

博士論文

論文題目： 関節リウマチ患者における
T細胞受容体多様性の解析

氏名： 石垣 和慶

関節リウマチ患者における T 細胞受容体多様性の解析

目次

	頁
要旨	1
序文	2
方法	7
結果	22
考察	47
参考文献	52
謝辞	63

関節リウマチ患者における T 細胞受容体多様性の解析

所属： 大学院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

申請者名： 石垣 和慶

要旨

関節リウマチの病態に自己反応性 CD4 陽性 T 細胞が重要な役割を担うことは以前より知られていたが、T 細胞受容体の特徴には不明な点が多い。我々は、シングルセル解析と次世代シーケンサーとを併用し網羅的な T 細胞受容体レパトア解析方法を確立し、関節リウマチ患者の末梢血にはクローナルな増殖を示す CD4 陽性 T 細胞が多く存在し、その一部が関節内に浸潤していることを確認した。また、各 T 細胞クローンの遺伝子発現解析を併用し関節炎の病態に関与する CD4 陽性 T 細胞の候補を同定した。この実験手法を拡大することで関節リウマチの病態生理がより明確になり、最終的には関節炎に関与する自己抗原の同定に繋がり得ると考える。

序文

関節リウマチ (rheumatoid arthritis、以下 RA) は手指を中心とした全身の滑膜炎を呈し、骨破壊、関節変形を特徴とした慢性の炎症性疾患である[1]。病態生理には不明な点が多く残るが、遺伝的要因と環境要因とが関与し発症すると考えられている[2]。非ステロイド性抗炎症薬、グルココルチコイド、種々の疾患修飾性抗リウマチ薬などの従来の治療薬に加えて近年は TNF- α 、IL-6 などの分子を標的とした生物学的製剤が併用される症例が急増しているが、その有効性は 7 割程度であり重篤な感染症などの副作用の報告も多く、新規治療薬の開発が期待されている[3-5]。

山本らは RA 患者の末梢血、滑膜、滑液中の T 細胞受容体 (T cell receptor、以下 TCR) を single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を用いて解析し、滑膜、滑液中の T 細胞クローンの集積を同定し、抗原特異的 T 細胞応答が RA の病態に関与することを間接的に示した[6]。その他にも、多種の自己抗体や自己反応性 T 細胞の存在を考慮して、RA が自己免疫疾患であることは広く受け入れられている。しかし、現行の RA の治療薬はいずれも抗原非特異的な治療法であり、有効性、副作用の観点からも不完全なものである。RA の病態に関与する主要な自己抗原を同定すれば、抗原特異的な新規 RA 治療法の開発への糸口となる。また、自己抗原に対する免疫寛容の破綻を未然に予防することや、免疫寛容の再獲得による RA の完治を目指すなど、新たな治療目標を検討できる。

RA 患者の滑膜内、特に滑膜組織の新生された小血管の周囲には多くの CD4 陽性 T 細胞が浸潤していることから、病態に関与する細胞集団ということは以前から認識されていた。また複数の関節炎のマウスモデルからも CD4 陽性 T 細胞の中心的役割は確認されている [7-9]。また、候補遺伝子解析やゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study、以下 GWAS) から Human Leukocyte Antigen-DR 鎖 (以下、HLA-DR 鎖) 上の共通なエピトープ (shared epitope、以下 SE) が RA の発症に強く関与することが示された [10]。GWAS で関連が指摘された遺伝子は疾患の発症、病態に深く関わる原因遺伝子として考えられるため、SE を持つ HLA-DR 鎖に効率良く結合する自己抗原とその抗原を認識する CD4 陽性 T 細胞が RA の発症の誘因であると推測される。

B 細胞レベルでの免疫寛容の破綻は自己抗体の存在から比較的容易に推測可能である。RA 患者の血清にはガンマグロブリン、シトルリン化蛋白 (フィブリン、ビメンチン、 α -エノラーゼ)、II 型コラーゲン、heat shock protein (以下、HSP) などのストレス蛋白などに対する抗体が認められる [11-14]。特に抗シトルリン化蛋白抗体 (anti-citrullinated protein antibodies、以下 ACPAs) は近年 RA において注目されている抗体である [15]。シトルリン化タンパクを合成する酵素の 1 つである PADI4 が GWAS において RA の疾患感受性遺伝子として同定されていること、RA の関節内にシトルリン化抗原が発現していること、ACPA は RA 発症前から認められること、ACPA は RA に特異的であること、マウスモデルの検討で ACPA の投与により関節炎

が増悪した結果などから ACPA は RA において重要な役割を担っていることが推測される[16, 17]。

一方、自己免疫疾患における T 細胞レベルでの対応抗原を同定することは一般に困難である。患者から得られた T 細胞を抗原提示細胞と共に種々の候補抗原で刺激し T 細胞の増殖やサイトカインの産生を確認する実験系や、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex、以下 MHC) と候補抗原内のエピトープの結合を予測するなどの手法が標準的な解析法である[18-20]。現在の技術では T 細胞の対応抗原の検索を網羅的に行うことは不可能であり、何らかの仮説をもとに抗原の候補を予め設定する必要がある。HLA-DR 鎖の SE には陽性荷電されたアミノ酸が多いため、陰性荷電または中性の蛋白を効率良く結合する可能性がありシトルリン化蛋白はこの条件を満たす[21]。T 細胞レベルでも B 細胞同様にシトルリン化蛋白に対する免疫寛容破綻の破綻が生じている可能性はあるが、RA では抗原の候補が多岐に渡るのみならず、intermolecular epitope spreading により T 細胞レベルで寛容が破綻している抗原が B 細胞のものと同分子内であるかは自明のことではない[22]。

RA における自己抗原の候補であるシトルリン化ビメンチンやシトルリン化フィブリノゲンを基に作成された MHC-ペプチドテトラマーを用いた研究報告によると、RA の末梢血中のテトラマー陽性細胞の率は ex vivo における増殖を行わなければ 100,000 CD4 陽性 T 細胞につき 1~5 細胞と極めて低い[20]。一方で、我々は TCR のレパトア解析をすることで RA 患者の末梢血、関節組織にて増殖傾向の強いメモリー

CD4 陽性 T 細胞のクローンを複数同定した。他のグループの報告でも、同様の現象が確認されている[23]。これらのクローンは既存のテトラマー陽性細胞に比して数的に大きな集団を形成しており、異なる抗原を認識する細胞集団と考えられる。クローナルな増殖の程度、関節への浸潤などから RA の病態に関与していることが推測されるが、集団としての表現型、対応抗原などの説明はなされていない。

従来から TCR 解析に使用されていたシングルセル解析はサンガー法によりシーケンスしており、配列情報が正確であり α 鎖と β 鎖との対応情報も得られるが、多様性に富む TCR レパトアについては部分的に評価するのが限界であった。一方、近年登場した次世代シーケンサー技術 (Next generation sequencing、以下 NGS) を応用することで網羅的な TCR 解析が可能となったが、発展途上の技術であり解決すべき問題点が複数存在する。解析前に PCR 増幅処置が必要となる場合があるが、PCR 増幅効率の差によりレパトア情報が歪むリスクがある。また、サンガー法に比してエラー率が高い。TCR は V-D-J recombination により理論的に 10^{15} の多様性が存在するが [24]、マッピングするための参照配列がないため、エラー配列と稀な配列とを厳密に区別することは不可能である。このように TCR レパトア解析をするうえで、シングルセル解析と NGS 解析はお互いに相補的な特徴を有する。

近年、シングルセルレベルでの遺伝子発現解析の報告が増えている。2007 年の Kurimoto 法に始まり [25]、多くの改良された解析方法が報告されている [26, 27]。他の遺伝子発現解析に比して対象となる RNA (cDNA) 量が 10pg 以下と微量であるた

め解析前に相当数の PCR 増幅を要し、PCR 増幅に伴う確率論的影響、PCR 増幅効率の差による影響などがあるものの、卵細胞、幹細胞、神経細胞、腫瘍細胞などで信頼性の高いデータが得られている[25, 28-30]。クローナルな増殖傾向と相関する信頼できるマーカーは CD4 陽性 T 細胞では知られておらず、各クローンの増殖の程度を確認する確実な方法は TCR レパトア解析である。そのため、クローナルな増殖を認める T 細胞の遺伝子発現解析をするためには、TCR 配列と遺伝子発現をシングルセルレベルで並行して解析し、それらを集約的に解析する必要がある。TCR 解析から得られる増殖の程度や炎症の局所である関節への集簇に関する情報だけでなく、各クローンの遺伝子発現情報も併せて解析することで、RA の病態に関与する CD4 陽性 T 細胞の候補をより確実に同定できると考えられるが、この主旨の報告は現時点では認めない。

我々は RA の病態に関与する CD4 陽性 T 細胞を正確に同定することが、RA の病態生理の解明、新規自己抗原の同定へと繋がり、最終的には新規治療の開発の一助になると考えた。その目的を達成するには網羅的な TCR レパトア解析方法とシングルセルの遺伝子発現解析の系が必要と考え、実験を開始した。

方法

臨床検体

東大病院アレルギー・リウマチ内科、もしくは整形外科の外来に通院する RA 患者から 5 症例を選択した。各症例の臨床情報は健常人コントロール 5 名の情報と併せて Table1 に記す。発症から 10 年以上経過した症例を 4 例、数ヶ月以内に発症し治療開始前の早期 RA を 1 例認め、4 例から外科手術、もしくは関節穿刺の際に関節検体を回収した。尚、本実験における RA 患者の末梢血、関節検体の使用は東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会にて承認を受けている。

Table1 臨床情報の要約

A: 関節リウマチ症例

	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5
年齢/性別	60/女性	69/女性	61/女性	58/女性	53/女性
罹患期間(年)	37	31	18	25	0.2
圧痛関節数	5	ND	8	1	22
腫脹関節数	6	ND	2	3	20
PtGA[/100mm]	60	ND	27	48	60
EGA[/100mm]	60	ND	35	36	80
CRP[mg/dL]	3.84	0.34	0.32	0.32	8.34
ESR[mm/1hr]	102	ND	30	28	83
RF[U/mL]	248	149	24	41	410
CCP[U/mL]	16.6	100	194	ND	361
HLA-DRB1	0405/0101	0405/0405	0405/1502	ND	0405/0803
DAS28(CRP)	4.24	ND	3.32	2.68	6.47
DAS28(ESR)	6.02	ND	4.74	4.05	7.81
SDAI	17	ND	12.7	8.8	48
治療内容	ETN 50mg/週 mPSL 4mg	MTX 6mg/週	ETN 50mg/週 MTX 12.5mg/週 PSL 4mg	ETN 25mg/週 MTX 8mg/W	未治療
関節検体	肘 滑膜切除	ND	膝 全置換術	股関節 全置換術	膝 関節液

B: 健常人コントロール

	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5
年齢/性別	30/男性	30/男性	31/男性	31/男性	29/女性
既往歴	特記事項なし	特記事項なし	特記事項なし	特記事項なし	特記事項なし

A: 5名のRA患者の臨床情報。B: 5名の健常人コントロールの情報。

PtGA: patient global assessment、EGA: examiner global assessment、ESR: erythrocyte sedimentation rate、RF: rheumatoid factor、CCP: 抗 cyclic citrullinated peptide 抗体 (抗 CCP 抗体)、ETN: etanercept、mPSL: methylprednisolone、PSL: prednisolone、ND: no data。

フローサイトメーターによる解析とソーティング

シングルセル解析、NGS 解析用のサンプルは全てフローサイトメーターによるソーティングにより回収した。末梢血単核球 (peripheral blood mononucleated cell、以下 PBMC) の分離は Ficoll-Paque (GE Healthcare) による密度勾配遠心分離にて実施した。滑膜検体からの単核球の分離は、メスにて検体を細断化した後、スチール製メッシュとナイロン製メッシュ (70 μm) 上で磨り潰し細胞懸濁液を作成し、末梢血と同様に Ficoll-Paque による密度勾配遠心分離にて実施した。PBMC のフローサイトメーター解析用の染色は、CXCR5-FITC (clone: RF8B2, BD Pharmingen)、CXCR3-PE (clone: 1C6, BD Pharmingen)、CD4-PerCP-Cy5.5 (clone: OKT4, Biolegend)、CD3-PE-Cy7 (clone: VCHT1, Biolegend)、CCR6-APC (clone: 11A9, BD Pharmingen)、CD45RO-APC-Cy7 (clone: UCHL1, BD Pharmingen) を用いて染色した。関節由来の単核球の染色は、7-AAD、CD3-PE-Cy7、CD4-APC、CD45RO-APC-Cy7 を用いて染色した。フローサイトメーター解析、ソーティングは MoFlo XDP (Beckman Coulter) を用いた。メモリーCD4 陽性 T 細胞は $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+$ にて、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞は $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD45RO}^-$ にて定義してソーティングした。PBMC 中の濾胞性ヘルパー T 細胞 (follicular helper T cell、以下 Tfh)、Th1、Th2 のソーティングに関しては Figure6A を参照。NGS による TCR 解析用にソートした細胞数は Table2 にまとめて記載した。

