

博士論文（要約）

末梢血サブセットのトランスクリプトーム解析を用いた ANCA

関連血管炎の病態解明

柳岡 治先

論文の内容の要旨

論文題目 末梢血サブセットのトランスクリプトーム解析を用いた

ANCA 関連血管炎の病態解明

氏名 柳岡 治先

抗好中球細胞質抗体関連血管炎 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis、以下 AAV) は様々な臓器を支配する小血管から中血管を中心に炎症性細胞浸潤とそれに伴う壊死が起こり、その結果、肺胞出血、糸球体腎炎などの致命的な合併症を起こすことがある全身性炎症性疾患である。AAV は多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis、以下 GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis、以下 EGPA)、顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis、以下 MPA) に分類される。これらの疾患は血清中に抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody、以下 ANCA) という好中球に発現している抗原に対する抗体が検出されるという共通した特徴を有している。

AAV の原因については未だ明らかではないものの、様々な *in vitro* や *in vivo* の研究で T 細胞、単球、B 細胞などいくつかの免疫細胞サブセットが重要であることが示唆されてきた。一方で近年、末梢血中の免疫細胞における遺伝子発現と AAV の臨床的特徴の関連についての研究が盛んに行われるようになってきている。いくつかの研究で末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells、以下 PBMC) 全体における遺伝子発現を解析し AAV 患者と健常人で比較したところ複数の発現変動遺伝子 (differentially expressed genes、以下 DEG) が検出され、その発現レベルが活動性や予後との関連があることが証明されたが、PBMC に分類される免疫細胞には様々なサブセットが混在しているため、PBMC 全体の遺伝子発現情報はサブセットの存在比率に左右されていた可能性がある。このことは PBMC 全体ではなくそのサブセットの遺伝子発現を観察することにより、さらに疾患に特異的で病態との関連が強い細胞集団および遺伝子群を特定することができ、より質の高いバイオマーカーが得られる可能性があることを示唆している。私は本研究において従来の研究より詳細なサブセットを観察することによってさらに疾患特異的な PBMC サブセットや遺伝子群が特定できる可能性があるという仮説のもと、AAV 患者の PBMC を 19 種類のサブセットに分類し、各サブセットにおける遺伝子発現 (mRNA) を健常人 (healthy controls、以下 HC) のそれと比較することで AAV の病態に重要と思われるサブセットおよび遺伝子群の同定を試みた。さらに、それらの生物学的意味を考察し AAV の病態を明らかにするためパスウェイ解析および weighted gene co-expression analysis (以下 WGCNA) を行った。遺伝子発現を測定する方法としては microarray ではなく RNA-sequencing (以下 RNA-seq) を使用した。RNA-seq は microarray とは違い転写産物特異的な probe を必要としないため microarray では検出できない新規転写

産物を検出することができるだけでなく、より広範なダイナミックレンジが得られるなどの利点を有している。

2016年2月1日から2017年8月31日までの間に東大病院アレルギー・リウマチ内科および協力施設である聖路加国際病院アレルギー膠原病科の外来に通院中もしくは入院した患者の中で、欧州医薬品庁 (European Medicines Agency) のアルゴリズムによって GPA もしくは MPA に分類され、かつ PR3(proteinase 3)-ANCA もしくは MPO(myeloperoxidase)-ANCA が陽性である患者 26 名を研究の対象とした。

私はまず AAV 患者 26 名および HC 15 名の PBMC をサブセット別に分離回収し、PBMC サブセットの比率について解析を行った。AAV 患者では特に CD4 陽性 T 細胞、B 細胞、樹状細胞の様々なサブセット比率に変化が生じていた。最も多くのサブセット比率の変化と関連があった病変は糸球体腎炎の有無であり、mCD4(memory CD4+ T cells)、non-Th1/17(non-Th1/Th17 cells)、CD16+Mono(CD16+ monocytes)の比率とは正の相関があった。反対に nCD4(naïve CD4+ T cells)、CD16-Mono(CD16-monocytes)、mDC(myeloid dendritic cells)の比率とは負の相関がみられた。さらに健常人を含めた 3 群で比較を行うと HC と比べ AAV 患者にてサブセット比率上昇していた mCD4、non-Th1/17 では特に糸球体腎炎を伴う AAV 患者が糸球体腎炎を伴わない患者よりも有意に上昇していることがわかった。反対に HC と比較して AAV 患者にてサブセット比率が低下していた nCD4、mDC でも特に糸球体腎炎を伴う患者で他 2 群よりも低下を認めた。また、単球サブセットは AAV 患者全体と HC の比較においてはサブセット比率の差が認められなかったが、糸球体腎炎を有する患者においては有意なサブセット比率の変化がみられていた。これらの PBMC サブセットと AAV の病態との関連が示唆された。

