対するヘルプ活性に関する報告は乏しく、今回の結果は新たな Tfh の機能を示唆するものとする。

さらに、今回の実験では、各免疫細胞と cell-to-cell interaction が観察されても、IL-6 を分泌しない SFs も認められた。この結果から、SFs についても細胞ごとに cell-to-cell interaction に対する反応性が異なる可能性が考えられた。cell-to-cell interaction に対する反応性の差異は、滑膜の scRNA-seq により指摘された SFs の機能的な heterogeneity を反映していると推察される。

今回構築された実験系は複数の応用方法がある。第一に、使用する細胞種は SFs と免疫細胞に限らないため、任意の接着細胞、浮遊細胞に応用できる。第二に、検出する蛋白質に関しても検出及び捕捉抗体を変更すればいずれの蛋白質も測定できる。第三に、LCI-S では、対象とした細胞を 1 細胞ずつ pick up し scRNA-seq を行うことが可能である。例えば、SFs を pick up し、接触性 IL-6 分泌をきたした SFs と非接触性 IL-6 分泌をきたした SFs、免疫細胞と接触しても IL-6 を分泌しなかった SFs の遺伝子プロファイルの違いを解析できる。また、免疫細胞を pick up することで接触性 IL-6 分泌を効率よく誘導する免疫細胞種の詳細な同定を進める予定である。

RA の既存治療では未だ約 3 割の患者は寛解を達成せず、難治性 RA に対する新たな治療ターゲットの探索が望まれている。今後、本研究が、SFs の病的形質の獲得機序の解明の一助となり、RA の病態のより精緻な理解と新規創薬標的の同定につながると期待される。