Table2 NGS による TCR レパトア解析を実施した細胞数 ($\times 10^4$ 細胞)

	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5
CD45RO+	10	10	35	10	18	10	10	67	74	42
CD45RO-	10	10	100	10	20	10	10	77	64	60
Tfh	10	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Th1	5	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Th17	6	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Others	10	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

FACS によるソーティングにて各サブセットを表記の細胞数だけ回収した。ND : no data。

シングルセル解析

シングルセル解析におけるサンプルの調整方法の概要を Figure 1 に示し、シングルセルソーティングした細胞数を Table3 に記載した。シングルセル解析は全般に Kurimoto 法とほぼ同様の方法で実施した[25]。10×PCR buffer II (Applied Biosystems) 0.45μL、MgCl₂ (Applied Biosystems) 0.27μL、NP40 (5%) 0.45μL、DTT (0.1M) 0.225μL、RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega) 0.045μL、QIAGEN RNase Inhibitor 0.045μL (Qiagen)、V1(dT)24 primer (10ng/μL) 0.09μL、dNTP mix (2.5mM each, Takara) 0.09μL、nuclease free water 3.335μL を混合した細胞溶解バッファー (合計 5μL) を PCR チューブ (200μL) に分注し各シングルセルをフローサイトメーターにて直接ソーティングした。70°C90 秒にて細胞溶解と RNA の変性を行った後、SuperScriptIII (Invitrogen) 0.2μL、RNasin® Plus RNase Inhibitor 0.033μL、T4 gene 32 protein (Roche) 0.067μL を各チューブに加え、50°C50 分にて逆転写反応を行い、70°C10 分にて酵素の不活性化を行った。逆転写の反応時間は原法では 5 分あったが、TCRβ 鎖の 3'側で cDNA 合成が早期に終了してしまうことがあったため、反応時間を 5 分から 50 分に延長したところ十分な cDNA の伸長が認められた。次に、10×exonuclease I buffer (Takara) 0.1μL、nuclease free water 0.8μL、Exonuclease I (Takara) 0.1μL を加え、37°C30 分で余剰な逆転写プライマーを分解し、80°C25 分で酵素の不活性化を行った。次に、10×PCR buffer II 0.6μL、MgCl₂ 0.36μL、ATP (100 mM, Roche) 0.18μL、RNaseH (Invitrogen) 0.3μL、TdT (Invitrogen) 0.3μL を加え、37°C15 分で cDNA の 3' 側をポリアダニル化し、70°C

10分で酵素の不活性化を行った。次に、10×ExTaq buffer (Takara) 7.6μL、dNTP mix 7.6μL、V3(dT)24 primer (1μg/μL) 1.52μL、nuclease free water 58.52μL、ExTaq Hot Start Version (Takara) 0.76μLを混合し新しいPCRチューブ(200μL)4本に19μLずつ分注し、上記のcDNAを3μLずつ加え、95°C3分→50°C2分→72°C3分で1サイクル反応させた(cDNAの2nd strand合成)。次に、10×ExTaq buffer 7.6μL、dNTP mix 7.6μL、V1(dT)24 primer (1μg/μL) 1.52μL、nuclease free water 58.52μL、ExTaq Hot Start Version 0.76μLを混合し19μLずつ各チューブに加え、95°C30秒→67°C1分→72°C3分で20サイクルPCR反応させた後、PCR産物を精製した(QiaQuick PCR purification kit, Qiagen)。微量サンプルからのPCR増幅における確率論的影響を減らすため、最初の20サイクルのPCR増幅は1細胞あたりのcDNAを4分割し、それぞれを鋳型として独立して実施し、反応後の産物を混合している。ここで精製されたものを1st PCR産物として保管し、以降の反応系で使用した。

TCR解析用のサンプルは、上記の1st PCR産物0.5μLを鋳型とし、機能性のTRBV遺伝子を全て網羅するように設計されたフォワードプライマー (“V_beta_common”で表記された23個のプライマー、各100μM)と[31]、TRBC内のリバープライマー(C_beta_332、100μM)を各0.2μL、10×ExTaq buffer 5μL、dNTP mix 4μL、nuclease free water 33.3μL、ExTaq Hot Start Version 0.5μLを混合し、95°C2分、95°C30秒→60°C1分→72°C1分で50サイクルのマルチプレックスPCRを実施し、1.5%ア

ガロースゲル上の電気泳動にて目的の PCR 産物 (550bp 前後) を分離・精製した (QiaQiuck gel extraction kit, Qiagen)。

NGS を用いた網羅的なトランスクリプトーム解析は RNA sequencing (以下、RNA-Seq) と表現されることが多い。RNA-Seq 用のサンプルも Kurimoto 法の原本に基づき調整した。上記の 1st PCR 産物 0.63 μ L を鋳型とし、10 \times ExTaq buffer 5 μ L、dNTP mix 5 μ L、T7V1 primer (1 μ g/ μ L) 1 μ L、V3(dT)24 primer (1 μ g/ μ L) 1 μ L、nuclease free water 36.87 μ L、ExTaq Hot Start Version 0.76 μ L を混合し、95 $^{\circ}$ C 5 分 \rightarrow 64 $^{\circ}$ C 1 分 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 5 分 18 秒で 1 サイクル反応させた後、95 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 67 $^{\circ}$ C 1 分 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 5 分 18 秒で 8 サイクル PCR 反応させ、PCR 産物を精製後、2%アガロースゲル上の電気泳動にて 200bp 以上の目的の PCR 産物を分離・精製した (QiaQuick PCR purification kit, QiaQiuck gel extraction kit)。原法ではこの段階で PCR 増幅を終了しているが、我々のサンプルでは RNA-Seq を実施するために必要な DNA 量に至らず、更に 40cycle の PCR 増幅を要した。原法で使用していたマウス由来の ES 細胞に比して我々が解析したヒトの CD4 陽性 T 細胞内の mRNA の含有総量が少なく、mRNA の増幅効率が大幅に低下したことに起因すると考えた。

リアルタイム PCR は上記の 1st PCR 産物 0.5 μ L を鋳型とし各遺伝子特異的プライマーを用いて実施した (QuantiTect SYBR Green PCR Kits、Qiagen)。使用したプライマー配列は Table4 にまとめて記した。

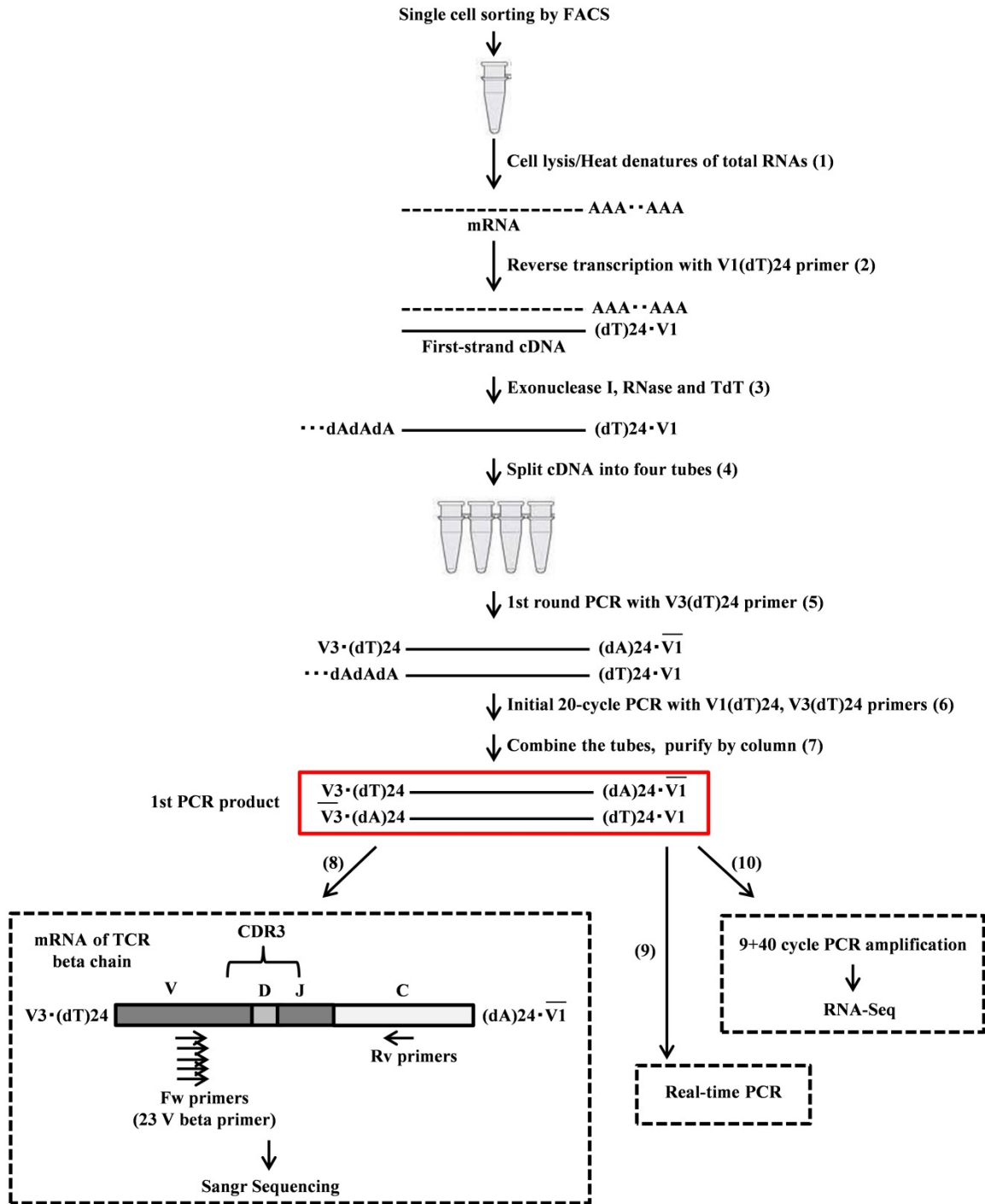


Fig 1 シングルセル解析におけるサンプル調整方法

(1) : 細胞溶解液に単細胞を直接ソーティングし細胞溶解する。(2) : 逆転写反応液を加えて逆転写反応を行う。(3) : TdTにて cDNA の 3'端に poly A を付加する。(4) : cDNA を 4 分割しそれぞれ独立して PCR 反応 (5, 6, 7) を行う。(5) : 1 サイクルの PCR にて cDNA を 2 本鎖にする。(6) : 20 サイクルの PCR を行う。(7) : 4 分割して行った PCR 産物を混合する。(8) : TCR レパトア解析用のプロトコル。(9) : Real-time PCR 用のプロトコル。(10) : 遺伝子発現解析用のプロトコル

Table3 シングルセル解析を実施した細胞数と効率

	RA1				RA2			RA3	RA4	RA5	Total
	PBMC	PBMC	PBMC	SM	PBMC	PBMC	PBMC	SM	SM	SF	
	1	2	3		1	2	3				
Sorted cell count	102	34	34	23	85	51	34	17	17	17	414
Productive PCR	92 (90.1%)	30 (88.2%)	24 (70.5%)	21 (91.3%)	75 (88.2%)	42 (82.3%)	28 (82.3%)	16 (94.1%)	11 (64.7%)	16 (94.1%)	355 (85.7%)
Successful secuencing	81 (79.4%)	30 (88.2%)	22 (64.7%)	21 (91.3%)	68 (80%)	37 (72.5%)	28 (82.3%)	16 (94.1%)	11 (64.7%)	15 (88.2%)	329 (79.4%)

