

論文の内容の要旨

論文題目

末梢血免疫担当細胞種特異的遺伝子発現解析による全身性エリテマトーデスの病態解明

氏名 竹島 雄介

全身性エリテマトーデス(SLE)は多様な全身症状を呈する慢性自己免疫性疾患であり、多種の免疫抑制剤の有効性が示され予後は飛躍的に改善しているが、既存治療に反応しない難治性病態の残存に加え、SLE の死因の第一は依然として免疫抑制療法による感染症が占めており、病態の根幹を修復する新規治療開発が切望されている。近年、次世代シーケンサー開発とビッグデータ解析手法の進歩は目覚ましく、断片化した mRNA や miRNA を鋳型にランダムプライマーを用いて DNA ライブラリーを作成する RNA-seq(RNA sequencing)による少数細胞に対するゲノムワイドなトランスクリプトーム解析が高速かつ安価に可能となり、患者個人の細胞を遺伝子レベルで分析し個々に最適な治療・薬を提供するプレジジョン・メディシンの必要性が高まっている。

SLE では、自己に対する免疫寛容の喪失により多彩な自己抗体産生が生じる。その背景には、通常アポトーシス時に細胞外に放出され速やかに除去される核抗原が、アポトーシスの亢進時に除去しきれない核抗原として免疫系に暴露されることが誘因として存在すると考えられている。機構として、核抗原が Toll 様受容体(TLR)ファミリーなどの核酸認識受容体に認識され、転写因子である IRF(interferon-regulatory factor)を活性化し、1 型インターフェロン(IFN)産生が亢進することが重要と考えられており、実際に SLE 患者の末梢血において 1 型 IFN の血中濃度は高く、1 型 IFN の投与による SLE の発症報告があり、また、マイクロアレイにて interferon signature と病勢や抗体産生との関連も複数報告されている。

同じく代表的な自己免疫疾患である関節リウマチにおける多種の生物学的製剤を含む新規治療法の進歩が大きい一方、SLE に関しては有効性が示されている製剤は限定的である。最近、可溶性 BAFF(B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family)に結合する完全ヒト型抗 BAFF モノクローナル抗体(Belimumab)が我が国でも承認され使用可能となった。BAFF は 1 型 IFN 刺激を受けた骨髄系樹状細胞や単球から産生され、SLE 患者を対象とした抗 IFN- α 抗体の臨床試験において末梢血単核球における BAFF mRNA の発現低下を

認め、1 型 IFN シグナル下流で病態に関与していると推察される。しかし、抗 IFN- α 抗体 (Sifalimumab) や抗 I 型 IFN 受容体抗体(Anifrolumab)の治験は有効性が示されたものの全例著効しているとは言えない結果に留まっており、SLE 新規治療薬の開発のためには IFN シグナル系とは別の、或いは、IFN シグナル系を修飾する、SLE 病態形成に重要な新たな系の解明が期待されている。

SLE 病態の詳細な解明のためには、免疫担当細胞各々の役割を解析していくことが重要と考え、本研究では、SLE 患者と健常人の末梢血から 19 のサブセットに分離して免疫担当細胞を採取し、RNA-seq を行うことで細胞種特異的なトランスクリプトームの情報を得、それを足掛かりにそれぞれの細胞種の SLE 病態への関与を探索した。SLE 49 例および健常人 30 例において、末梢血 PBMC より免疫担当細胞 19 サブセットを、5000 細胞を目標にマルチカラーフローサイトメトリーを用いて分取した。各サブセットの存在比は既報と合致していたが、サブセットの存在比率の変化は、病態の一次的な原因なのか、それとも二次的な影響なのかの判断は困難であった。次に、RNA-seq にて発現遺伝子を網羅的に解析した。リードの質を担保するために、同一サブセットは似通った発現になると推定して Quality control を行った。次に、サブセット毎に切り分けて IFN signature score を計算したところ、SLE において全サブセットで IFN signature が亢進しており、同一症例においてサブセット間での変動は少なかった。この score を用いて階層的クラスタリングを施行したところ 5 つのクラスターが形成され、興味深いことに IFN signature の強さによって疾患群が層別化されることが明らかとなった。

