

博士論文

論文題目 次世代シーケンサーを用いた関節リウマチに
おける T 細胞受容体レパトワ解析

氏名 櫻井 恵一

目 次

目 次	• • • • • 1
要 旨	• • • • • 2
序 文	• • • • • 3
方 法	• • • • • 9
結 果	• • • • • 16
考 察	• • • • • 22
参考文献	• • • • • 29
図 表	• • • • • 40
謝 辞	• • • • • 55

次世代シーケンサーを用いた 関節リウマチにおける T 細胞受容体レパトワ解析

所属： 医学系研究科内科学専攻（博士課程）

生体防御腫瘍内科学講座 アレルギー・リウマチ学

指導教員名： 山本 一彦

申請者： 櫻井 恵一

要旨

次世代シーケンサーは網羅的で high through put な T 細胞受容体（TCR）レパトワ解析を可能にした。今回、関節リウマチ(RA)患者と健常人の末梢血の TCR レパトワを CD4 陽性ナイーブ・メモリーT 細胞の双方で解析した。RA では CD4 陽性ナイーブ・メモリーT 細胞双方がクローナルに増殖し、その増殖は疾患活動性及び shared epitope アリル数と相関し、特定の自己抗原に対するクローナルな増殖の RA の病態への関連を示唆した。一方、RA の病態に関連する炎症性サイトカインはこのクローナルな増殖と関連しないと考えうる結果を得た。抗サイトカイン療法とは別機序の治療開発に重要な知見と考えられた。(300 文字)

序文

関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis／以下 RA）は、末梢関節を中心とした多関節における滑膜炎と、その進行に伴う関節破壊を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。その有病率は日本においては約 1 % 程度と推定されており、common disease であるといえる[1]。進行例では、関節の高度な変形・強直をきたし、著しく患者の生活の質（Quality of Life／以下 QOL）の低下をきたす。RA に対する治療としては、従来、サラゾスルファピリジン・メトトレキサート（Methotrexate／以下 MTX）などの疾患修飾薬（Disease Modified Anti-Rheumatic Drugs／以下 DMARDs）や、グルココルチコイド、非ステロイド消炎鎮痛剤（Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs／以下 NSAIDs）を中心とした薬物療法がおこなわれてきたが、抗 TNF - α 阻害薬、抗 IL-6 阻害薬、T 細胞受容体共刺激阻害薬等の生物学的製剤の出現により、寛解が現実的な治療のゴールとなった。これらの生物学的製剤を積極的に用いた治療を行うことで、以前と比較して高い治療効果、並びに QOL の改善が達成可能となった[2-4]。

しかしながら、生物学的製剤を使用しても厳密な基準によれば寛解率は 15 - 30% 程度とされており、十分に寛解に導くことができない症例もいまだ多い。また、現時点における RA 治療薬は非特異的に免疫を抑制する為、日和見感染症をはじめとする各種感染症のリスクは高まる[1,5]。一方で、RA の病因・病態に即した、選択的

な免疫抑制が理想であるが、RA の病因・病態について不明な点も多く、RA の免疫異常に特異的な免疫抑制療法の開発には、更なる RA における臨床免疫研究が必要とされている。

RA の病因には遺伝的因子、環境的因子の両者が関与していると考えられている[6,7]。遺伝的因子については、双生児において RA の発症一致率は一卵性双生児で二卵性双生児と比して高いことが指摘されており[8,9]、RA において遺伝的因子の関与が示唆される。さらに、GWAS 研究によって多数の RA の疾患感受性遺伝子座が明らかになっている[10,11]。例えば、ヒトにおける主要組織適合抗原複合体 (Major Histocompatibility Antigen/以下 MHC) であるヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen/以下 HLA) -DRB1 は現在わかっている中で最も寄与率が高い遺伝子である[10]。一方で、環境的因子としては、微生物や[12,13]、喫煙が発症にかかわるといふ疫学的報告もあるが十分な証明はなされていない[14,15]。

また RA の発症には自己抗原に対する免疫学的寛容の破綻が関与すると考えられている。複数の全身性自己抗原、関節抗原に対する自己抗体が知られているが[16-18]、特にシトルリン化された抗原に対する自己抗体 (anti-citrullinated-protein-antibody/以下 ACPA) は RA において特異度が高いことが知られており[17,18]、例えば RA 患者の血清中には関節炎発症前から自己抗体が検出されることが知られている[16-18]。このことは関節炎発症に先立つ B 細胞における免疫学的寛容の破綻を示唆する。

一方 RA においては T 細胞も病態の中心的な役割を果たす細胞のひとつであると
考えられている。例えば RA 患者の炎症滑膜において、CD4 陽性 T 細胞が主に浸潤
していること[19]、また関節において CD4 陽性 T 細胞のポリクローナルなクローン
集積が認められることから[19-22]、CD4 陽性の自己反応性 T 細胞クローンが RA の
関節炎症において重要な働きをしていると考えられてきた[23]。また、ACPA に関
連する B 細胞クローンの検討では、体細胞変異の重要性が示唆されており、自己反
応性 B 細胞応答をヘルプする CD4 陽性 T 細胞の重要性も示唆される。[24]さらに、
GWAS 研究においても CD4 陽性 T 細胞に関連のある遺伝子の RA への寄与が示さ
れている。一方で、CD4 陽性 T 細胞の T 細胞受容体 (T-cell receptor / 以下 TCR) が
認識する抗原やエピトープに関する情報はいまだ不十分であり[25,26]、このことが
RA の免疫異常に特異的な治療法の開発が達成できていない理由のひとつである。

RA の疾患関連遺伝子座のうち最も寄与率が高いものは HLA-DRB1 である。これ
に関連して、Shared Epitope (以下 SE) 仮説が提唱されている[27]。SE 仮説は、HLA-
DRB1 において DRB1*0405、DRB1*0401 の 70-74 番目のアミノ酸にみられる配列が
共通または極性が類似しているという仮説である[27]。最近では構造解析の結果よ
り、DRB1 の 11・13・71・74 番目におけるアミノ酸の share を指摘するモデルがあ
り[11,28]これらのアミノ酸が P4 pocket を形成し、抗原提示するエピトープを規定
していると考えられている[29]。ACPA の対応抗原であるシトルリン化蛋白のシト
ルリンは SE の P4 pocket に提示されやすいとされており、SE 陽性症例では効率的

に T 細胞に対してシトルリン化抗原が提示されると考えられる[30]。以上のように、シトルリン化抗原に対する免疫応答の研究より、RA における獲得免疫の異常が明らかとなってきている。さらに GWAS 研究により、蛋白シトルリン化酵素である PADI4 遺伝子多型の RA への寄与が指摘されていることもシトルリン化抗原の関与を支持すると考えられる[10,11,31]。

RA 患者における T 細胞がクローナルな増殖を示すことから、増殖しているクローンを解析する試みは古くから行われてきた[32]。例えば、フローサイトメーターにより解析により、RA の TCR において特定の V (または J) 領域のうち特定の V 領域を持つクローンの増殖が報告されており、さらにその一部をシングルセル解析によりクローニングし配列を同定した報告が複数ある[19,33-35]。しかし、こうした系による TCR レパトワ解析は技術的に煩雑であるうえ、low throughput であるため、解析は限定的であり、TCR レパトワの異常については十分な知見を得ることができなかった。

近年の次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer / 以下 NGS) の開発によって、より簡便に網羅的な TCR レパトワの解析が行えるようになった。RA においても TCR のクローン増殖と TCR レパトワの多様性減少について報告されている[36,37]。また、年齢に伴って TCR レパトワ多様性が減少することも知られている[38]。これらの結果から、RA の免疫異常の成因のひとつとして、免疫学的な老化に伴って胸腺からの T 細胞アウトプットが減少し、それに伴って末梢において T 細胞

の homeostatic expansion が起こり、ナイーブ細胞における自己反応性クローンの増殖を引き起こされているという仮説を Goronzy らは提唱している[19,39-41]。我々は以前、4名の RA 患者と5名の健常人サンプルを用いて NGS による TCR レパトワの解析を行い、CD4 陽性メモリー T 細胞だけではなく、CD4 陽性ナイーブ T 細胞においても有意なクローン増殖を示すクローンが認められることを見出しており[37]、抗原提示を受けた後の CD4 陽性メモリー T 細胞 TCR レパトワのみならず、CD4 陽性ナイーブ T 細胞 TCR レパトワにおいても、RA において何らかの異常が生じている可能性が高いと考えた。

一方、NGS を用いることによって、頻度の少ないクローンを含む情報を得ることが可能となり、TCR レパトワにおけるクローン分布の全体像が分かるようになってきた[36,42-45]。一方で、NGS に伴う各種のバイアスをいかに排除して解析するかという解析手法の選択が重要なものとなっている。特に全体像を解析する方法として、エントロピーを用いて多様性指標を議論する方法は有効であるとされている。[44-48]。さらに、エントロピーによる多様性指数としては Gini index や Shannon index などの特殊解より、これらの指標を含む一般化式である Renyi エントロピーを用いたほうがより方法選択によるバイアスを減らし網羅的に解析することができることが指摘されている[49]。

現時点で RA の疾患活動性およびサイトカインなどの免疫学的パラメータと CD4 陽性 T 細胞 TCR レパトワ多様性との関連を網羅的に比較した解析については既報

がない。さらに CD4 陽性 T 細胞 TCR レパトワが加齢に伴って多様性が減少することから、健常人コントロールとの比較をする場合に年齢をマッチさせたコントロールを用いた検討が必須と考えられるが、この点でも十分な年齢マッチコントロール群との比較が考慮された NGS による CD4 陽性 T 細胞 TCR レパトワ解析の報告はない。一方、エントロピーを用いた解析としても、既報では Gini index や Shannon Index などの特定の係数を用いた研究が多く、Renyi エントロピーを用いる方法に比べて恣意性が否定できない。

本研究は、RA における CD4 陽性 T 細胞の異常を明らかにするために、NGS を用いて TCR レパトワの多様性の解析を網羅的に RA 患者で行い、臨床パラメータや生物学的マーカーとの関連を検討することで、RA における CD4 陽性 T 細胞異常について病態とのかかわりを明らかにすることを目的として行った。

方法

【臨床検体】

東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科に通院中の RA 患者と、コントロールとして非 RA である健常人ボランティア (Healthy Donor / 以下 HD と記す) から十分な説明と文章による同意取得後、採血により検体を得た。また、サンプル採取時に RA 群では疾患活動性をはじめとする臨床情報を併せて記録した。参加者の疾患活動性を含む臨床情報は(表 1)および(表 2)として治療内容は (表 3) として記す。この研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を受けている。(倫理委員会承認番号 : G3582 および 10154)

【Fluorescence-activated cell sorting (FACS)】

末梢血液検体は一部 HLA タイピングに使用し、さらにサイトカイン測定のため一部を血清分離後保存し、残りを Ficoll-Paque (GE ヘルスケア社) を用い、密度勾配遠心分離により末梢血単核球を分離した。その後、FcR-binding-inhibitor(eBioscience 社)にて Fc 受容体 blocking を行ったのち、次の抗体で染色した。CD3-PECy7 (clone:UCHT1, Biolegend 社)、CD4-BV421 (clone:OKT4, BD 社)、CD45RA-V500 (clone:HI100, Biolegend 社)。フローサイトメーターは MofloXDP (Beckman Coulter 社 / 以下 Moflo) を使用し、解析およびソートを行った。ソート時の細胞定義は(図 1)にて提示するように、CD4 陽性メモリー T 細胞は CD3 陽性 CD4 陽性

CD45RA 陰性と、CD4 陽性ナイーブ T 細胞は CD3 陽性 CD4 陽性 CD45RA 陽性と定義した。それぞれの分画は 50000 細胞ずつ事前に RLT (QIAGEN RNeasy Micro kit) 350 μ l を分注したエッペンドルフチューブにソートし、十分に Voltex ミキサーにて混和した後に - 80 度で冷凍保存した。