シングルセルソーティングした細胞数 (sorted cell count)、シングルセル解析において TCR β 鎖を PCR 増幅できた細胞数 (productive PCR)、シングルセル解析において TCR β 鎖を PCR 増幅しシーケンシングまで実施できた細胞数 (successful sequencing)、を各症例に分けて記載した。括弧内はソーティングした細胞数中の割合 (%)。SM : synovial membrane、SF : synovial fluid。

Table4 プライマー配列

Name	Sequence(5'-3')
V1_dT_24	ATATGGATCCGGCGCGCCGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
V3_dT_24	ATATCTCGAGGGCGCGCCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
T7-V1	GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGATATGGA TCCGGCGCGCCGTCGAC
V_beta_common_2	AACTATGTTTTGGTATCGTCA
V_beta_common_4	CACGATGTTCTGGTACCGTCAGCA
V_beta_common_5/1	CAGTGTGTCCTGGTACCAACAG
V_beta_common_6a11	AACCCTTTATTGGTACCGACA
V_beta_common_6a25	ATCCCTTTTTTGGTACCAACAG
V_beta_common_6c	AACCCTTTATTGGTATCAACAG
V_beta_common_7	CGCTATGTATTGGTACAAGCA
V_beta_common_8a	CTCCCGTTTTCTGGTACAGACAGAC
V_beta_common_9	CGCTATGTATTGGTATAAACAG
V_beta_common_10	TTATGTTTACTGGTATCGTAAGAAGC
V_beta_common_11	CAAAATGTAAGTGGTATCAACAA
V_beta_common_12a	ATACATGTAAGTGGTATCGACAAGAC
V_beta_common_13b	GGCCATGTAAGTGGTATAGACAAG
V_beta_common_13c	GTATATGTCCTGGTATCGACAAGA
V_beta_common_16	TAACCTTTATTGGTATCGACGTGT
V_beta_common_17	GGCCATGTAAGTGGTACCGACA
V_beta_common_18	TCATGTTTACTGGTATCGGCAG
V_beta_common_19	TTATGTTTATTGGTATCAACAGAATCA
V_beta_common_20	CAACCTATACTGGTACCGACA
V_beta_common_21	TACCCTTTACTGGTACCGGCAG
V_beta_common_22	ATACTTCTATTGGTACAGACAAATCT
V_beta_common_23	CACGGTCTACTGGTACCAGCA
V_beta_common_24	CGTCATGTAAGTGGTACCAGCA
C_beta_332	TGGGTCCACTCGTCATTCTCC
hTCR-CA-R2.2	TCAGGCAGTGACAAGCAGCAATAAGGGAAC
hTCR-CB1-R3.2	CCATGACGGGTTAGAAGCTCCTAACTCC
hTCR-CB2-R3	CTGGGATGGTTTTGGAGCTA
Oligo de-adaptor2	ACAGCAGGTCAGTCAAGCAGTAGCAGCAGTTCGATAACATCCCCC CCCCCDN
hTCR-CA-R7	TCTCAGCTGGACCACAGCCGCAGCGTCA
hTCR-CB1-R9	VVGRAATCCTTTCTCTTGACCATGGCCATCA
AP2	AGCAGTAGCAGCAGTTCGATAA
TRBC_HTS_3	CGACCTCGGGTGGGAACA
ACTB_Fw	TCCTGTGGCATCCACGAAACT
ACTB_Rv	GAAGCATTGCGGTGGACGAT
CXCR4_Fw	AACATTCCAGAGCGTGTAGT
CXCR4_Rv	CTATACCACTTTGGGCTTTG
FoxP3_Fw	TATCTCACGCATATGCACAC
FoxP3_Rv	CTTGGATCCCAAATAAATGA
GATA3_Fw	AGGGTCTCTAGTGCTGTGAA
GATA3_Rv	GTGAAAGGAAACAAAAGTGG
RORA_Fw	TGTGGACGACATACAGAAAA
RORA_Rv	GCAGGGCCATATAAAGTGT
TBX21_Fw	TAATCCCTGATCCAAAAGA
TBX21_Rv	CACAACCACCACAAACAATA

NGS による TCR 解析用のサンプル調整

Figure 2 に概要を図示したように既報のプロトコルを一部改変して実施した [32]。フローサイトメーターにてソートされた細胞から全 RNA を 11 μ L の nuclease free water で抽出し (RNeasy Micro kit, Qiagen)、dNTP mix 1 μ L、hTCR-CA-R2.2、hTCR-CB1-R3.2、hTCR-CB2-R3 (TRAC、TRBC に特異的なプライマー、10 μ M) 各 0.33 μ L を加え、65 $^{\circ}$ C 5 分で加熱し冷却後、RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 1 μ L、SuperScriptIII 1 μ L、DTT 1 μ L、5 \times FS buffer(Promega) 4 μ L を混合し 54 $^{\circ}$ C 60 分反応させ cDNA を合成し、85 $^{\circ}$ C 5 分にて酵素を不活性化した。次に RNaseH 1 μ L を加え 37 $^{\circ}$ C 20 分にて RNA を分解した後、cDNA を精製し 30 μ L の nuclease free water に抽出し (QiaQuick PCR purification kit, Qiagen)、94 $^{\circ}$ C 3 分で加熱し冷却し、全量に 10 \times TdT buffer(Invitrogen) 7.75 μ L、dGTP(10mM, Takara) 0.5 μ L、TdT 1 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C 60 分にて cDNA の 3' 側をポリグアニル化し、65 $^{\circ}$ C 10 分にて酵素を不活性化した。次に行う PCR 増幅は前半、後半に分かれるが、PCR 増幅における確率論的影響を減らすため前半の反応は cDNA を 4 分した 9 μ L を鋳型とし、100 μ M の Oligo dc-adaptor2 (ポリグアニル酸領域に結合するフォワードプライマー)、hTCR-CA-R7、hTCR-CB1-R9 (TRAC、TRBC に特異的なリバープライマー) を各 0.1 μ L、PrimeStarGXL (Takara) 1 μ L、5 \times buffer 10 μ L、dNTP 4 μ L、nuclease free water 26 μ L を混合し、96 $^{\circ}$ C 2 分、96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 2 分を 3 サイクル、96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 69 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒を 3 サイクル、96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 66 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒を 3 サイクル、96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 63 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒を 16 サイクルにてタッチ

ダウン PCR を行った。次に、4 分割して行った PCR 産物を混合し、nuclease free water にて 20 倍希釈したものを 1 μ L 鋳型として使用し、100 μ M の AP2 (前半の PCR 反応で用いたプライマーの Oligo dc-adaptor2 領域に結合するフォワードプライマー)、TRBC_HTS_3 (TRBC に特異的なリバースプライマー) を各 0.1 μ L、PrimeStarGXL 1 μ L、5 \times buffer 10 μ L、dNTP 4 μ L、nuclease free water 33 μ L を混合し、96 $^{\circ}$ C 2 分、96 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 63 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 分を 18 サイクルにて PCR 増幅し、PCR 産物を精製した (QiaQuick PCR purification kit)。

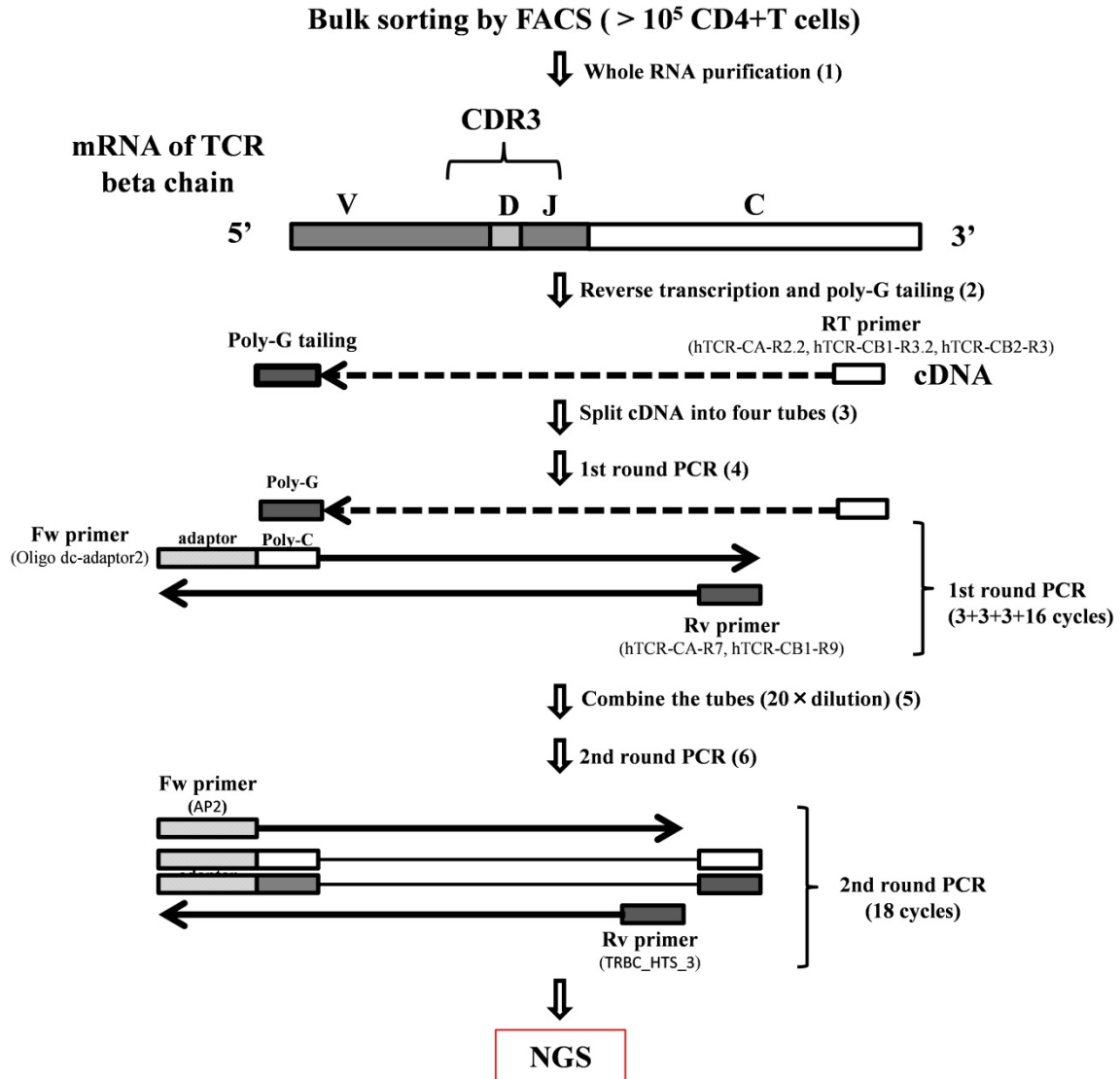


Fig 2 NGS による TCR レパトア解析用の PCR サンプル調整方法

(1) : total RNA の精製を行う。(2) : C 領域に特異的なプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA の 3' 端に poly-G を付加する。(3) : cDNA を 4 分割して以後の 1st PCR をそれぞれ独立して行う。(4) : 合計 25 サイクルの 1st PCR を行う。(5) : 4 分割して行った 1st PCR 産物を混合する。(6) : 18 サイクルの 2nd PCR を行う。

TCR 配列解析

TCR の complementarity-determining region 3 (以下、CDR3) は V-D-J 遺伝子組換えにより生じる高度に多様な領域であり、各 T 細胞クローンは CDR3 配列にて区別できる。また、TCR は α 鎖、 β 鎖から構成されるが、 β 鎖は α 鎖より厳密な allelic exclusion があるため、TCR 配列情報からクローナルな増殖の程度を評価するには β 鎖の CDR3 解析が妥当と考えた。シングルセル由来の TCR 解析用の PCR 産物はサンガー法にてシーケンシングし (オペロンバイオテクノロジー株式会社に依頼)、TCR β 鎖の CDR3 領域の配列を得た。IMGT (the international ImMunoGeneTics、<http://www.imgt.org>) は免疫遺伝学に関するデータベースや、TCR 配列の解析ツールを公開している。本研究では TCR を構成する各遺伝子の分類、表記方法、CDR3 などの領域の定義は全て IMGT のデータベースに従った。シングルセル解析では IMGT/V-QUEST[33]を、NGS では IMGT/HighV-QUEST[34]を用いて解析した。IMGT/HighV-QUEST では TCR 領域を認識できなかったリードは”No results”、TRBV 領域のみにマッピングされ CDR3 が認識されなかったリードは”unkown”、CDR3 領域内に終始コドンやフレームシフトを認められたものを”unproductive”、CDR3 領域に終始コドンやフレームシフトを認めなかったものを”productive”に、CDR3 の機能性にに基づき全リードが 4 群に分類される。我々は”productive”に分類された機能性の CDR3 配列を含むリードだけを抽出し、解析に用いた。