次に、疾患によるサブセット特異的な変化を捉えるため、まずは SLE と HC においてサブセット毎に発現変動遺伝子(differentially expressed genes; DEGs)の解析を行った。サブセット毎に DEGs は大きく異なり、特に Naive B 細胞に比して Switched Memory B・Unswitched Memory B 細胞における DEG 数の上昇が目立ち、Naive B 細胞から Memory B 細胞に分化する過程で疾患特異的な遺伝子発現の変化が生じている可能性が示唆された。サブセット毎の発現変動遺伝子をパスウェイ解析にて比較することで、全サブセットで 1 型 IFN パスウェイが検出された一方、Switched Memory B 細胞、DNB 細胞に特徴的にミトコンドリア機能異常や酸化的リン酸化(oxidative phosphorylation ; OXPHOS)に関わる遺伝子群が検出された。

遺伝子発現情報と臨床情報を統合するため、ネットワーク解析である WGCNA(Weighted gene co-expression network analysis)を行った。DEGs 解析にてミトコンドリア機能変調を強く認めた Switched Memory B 細胞の解析において、疾患の有無との相関が高い遺伝子群が複数同定され、自己抗体産生との相関も認めた。それらの遺伝子群のパスウェイ解析から、1 型 IFN パスウェイ、ミトコンドリア機能異常・OXPHOS パスウェイの enrichment を認めた。これより、WGCNA の結果からも SLE の Switched Memory B 細胞において 1 型 IFN パスウェイの遺伝子発現に加えてミトコンドリア機能異常・OXPHOS パスウェイの遺伝子発現の重要性が示された。また、IFN と OXPHOS の signature score を算出したところ、B 細胞において IFN と OXPHOS との相関を認め、中でも Switched Memory B 細胞において強く認められた。これらから、特に Memory B 細胞において IFN signature と代謝制御とが互いに関連して動いていることが推察された。

SLE 患者末梢血 B 細胞におけるミトコンドリア機能変調を検証するために、OXPHOS において中心的な役割を果たす電子伝達系酵素複合体(complex I-V)の遺伝子発現量を B 細胞サブセットにて比較したところ、Switched Memory B 細胞において全ての complex 発現が SLE で亢進していた。次に、SLE と HC 間での末梢血 B 細胞におけるミトコンドリアの形態学的な変化を透過型電子顕微鏡にて確認した。SLE と健常人の末梢血由来の Naive B 細胞と Memory B 細胞を観察し、膨化したミトコンドリアを持つ細胞の割合が SLE の Memory B 細胞で有意に増加していることが明らかとなった。次に、細胞外フラックスアナライザーを用いて細胞外の酸素消費速度を測定し、電子伝達系で消費される酸素の状態から代謝状態の変化を評価した。結果 SLE と HC の間に有意差を認めず、SLE Memory B 細胞における電子伝達系酵素複合体遺伝子発現上昇を考慮すると、電子伝達系(electron transport chain; ETC)あたりの機能異常の可能性が考えられた。

続いて、SLE の Memory B 細胞で生じている遺伝子変動を引き起こしている刺激の探索を行った。健常人の Memory B 細胞を無刺激・IFN α 単独刺激・TLR9 単独刺激・IFN α +TLR9 刺激のそれぞれの条件下に 3 日間培養し、RNA-seq を行った。IFN α 単独ではミトコンドリア機能異常・OXPHOS 関連遺伝子の発現変動は認めず、TLR9 単独および IFN α +TLR9 刺激にてミトコンドリア機能異常・OXPHOS 関連遺伝子の発現変動を認めた。Plasmablast 分化

に必要とされる PRDM1、XBP1、IRF4 の発現は、TLR9 単独刺激および IFN α +TLR9 において発現上昇が確認され、特に Plasmablast の表面マーカーで、活性化マーカーとして知られる CD38 の発現は TLR9 単独刺激では誘導されないのに対し、IFN α +TLR9 刺激では他の条件に比べて有意に発現上昇を認めた。TLR9 と IFN α の共刺激により、ミトコンドリア機能の変化が生じると同時に Plasmablast 分化が促されることが示され、この刺激が SLE の Memory B 細胞における遺伝子発現と類似した発現変動をもたらすものと考えられた。

本研究では 19 種類におよぶ末梢血免疫担当サブセットの RNA-seq にて遺伝子発現変動を網羅的に概観することで、in silico の解析アプローチから SLE の Memory B 細胞特異的なミトコンドリア機能異常・OXPHOS 関連パスウェイの重要性を同定するとともに、それらと自己抗体産生との関連性を示した。また、1 型 IFN と TLR9 刺激により、SLE の Memory B 細胞を特徴づける遺伝子発現変動がもたらされることを明らかとし、これらの刺激によって B 細胞に誘導されるミトコンドリアの機能変調・代謝変容が、SLE の病態形成に関与している可能性が示唆された。