【TCR 領域の次世代シーケンサー用ライブラリー作成】 (図 2)

1) RNA 精製

RNeasy Micro Kit (QIAGEN 社) 推奨の方法に従い RLT Buffer に回収した各細胞内の total RNA は最終的に 11 μ l の nuclease free water (以下精製水) に精製した。

2) cDNA の合成

抽出した 11 μ l に対して、dNTP mix(2.5mM Takara 社)1 μ l および、(表 4)に配列を示した、TRAC,TRBC の gene specific primer である hTCR-CA-R2.2、hTCR-CB1-R3.2、hTCR-CB2-R3 (各 10 μ M) をそれぞれ 0.33 μ l ずつ混合し、サーマルサイクラーにて {65°C5 分→4°C冷却} (以下サーマルサイクラー処理温度は {} 内に示す) した後、RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega 社) 1 μ l、Super Script III(Invitrogen 社)1 μ l、DTT(Invitrogen 社)1 μ l、5×First Strand Buffer (Promega 社) を混合し、{54°C60 分→85°C5 分→4°C冷却} とし cDNA を得た。その後、RNase H(Invitrogen 社)1 μ l を混合し {37°C20 分→4°C冷却} として、RNA を分解した。得られた cDNA は QIAquick PCR purification kit(QIAGEN 社)にて精製。精製水 30 μ l に溶出し {94°C3 分→4°C冷却} で処理した。

3) 5'-RACE 法による TCR β 鎖の PCR 増幅

サンプルは 5'-RACE 法を用いた手順を一部改変して処理した[50]。精製水 30 μ l に溶出された cDNA 全量に対して、Terminal deoxynucleotidyl transferase(Invitrogen 社/以下 TdT)1 μ l、dATP(10mM に希釈したもの、Takara 社)0.5 μ l、5 \times TdT buffer(Invitrogen 社)7.75 μ l を混合し、{37 $^{\circ}$ C 60 分 \rightarrow 65 $^{\circ}$ C 10 分 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 冷却} を行い、poly-A tailing を行った。得られた、poly-A tail 付加後の産物は、2 回の PCR によって増幅した。まず前半の PCR は確率論的影響によるバイアスを減らすため、9 μ l ずつ四等分したうえで、9 μ l のサンプルに対して、(表 4)に配列を示した poly-A に相補的な poly-T 配列を持ちさらにその 5'側にアダプター配列を付けた primer である Oligo-dT-N0-Adaptor と、TRAC と TRBC にそれぞれ相補的な primer である hTCR-CA-R7 と hTCR-CB1-R9 (いずれも 100 μ M) を 0.1 μ l、PCR 酵素として Prime Star GXL (Takara 社) 1 μ l、5 \times GXL Buffer 10 μ l、dNTP (2.5mM)4 μ l、精製水 26 μ l をよく混合し {96 $^{\circ}$ C 2 分 \rightarrow (96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90 秒) \times 3 サイクル \rightarrow (96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 57 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90 秒) \times 3 サイクル \rightarrow 96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 54 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90 秒) \times 3 サイクル \rightarrow (96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 51 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90 秒) \times 16 サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7 分 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 冷却} の計 25 サイクルのタッチダウン PCR を行った。得られた前半 PCR 後の 4 分されたサンプル全量を十分混合し、そのうち 1 μ l を後半の PCR に用いた。後半の PCR では 1 μ l のサンプルに対して、Oligo-dT-N0-adaptor primer のアダプター配列の 5'端よりも 3'側の一部に相補的なプライマー AP2 と TRBC に相補的な primer TRBC-HTS (いずれも

100mM) をそれぞれ 0.1 μ l、Prime Star GXL 1 μ l、5 \times GXL Buffer 10 μ l、dNTP4 μ l、精製水 34 μ l をよく混合し、{96 $^{\circ}$ C 2 分 \rightarrow (96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 63 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 秒) \times 13 サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7 分 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 冷却} によって nested-PCR を行った。文中におけるプライマーの配列情報は(表 4)に示す。

4) DNA 断片化・シーケンス用アダプター配列の付加

得られた PCR 産物はゲル電気泳動によって増幅を確認後、QIAquick PCR Purification kit (既出) を用いて 10 分の 1 希釈 EB 溶液 50 μ l に溶出し、全量を Covaris S1 にて 200bp を目標に断片化を行った。断片化後のサンプルを KAPA Library Preparation LP Kit for illumina (KAPA 社)を用いて、末端を平滑化し、dA Tailing、表 4 に示すアダプターをライゲーションし、PCR 増幅{98 $^{\circ}$ C 45 秒 \rightarrow (98 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 30 秒) \times 8 サイクル \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 冷却} した。シーケンス用アダプターにはシーケンスデータ内で各サンプル由来のデータを区別するため 24 種類の異なる index 配列が含まれている。異なる index 配列をもつサンプル (最大 24 サンプル) を等量混合し、PCR Purification Kit にて精製し、KAPA Library Quantification Kit にて濃度を測定、Illumina 社の推奨に従い NaOH により変性後 20pM に調整した。使用したアダプターの配列は(表 4)に示す。

【次世代シーケンサー・データ解析】

1) シーケンシング

Miseq (Illumina 社) を使用し、Miseq Reagent V2kit(2 \times 150bp)により、paired-end の

シーケンシングを行った。

2) Quality control mapping

得られたシーケンスデータ（各 Sample read 数：749702 read/sample（中央値）（範囲：505832-918286 read/sample）は、Cutadapt[51]によりアダプター配列を除去した後に、Fastx-Toolkit (<http://hannonlab.cshl.edu/fastx-toolkit>) を使用し Phred クオリティスコア 20 未満の末端をトリミングした。その後 MiXCR[43,52]にて各リードを TCR 領域に mapping し、CDR3 配列の同定を行った。CDR3 配列は coding potential を持つリードのみ採用し、総リード数が解析に与える影響を除くため random re-sampling により最終的に 1×10^5 read/sample の CDR3 配列を TCR レパトワ解析に使用した。

3) TCR レパトワ解析

Expanded clone（クローナルな増殖の程度の強いクローン）の割合は、expanded clone のリード数の合計が全リードの中で占拠する割合として計算した。NGS による TCR レパトワ解析における expanded clone の一般的定義は存在しないため、本解析では全リードの 0.2%または 0.5%以上の read 数を占める clone と定義した。同様に、non-expanded clone（クローナルな増殖の程度が弱いクローン）の割合は、non-expanded clone のリード数の合計が全 read の中で占拠する割合として計算した。Non-expanded clone は全 read の 0.01%または 0.02%以下の read 数を占める clone と定義した。

TCR レパトワの多様性は (表5) に記す Renyi エントロピーを使用した。既報 [49] を参考とし、 α を 0-5(0.1 間隔)の範囲で動かし、Renyi エントロピーを計算した。その結果、各サンプルの Renyi エントロピーは 51 次元のベクトルとして求められる。RA 群と HD 群との比較においては、 $\alpha=0,1,2,3,4,5$ の 6 条件のみの値を使用した。疾患活動性などの臨床パラメータ、血清サイトカイン濃度との相関は 51 条件の値を全て使用した。

【サイトカイン濃度】

サイトカイン濃度測定は RA 群 18 名中 8 名、HD 群の 21 名中 13 名で行った。末梢血は採取時一部を生化学検査用スピッツに分注し常温静置後、遠心分離し上清を冷凍保存したものを解凍し使用した。RA 患者においてはリウマトイド因子が血清中に高い titer で存在する症例もある。そうした症例においては、リウマトイド因子が Fc 部位を阻害するため、解析に影響することが考えられる。そのため、血清は Hetero Block にて自己抗体の影響を減じて行った。解析は Multiplex Cytokine Assay 用のキットである Milliplex Map human cytokine magnetic beads kit (Millipore 社) を使用した。

【疾患活動性情報】

患者の疾患活動性情報として、検体採取当日に、CRP (C-reactive protein)、ESR (erythrocyte sedimentation rate)、罹病期間、腫脹関節、圧痛関節、全般 VAS (Visual Analog Scale)、医師 VAS、DAS28CRP (disease activity score)、DAS28ESR、CDAI

(clinical disease activity index)、HAQ (health assessment questionnaire) 以上の疾患活動性パラメータを記録した。これらの詳細をまとめて(表6)に示す。また HLA タイピングを外部測定業者 (SRL 社) により行った。リウマトイド因子は検体採取の2週間以内の採血データを用い、抗 CCP 抗体 titer は1年以内のものを用いた。なお、一部の解析にて RA 群を疾患活動性で2群に分けるため、既報[53]にならい寛解または低疾患活動性とされる症例を、低疾患活動性群 (LDA 群) として $DAS28CRP < 2.7$ 、同勧奨において中疾患活動性または高疾患活動性とされる症例を、高疾患活動性群 (HDA 群) として $DAS28CRP \geq 2.7$ と規定した。

【統計学的手法】

連続変数の二群間比較は Mann-Whitney U 検定を用いた。相関係数は Spearman 順位相関係数を用いた。Biological replicate sample 間での Renyi entropy の相関解析のみ Pearson 相関係数を採用した。これは Renyi エントロピーは降順に配置された 51 次元のベクトルであり、順位相関係数は全て 1 となりサンプル間の差を議論できないためである。

結果

【Renyi エントロピーによるシミュレーション TCR レパトワデータの評価】

近年、TCR レパトワ構造を評価する指標としてエントロピーを用いることは標準的解析手法になりつつある[44-48]。特に各クローンの頻度に重みを付けて解析する Renyi エントロピーは TCR レパトワ構造を網羅的に評価できると考えられ[49]、本研究でも採用した。しかしながら Renyi エントロピーの解釈は容易ではないため、シミュレーションによる TCR レパトワデータを作成し、解析した具体例を (図3) に示す。

ここでは合計 10000read を、5000read はクローナル増殖の程度の強いクローンに、残り 5000read はクローナルな増殖の程度の弱いクローン代表するように割り振ったデータを S1~S4 の 4 つ作成した。Renyi エントロピー は各クローンの頻度が α 乗されるため(表5)、 α の値が小さい条件ではクローナルな増殖の程度の弱いクローンを中心に、 α の値が大きい条件では Renyi エントロピーはクローナルな増殖の程度の強いクローンを中心に評価する。エントロピーは多様性の指標であるため評価の中心となるクローンの個数が Renyi エントロピーの値に強く反映される。

シミュレーションデータ S1~S4 の Renyi エントロピーの大小関係は α の値に依存して変わることが確認され、TCR レパトワ構造の全体を評価するためには α を

固定せずに連続変数として扱う解析が重要であることが示された。

また、特定の α のみを使用する Gini index や Shannon Index (表 5) では TCR レパトワの構造を正確に評価できないことも確認された (図 3、赤破線)。本データだけでなく、実データにおいても $\alpha > 5$ の条件では Renyi エントロピーの値はほぼ一定となったため、本研究では以下 α を 0~5 の範囲の変数とした。

TCR レパトワ構造を評価するもう 1 つの指標として read 数から計算されるクローナルな増殖の程度の強いクローンの割合がある。この指標の理解は容易であるが、Renyi エントロピーのように TCR レパトワ構造の全体像を捉えることはできない。例えば、本シミュレーションデータで、クローナルな増殖の程度の強いクローンを全 read の 0.5% 以上の read を占めるクローンと定義した場合、クローナルな増殖の程度の強いクローンの割合が S1~S4 で同一の値 (=0.5) をとるように作成した本データセットにおいて、S1~S4 の違いを議論できない。

なお、どの程度の α で、どの程度のクローナルな増殖をしたクローンの影響が強いかわかることはできない為、厳密な α の数値により議論を進めることは不適當である。そのため、以下の結果では全体の傾向を知るため、大まかな α の範囲を記す。