次世代シーケンサー

TCR 解析と RNA-Seq のサンプルは超音波細断し (Covaris S2)、400bp 用のライブラリー調整キット、318 v2 chip を使用し Ion PGM (Applied Biosystems) にて解析した。Quality value の低いリード (Phred quality score < 20)、アダプター配列、プライマー配列のトリミング、RNA-Seq におけるデータの標準化、レファレンスへのマッピングは CLC Genomics Workbench (CLC bio) にて行った。マッピングのレファレンスは Ensembl GRCh37.72 を使用した。

統計

リード数の 2 群間の比較、Gini 係数の比較は T test を使用した。リアルタイム PCR の結果の比較は Mann-Whitney U test を用いた。アノテーションのタイトルの集積は hypergeometric test にて解析した。Heat map の作図、Gini 係数の解析は R(version3.0.2)を用いた。有意水準を 5%とした。

結果

RA 患者の末梢血中には特定のメモリーCD4陽性T細胞クローンが持続的に増殖している

RA の末梢血における CD4 陽性 T 細胞の TCR のレパトアに関しては不明な点が多い。本解析の最終的目標が RA の病態に關与する CD4 陽性 T 細胞クローンを同定することであり、該当する T 細胞クローンは抗原感作された CD4 陽性 CD45RO 陽性のメモリー細胞分画に存在しクローナルな増殖傾向が強いと考え、この分画を本研究の対象とした。最も信頼性の高い TCR レパトア解析による T 細胞のクローナリティの評価方法はシングルセル解析である。本研究のシングルセル解析では Table3 に示したように対象細胞数は 100 細胞程度と比較的少数であるため、2 細胞以上で同一の TCR 配列が確認された場合にクローナルな増殖傾向の強い T 細胞クローン (expanded clone、以下 EC) と定義した。

我々は 2 名の RA 患者の末梢血を数ヶ月の間隔で各合計 3 回採取し、シングルセル解析による TCR 解析を繰り返した (RA1 : Table5、RA2 : Table6)。解析細胞数は各症例合計 100 細胞以上で、TCR の CDR3 同定率は 8 割程度であり (Table3)、EC の評価は可能だと考えた。検出された EC の TCR β 鎖の配列情報を Table7 に示した。クローンの ID は "Cx.y" と表記し、x は患者 ID 番号、y はクローナルな増殖の強い順の番号、とした (具体的には RA2 から得られたクローンはクローナルな増殖

の強い順に C2.1、C2.2、C2.3 のように表記する)。これらの EC は約 6 ヶ月間持続的に高頻度で認められた(Figure 3)。RA 患者の末梢血中には複数のメモリーCD4 陽性 T 細胞の EC が定常的に存在することが確認された。

Table5 シングルセル TCR 解析結果 (RA1、PBMC)

ID	QV	TRBV	TRBJ	CDR3	ID	QV	TRBV	TRBJ	CDR3
1	>20	3-1	1-1	ASSQGGATEAF	51	>20	12-3	1-6	ASSSFGNSPLH
2	>20	4-2	1-1	ASSQMGQGSTEAF	52	>20	12-3	2-1	ASSLGGGSTWSYNEQF
3	>20	4-2	1-2	ASSPAGTGGNYGYT	53	>20	12-3	2-3	ASSLEGSQDTQY
4	>20	5-1	2-1	ASSAGTSAGNEQF	54	>20	12-3	2-3	ASSLEGSQDTQY
5	>20	5-1	2-7	ASSPSYEQY	55	>20	12-3	2-7	ASSLGLDSYEQY
6	>20	5-1	2-7	ASSFKGTGEQY	56	>20	14	2-3	ASSQAADTQY
7	>20	5-4	1-2	ASSLHQGADYGYT	57	>20	15	1-2	ATSRNRPDGYT
8	>20	5-4	2-7	ASSLVGSSDEQY	58	>20	15	2-1	ATSRDPWSGRANEQF
9	>20	5-5	1-5	ASSLLLNNQPQH	59	>20	15	2-7	ATSRETGTAYEQY
10	>20	5-6	2-5	ASSFLRGEETQY	60	>20	18	1-5	ASSPTGSGDQPQH
11	>20	5-8	2-1	ASSSEGGLAYSEQF	61	>20	18	2-1	ASSPPASANNEQF
12	>20	6-1	1-2	ASRGTGLNGYT	62	>20	19	1-2	ASRTGGGSGYT
13	>20	6-1	2-7	ASKGRVSSGDSYEQY	63	>20	19	1-3	ASGTGSGNTIY
14	>20	6-1	2-7	ASSGQGTGTSGSTLREQY	64	>20	19	2-1	ASHRGGIYNEQF
15	>20	6-2	1-2	ASSWEINYGYT	65	>20	19	2-2	ASSTDSYSGTGELF
16	>20	6-2	1-5	ASSYSGQGAYSNQPH	66	>20	19	2-5	ASSKQSQETQY
17	>20	6-4	2-3	ASSPGAGTDTQY	67	>20	19	2-5	ASKKEQGGTQY
18	>20	6-5	1-1	ASSNQPGGAF	68	>20	19	2-5	ASSMGTYQETQY
19	>20	6-5	1-1	ASSRGTARDTEAF	69	>20	19	2-7	ASSVFPSSYEQY
20	>20	6-5	2-2	ASSRAESGELF	70	>20	20-1	1-1	SAYRGEIWNTEAF
21	>20	6-5	2-7	ASSRYTQGAYEQY	71	>20	20-1	1-5	SARDYGTGNQPQH
22	>20	6-5	2-7	ASSYSRTSGRIGYEQY	72	>20	20-1	1-5	SARPRGTAYNQPH
23	>20	6-6	2-4	ASSYSRAGGQNIQY	73	>20	24-1	2-3	ATSDLADTQY
24	>20	7-2	1-2	ASSARYGYT	74	>20	25-1	1-2	ASSEYGGYT
25	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	75	>20	27	2-1	ASSPRTGVHNEQF
26	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	76	>20	28	1-1	ASSFYLGEAF
27	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	77	>20	28	1-1	ASQLVDTEAF
28	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	78	>20	28	2-3	ASSWTSGPSPTQY
29	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	79	>20	28	2-7	ASRSGTSHEQY
30	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	80	>20	29-1	2-1	SGKTYNEQF
31	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	81	>20	29-1	2-3	SARTTGPASTDTQY
32	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	82	dual	ND	ND	ND
33	>20	7-2	2-1	ASSQANSEQF	83	dual	ND	ND	ND
34	>20	7-2	2-7	ASSLRGLAGSEQY	84	dual	ND	ND	ND
35	>20	7-3	2-7	ASSLDRAIEQY	85	dual	ND	ND	ND
36	>20	7-3	2-7	ASSLPPASRVRDGSSYEQY	86	dual	ND	ND	ND
37	>20	7-6	1-2	ASSLGRGKGYT	87	dual	ND	ND	ND
38	>20	7-8	1-1	ASSPHSSRNTEAF	88	dual	ND	ND	ND
39	>20	7-8	2-3	ASSLVIGGDTQY	89	dual	ND	ND	ND
40	>20	7-8	2-5	ASSPKSGGPQETQY	90	<20	ND	ND	ND
41	>20	7-9	2-3	ASSPADTQY	91	<20	ND	ND	ND
42	>20	9	2-1	ASSAQGASSGNEQF	92	<20	ND	ND	ND
43	>20	10-2	1-2	ASSESPRVSGYT	93-102				No band
44	>20	10-2	2-1	ASREGQGYEQF					
45	>20	10-3	1-2	AISEKTNYGYT					
46	>20	11-1	2-3	ASSLALGGATDTQY					
47	>20	11-2	2-5	ASSLEAMETQY					
48	>20	11-2	2-7	ASSSLRSPHEQY					
49	>20	11-2	2-7	ASSLMGVAGSSYEQY					
50	>20	11-3	2-2	ASSPEGSGGELF					

RA 患者 (RA1) の末梢血由来の CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞のシングルセル解析結果。3 回実施したシングルセル解析のうち代表的な結果を示す。QV(quality value) : CDR3 配列のシーケンシングにおける quality value。Dual : ダイターミネーター法によるシーケンシング波形データが TRBC 領域は単波形であったが、V 領域では 2 重に認められた細胞。ND : TCR β 鎖の PCR は成功したが、PCR 産物のシーケンシングが解析不能だった細胞。No band : TCR β 鎖の PCR が失敗した細胞。TRBV、TRBJ の遺伝子名は IMGT の database を参考にした。増殖傾向を認めた T 細胞クローンに網枠で囲った。

Table6 シングルセル TCR 解析結果 (RA2、PBMC)

Table6 シングルセルTCR解析結果 (RA2、PBMC)

ID	QV	TRBV	TRBJ	CDR3	ID	QV	TRBV	TRBJ	CDR3
1	>20	2	1-6	ASREDSFN SPLH	51	>20	20-1	1-1	SATDRDRGTGTEAF
2	>20	2	2-2	ASRTSTSGTG GELF	52	>20	20-1	1-2	SPLRAGDFHGYT
3	>20	3-1	1-2	ASSRGTGPPNYGYT	53	>20	20-1	1-6	SALKANSPLH
4	>20	3-1	1-4	ASSRRTGNEKLF	54	>20	20-1	2-1	SATDRGWNEQF
5	>20	3-1	2-2	ASSQVEGAGELF	55	>20	20-1	2-2	SARVSGGRLGTGELF
6	>20	3-1	2-3	ASSHQKDTQY	56	>20	20-1	2-7	SARDVRS GSSYEQY
7	>20	5-1	1-2	ASSLDGKGYT	57	>20	24-1	2-1	ATSDGTS GRRDEQF
8	>20	5-1	1-4	ASSLGREENEKLF	58	>20	27	2-5	ASSSLNQETQY
9	>20	5-1	2-7	ASRPVGTGAHEQY	59	>20	27	2-5	ASSPGQGRRETQY
10	>20	5-4	2-1	ASSLAGGNEQF	60	>20	28	1-1	ASSLPQGTTEAF
11	>20	5-4	2-3	ATRS GSSLDTQY	61	>20	28	1-2	ASRPPN NYGYT
12	>20	5-4	2-5	ATGQGETQY	62	>20	28	1-2	ASRLGQGFAYGYT
13	>20	5-6	1-6	ASSSEQGAANSPLH	63	>20	28	2-1	ASSFPTGG SFGGSYNEQF
14	>20	5-6	2-1	ASSPPLAGEKQF	64	>20	28	2-3	ASSFIRTS GISTDTQY
15	>20	5-6	2-4	ASSPGLAKNIQY	65	>20	29-1	2-2	SGRSGNTGELF
16	>20	6-1	1-3	ASSIGQGVSGNTIY	66	>20	29-1	2-3	SVSGQGPDTQY
17	>20	6-1	2-1	ASSESGARYNEQF	67	>20	30	2-3	GLGASTDTQY
18	>20	6-1	2-5	ASRTGDEQETQY	68	>20	30	2-7	AWSVSRGLPYEQY
19	>20	6-5	2-1	ASSYRRPSSYNEQF	69	dual	ND	ND	ND
20	>20	6-5	2-1	ASSYRRPSSYNEQF	73	dual	ND	ND	ND
21	>20	6-5	2-1	ASSYRRPSSYNEQF	74	dual	ND	ND	ND
22	>20	6-5	2-7	ASSYSRPFYEQY	70	<20	ND	ND	ND
23	>20	7-9	2-1	ASSLGT RSFF	71	<20	ND	ND	ND
24	>20	11-2	2-5	ASSFAGGNPGETQY	72	<20	ND	ND	ND
25	>20	11-2	2-7	ASSLRGGRYEQY	75	<20	ND	ND	ND
26	>20	12-3	1-2	ASNLQGAGYT	76-85				No band
27	>20	12-3	1-6	ASTGGNSPLH					
28	>20	12-3	1-6	ASSWASGTEGSPLH					
29	>20	12-3	2-2	ASRGGNTGELF					
30	>20	15	2-1	ATSREGGRPSEQF					
31	>20	15	2-1	ATSRGLAVGVEQF					
32	>20	15	2-7	ATSRGLSGFAVEQY					
33	>20	16	1-2	ASSQAGIGYT					
34	>20	16	1-2	ASSQAGIGYT					
35	>20	16	1-2	ASSQAGIGYT					
36	>20	16	1-2	ASSQAGIGYT					
37	>20	16	1-2	ASSQAGIGYT					
38	>20	16	1-2	ASSQAGIGYT					
39	>20	18	1-1	ASSPPTADTEAF					
40	>20	18	1-4	ASSPGQGEKLF					
41	>20	18	1-4	ASSPGQGEKLF					
42	>20	18	1-4	ASSPGQGEKLF					
43	>20	18	1-4	ASSPGQGEKLF					
44	>20	18	1-5	ASSPTGGNNQPQH					
45	>20	18	2-1	ASSRTSGTSVDEQF					
46	>20	18	2-5	ASSQAGGPETQY					
47	>20	18	2-7	ASSPNSGYSSYEQY					
48	>20	19	1-2	ASSISANPTRTGDGYT					
49	>20	19	1-5	ASSRPGQRNQPQH					
50	>20	19	2-2	SRRGGQGAITGELF					