続いて AAV 患者の PBMC サブセットにおける遺伝子発現を HC のものと比較するため、13 名の AAV 患者と 9 名の HC の PBMC サブセットについて RNA-seq を行った。RNA-seq により得られた遺伝子発現データを用いて各サブセットにおける DEG の検出を試みたところ、DEG が特に多かったサブセットは Type-17 helper T cells (以下 Th17) 、 follicular helper T cells (以下 Tfh) 、 CD16-Mono であった。

これらの細胞はいずれも AAV の病態への関与が注目されているサブセットであり、検出された DEG がどのシグナル伝達経路に関わっているかをパスウェイ解析で調べた。まず、既知のシグナル伝達経路とのオーバーラップを検討したところ、Th17 と Tfh における酸化的リン酸化経路とミトコンドリア機能異常経路が強い関連を示した (それぞれ $p < 1.0 \times 10^{-3}$ 、 $< 1.0 \times 10^{-3}$)。また、Th17 においては sirtuin シグナル伝達経路も強い関連を示した ($p < 1.0 \times 10^{-3}$)。次にこれらの既知のシグナル伝達経路とオーバーラップを認めたものの中で有意な活性化を認める ($z\text{-score} > 2$) シグナル伝達経路を抽出したところ、Th17、Tfh、CD16-Mono の 3 サブセットでは共通して FLT3 (Fms-like tyrosine kinase3) シグナル伝達経路、iNOS (inducible nitric oxide synthase) シグナル伝達経路、NO (nitric oxide) と ROS (reactive oxygen species) 産生シグナル伝達経路が活性化していた。Th17 および Tfh では sirtuin シグナル伝達経路も活性化していたが、CD16-Mono では抑制されていた。これらの結果から AAV 患者では、特に CD4 陽性 T 細胞や CD16-Mono 特異的な細胞内代謝経路の変化を認めることが示された。

DEG が最も多かった Th17 に対してさらなる発現遺伝子の機能解析を行うため、WGCNA により臨

床情報と関連がある遺伝子モジュールの同定を試みた。各モジュールの平均的発現を示す eigengene と臨床情報の解析結果の中で最も強い相関がみられたのは darkgrey モジュールの eigengene と ANCA の力価であった (相関係数 0.7、 $p=0.0004$)。同モジュールには TLR4 (Toll-like receptor 4) 関連経路およびインターフェロンシグナル伝達経路の遺伝子群が含まれていた。同モジュールに含まれる遺伝子の一部は Th17 で上昇している DEG として検出されていたが (21/91、23.1%)、その多くは DEG としては検出されておらず WGCNA の手法によって DEG 解析だけでは検出されない病態と関連した細胞内経路が検出された。

私は AAV 患者と HC における PBMC サブセットの存在比率の比較、臓器病変とサブセットの関連の検討、各サブセットにおける DEG の検出とそれをもとにしたパスウェイ解析、そして WGCNA を用いた遺伝子モジュールと臨床指標の関連の検討を通して、AAV の病態と関連していると思われるサブセットと遺伝子群の同定を試みた。その結果、Th17、Tfh、CD16-Mono において細胞内代謝と関連するシグナル伝達経路の活性化が起こっていること、Th17 の TLR4 やインターフェロンシグナル伝達経路と関連する遺伝子モジュールが ANCA の力価と関連していることを示した。本研究によって AAV の病態への理解が深まり、新規治療の開発につながる可能性があると思われる。