【Biological Replicate Sample を用いた TCR レパトワ関連指標の再現性の評価】

次に Renyi エントロピーによる TCR レパトワ解析の再現性について検討した。biological replicate sample (同一 RA 症例から同時に 2 組ソートしたサンプル) における clone の一致率は replicate 間での Clone の一致率は 2.1% と低かった(図 4A)。

また、一致したクローンが各 sample で占める read 数の相関係数も-0.347 と低値であった。一方で、Renyi エントロピーを replicate 群間で相関を検討するときわめて強い相関が認められたため (図4B)、Renyi エントロピーについては再現性をもって議論することが可能であると考えられた。

【関節リウマチと健常人コントロールのレパトワの比較】 (Renyi エントロピー)

次に RA 群における CD4 陽性 T 細胞の TCR レパトワ構造の特徴を捉えるため、Renyi エントロピーを用いて HD 群と RA の低疾患活動性群、高疾患活動性群における T 細胞レパトワの多様性を比較した (図5)。その結果、 $\alpha > 2$ の条件では CD4 陽性のメモリー T 細胞とナイーブ T 細胞はともに、高疾患活動性 RA 群は HD 群に比して Renyi エントロピーが低いことが確認された (一部有意水準を満たさなかった)。一方、 α が小さい $\alpha = 0$ の条件では 3 群に差を認めなかった。つまり、高疾患活動性 RA 群の CD4 陽性 T 細胞ではクローナルな増殖の程度の強いクローンの減少が顕著に認められると解釈される。

【関節リウマチと健常人コントロールのレパトワの比較】 (クローンの頻度)

Renyi エントロピーによる議論に続き、同様の比較をクローンの頻度の視点から再検討した (図6)。本指標は Renyi エントロピーに比して網羅性の点で劣るが、RA 患者において CD4 陽性 T 細胞の多様性を議論した報告では、我々の以前の報告[37]を含め、この指標を用いて議論しており、結果の理解が容易である長所がある。また、Renyi エントロピーは多様性 (クローンの個数) の指標であるのに対し

て、本指標はクローナルな増殖の程度を直接評価できるため、補完的なデータが得られると期待される。そこで今回の解析でも基礎的検討として HD 群と RA の低疾患活動性群、高疾患活動性群とにおいて、CD4 陽性のメモリー T 細胞およびナイーブ T 細胞について、expanded clone の read 数が全 read 数に占める割合を求めた。CD4 陽性のメモリー T 細胞およびナイーブ T 細胞のいずれでも高疾患活動性群では HD 群と比して expanded clone の占める割合の増加する傾向が認められ、特にナイーブ群では HD と比して有意な増加を認めた。低疾患活動性群では expanded clone の占める割合は、有意差はないものの HD と比してより減少する傾向が認められた。(図 6A)

さらに、全 read の 0.01%、0.02%以下のクローナルな増殖の程度が低いクローン (non-expanded clone)の占める割合についても検討し、HD 群、RA-LDA 群、RA-HDA 群のいずれにおいても有意な差を認めなかった。(図 6B)

【関節リウマチ群における TCR レパトワと疾患関連パラメータとの関連】

また、TCR レパトワの RA の病態における意義を検討するため、Renyi エントロピーと RA の疾患活動性、臨床情報、HLA shared epitope のリスクアレル 数である SE dose との相関を解析した(図 7A)。RA においては、CD4 陽性メモリー T 細胞のみならず CD4 陽性ナイーブ T 細胞においても、疾患活動性を示す DAS28CRP、DAS28ESR、CDAI、HAQ、CRP、ESR と Renyi エントロピーの間に負の相関を認め、CD4 陽性メモリー T 細胞では $\alpha > 1$ の条件でより強い負の相関を認めた。SE dose

についても CD4 陽性メモリー T 細胞において Renyi エントロピーとの間に比較的強い負の相関を認め、SE dose は CD4 陽性メモリー T 細胞にて特に $\alpha > 1$ の範囲で相関が強かった。

一方で、CD4 陽性ナイーブ T 細胞においては $\alpha=1\sim 2$ で疾患活動性とエンロピーの間の負の相関に強い傾向を認め、メモリー T 細胞と異なる傾向を示した。

【TCR レパトワと血清サイトカイン濃度との関連】

TCR レパトワ多様性と RA の病態に関与すると推定されている種々のサイトカインの血清濃度との関連を解析した[54-56]。RA 群では血清中サイトカインの多くで Renyi エントロピーとの間に比較的強い相関を認めた (図 8A)。また、CD4 陽性のメモリー T 細胞よりナイーブ T 細胞においてより相関は強い傾向が認められた。

CD4 陽性ナイーブ T 細胞では IL-10、-21 濃度は Reniy エントロピーと負の相関を示し、 $\alpha < 1$ の範囲で相関が強くなっていた。また、CD4 陽性ナイーブ T 細胞では IL-1 β 、IL-6、IL-7、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF と Renyi エントロピーとの間で、全体の傾向として概ね $\alpha=1\sim 2$ の範囲で相関の正負が逆転し、 $\alpha > 2$ の条件で正の相関を示し、 $\alpha < 0.5$ の条件では逆に負の相関を示した。特に、IL-1 β 、TNF- α については α が大きい範囲での正の相関が強かった。spg-130 については α の小さいところで弱い正の相関が、 α が大きいと正の相関を示唆された。

CD4 陽性メモリー T 細胞においては、IL-10 と IL-21 では負の相関を認め、IL-10 では $\alpha > 2$ の範囲で、IL-21 では $\alpha < 1$ 相関が強い傾向があるが、ナイーブ T 細胞

と比すると相関は弱かった。さらに、CD4陽性メモリー T 細胞では IL-1 β 、IL-6、IL-7、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α で弱い正の相関が示唆された。IFN- γ 、IL-17、GM-CSF においては CD4陽性ナイーブ T 細胞と同様に α が小さいところでは負の、 α が大きいところでは正の、相関が弱いことが示唆された。

HD 群においては CD4陽性のメモリー T 細胞、ナイーブ T 細胞のいずれにおいても RA と比べてサイトカイン濃度と Renyi エントロピーの相関が全体的に弱く相関の向きを RA 群と厳密に比較することは困難であった。(図 9A)。

TNF- α に関しては HD 群と RA 群とで同様に CD4陽性メモリー T 細胞、CD4陽性ナイーブ T 細胞ともに正の相関関係を認めた。(図 8B・図 9B)。

考察

TCR レパトワ解析は T 細胞の動態、特に抗原特異的免疫応答を間接的に評価できる解析手法である。今回、関節リウマチの病態を TCR レパトワの観点から評価するため、18名の RA 患者と 21名の HD の CD4 陽性メモリー T 細胞およびナイーブ T 細胞の TCR レパトワを、次世代シーケンサーを用いて解析した。

高疾患活動性 RA 群では CD4 陽性 T 細胞のクローナルな増殖の程度の強い expanded clone の多様性は減少しているにも関わらず(図 5)、それらの expanded clone のリード数の総和はむしろ増えており (図 6)、少数のクローンのみがクローナルに強度に増殖する免疫環境が存在することが確認された。この多様性減少は CD4 陽性 T 細胞において、抗原特異的に特定の抗原に反応する一部の TCR を持つクローンが増殖している為と考えられる。RA 患者におけるクローナルな増殖は、CD4 陽性メモリー T 細胞、ナイーブ T 細胞の双方において確認された。

また、CD4 陽性 T 細胞の T 細胞受容体が物理的に会合し抗原の提示にかかわる HLA class II の、shared epitope を有する risk allele 数が多いほどクローナルな増殖が増え多様性が減ることが確認された(図 7)。この risk allele は GWAS によって指摘されている遺伝子の中でもっとも寄与度が大きいとされることから[10,11,31]、HLA class II 上に提示させる特定の抗原を認識する CD4 陽性 T 細胞のクローナルな増殖が病因にかかわっていると考えられる。

更に、RA の疾患活動性と CD4 陽性 T 細胞のクローナルな増殖が相関していることが示され (図 7)、クローナルに増殖している CD4 陽性 T 細胞が疾患活動性の維持・増悪そのものに関与すると考えている。

以上の考察とこれまでの知見を総合し、関節リウマチでは、shared epitope を有する HLA により提示される特定の自己抗原に対して反応する T 細胞受容体を持つ CD4 陽性 T 細胞が抗原特異的免疫反応によりクローナルに増殖し、その増殖した自己反応性の CD4 陽性 T 細胞が病態を生み出すという仮説を立てている (図 10)。

本研究では CD4 陽性 T 細胞をメモリー T 細胞とナイーブ T 細胞に分けて検討した。これはこの 2 つの T 細胞サブセットが抗原提示において質的に異なると考えたためである[57,58]。しかしながら RA 群における CD4 陽性ナイーブ T 細胞は CD4 陽性メモリー T 細胞と同様のクローナルに増殖した TCR レパトワの特徴を持つことが確認された。ナイーブ T 細胞がメモリー T 細胞へと分化・増殖していく過程において、抗原提示による TCR 刺激が重要であることは既知であり、さらに一定の T 細胞数の維持に必要である homeostatic expansion においても TCR 刺激が関与することが知られている[59-66]。そのため本研究で認められたように、質的に異なる 2 サブセットの TCR レパトワが類似した特徴を持つことは RA の病態の特徴である可能性がある。Goronzy らは、胸腺からの T 細胞供給が免疫学的加齢に伴って減少し、CD4 陽性 T 細胞において homeostatic expansion が起こることにより、自己抗原に反応性を持つ CD4 陽性 T 細胞クローンが増加し、RA の病態に関与するという仮説

[19,39-41]を提示しており、この仮説によれば、CD4 陽性メモリーT細胞のみならず、CD4 陽性ナイーブ T 細胞においても自己抗原の提示による TCR 刺激によりクローナルな増殖をすることは説明可能であると考えられる。

一方サイトカインと関節リウマチの関連はこれまでも議論されてきた[7,67]。特に近年は生物学的製剤による抗サイトカイン療法が効果をあげており[2-4]、TNF- α 、IL-6 をはじめとした炎症性サイトカインが関節リウマチの病態と関連があることは確かである。そのため、CD4 陽性 T 細胞がクローナルな増殖をし、RA の病態と関連しているとしても、その増殖が抗原提示による TCR 刺激よりむしろ、サイトカイン刺激により引き起こされている現象である可能性もある。しかし、今回の結果では血清中の炎症性サイトカイン濃度とレパトワ多様性との間で、疾患活動性とは逆の相関を示した (図8)。これは、炎症性サイトカインが抗原特異的なクローナルな増殖に直接関与しないことを示唆している。逆に、炎症性サイトカインは抗原特異的な反応とは関係なく、偏りのない CD4 陽性 T 細胞増殖を誘導し、レパトワ多様性が増えるというモデルを考えている (図10)。これまで RA において炎症性サイトカインにより T 細胞レパトワ多様性の増減がどのように影響を受けるかを示す報告はなく、今後の研究の進展が必要と考える。

RA の病態に関与する自己抗原に特異的な免疫応答を抑制する治療は現時点では存在しない。対応する自己抗原が未確定であるだけでなく、抗原は判明しても抗原特異的な免疫抑制療法には確立したものがないのが現状である。本研究により、抗

原特異的免疫応答を示唆する TCR レパトワ変化と TNF- α などの炎症性サイトカイン濃度に明らかな関連を認めなかったことは、抗サイトカイン療法により十分な反応性が得られない症例において自己抗原に特異的な免疫抑制療法が相補的な役割を担う可能性が示唆され、今後の研究が強く期待される (図 10)。