RA 患者 (RA2) の末梢血由来の CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞のシングルセル解析結果。3 回実施したシングルセル解析のうち代表的な結果を示す。解説は Table5 を参照。

Table7 PBMC において増殖傾向の強いメモリーCD4 陽性 T 細胞クローン

Clone ID	TRBV	TRBJ	CDR3	Oct-2012	Dec-2012	Apr-2013
C1.1	7-2	1-5	ASSEANQPQH	9/34 (26.4%)	5/34 (14.7%)	8/102 (7.8%)
C2.1	16	1-2	ASSQAGIGYT	4/34 (11.7%)	6/51 (11.7%)	6/85 (7.0%)
C2.2	18	1-4	ASSPGQGEKLF	1/34 (2.9%)	0/51 (0%)	4/85 (4.7%)
C2.3	6-5	2-1	ASSYRRPSSYNEQF	0/34 (0%)	1/51 (1.9%)	3/85 (3.5%)
C2.4	28	1-1	ASSLPQGTTEAF	2/34 (5.8%)	2/51 (3.9%)	1/85 (1.1%)
C2.5	5-1	1-2	ASSLDGKGYT	0/34 (0%)	1/51 (1.9%)	1/85 (1.1%)

RA 患者 2 名 (RA1、RA2) の末梢血中の CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞をシングルセル解析し複数の解析から検出された T 細胞の TCR の配列情報 (TRBV、TRBJ の遺伝子名、CDR3 のアミノ酸配列) を示した。クローンの ID は "Cx.y" と表記し、x は患者 ID 番号、y はクローナルな増殖の強い順の番号、とした (具体的には RA2 から得られたクローンはクローナルな増殖の強い順に C2.1、C2.2、C2.3 のように表記する)。3 回の解析のうち、各クローンの細胞数と全解析細胞数を示し、その割合を括弧内に記載した。

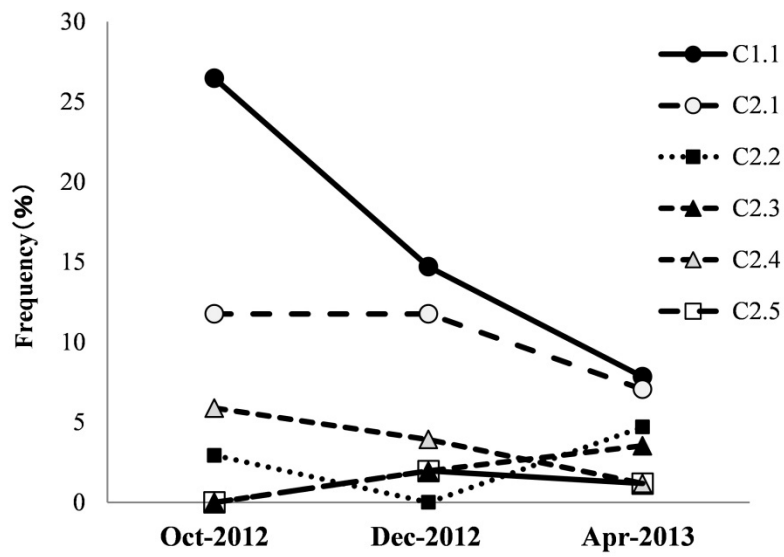


Fig 3 RA 患者の PBMC には特定のメモリーCD4 陽性 T 細胞クローンが持続的に増殖している

RA 患者 2 名 (RA1、RA2) の末梢血中の CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞を 2~3 ヶ月の間隔で各 3 回シングルセル解析し、クローナルな増殖傾向を示した T 細胞 (clone ID は Table7 と共通) の全ソート細胞中に占める頻度 (%) を示した。

NGS による TCR レパトア解析の妥当性の検討

近年、主に遺伝子発現解析、ゲノム解析の領域で NGS が頻繁に利用されるようになってきている。TCR レパトア解析に関しても、その膨大な多様性からハイスループットの実験系が理想であり、NGS を使用した報告は急速に増えている[35-39]。NGS の TCR レパトア解析において特に留意すべき点が、①解析前に実施する PCR 増幅による影響、②エラー配列と稀な配列との区別が原則不可能であること、である。フローサイトメーターから得られる TCR の V 領域の使用頻度や CDR3 領域のスペクトラタイピング解析結果が NGS 解析の妥当性の判断材料となっていることが多いが[40]、TCR レパトアを解析する際には CDR3 の配列や頻度が最も重要な要素であり、この情報を提供できるのは現時点ではシングルセル解析だけである。

まず、我々の NGS の解析系における CDR3 配列のエラー率の推定を行った。TCR β 鎖の TRBJ 遺伝子の FR4 領域[41]は VDJ 組換えにより影響されない領域で平均 30bp であり CDR3 と同程度の長さである。我々の解析系で得られたデータから各 TRBJ 遺伝子の配列を 1 万リード集めた場合、エラー率は 1.1~4.0%であった。また、我々と同じ Ion PGM のプラットフォームを利用した TCR レパトア解析の報告では CDR3 配列のエラー頻度は 3%程度と推定していた[42]。Ion PGM のプラットフォームにおけるシーケンスエラーの多くは insertion や deletion と考えられているため[43]、CDR3 解析においてはシーケンスエラーの多くはフレームシフトを生じ非機能性のアミノ酸配列を呈すると考えられる。我々は上述のように IMGT/HighV-QUEST に

て”productive”に分類され CDR3 が機能性のアミノ酸配列を持つ配列のみを抽出することでシーケンスエラーをある程度排除しているため、我々の CDR3 解析系におけるエラー率はこれらの頻度よりは低いと思われるが、参考になると考えた。

実際に 1 万リードの機能性の CDR3 配列を解析した際のアミノ酸配列の典型例を Table8 に示す。1701 リード検出されたクローンはシングルセル解析でも検出されたものである（クローン ID: C1.1）。このクローンの CDR3 アミノ酸配列と 1 ヶ所だけ異なる固有の配列が合計 12 配列（15 リード）検出された。これらがエラーに起因する配列か、真の稀な配列なのかを厳密に議論することは不可能であるが、上述の推定を参考にすると全てエラーである可能性はある（エラー率 0.88%）。NGS の TCR レパトア解析では種々のエラー補正方法が提唱されているが[39]、我々はエラー配列と稀な配列の区別ができない状況ではエラー補正により実際のレパトア情報が歪むリスクがあると考え、補正を行わなかった。

次に TCR レパトア解析における適切なリード数の設定を検討した。リード数が増加するに従いより低頻度のクローンが検出されるようになるが、一方でエラー配列によるデータの歪みが生じ易くなる。TCR レパトアを考えるうえで固有の CDR3 配列数は重要な指標であるが、Table8 で示したように多くのエラー由来の CDR3 配列は固有の配列で 1 リードであることが多い。Figure 4A はリード数の増加に伴う固有の CDR3 配列数の増加率を示したものである。灰色の網掛けで示されたように 3 万配列の近辺で、1 リードの増加あたり 0.03 個の固有な CDR3 配列数の増加（3%）が認

められる。この割合がエラーの出現頻度に近く、3万配列を超える辺りからエラーによる配列情報への影響が無視できなくなる。

次に2名のRA患者の末梢血のメモリーCD4陽性T細胞のTCRのNGS解析で得られた機能性のCDR3配列をそれぞれランダムに再抽出し、CDR3配列の一致率を計測した (Figure 4B)。また、TCRのNGS解析用のサンプルを別々にシーケンシングし、それぞれランダムに再抽出したデータ間のCDR3配列の一致率も同様に解析した (Figure 4B)。リード数が増加するに従いより多くのクローンが含まれ一致率が増加するが、リード数が更に増加するとエラー配列の割合が相対的に高くなり一致率が減少する。約1万配列近傍でデータ間の一致率は最高値になった。Figure 4A と Figure 4B の結果から、機能性のCDR3配列をランダムに再抽出し1万配列のみを解析に用いる方法が、CDR3の配列や頻度などの情報を正確に評価できると考え、以降の解析ではこの方法を採用した。

NGS解析結果の正当性の評価としてまず、同一採血検体をフローサイトメーター、NGSにより並行して評価し、TCRβ鎖のTRBV遺伝子の使用頻度を比較したところ、有意に強い相関関係を認めた (Figure 4C)。また、同一採血検体をシングルセル解析とNGSによって並行して評価し、共通して認められたクローンの全体に占める頻度を両解析間で比較したところ概ね同程度であり、有意に強い相関関係を認めた (Figure 4D)。以上よりNGSによるTCRレパトア解析の条件設定とその妥当性を実証し、特にECの評価ではシングルセル解析と相関することが確認された。

Table8 NGSによるTCRレパトア解析の具体例

Validated clone		Rare or incorrect clones			
CDR3	number of reads	CDR3	number of reads		
ASSSEANQPQH	1701	R SSSEANQPQH	1		
		V SSSEANQPQH	1		
		A CSSEANQPQH	1		
		A GSSEANQPQH	1		
		ASS P EANQPQH	1		
		ASSS K ANQPQH	1		
		ASSSE S NQPQH	1		
		ASSSE T NQPQH	2		
		ASSSE V NQPQH	1		
		ASSSEAN R PQH	2		
		ASSSEANQ S QH	2		
		ASSSEANQP Q Y	1		
		Total	1701	Total	15

TCR の NGS 解析の具体例を提示する。RA1 から 1×10^5 細胞のメモリーCD4 陽性 T 細胞を採取し、TCR の NGS 解析を実施し、1 万の機能性の CDR3 配列中（アミノ酸配列）で最も高頻度で認められる配列を表の左に示した。この配列はシングルセル解析にて確認されたものである。この配列と 1 アミノ酸だけ異なる CDR3 配列を全体から抽出し右に示した。

