

審査の結果の要旨

氏名高橋（波多野）悠

関節リウマチ（rheumatoid arthritis; RA）は、滑膜の炎症と骨軟骨破壊を特徴とする疾患である。滑膜線維芽細胞（synovial fibroblasts; SFs）は滑膜内の主要な間葉系細胞であり、多彩な免疫調節因子を発現し、関節局所における炎症の持続に寄与する。近年、SFsに機能的な heterogeneity が存在することが提示されたが、そのような差異が生じる機序の詳細は不明である。特に、免疫細胞との直接的な cell-to-cell interaction が SFs の炎症性フェノタイプを誘導するか、また、接着する免疫細胞の種類により、SFs の炎症性フェノタイプの誘導に違いがあるか、解明が望まれている。本研究は、免疫細胞と SFs の cell-to-cell interaction による炎症性フェノタイプの誘導を解析するため、1 細胞分泌実時間イメージング法（live-cell imaging of secretion activity; LCI-S）を用いた新たな 1 細胞イメージング研究手法の確立を目的とした。

本研究に用いた LCI-S は、薬学系研究科生体分析化学教室白崎善隆特任助教らが開発し、sandwich immunoassay と全反射照明蛍光顕微鏡（total internal reflection fluorescence microscope; TIRF）を応用した研究手法である。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 TIRF を用いて観察する。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ながら、細胞からの分泌蛋白や細胞の位置を、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。本研究では、SFs が発現する代表的な炎症性サイトカインである IL-6 に着目し、免疫細胞との cell-to-cell interaction による SFs からの IL-6 分泌を解析した。

まず、滑膜内の多様な細胞種が混在する炎症環境を模すため、未分画の滑膜細胞懸濁液を、LCI-S を用いて観察した。その結果、SFs と免疫細胞が接着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、免疫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）」を認めた。接触性分泌と非接触性分泌の分泌パターンを比較すると、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。しかし、この方法では、① debris や赤血球などが含まれ、cell-to-cell interaction の有無の判定が困難である、② 細胞種の判定が不正確である、という問題点があった。そこで、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、flow cytometry (FCM) により分取した同一患者の末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells; PBMC）由来免疫細胞を共培養し LCI-S で観察する方法に改変した。

さらに、1 実験あたり約 10 万画像もの大量の画像処理が必要であり、免疫細胞との直接

的な cell-to-cell interaction の判定の自動化が不可欠であった。そのためには、SFs の位置の同定が不可欠であるが、SFs は形態が多様かつ複雑に変化するため、従来の方法では、位置の正確な同定が困難であった。そこで、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、SFs 認識用 PSPNet を作成することで、average IoU (intersection over union) 0.69 と高精度での SFs の自動認識を達成した。これを用いて、SFs と免疫細胞の両方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。以上の方法を用いて、SFs 単独培養と、CD4⁺ T cell、CD8⁺ T cell、B cell と SFs の共培養、また、CD4⁺ T cell の亜分画である follicular helper T cell (Tfh)、type 1 helper T cell (Th1) と SFs の共培養条件における SFs からの IL-6 分泌を解析した。その結果、免疫細胞 (CD4⁺ T cell、CD8⁺ 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 ($p=2.75\times 10^{-5}$)。さらに、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⁺ T cell は B cell や CD8⁺ 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。

本研究では、SFs と免疫細胞の cell-to-cell interaction を観察、解析する研究手法を新規に確立した。これにより、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。今回の研究結果より、CD4⁺ T cell による SFs に対するヘルプ活性という新しい病的機序が示唆された。

また、今回構築された研究手法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 single-cell RNA-sequencing 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。他にも、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 3 割程度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。よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。