一方、本研究では種々の治療状態の症例を対象としており、高疾患活動性症例において強い免疫抑制療法が実施され炎症性サイトカイン濃度が下がるなどの治療修飾の存在の可能性はある。しかしながら HD 群においても TNF- α はクローナルな増殖の程度の強いクローンの多様性の増加との正の相関関係を示唆したことから (図 9)、RA 群において正の相関を示した結果も治療の影響だけではないと推定された。

また、一般に観測事象の多様性をエントロピーにより評価する際に、観測対象のサンプル数と観測回数（本研究の場合、細胞数とリード数に相当する）はエントロピー値に直接影響する要素である。今回、この点に留意し、各サンプルの細胞数は 5 万細胞に揃え、シーケンスデータは 1×10^5 リードをランダムに再回収した。エントロピーには複数の計算式が存在し (表 5)、TCR レパトワ解析においても従来から Gini index や Shannon Index などが使用されてきた[44-48]。Victor Greiff らによってすでに指摘されているように[49]、Gini index や Shannon Index などの Renyi エントロピーの特殊解のみを用いて解析を進めることは、TCR レパトワの局所的な評価に留まる危険性がある。このことはシミュレーションデータでも確認された。以上

のような背景から本研究では Renyi エントロピーの α を連続変数として扱うことで、クローナルな増殖の程度の強弱に応じた網羅的な TCR レパトワ解析が適切に実施されたと考えている。

TCR レパトワの評価指標としてはエントロピーのような多様性指標以外に、クローナルな増殖の程度の強いクローンの割合がある (図6)。シミュレーションデータでも示したように多様性指標の方が TCR レパトワ全体を評価するのに優れていると考えられる。しかし多様性指標単独では解析対象のクローンの多様性は分かるが、クローナルな増殖の程度は分からない。クローナルな増殖の程度の強いクローンの定義は恣意的な側面はあるが、複数の閾値 (図6では 0.2%、0.5%を採用) を用いることで TCR レパトワの特徴を理解するためには有用であり、多様性指標の欠点を補完するものだと考えられる。

一般的に NGS による TCR レパトワ解析の欠点として、biological replicate sample 間において検出されるクローンの配列情報の再現性が低いことがある [32,68,69]。これには二つの要素が関与している。一つは TCR が非常に多様性に富むため、同一症例由来のサンプルでもチューブ内に共通のクローンが回収される確率がそもそも低いことである。もう一つは既存の NGS による TCR レパトワ評価手法では PCR による増幅は必須であり、検出感度前後の頻度のクローンが検出に成功するかは確率論的に決まるため、再現性が下がると考えられることである [70,71]。一方、TCR レパトワの主な評価指標として使用した Renyi entropy は十分に高い再現性を

持つことを **biological replicate sample** を用いて確認しており (図4)、本解析結果はデータのばらつきに影響されにくい安定したものだと考えられる。

また、本研究を含め、NGS による TCR レパトワ解析においては、実際の細胞数ではなくクローナルな増殖を read 数で評価しているという限界がある[19,37,42-45]。確率論的影響などで同定できていないクローンの存在については、推定モデルを使用することで真のレパトワを予想する報告もあるが[72,73]、十分に手法が確立されている段階ではない。今後われわれは、既知の TCR 配列を有する T 細胞 cell line を、任意の割合でサンプルに混合したうえで NGS による TCR レパトワ解析を実施し、実際の read 数と細胞数との間の関係を測定する実験を検討中である。

また、RA の病因を明らかにする観点から、ごく初期の RA 患者や、ACPA 陽性で診断基準を満たさない症例において TCR レパトワを解析することで、発症に至る多様性変化を追うことができると考えている。またその結果によっては未発症の症例であっても予防的に介入をするタイミングを見出せる可能性もある。以上のように本研究において示した RA の疾患に関連するパラメータと TCR レパトワの関連を同一患者で時系列に追うなどの方法によって、RA の病勢の進展、ひいては RA の発症までの免疫異常を検知し、病因の解明や発症を未然に防ぐ予防法の確立につながると思う。

関節リウマチにおいてクローナルな CD4 陽性 T 細胞のクローナルな増殖がみられること、またそのレパトワ多様性が減じていることを指摘する報告はこれまでも

ある[19,32-35]。本研究は、初めて、NGSによって得られたCD4陽性ナイーブT細胞およびCD4陽性メモリーT細胞のTCRレパトワ情報を、RA患者と年齢・性別をマッチさせた健常人コントロールとの間の差異、RA患者における疾患活動性をはじめとした疾患関連パラメータとの関連、抗原提示に関連すると考えられるGWAS遺伝子であるshared epitopeのリスクアレル数との関連、および炎症性サイトカインとの関連について検討した。また、恣意性を減ずるためRenyiエントロピーを用いて解析を行った。その結果、CD4陽性のナイーブT細胞とメモリーT細胞の双方におけるレパトワ多様性がRAにおいて減少し、一部のクローンが極度に増殖していること、またレパトワ多様性の減少とshared epitopeリスクアレル数および疾患活動性パラメータとが関連することからCD4陽性T細胞が特定の自己抗原と反応しクローナルに増殖することがRAの病因において重要であることを示した。さらにこの偏ったクローナルな増殖が炎症性サイトカインの影響とは独立した免疫現象と考えられ、近年効果を上げている抗サイトカイン療法とは異なる、抗原特異的な治療の開発の重要性を示唆する知見を得たと考える(図10)。

参考文献

- 1 Yamanaka, H., Sugiyama, N., Inoue, E., Taniguchi, A. & Momohara, S. Estimates of the prevalence of and current treatment practices for rheumatoid arthritis in Japan using reimbursement data from health insurance societies and the IORRA cohort (I). *Mod. Rheumatol.* **24**, 33-40 (2014).
- 2 de Wit, M. P. T., Smolen, J. S., Gossec, L. & van der Heijde, D. M. F. M. Treating rheumatoid arthritis to target: the patient version of the international recommendations. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 891-895 (2011).
- 3 Smolen, J. S. *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 631-637 (2010).
- 4 Kaneko, Y. *et al.* Obstacles to the implementation of the treat-to-target strategy for rheumatoid arthritis in clinical practice in Japan. *Mod. Rheumatol.* **25**, 43-49 (2015).
- 5 Singh, J. A. *et al.* Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **386**, 258-265 (2015).
- 6 Gibofsky, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Manag. Care* **18**, S295-302 (2012).

- 7 McInnes, I. B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2205-2219 (2011).
- 8 Silman, A. J. *et al.* Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br. J. Rheumatol.* **32** 903-907 (1993).
- 9 Aho, K., Koskenvuo, M., Tuominen, J. & Kaprio, J. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J. Rheumatol.* **13**, 899-902 (1986).
- 10 Okada, Y. *et al.* Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* **44**, 511-516 (2012).
- 11 Yamamoto, K., Okada, Y., Suzuki, A. & Kochi, Y. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia--present and future. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 375-379 (2015).
- 12 van Heemst, J. *et al.* Crossreactivity to vinculin and microbes provides a molecular basis for HLA-based protection against rheumatoid arthritis. *Nature communications* **6**, 6681 (2015).
- 13 Scher, J. U. *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife* **2**, e01202 (2013).
- 14 Klareskog, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* **54**, 38-46 (2006).

- 15 Stolt, P. *et al.* Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 835-841 (2003).
- 16 Steiner, G. & Smolen, J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res.* **4 Suppl 2**, S1-5 (2002).
- 17 Nishimura, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* **146**, 797-808 (2007).
- 18 van Boekel, M. A., Vossenaar, E. R., van den Hoogen, F. H. & van Venrooij, W. J. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* **4**, 87-93 (2002).
- 19 Goronzy, J. J. *et al.* Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **94**, 2068-2076, (1994).
- 20 Uematsu, Y. *et al.* The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8534-8538 (1991).
- 21 Stamenkovic, I. *et al.* Clonal dominance among T-lymphocyte infiltrates in arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1179-1183 (1988).

- 22 Yamamoto, K. *et al.* Accumulation of multiple T cell clonotypes in the synovial lesions of patients with rheumatoid arthritis revealed by a novel clonality analysis. *Int. Immunol.* **4**, 1219-1223 (1992).
- 23 Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. T-cell responses in rheumatoid arthritis: systemic abnormalities-local disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* **11**, 210-217 (1999).
- 24 Kerkman, P. F. *et al.* Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* Online First: 1 June 2015 (2015).
- 25 Kotzin, B. L. *et al.* Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 291-296 (2000).
- 26 Snir, O. *et al.* Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **63**, 2873-2883 (2011).
- 27 Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **30**, 1205-1213 (1987).

- 28 Raychaudhuri, S. *et al.* Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **44**, 291-296 (2012).
- 29 de Almeida, D. E., Ling, S. & Holoshitz, J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Lett.* **585**, 3619-3626 (2011).
- 30 Hill, J. A. *et al.* Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1*0401 MHC Class II Molecule. *The Journal of Immunology* **171**, 538-541 (2014).
- 31 Suzuki, A. *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **34**, 395-402 (2003).
- 32 Wagner, U. G., Koetz, K., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Perturbation of the T cell repertoire in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14447-14452 (1998).
- 33 Sottini, A., Imberti, L., Gorla, R., Cattaneo, R. & Primi, D. Restricted expression of T cell receptor V beta but not V alpha genes in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **21**, 461-466 (1991).

- 34 Fischer, D. C., Opalka, B., Hoffmann, A., Mayr, W. & Haubeck, H. D. Limited heterogeneity of rearranged T cell receptor V alpha and V beta transcripts in synovial fluid T cells in early stages of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**, 454-462 (1996).
- 35 Pluschke, G. *et al.* Analysis of T cell receptor V beta regions expressed by rheumatoid synovial T lymphocytes. *Immunobiology* **188**, 330-339 (1993).
- 36 Woodsworth, D. J., Castellarin, M. & Holt, R. A. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* **5**, 98 (2013).
- 37 Ishigaki, K. *et al.* Quantitative and qualitative characterization of expanded CD4+ T cell clones in rheumatoid arthritis patients. *Sci. Rep.* **5**, 12937 (2015).
- 38 Britanova, O. V. *et al.* Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J. Immunol.* **192**, 2689-2698 (2014).
- 39 Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 249 (2009).
- 40 Koetz, K. *et al.* T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9203-9208 (2000).
- 41 Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. T-cell regulation in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **16**, 212-217 (2004).

- 42 Bolotin, D. A. *et al.* Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3073-3083 (2012).
- 43 Mamedov, I. Z. *et al.* Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front. Immunol.* **4**, 456 (2013).
- 44 Zvyagin, I. V. *et al.* Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 5980-5985 (2014).
- 45 Putintseva, E. V. *et al.* Mother and child T cell receptor repertoires: deep profiling study. *Front. Immunol.* **4**, 463 (2013).
- 46 Rechavi, E. *et al.* Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development. *Sci. Transl. Med.* **7**, 276ra225, (2015).
- 47 Thapa, D. R. *et al.* Longitudinal analysis of peripheral blood T cell receptor diversity in patients with systemic lupus erythematosus by next-generation sequencing. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 132 (2015).
- 48 Spreafico, R. *et al.* A circulating reservoir of pathogenic-like CD4+ T cells shares a genetic and phenotypic signature with the inflamed synovial micro-environment. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 459-465 (2016).
- 49 Greiff, V. *et al.* A bioinformatic framework for immune repertoire diversity profiling enables detection of immunological status. *Genome Med.* **7**, 49, (2015).

- 50 Sun, X. *et al.* Unbiased analysis of TCRalpha/beta chains at the single-cell level in human CD8+ T-cell subsets. *PLoS One* **7**, e40386 (2012).
- 51 Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal* **17**, pp. 10-12 (2011)
- 52 Bolotin, D. A. *et al.* MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* **12**, 380-381 (2015).
- 53 Inoue, E., Yamanaka, H., Hara, M., Tomatsu, T. & Kamatani, N. Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 407-409 (2007).
- 54 McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* **7**, 429-442 (2007).
- 55 Cornish, A. L., Campbell, I. K., McKenzie, B. S., Chatfield, S. & Wicks, I. P. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **5**, 554-559 (2009).
- 56 Feldmann, M., Brennan, F. M. & Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 397-440 (1996).