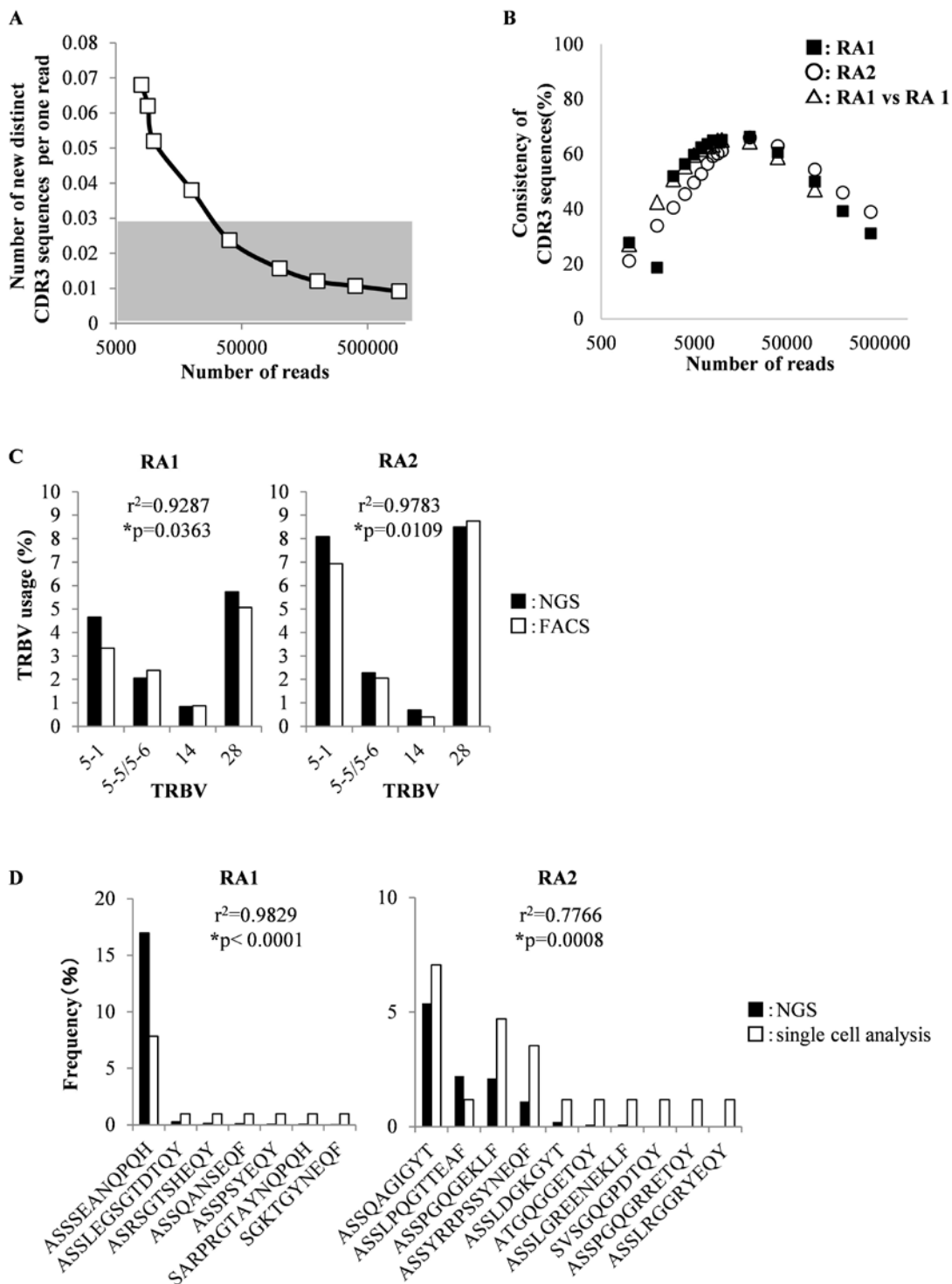


Fig 4 NGS による TCR レパトア解析の妥当性の検討

(A): TCR の NGS 解析に用いるリード数と 1 リードの増加あたりの固有の CDR3 配列の増加率をグラフ化した。CDR3 配列の増加率が 0.03 以下の領域（網掛け部分）ではエラー率が CDR3 配列の増加率を上回る可能性があり、TCR レパトアの全体像を評価するには不適切と思われる。

(B) : 2名のRA患者の末梢血のCD4陽性CD45RO陽性T細胞のTCRのNGS解析で得られた機能性のCDR3配列をそれぞれランダムに再抽出し、CDR3配列の一致率を計測した(■、○)。また、1名のRA患者の末梢血のCD4陽性CD45RO陽性T細胞のTCRのNGS解析用のサンプルを別々にシーケンシングし、それぞれランダムに再抽出したデータ間のCDR3配列の一致率を計測した(Δ)。

(C)-(D) : 2名のRA患者の末梢血のCD4陽性CD45RO陽性T細胞(同一採血検体由来)を用い、それぞれFACS解析、シングルセル解析、NGSによるTCR解析(機能性のCDR3配列をランダムに再抽出し1万リードを解析に使用した)を並行して実施した。

(C) : NGS解析で得られたTRBV遺伝子の使用頻度とFACSで得られた各TRBV領域の陽性頻度を比較し、ピアソンの相関係数を記載した。

(D) : シングルセルとNGSの両解析で共通して認められたクローンの全体に占める頻度を比較し、ピアソンの相関係数を記載した。

* : $p < 0.05$

RA 患者の PBMC ではメモリーCD4 陽性 T 細胞の EC が多く認められる

Figure 3 では RA 患者の末梢血中に特定の CD4 陽性 T 細胞クローンが持続的に増殖していることをシングルセル解析にて示したが、解析細胞数が 100 細胞程度であるため TCR レパトアの極一部の評価に留まり、健常人コントロールとの比較がなかった。そこで NGS によるハイスループットの系にて TCR レパトアを網羅的に評価し、健常人コントロールとの比較を行った (Figure 5)。TCR レパトアの比較方法は種々の報告があるが、我々は既報を参考に①高頻度 (0.1%以上) の CDR3 配列の配列数とリード数の総和、②各 CDR3 配列を頻度順に並べ各配列のリード数を総和したプロット図、③Gini 係数(各 CDR3 配列のリード数の分布の偏りを評価)を採用した[23, 44, 45]。RA のメモリーCD4 陽性 T 細胞では健常人コントロールに比して高頻度の CDR3 配列が多く認められ、全リードに占める割合も高いことが確認され (Figure 5A,B)、各 CDR3 配列のリード数の分布が大きく偏っていることが確認された (Figure 5C,D)。以上より、RA 患者の PBMC 中のメモリーCD4 陽性 T 細胞には健常人コントロールに比して、クローナルな増殖傾向を示す T 細胞クローンが多く含まれることが示唆された。

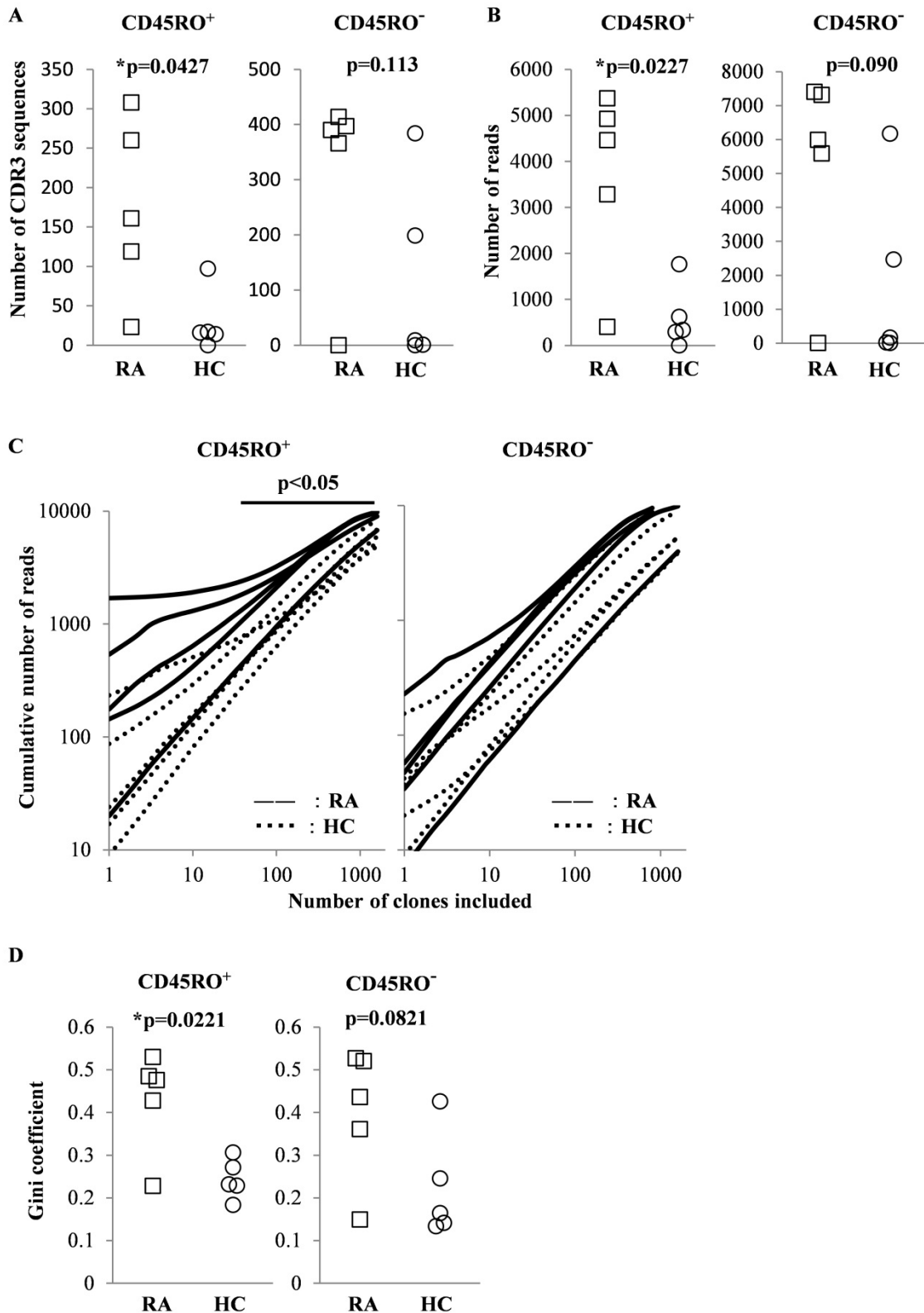


Fig 5 RA 患者の PBMC ではメモリー CD4 陽性 T 細胞の EC が多く認められる
 5 名の RA 患者と 5 名の健康人コントロールの末梢血の CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞、CD4 陽性 CD45RO 陰性 T 細胞を用いて NGS による TCR レパトア解析を行った。
 機能性の CDR3 配列をランダムに再抽出し 1 万リードを解析に使用した。

- (A) : 高頻度 (0.1%以上) で検出された CDR3 配列の配列数。
- (B) : 高頻度 (0.1%以上) で検出された CDR3 配列のリード数の総和。
- (C) : 各 CDR3 配列を頻度順に並べ(X 軸)、リード数の総和を計測し(Y 軸)、プロットした。プロットラインが上側にあるほど、高頻度の CDR3 配列を多く含むことを意味する。
- (D) : 各 CDR3 配列のリード数の分布の Gini 係数を計測した。Gini 係数は 0 に近いほど均等に分布し、1 に近いほど偏った分布であることを意味する統計指標である。
- * : $p < 0.05$

RA 患者の PBMC では Th1 と Th17 のクローナルな増殖傾向が強い

近年、免疫学の分野ではメモリーCD4 陽性 T 細胞は更に細かく分類され議論されるようになってきている[46]。我々はメモリーCD4 陽性 T 細胞を更に細胞表面マーカーにより Tfh、Th1、Th17 の3分画に分類し(Figure 6A)、NGS による TCR レパトア解析を実施した。2名の RA 患者のシングルセル解析にて検出された EC に注目し (Table 7)、これらの EC が各分画で占められる割合を比較した (Figure 6B)。分画間を公平に比較するため、各分画のリード数はその分画のメモリーCD4 陽性 T 細胞に占める割合で補正した。具体的には Tfh がメモリーCD4 陽性細胞の 25% を占め特定の CDR3 配列が Tfh 分画に 100 リード検出されたときは、 $100 \times 0.25 = 25$ リード、のように補正している。ほぼ全ての EC は Th1、Th17 の順で多く検出され (C2.2 のみ Th17 > Th1)、Tfh に認められるのは極一部のみであった。

PBMC 中の EC が Th1 に偏っていることを別の手法で再確認するため、PBMC 中の C1.1 と C2.1 における TBX21 の発現をシングルセル解析によるリアルタイム PCR にて確認した (Figure 6C)。約 4 割の C1.1、約 7 割の C2.1 で TBX21 の発現が確認された。TBX21 は Th1 の調整因子として重要な遺伝子であることから、C1.1 と C2.1 は Th1 型の表現型を持つことが予想される。

各分画のクローナルな増殖の程度を Gini 係数を用いて評価したところ Th1 と Th17 で高く、クローナルな増殖傾向が強いことが示唆された(Figure 6D)。

