

論文の内容の要旨

論文題目 RNA-sequencing を用いた全身性エリテマトーデスの B 細胞受容体レパトア解析

氏名 太田 峰人

全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus、以下 SLE)は様々な自己抗原に対する抗体の出現を特徴とする全身性自己免疫疾患である。発症機序は明らかでないが、罹患臓器への免疫複合体の沈着が高頻度で認められることから、抗原-抗体反応に伴う免疫複合体の形成およびその沈着が全身性炎症の1つの原因となっていると推測される。しかし、SLE において多彩な自己抗体が形成される機序についてはこれまで明らかにされていなかった。

B 細胞は細胞毎に異なる B 細胞受容体(B cell receptor, 以下 BCR)を有し、BCR の集合を BCR レパトアと呼ぶ。BCR は各分化段階において VDJ 遺伝子再構成・体細胞超変異(Somatic Hypermutation, SHM)・クラススイッチ組み換えを経てレパトアの多様性を獲得しており、分泌型の BCR は抗体として機能する。これまで複数のグループが SLE の BCR レパトアについてシングルセル解析と target PCR 法などを組み合わせて報告を行ってきたが、技術的に数百細胞・数例の少数サンプルの解析にとどまっており、多細胞種・多症例にわたる網羅的解析は行う事が困難であった。近年、遺伝子発現の網羅的解析手法として次世代シーケンサー(Next generation sequencer, NGS) を用いた RNA-sequencing (以下 RNA-seq) が登場した。RNA-seq ではマイクロアレイ法のような事前のプローブ設計が不要なため、バイアス無く網羅的な転写産物の発現解析を行うことが可能となる。そのため、未知の転写産物や TCR/BCR 領域のような

多様性に富んだ領域の解析も可能となる。

そこで我々は SLE における BCR レパトア異常を網羅的に解析するために、SLE 患者から B 細胞 5 サブセット (ナイーブ B 細胞・アンスイッチメモリーB 細胞・スイッチメモリーB 細胞・ダブルネガティブ B 細胞・plasmablast) をセルソーターで分取し、RNA-seq を用いて BCR レパトア解析を行った。対照として健常人及び関節リウマチ (RA) 患者における BCR レパトアの解析も行った。さらに、RNA-seq で得られるトランスクリプトームデータと BCR レパトアの関連についても解析を行った。

結果、第一にトランスクリプトーム解析で SLE 患者では全ての B 細胞サブセットにおいてインターフェロンシグナルの亢進がみられ、アンスイッチメモリーB 細胞やスイッチメモリーB 細胞では Unfolded protein response の亢進がみられた。第二にプラズマブラストにおける BCR の多様性が RA 患者では健常人に比較して低下していたのに対して SLE 患者では増大していた。さらに、SLE 症例の中でトランスクリプトームとの比較解析を行うと、インターフェロンシグナルの強さと BCR 多様性は正の相関を示した。第三に SLE 患者ではナイーブ B 細胞やアンスイッチメモリーB 細胞といった抗原提示を受ける以前の B 細胞において健常人と比較して V gene usage に偏りが見られた。第四に SLE 患者プラズマブラストでは Somatic hyper mutation を受けた細胞の割合が減少しており、Somatic hyper mutation の個数はインターフェロンシグナルの強さと負の相関を示した。第五に SLE 患者ではアイソタイプの比率がアンスイッチメモリーB 細胞・スイッチメモリーB 細胞・プラズマブラストにおいて健常人と大きく異なり、アイソタイプの比率の異常はインターフェロン

シグナルや Unfolded protein response の強さと関連した。

これらの結果は SLE において B 細胞成熟の複数の過程に異常がある事を示唆しており、さらにそれらがインターフェロンシグナルや Unfolded protein response といった SLE を特徴づける遺伝子発現パスウェイと密接に関連している事を示唆するものであった。また SLE 患者プラズマブラストにおける somatic hyper mutation の減少から、通常の germinal center における抗原特異的成熟と異なる経路を経た B 細胞成熟過程が想定された。さらに我々は異常な B 細胞成熟過程の結果 SLE 患者に共通する BCR 配列が出現するのではないかと仮説を立てた。検証のため、複数人で共有される BCR 配列である public sequence について解析を行った。すると、SLE では健康人や RA と異なる public sequence の発現パターンが存在する事が明らかとなった。さらにそれらの public sequence は somatic hypermutation が少ないこと、negative selection の破綻により出現している可能性があることが示唆された。SLE の public sequence の一部は既知の自己抗体価と有意な相関を示した。

また、SLE を特徴づける public sequence について、重鎖・軽鎖の発現量の相関を解析することで SLE に特徴的な重鎖・軽鎖のペアが存在する可能性を示した。

SLE におけるインターフェロンをはじめとした自然免疫系シグナルの亢進は以前から知られていたが、それと B 細胞成熟異常の間に関連がある事が今回の報告で示唆された。さらに、SLE における特徴的な public sequence の存在についてはじめて報告した。今回の結果から、SLE 患者において自然免疫系シグナルによって germinal center を経ない異常な B 細胞成熟がドライブされて

おり、その結果多様な BCR が出現し、その一部は患者間で共有されているという可能性が示唆された。

SLE の治療薬は長期にわたって開発が進んでおらず、抗インターフェロン抗体の効果も限定的なものであった。今後本研究を発展させ、SLE を特徴づける public sequence の対応抗原の探索や BCR 成熟異常を促進するパスウェイのより詳細な解析を行うことで、新たな SLE の治療法につながる可能性がある。