- 57 Croft, M., Bradley, L. M. & Swain, S. L. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *The Journal of Immunology* **152**, 2675-2685 (1994).
- 58 Croft, M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 431-437 (1994).
- 59 Wagner, U. *et al.* Ex vivo homeostatic proliferation of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis is dysregulated and driven by membrane-anchored TNFalpha. *J. Immunol.* **173**, 2825-2833 (2004).
- 60 Takada, K. *et al.* TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1069-1076 (2015).
- 61 Rocha, B., Dautigny, N. & Pereira, P. Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur. J. Immunol.* **19**, 905-911 (1989).
- 62 Persaud, S. P., Parker, C. R., Lo, W. L., Weber, K. S. & Allen, P. M. Intrinsic CD4+ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC. *Nat. Immunol.* **15**, 266-274 (2014).

- 63 Mandl, J. N., Monteiro, J. P., Vrisekoop, N. & Germain, R. N. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**, 263-274 (2013).
- 64 Ernst, B., Lee, D. S., Chang, J. M., Sprent, J. & Surh, C. D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* **11**, 173-181 (1999).
- 65 Beutner, U. & MacDonald, H. R. TCR-MHC class II interaction is required for peripheral expansion of CD4 cells in a T cell-deficient host. *Int. Immunol.* **10**, 305-310 (1998).
- 66 Bender, J., Mitchell, T., Kappler, J. & Marrack, P. CD4+ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J. Exp. Med.* **190**, 367-374 (1999).
- 67 McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429-442 (2007).
- 68 Ruggiero, E. *et al.* High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nature communications* **6**, Online First: 1 September 2015 (2015).
- 69 Dziubianau, M. *et al.* TCR repertoire analysis by next generation sequencing allows complex differential diagnosis of T cell-related pathology. *Am. J. Transplant.* **13**, 2842-2854 (2013).

- 70 Blomquist, T., Crawford, E. L., Yeo, J., Zhang, X. & Willey, J. C. Control for stochastic sampling variation and qualitative sequencing error in next generation sequencing. *Biomolecular Detection and Quantification* **5**, 30-37 (2015).
- 71 Robasky, K., Lewis, N. E. & Church, G. M. The role of replicates for error mitigation in next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* **15**, 56-62 (2014).
- 72 Laydon, D. J., Bangham, C. R. & Asquith, B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**, e20140291 (2015).
- 73 Laydon, D. J. *et al.* Quantification of HTLV-1 clonality and TCR diversity. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003646 (2014).

図表

【表 1】 RA群とHD群の年齢・性別

	RA 群 (18 名)	HD 群 (21 名)
女性 (%)	13 名 (72.2%)	19 名 (90.4%)
年齢 (平均±標準偏差)	57.89±12.9	51.76±7.77

群	女性	年齢
LDA 群 (6 名)	4 名 (66.7%)	50.3±10.6
HDA 群 (12 名)	8 名 (66.7%)	61.7±12.2

表 1 : RA 群と HD 群間において性別及び年齢はそれぞれ $p=0.15$ (chi-square test)、 $p=0.07$ (Mann-Whitney's U test) で有意差を認めない。

低疾患活動性 RA 群 (low disease activity RA: LDA 群) と中～高疾患活動性 RA 群 (high disease activity RA: HDA 群) の性別・年齢。それぞれ $p=1$ (chi-square test)、 $p=0.11$ (Mann-Whitney's U test) で有意差を認めない

(LDA : DAS28CRP < 2.7、HDA : DAS28CRP \geq 2.7 と定義した)

【表 2】 RA群の臨床的特徴

	範囲 (中央値)
罹病期間(月)	2-420(35)
圧痛関節	0-13(2)
腫脹関節	0-24(2)
全般 VAS	0-80(26)
医師 VAS	0-70(22.5)
DAS28CRP	1.15-5.21(3.39)
DAS28ESR	1.74-5.99(1.74)
CDAI	0-37(12.5)
HAQ	0-2.75(0.5)
ACPA titer(U/ml)	1.3-1170(79.4)
RF titer(U/ml)	5-3250(56)
CRP(mg/dl)	0.02-6.9(0.445)
ESR(mm/h)	6-101(35)

【表3】RA群の治療内容

治療内容	人数
治療開始前	5名
プレドニゾン (3-10mg/日)	8名
メトトレキセート (4-12mg/週)	2名
タクロリムス	1名
サラゾスルファピリジン	3名
アバタセプト	2名
トシリズマブ	1名
シクロフォスファミド (経静脈投与)	1名

【表 4】プライマー配列およびシーケンシング用アダプター配列

	Primer 名	配列(5'→3')
RT-PCR	hTCR-CA-R2.2	TCAGGCAGTGACAAGCAGCAATAAGGGAAC
	hTCR-CB-R3.2	CCATGACGGGTTAGAAGCTCCTAACTCC
	hTCR-CB2-R3	CTGGGATGGTTTTTGGAGCTA
1st PCR	Oligo-dT-N0-Adaptor	ACAGCAGGTCAGTCAAGCAGTAGCAGCAGTTTCG ATAACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
	hTCR-CA-R7	TCTCAGCTGGACCACAGCCGCAGCGTCA
	hTCR-CB-R9	VVGRAATCCTTTCTCTTGACCATGGCCATCA
2nd PCR	AP2	AGCAGTAGCAGCAGTTTCGATAA
	TRBC-HTS	CGACCTCGGGTGGGAACA

IUPAC 標記に従う V : A or C or G、 R : A or G、 N : A or T or C or G

Illumina Adaptor	配列 (5'→3')
TRSU	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTAC ACGACGCTCTTCCGATC*T
TRSI-IndexNo.	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC- (Index 配列) -ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTT*G

* : ホスホロチオエート化

IndexNo.	Index 配列 (5'→3')	IndexNo.	Index 配列 (5'→3')
1	ATCACG	13	AGTCAA
2	CGATGT	14	AGTTCC
3	TTAGGC	15	ATGTCA
4	TGACCA	16	CCGTCC
5	ACAGTG	18	GTCCGC
6	GCCAAT	19	GTGAAA
7	CAGATC	20	GTGGCC
8	ACTTGA	21	GTTTCG
9	GATCAG	22	CGTACG
10	TAGCTT	23	GAGTGG
11	GGCTAC	25	ACTGAT
12	CTTGTA	27	ATTCCT

最終 PCR 用	配列
TPC1	AATGATACGGCGACCACCGA*G
TPC2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGA*G

* : ホスホロチオエート化

【表5】 エントロピー計算式

方法	式
Shannon index	$\alpha=1$ $H_1(X) = - \sum_{i=1}^n p_i \log p_i.$
Gini index	$\alpha=2$ $H_2(X) = - \log \sum_{i=1}^n p_i^2$
Renyi エントロピー	α を変数として一般化 $H_\alpha(X) = \frac{1}{1-\alpha} \log \left(\sum_{i=1}^n p_i^\alpha \right)$
$p_i = \frac{i \text{ 番目のクローンのread数}}{\text{全体のread数}}$	

表5

Shannon Index は $\alpha=1$ における Renyi エントロピーであり、Gini index は $\alpha=2$ における Renyi エントロピー である。

【表6】疾患活動性パラメータ算出法

VAS	10 cmの直線を用い、mm 単位で患者の状態を主観的に評価する。0 - 100 で評価し、全く症状がない状態を 0、考えられる最大の症状（痛み）を 100 とする。
DAS28-CRP	$0.56 \times \sqrt{(\text{圧痛関節数})} + 0.28 \times \sqrt{(\text{腫脹関節数})} + 0.36 \times \text{LN}((\text{CRP}) \times 10) + 0.0142 \times (\text{VAS}) + 0.96$ LN は自然対数
DAS28-ESR	$0.56 \times \sqrt{(\text{圧痛関節数})} + 0.28 \times \sqrt{(\text{腫脹関節数})} + 0.7 \times \text{LN}(\text{ESR}) + 0.014 \times (\text{患者 VAS})$ LN は自然対数
CDAI	圧痛関節数 + 腫脹関節数 + 患者 VAS + 医師 VAS
SDAI	圧痛関節数 + 腫脹関節数 + 患者 VAS + 医師 VAS + CRP
HAQ	難なくできる(0点)/ 少し難しい(1点)/ かなり難しい(2点)/ できない(3点)の4段階で8つのカテゴリーの質問に答え、すべてのカテゴリーの最高点の単純平均を求める。

HAQ の質問内容	
衣類着脱	靴ひもを結びボタンをかけ自分で身支度ができますか？
身支度	自分で洗髪できますか？
起床	肘なし、背もたれの垂直な椅子から立ち上がれますか？
	就寝、起床の動作ができますか？
食事	皿の肉を切ることができますか？
	いっぱい水の入っている茶碗やコップを口元まで運べますか？
	新しい牛乳パックの口を開けられますか？
歩行	戸外の平坦な地面を歩けますか？
	階段を5段登れますか？
衛生	身体全体を洗い、タオルで拭くことができますか？
	浴槽につかることができますか？
	トイレに座ったり立ったりできますか？
伸展	頭上にある約 2.3 kg (5 ポンド) の袋を手を伸ばして降ろせますか？
	腰を曲げて床にある衣類を拾えますか？
握力	自動車のドアを開けられますか？
	蛇口をひねって開けたり閉めたりできますか？
活動	用事や買い物で出かけることができますか？
	車の乗り降りができますか？
	掃除機をかけたり庭掃除など、家事ができますか？

表6：疾患活動性パラメータの定義や計算式

大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学免疫アレルギー内科の Web ページも参照 http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab_2/page4/page4-9.html