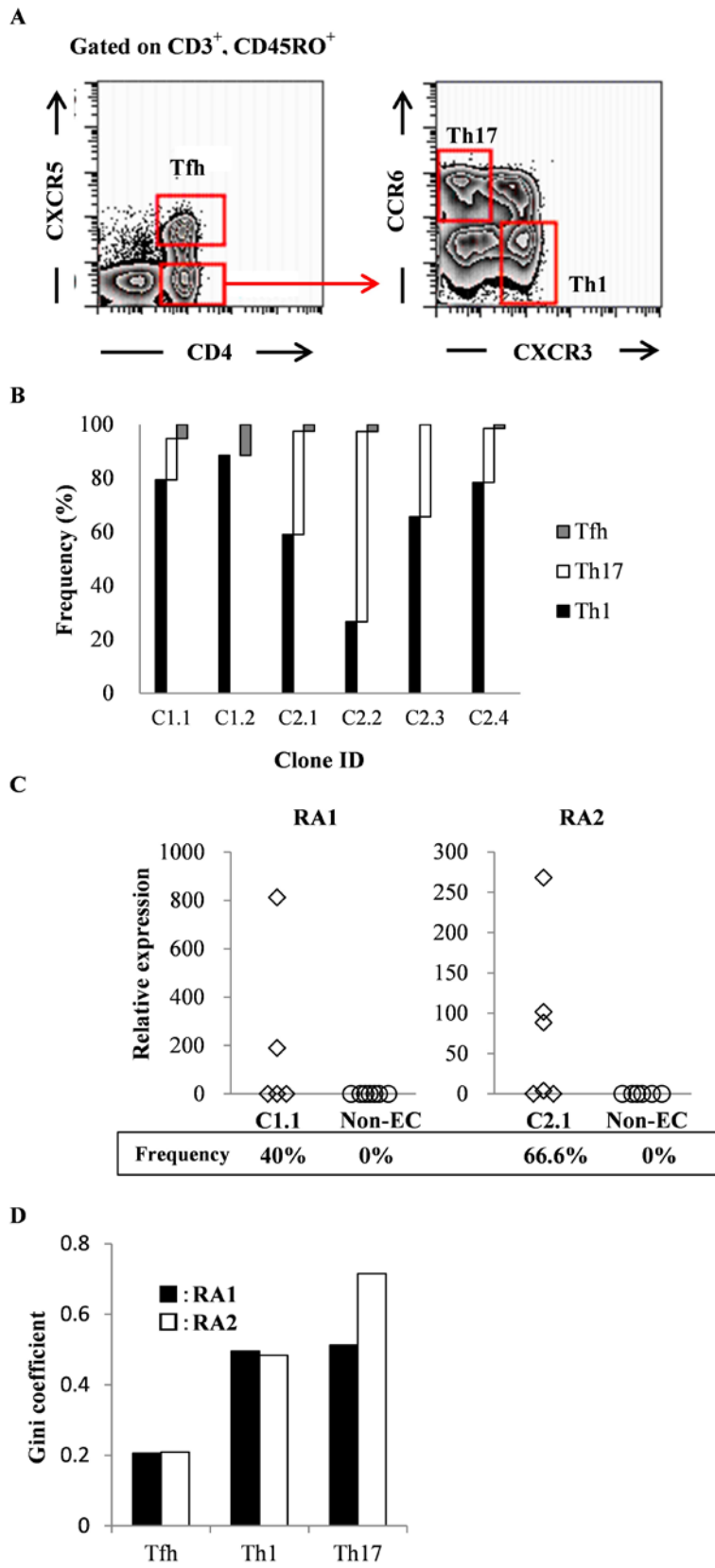


Fig 6 RA 患者の PBMC では Th1 と Th17 のクローナルな増殖傾向が強い

2名のRA患者(RA1、RA2)の末梢血中のCD4陽性CD45RO陽性T細胞をTfh、Th1、Th17の3分画に分類し、NGSによるTCRレパトア解析を行った。各サンプル内で機能性のCDR3配列をランダムに再抽出し1万リードを解析に使用した。各分画のメモリーCD4陽性T細胞における割合によりリード数を補正した。具体的にはTfhがメモリーCD4陽性細胞の25%を占め特定のCDR3配列がTfh分画に100リード検出されたときは、 $100 \times 0.25 = 25$ リード、のように補正している。

(A) : RA1のFACS解析結果を提示する。赤枠が3分画のソーティングゲートである。

(B) : Table7に示したECが各分画で占められる割合を比較した。

(C) : C1.1、C2.1の各単細胞由来のcDNAを利用し、RT-PCRにてTBX21遺伝子の発現を解析した。内在性コントロール遺伝子としてACTB遺伝子を用いた。下段にTBX21遺伝子発現の陽性率を記載した。

(D) : 各サブセットにおける各CDR3配列のリード数の分布のGini係数を計測した。

RA の滑膜組織には Th1 型の EC が浸潤する

RA の病態に関与する CD4 陽性 T 細胞を正確に同定するためには、PBMC だけでなく炎症の局所である関節内での EC の同定とその EC の遺伝子発現解析が重要だと考えた。現時点では EC の信頼できるマーカーがないため、EC の発現解析を行うにはシングルセル解析での TCR のシーケンシング、遺伝子発現解析を並行して実施する必要がある。

関節検体（滑膜 3 例、滑液 1 例）から抽出されたメモリー CD4 陽性 T 細胞をシングルセル解析し、TCR をシーケンシングした（Table 9）。RA1 の関節検体では PBMC の解析で最もクローナルな増殖傾向が強かった EC（clone ID: C1.1）が 4/23 細胞で検出され、もう 1 つの EC（clone ID: C1.2）も 1/23 細胞で検出された。RA3、RA5 の関節検体においても、PBMC の NGS 解析で認めた複数のクローンが関節組織からも検出された（Table 9、点線枠）。これらは関節検体のシングルセル解析では 1 細胞のみの検出であったが、解剖学的に離れた部位の独立した解析で同定されたためクローナルに増殖していると考えられる。

RA1 の滑膜検体を用いてシングルセルレベルでの遺伝子発現解析を行った。C1.1 は 4 細胞で認めており EC1~4 のように各細胞に ID を付け区別して解析した。まず、C1.1 から 2 細胞（EC1~2）を、クローナルな増殖の所見がない T 細胞から 3 細胞（non-EC1~3）をランダムに選択し、合計 5 細胞検体の RNA-Seq を実施した。トリミ

ング後に各サンプル平均 1,297,307 リードがレファレンス配列にマッピングされ、全体で 4873 遺伝子が含まれていた。

EC のうち 1 細胞 (EC1) にて TNFSF14 (LIGHT をコードする遺伝子) と TNFSF14 と関連する遺伝子 (BIRC2、CYFIP2) の発現が高く検出された (Figure 7B-1) [47, 48]。LIGHT は活性化 T 細胞の膜上に発現し破骨細胞分化に重要であることが示されており [49]、EC が関節破壊に関与する可能性が示唆された。EC のうち 1 細胞 (EC2) では TBX21 などの Th1 を制御する重要な遺伝子群の発現が高く (Figure 7B-2)、Th1 型の表現型を呈していると考えられ、PBMC のサブセット毎の TCR レパトア解析の結果に合致する所見と考えた。この所見を強固に確認するため、EC 1~4、non-EC 1~9 の 13 個のシングルセルから得られた cDNA サンプルを用いて TBX21 の発現を real time PCR にて評価した。EC と non-EC における TBX21 の陽性率はそれぞれ 2/4 細胞、1/9 細胞であり、EC は Th1 型に偏っていることが示唆された (Figure 7D)。一方、non-EC では GATA3 の陽性率が高い傾向があった (Figure 7C、D)。EC と non-EC の遺伝子発現の特徴を検討するため EC で発現がより高い遺伝子群 (EC cluster)、non-EC で発現がより高い遺伝子群 (non-EC cluster) を抽出した (Figure 7B-3)。EC cluster では細胞分裂の M 期に関連した遺伝子が集簇し、non-EC cluster ではアポトーシス抑制関連遺伝子が集簇していた (Figure 7C)。CD5 は自己反応性 T 細胞で高発現するという報告があり [50]、EC 群で特徴的に CD5 の発現亢進が認められたことからこれらの clone は自己反応性の clone である可能性が示唆される (Figure 7C)。また CXCR4 は関節炎

の発症と関連するケモカイン受容体であるが[51, 52]、EC 群で有意に発現が亢進していた (Figure 7E)。以上より、RA1 から検出された C1.1 は末梢血だけでなく関節内においても高レベルの増殖傾向を示し、RA の病態に関与するクローンであることが示唆された。

Table9 関節検体を用いたシングルセル解析結果

A: RA1 (synovial membrane)					C: RA4 (synovial membrane)				
ID	QV	TRBV	TRBJ	CDR3	ID	Quality	TRBV	TRBJ	CDR3
1	>20	2	1-4	ASSLNEKLF	1	>20	4-2	2-6	ASSQVWVWRLSAGANVLT
2	>20	2	2-5	ASKAYGEQY	2	>20	5-1	2-3	ASSLPQGDYQY
3	>20	4-2	2-7	ASSHLEGQGGEQY	3	>20	6-1	1-2	ASSDRQNYGYT
4	>20	5-1	2-3	ASSLSPPDYQY	4	>20	6-1	1-5	ASSSSESTGSNQPH
5	>20	5-1	2-5	ASSLRGLAGLYPQETQY	5	>20	7-2	1-4	ASRGGGGKLF
6	>20	5-6	1-5	ASSSRQGINQPH	6	>20	11-3	2-1	ASSRGGAGGLNEQF
7	>20	5-6	2-5	ASSVDRYQETQY	7	>20	18	2-2	ASSPPHAGNTGELF
8	>20	6-2	2-5	ASSLLREGYQETQY	8	>20	19	2-1	ASRRTPGGEQF
9	>20	6-2	1-1	ASSMLDGAEAF	9	>20	24-1	2-2	ATSDLGQGYTQY
10	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	10	>20	25-1	2-3	ASSSPGLSDYQY
11	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	11	>20	30	1-3	AFSTGPGNTIY
12	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	12				No band
13	>20	7-2	1-5	ASSSEANQPQH	13				No band
14	>20	7-2	1-5	ASSLGSGREQH	14				No band
15	>20	7-2	2-1	ASSLRGNEQF	15				No band
16	>20	12-3	2-3	ASSLESGTDTQY	16				No band
17	>20	19	1-6	ASSISTNSPLH	17				No band
18	>20	19	1-1	ASSLQDTEAF					
19	>20	20-1	2-1	SARDPRGGLYNEQF					
20	>20	20-1	2-2	SALTSGNTGELF					
21	>20	27	1-6	CANRDSPLH					
22				No band					
23				No band					

B: RA3 (synovial membrane)					D: RA5 (synovial fluid)				
ID	Quality	TRBV	TRBJ	CDR3	ID	QV	TRBV	TRBJ	CDR3
1	>20	2	1-6	ATSGQGGMSPLH	1	>20	3-1	1-2	ASSQFFGNYGYT
2	>20	3-1	2-2	ASSINTGELF	2	>20	3-1	2-2	ASNREGTGELF
3	>20	4-1	2-1	ASRRDGSSYNEQF	3	>20	4-3	1-3	ASSQDVAGGNTIY
4	>20	6-1	1-4	ASRPGQRARRGEKLF	4	>20	4-3	2-2	ASSQDLGGAGGELF
5	>20	6-5	2-1	ASSHNDRVTNEQF	5	>20	5-1	1-4	ASSLGEPPGNEKLF
6	>20	7-3	2-3	ASSGDFDTQY	6	>20	5-4	1-1	ASSRQAGTENTAEAF
7	>20	7-9	1-4	ASSPGEGLGQGEKLF	7	>20	5-6	2-3	ASSGGTTPQY
8	>20	7-9	2-7	ASSSTGGSYEQY	8	>20	18	2-2	ASSPRPADTGELF
9	>20	11-3	1-1	ASSLSRNTEAF	9	>20	18	2-5	ASSPNQGPVETQY
10	>20	18	2-7	ASSMTGYEQY	10	>20	18	2-7	ASSPGSTEQY
11	>20	18	2-7	ASSPVLAPKTYEQY	11	>20	20-1	2-3	SASSHSWDPDTQY
12	>20	20-1	1-3	SARAGGNGNTIY	12	>20	20-1	2-3	SARVSGSVGTDTQY
13	>20	20-1	2-2	SAKYGGNTGELF	13	>20	20-1	2-7	SALPTGSFSYEQY
14	>20	28	1-1	ASSSVNTEAF	14	>20	28	1-3	ASSLIQSGGNTIY
15	>20	28	1-6	ASMRLGSPLH	15	>20	30	2-1	AWTPGLAYNEQF
16	>20	30	2-3	AWSRKPNTDTQY	16	dual	ND	ND	ND
17				No band	17				No band

