

論文の内容の要旨

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

【背景】自己免疫疾患である関節リウマチ(RA)において、CD4 陽性 T 細胞の重要性を示す知見として、炎症滑膜に浸潤細胞として見いだされること、関節や末梢血にポリクローナルなクローン集積が認められること、GWAS において CD4 陽性 T 細胞に関連のある遺伝子座が指摘されていること等がある。しかしながら、CD4 陽性 T 細胞がどのようなエピトープを認識するのか、どのようにクローナルな集積を示すようになるのかについては未だ不明な点が多い。

今回、次世代シーケンサーを用いて網羅的に RA 患者の CD4 陽性メモリー T 細胞と CD4 陽性ナイーブ T 細胞の T 細胞受容体レパトワを、疾患活動性やサイトカイン情報などと併せて解析することにより、T 細胞受容体レパトワ解析を通じて関節リウマチの病態を解明することが可能ではないかと考えた。

【方法】今回、RA 患者 18 名と年齢・性別をマッチさせた健常人コントロール(HD)21 名の末梢血から CD4 陽性メモリー T 細胞 (CD4+CDRA⁻)、CD4 陽性ナイーブ T 細胞 (CD4+CDRA⁺) をソートし、RNA を抽出し、そこから T 細胞受容体- β 鎖の cDNA を逆転写合成後、5'-RACE 法により PCR 増幅し Illumina 社の Miseq によりシーケンスした。

疾患活動性および HLA タイピングは、サンプル回収時に確認し、一部の症例については血清中のサイトカイン濃度を multiplex cytokine assay にて測定した。

解析にあたっては、俯瞰的に T 細胞受容体レパトワの多様性を解析する方法である Renyi エントロピーを用いて行い、Renyi エントロピーを規定する変数である α を変数として連続的に複数用意しそれぞれによって得られる複数のエン트로ピーをすべて用いて解析した。

【結果】最初に Renyi エントロピーを用いた解析の理解の為、シミュレーションデータを検討した。その結果、Renyi エントロピーは α が大きい程クローナルな増殖の程度が大きいクローンの影響が大きく、 α が小さい程クローナルな増殖の程度の小さいクローンの影響が大きいと分かった。

次に T 細胞受容体レパトワを、Renyi エントロピーを用いて解析することの妥当性を検討した。biological replicate 間で Renyi エントロピーを求め、非常に高い相関を得られることを確認し、エン트로ピーを用いた解析の再現性を確認した。

さらに従来から行われている方法である、クローナルな増殖を示すクローンの割合を解析し、中～高疾患活動性の関節リウマチ群(HDA 群)では HD 群と比して、CD4 陽性メモリー T 細胞と CD4 陽

性ナイーブ T 細胞の双方にクローナルな増殖を示すクローンが増加している傾向がみられた。

ついで、Renyi エントロピーを用いて HD 群との比較を行い、CD4 陽性メモリー T 細胞、CD4 陽性ナイーブ T 細胞ともに HDA 群では HD 群と比して有意に多様性が減少していることを認めた。

疾患活動性との関連については、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、負の相関を認めた。特に CD4 陽性メモリー T 細胞においてはいずれの疾患活動性指標についても Renyi エントロピーの α が大きいクローナルな増殖の強いクローンの影響が大きい時に相関は強くなる傾向を認めた。HLAclassII のリスクアレル数についても CD4 陽性ナイーブ T 細胞・メモリー T 細胞の双方で負の相関を認めた。

サイトカイン濃度とエントロピーについては、RA 群では HD 群と比して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。RA 群では CD4 陽性メモリー T 細胞より CD4 陽性ナイーブ T 細胞においてより相関は強い傾向が認められた。

RA 群における CD4 陽性ナイーブ T 細胞メモリー T 細胞の双方で IL-10 と IL-21 濃度はエントロピーと負の相関を示した。また、一般に炎症性サイトカインとされる IL-1b、TNF- α 等については疾患活動性とは逆のエントロピーと正の相関を認めた。

【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、関節リウマチ患者における TCR レパトワを、次世代シーケンサーを用いて解析した。また、解析に際しては多様性の指数として用いられる Gini 係数や Shannon Index などの特定の指数のみを用いることによる恣意性について指摘する報告もあることから、多様性指数の一般化式である Renyi エントロピーを複数の α 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少数のクローンのみが、強度に増殖する免疫環境が存在し多様性が減少することを認めた。この多様性減少は CD4 陽性 T 細胞において、特定の自己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。また、CD4 陽性 T 細胞への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ることが確認された。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、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態に関わると考えられる。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、クローナルに増殖している CD4 陽性 T 細胞が病態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考えている。

本研究では抗原提示において質的に異なると考えられる 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。しかしながら RA 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るが、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。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を提唱しており、これにより、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、関節リウマチにおいて炎症性サイトカインが関連することは、生物学的製剤の効果などからも確かであるが、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。これは、炎症性サイトカインと抗原特異的なクローナルな増殖が独立であることを示唆しているものと考えられる。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現時点では考えている。

【結語】本研究は、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、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 HLA classII 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うる結果を得た。現時点で 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存在しない。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から、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。