【図1】メモリー CD4 陽性 T 細胞とナイーブ CD4 陽性 T 細胞のソート

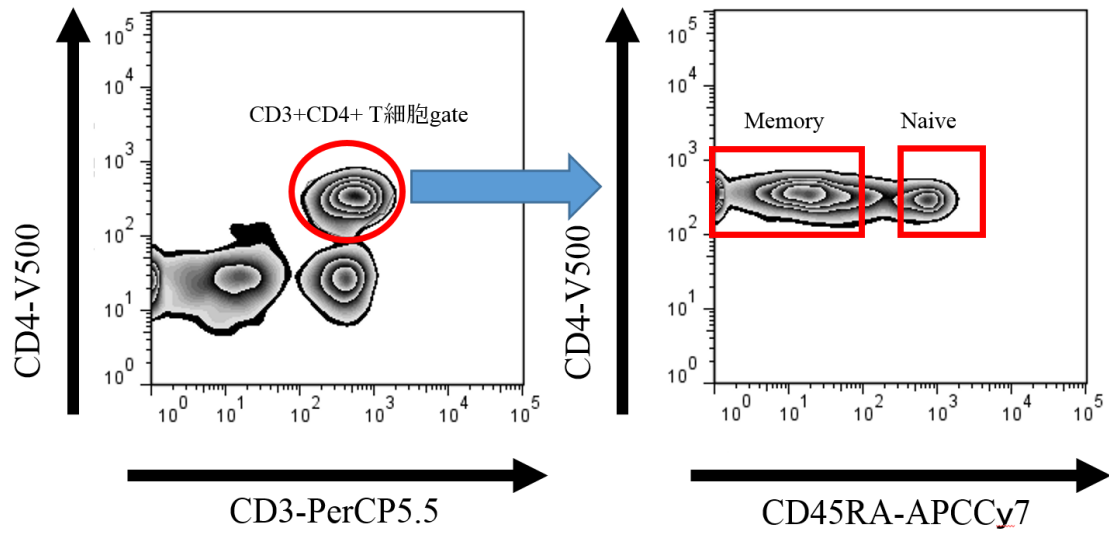


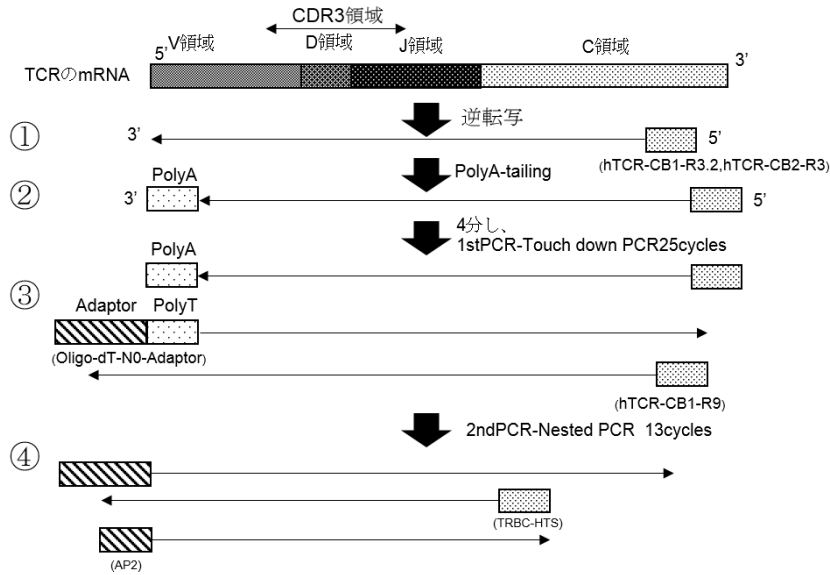
図 1

CD4 陽性メモリー T 細胞および CD4 陽性ナイーブ T 細胞は、CD3 陽性かつ CD4 陽性でリンパ球を Gate したのち、CD45RA で展開し、CD45RA 陰性集団を CD4 陽性メモリー T 細胞、CD45RA 陽性集団を CD4 陽性ナイーブ T 細胞として各々 50000 細胞ソートした。

【図2】ライブラリーの作成手順

A

5'-RACE法によるTCRβ鎖のPCR増幅



B

KAPA Library Preparation Kitによるシーケンス用Adaptor付加

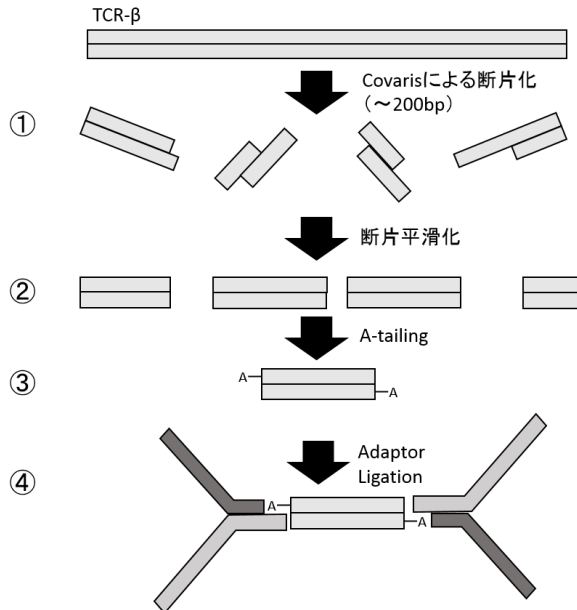


図2

ライブラリーは上記のように作成した

A : 5'RACE 法による TCR - β 鎖の PCR 増幅

Gene Specific Primer による cDNA 合成→poly-A Tailing→Adaptor 付加→PCR 増幅

B : KAPA Library Preparation Kit によるシーケンスアダプター付加

Covaris による断片化→断片平滑化→A-tailing→アダプター付加

【図3】Renyi エントロピーによる TCR レパトワ評価 (シミュレーションデータ)

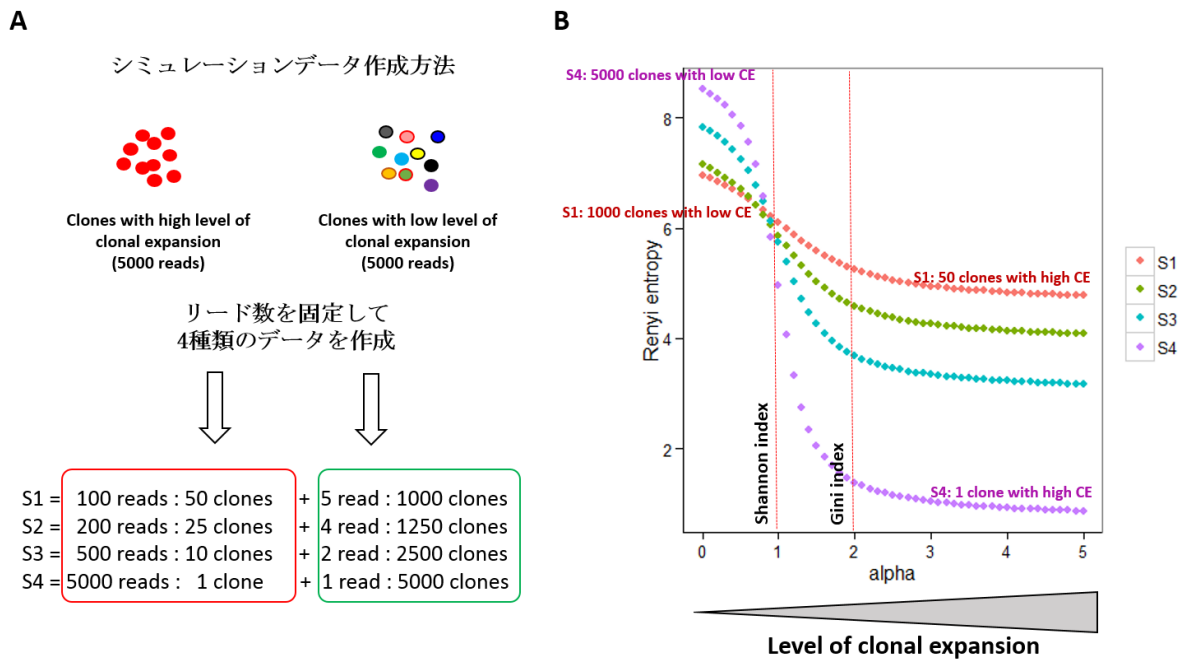


図 3

A : シミュレーションデータの作成方法。合計 10000 リードのデータを 4 つ作成。5000 リードは clonal expansion (CE) の程度の強いクローンを、残り 5000 リードは CE の程度の弱いクローンを代表している。

B : A で作成した 4 つのシミュレーション TCR レパトワデータを Renyi エントロピーを用いて評価した。 α の値が低い条件では Renyi エントロピーは CE の程度の弱いクローンを中心に評価するため 4 つのデータ間の差は小さい。一方、 α の値が大きい条件では Renyi エントロピーは CE の程度の強いクローンを中心に評価するため、4 つのデータ間の差は広がる。評価の中心となる clone の個数が少ない程、Renyi エントロピーは低い値をとる。参考として $\alpha=1$ (Shannon index)、 $\alpha=2$ (Gini index) の部分を破線で示した。

【図4】 Biological replicate sample を用いた TCR レパトワ関連指標の再現性の評価

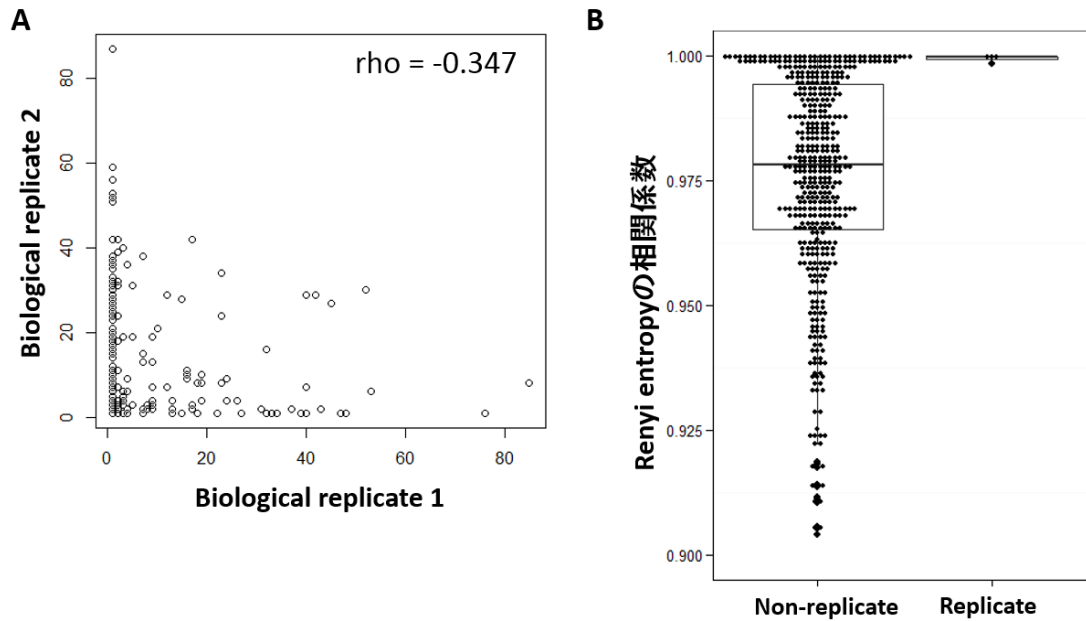


図4

A : Biological replicate sample 間の共通クローンにおける read 数分布を表した。4 組（合計 8 個）の replicate sample から 1 組のデータを代表データとして選択した。Biological replicate sample 間におけるクローンの一致率は 2.1% と低く、その一致したクローンが各 sample で占める read 数の相関係数は -0.347（スピアマン順位相関係数）であった。

B : Biological replicate sample 間（4 組、合計 8 サンプル）での Renyi エントロピーの相関係数と replicate となっていない独立したサンプル間での Renyi エントロピーの相関係数の分布を示した。本解析においてのみ Pearson 相関係数を使用し、各サンプルの総リード数のトリミングは 4×10^4 リードとした。

【図5】 RA 群と HD 群における Renyi エントロピーの比較

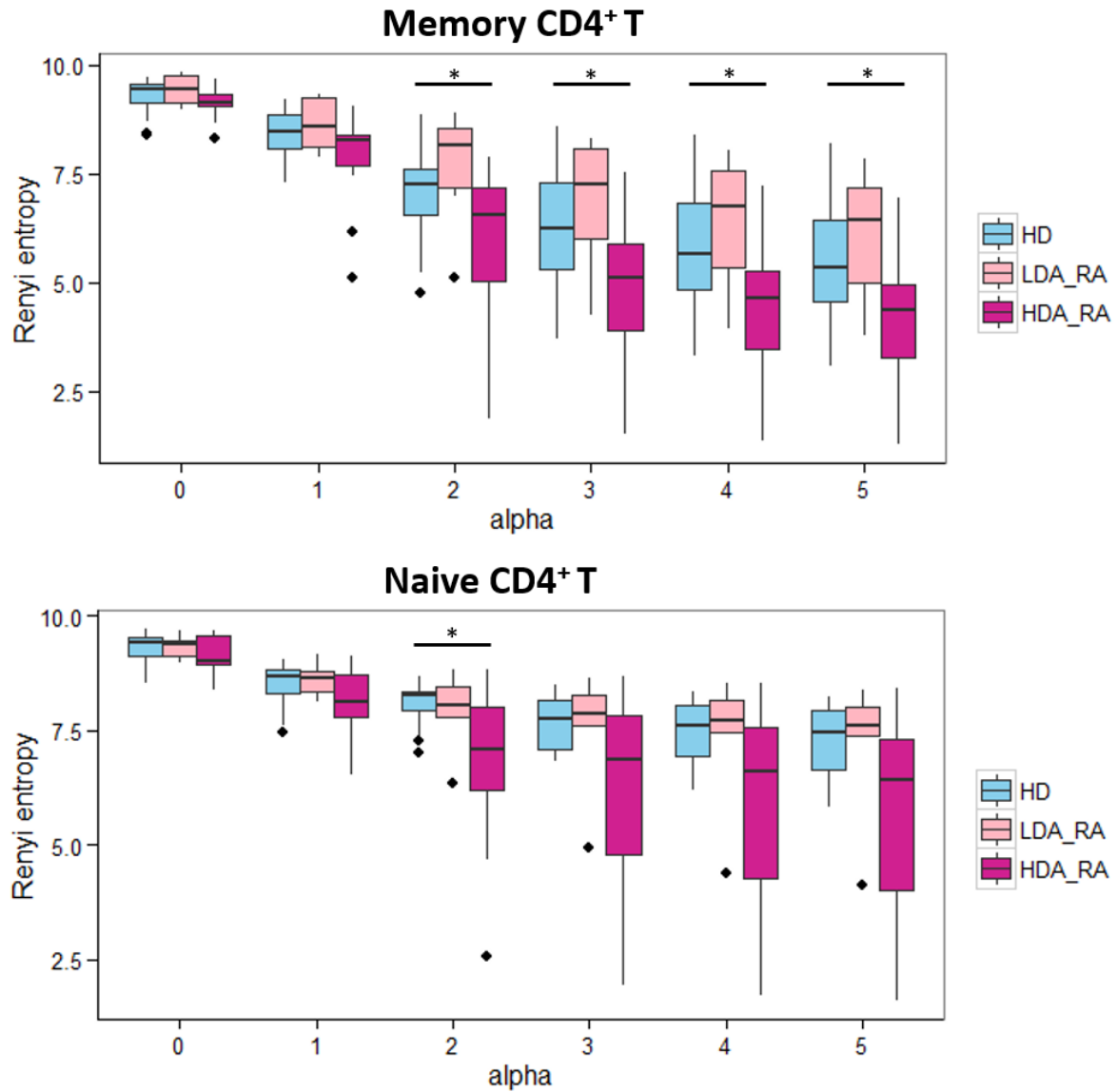


図 5

低疾患活動性 RA 群 (low disease activity: LDA-RA) と中～高疾患活動性 RA 群 (high disease activity RA: HDA-RA)、HD 群の 3 群で比較した (LDA : DAS28CRP < 2.7、HDA : DAS28CRP ≥ 2.7 と定義した)。それぞれの群について CD4 陽性のメモリー、ナイーブ T 細胞における Renyi エントロピーを $\alpha = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ の条件で計算した (* : $p < 0.05$)

【図6】 RA 群と HD 群における expanded clone と non-expanded clone の割合

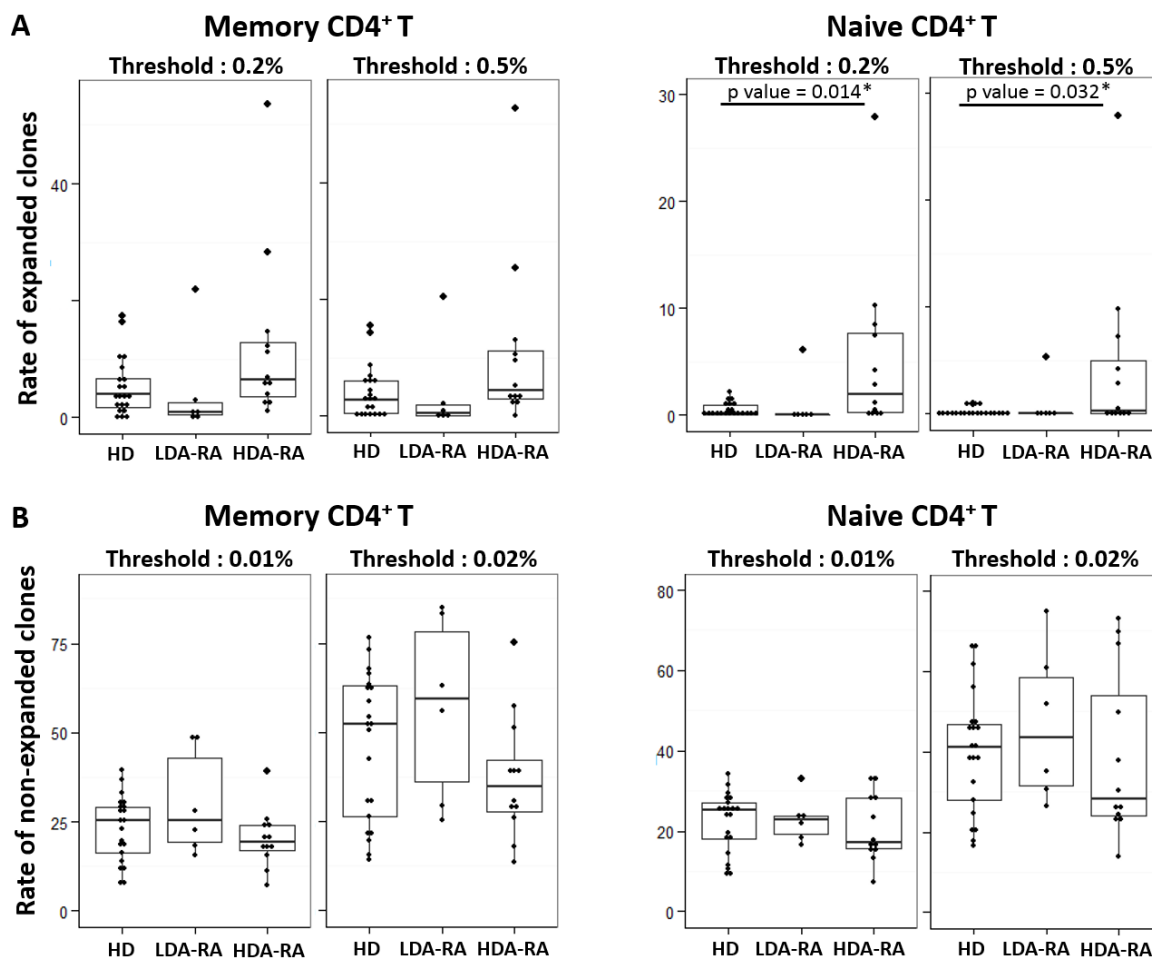


図6

低疾患活動性 RA 群（low disease activity RA: LDA-RA）と中～高疾患活動性 RA 群（high disease activity RA: HDA-RA）、HD 群の 3 群で比較した（LDA : DAS28CRP < 2.7、HDA : DAS28CRP ≥ 2.7 と定義した）。

A : Expanded clone（クローナルな増殖の程度の強いクローン）のリード数の合計が全リードの中で占拠する割合を CD4 陽性のメモリー，ナイーブ T 細胞において計算した。Expanded clone は全リードの 0.2% または 0.5% 以上の read 数を占める clone と定義した。

B : Non-expanded clone（クローナルな増殖の程度が弱いクローン）のリード数の合計が全リードの中で占拠する割合を CD4 陽性のメモリー，ナイーブ T 細胞において計算した。Non-expanded clone は全リードの 0.01% または 0.02% 以下の read 数を占める clone と定義した。

【図7】 RA 群における Renyi エントロピーと疾患関連パラメータとの相関

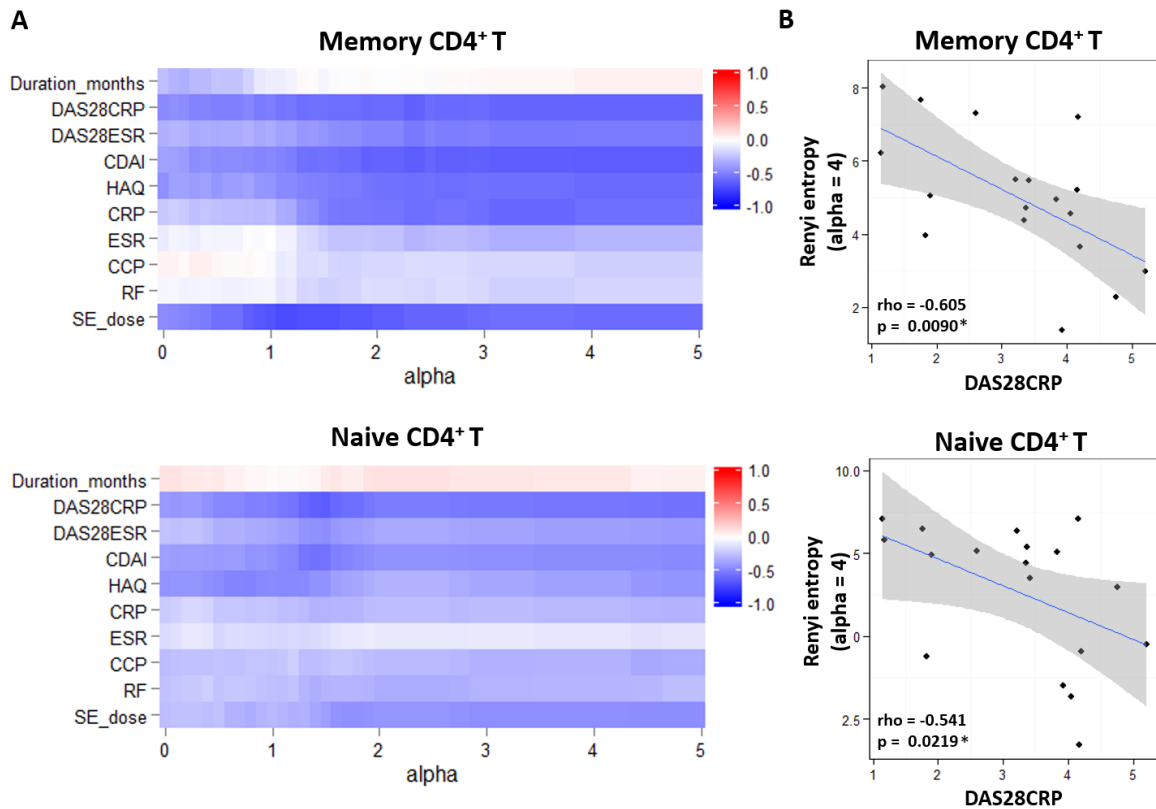


図 7

A : CD4 陽性のメモリー, ナイーブ T 細胞における Renyi エントロピーを $\alpha=0\sim 5$ (0.1 間隔) の条件で計算し, 各種疾患関連パラメータとの相関係数をヒートマップに示した (Spearman 順位相関係数)。

B : DAS28CRP と Renyi エントロピー ($\alpha=4$) との散布図を示す (* : $p<0.05$)。

【図 8】 RA 群における血清サイトカイン濃度と Renyi エントロピーとの相関

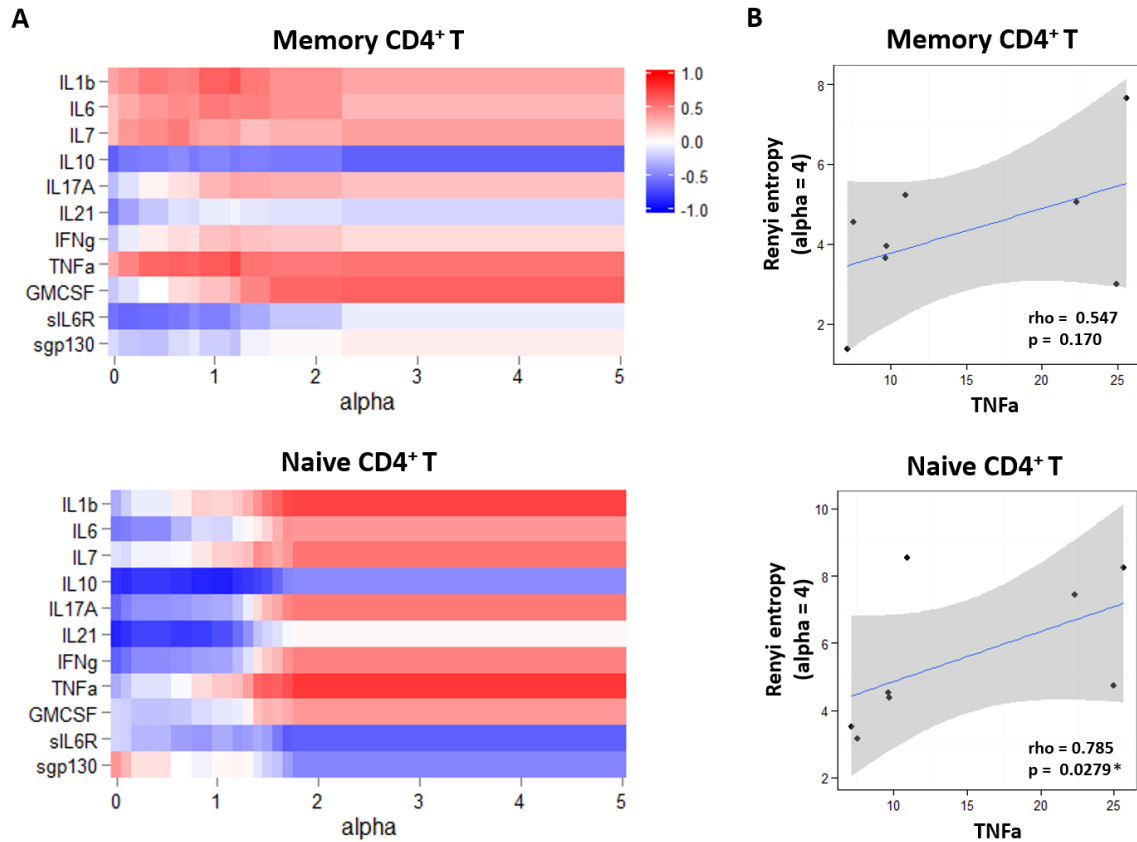


図 8

A : CD4 陽性のメモリー, ナイーブ T 細胞における Renyi エントロピーを $\alpha=0\sim 5$ (0.1 間隔) の条件で計算し, 各種血清サイトカイン濃度との相関係数をヒートマップに示した (Spearman 順位相関係数)。

B : 血清 TNF- α 濃度と Renyi エントロピー ($\alpha=4$) との散布図を示す (* : $p<0.05$)。

【図9】HD群における血清サイトカイン濃度と Renyi エントロピーとの相関

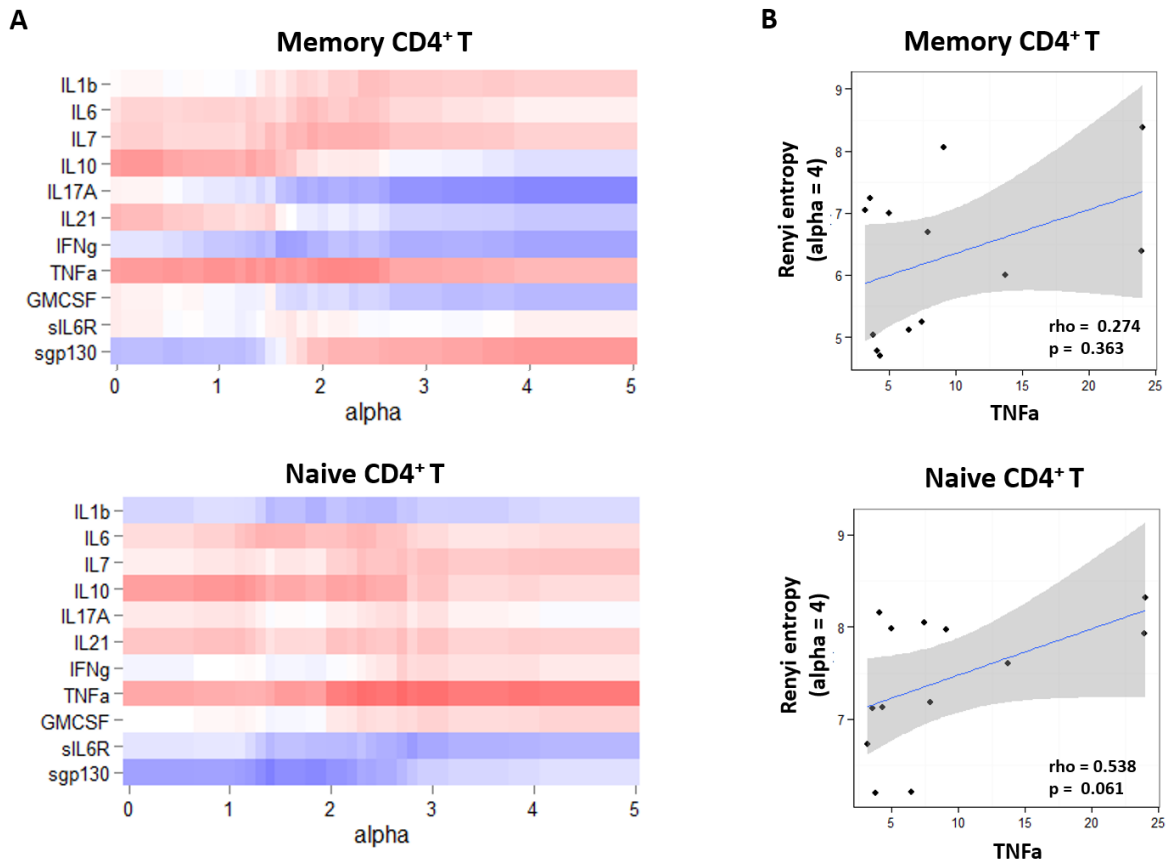


図9

A : CD4 陽性のメモリー、ナイーブ T 細胞における Renyi エントロピーを $\alpha=0\sim 5$ (0.1 間隔) の条件で計算し、各種血清サイトカイン濃度との相関係数をヒートマップに示した (Spearman 順位相関係数)。

B : 血清 TNF- α 濃度と Renyi エントロピー ($\alpha=4$) との散布図を示す (* : $p<0.05$)。

【図10】RAにおけるCD4陽性T細胞レパトワ形成のモデルとその将来の治療モデル

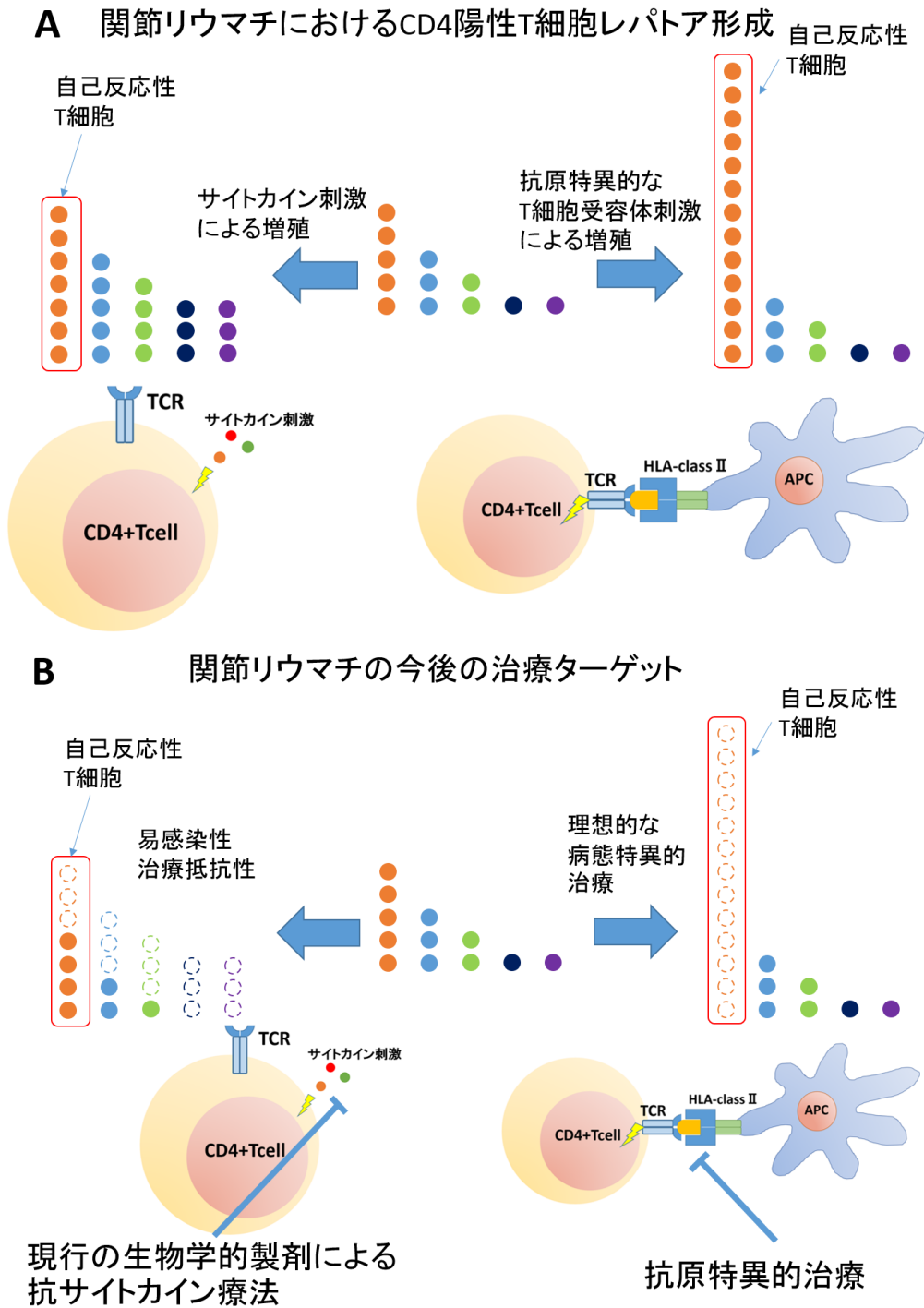


図10

A: 関節リウマチにおけるCD4陽性T細胞のレパトワ形成におけるサイトカインおよび抗原提示の様子を模式的に示した図

B: 関節リウマチにおけるCD4陽性T細胞のレパトワ形成についての仮説により今後検討される治療ターゲット

謝辞

まず初めに本研究を通じ、多大なご支援とご指導を賜りました山本一彦教授に深く感謝申し上げます。

また本研究においては、東京大学アレルギー・リウマチ内科のスタッフ、大学院生および、共同研究先である理化学研究所統合生命医科学研究センター自己免疫疾患研究チームの協力をいただきました。

サンプルの回収およびソートについては、住友秀次助教、永渕泰雄特任臨床医をはじめ、当科大学院生である加藤里佳先生、土田優美先生、仲地真一郎先生、花田徳大先生に、ライブラリー作成用 Kit の使用・発注、機器の使用につきまして、理化学研究所の井上堯様、小林香子様にご協力いただきました。また、シーケンスは、理化学研究所、鈴木亜香里上級研究員のご協力で行いました。サイトカインデータは永渕泰雄特任臨床医のご協力いただき、データの解析に当たっては理化学研究所高地雄太上級研究員、石垣和慶特任臨床医に多大な協力をいただきました。

さらに石垣和慶特任臨床医、庄田宏文助教には本実験をはじめ、全てにおいて、きめ細かいご指導と多大なご協力をいただきました。

最後に藤尾圭志先生には、実験の実施、テーマの選択、方向性の指導など様々なご教示・ご指導をいただきました。

特に上記の方々、またお世話になった方々にこの場を改めて借りて心からの感謝の意を表します。