RA患者4名（RA1、RA3、RA4、RA5）から得られた関節検体を用いたシングルセル解析結果。増殖傾向を認めたT細胞クローンを枠で囲った。実線枠は複数細胞で検出されたクローンであり本解析ではECと定義されている。点線枠は1細胞のみの検出であったが、同一症例のPBMCのNGS解析でも検出された配列である。Table5の解説も参照。

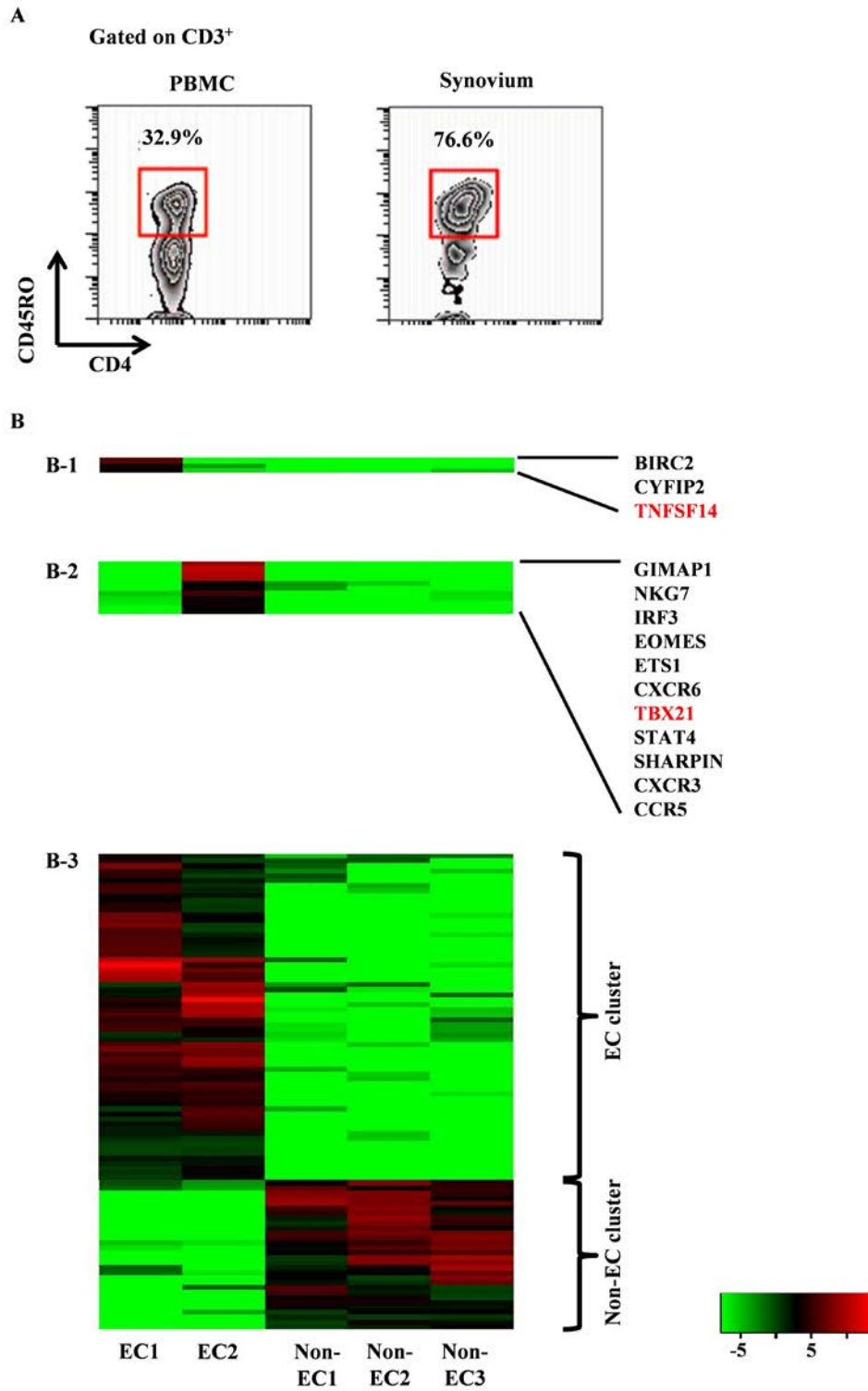


Fig 7 RA の滑膜組織には Th1 型の EC が浸潤する (次項に続く)

C

C-1. Hypergeometric test (EC cluster)

GO annotation title	Frequency	p-value
biological_process	5	0.05
response to drug	4	0.01
mitotic cell cycle	4	0.03
protein transport	4	0.04
ATP catabolic process	3	0.00

C-2. Hypergeometric test (non-EC cluster)

GO annotation title	Frequency	p-value
signal transduction	5	0.03
negative regulation of apoptotic process	4	0.01
T cell receptor signaling pathway	3	0.00
response to drug	3	0.01
viral reproduction	3	0.01
virus-host interaction	3	0.02
negative regulation of transcription	3	0.04

C-3. Genes included in each cluster

EC	Non-EC
CD5	CD247
GZMH	GATA3
GZMK	HLA-DRB1
JAK3	IL2RG
JUN	LAIR2
	TRAF5

D

	TBX21	RORA	GATA3	Foxp3
EC1	×	×	×	×
EC2	○	×	×	×
EC3	○	○	×	×
EC4	×	×	○	×
non-EC1	×	×	○	×
non-EC2	×	×	○	×
non-EC3	×	×	○	×
non-EC4	×	×	○	×
non-EC5	×	×	×	×
non-EC6	×	×	×	×
non-EC7	×	×	×	×
non-EC8	○	×	○	×
non-EC9	×	×	○	×

E

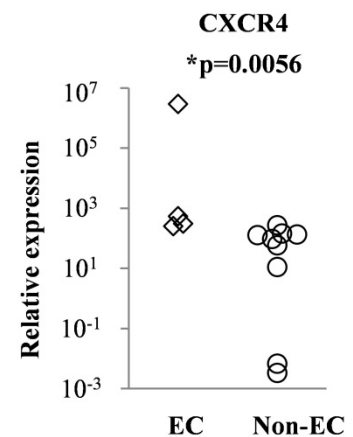


Fig 7 RA の滑膜組織には Th1 型の EC が浸潤する

RA 患者 1 名の滑膜組織から抽出された CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞をシングルセルソーティングし、各単細胞毎に TCR 解析と発現解析を並行して行った。

- (A) : 同一症例の PBMC と関節検体の FACS 解析結果を提示する。右側の赤枠がソーティングゲートである。
- (B)、(C) : C1.1 から 2 細胞 (EC1~2) を、クローナルな増殖の所見がない T 細胞から 3 細胞 (non-EC1~3) をランダムに選択し、合計 5 細胞検体の RNA-Seq を実施した。標準化 $\log_2(\text{RPKM})$ を発現量の指標として用いた。
- (B) : B-1 と B-2 はそれぞれ EC1、EC2 のみに高発現であった遺伝子 (標準化 $\log_2(\text{RPKM}) > 2$) の一部をまとめた heat map。B-3 は EC 群と non-EC 群で発現の差が明瞭な遺伝子をまとめた heat map。EC cluster は EC 群で 2 サンプル伴に標準化 $\log_2(\text{RPKM})$ が 0 以上であり、かつ、non-EC 群で 3 サンプル伴に標準化 $\log_2(\text{RPKM})$ が 0 未満である遺伝子をまとめた群。Non-EC cluster も同様に作成した。
- (C1-C2) : 各遺伝子に Gene ontology による annotation を付加し、各 cluster において hypergeometric test を実施した。有意に集簇している annotation のタイトルを表に示した。
- (C3) : 各 cluster 内に分類された遺伝子のうち、免疫学的に特徴のある遺伝子を表にまとめた。
- (D)、(E) : EC 4 細胞、non-EC 9 細胞の各単細胞由来の cDNA を利用し、RT-PCR にて各遺伝子の発現を解析した。内在性コントロール遺伝子として ACTB 遺伝子を用いた。
- (D) : TBX21、RORA、GATA3、Foxp3 の発現を定性的に示した表。13 クローンの解析で最も高い発現量の 1% 以上の発現を認めたクローンを陽性 (○)、1% 以下のクローンを陰性 (×) と表記した。赤字で示した細胞 (EC1、EC2、non-EC1、non-EC2、non-EC3) は(B)(C)の RNA-Seq の ID と共通である。
- (E) : CXCR4 の発現量。

考察

我々はシングルセル解析と NGS 解析という相補的な性質を持つ解析系を組み合わせることで、網羅的な TCR レパトア解析の実験系を確立した。この手法により RA 患者の末梢血中のメモリーCD4 陽性 T 細胞は健常人と比較してクローナルな増殖傾向が強く、特に Th1 と Th17 の分画においてその傾向が強いことが示唆された。また、RA1 から検出されたメモリーCD4 陽性 T 細胞のクローンである C1.1 は、末梢血と関節組織内で強い増殖傾向を示し、TNFSF14、CD5、JAK3、Th1 のマーカー遺伝子、CXCR4 などの発現が高い傾向にあることを示した。

TNFSF14 (LIGHT) は活性化 T 細胞の膜上に発現し破骨細胞分化に重要であることが示されており[49]、CD5 は自己反応性 T 細胞で高発現するという報告があり[50]、JAK3 阻害剤は近年 RA の新規治療として使用され始めている[53]。RA の関節組織における CD4 陽性 T 細胞のサブセット解析を行うと多くは Th1 細胞であることが報告されており[54, 55]、シトルリン化ビメンチン特異的 T 細胞は主に Th1 細胞であるとの報告もあり[20]、またインターフェロンガンマを抑制する治療が RA に有効であったとする知見もあり[56]、RA の病態に中心的に関与する CD4 陽性 T 細胞は主に Th1 である可能性が示唆され、今回の研究の結果とも合致する。また、ヒト滑膜中の CD4 陽性 T 細胞の大半は CXCR4 陽性であり、CXCR4 のリガンドである stromal cell-derived factor (SDF)-1 はヒト滑膜内で発現が高くヒト滑膜 CD4 陽性 T 細胞の遊走

を誘導し、CXCR4 阻害剤によりコラーゲン誘導関節炎モデルマウスの関節炎スコアが抑制されることから CXCR4 陽性 CD4 陽性 T 細胞は関節リウマチの病態形成に関与すると考えられる[51, 57]。本解析にて関節内の EC (C1.1) で CXCR4 の発現が高かったことは興味深い。この知見より関節組織内では CXCR4 の発現が高い CD4 陽性 T 細胞内に EC が多く含まれる可能性がある。以上より RA1 から検出されたメモリー CD4 陽性 T 細胞のクローンである C1.1 は関節内自己抗原に反応してクローナルな増殖と活性化を起こしたと推測され、RA の病態に関与している可能性が高いと考えられる。

関節炎モデルマウスの解析では関節内の EC が関節炎の病態に関与することが示唆されている[58]。本解析では 5 症例の RA の PBMC を用いて TCR レパトア解析を実施し多くの EC を同定している。1 症例 (RA1) のみの解析であるが、TCR レパトア解析と遺伝子発現解析を併用し EC の 1 つが RA の病態に関与していることが示唆された。同様の解析を継続することで他の EC についても RA の病態形成への関与を検証できると期待される。また、治療が EC にどのように影響するかは今後の解析課題であるが、EC の頻度や遺伝子発現パターンの変化を解析することで EC の病態への関与を間接的に検証できると期待される。

NGS を駆使した RA 患者の末梢血中の TCR レパトア解析は既報があるが[23]、CD4/CD8、Tfh/Th1/Th17 などのサブセットは区別せずに T 細胞全体を解析しており、健常人との比較がなされていなかった。注目すべき点として健常人の一部の CD4 陽

性細胞においても高いクローナリティが観察されたため、RA の CD4 陽性 T 細胞の TCR レパトアを解析するうえで健常人コントロールの設定は重要である。また、CD8 陽性 T 細胞の方が CD4 陽性 T 細胞よりクローナルな増殖傾向が強いことは既に知られており[44]、CD4 陽性 T 細胞の TCR レパトアを正確に評価するには CD4/CD8 を分画することが必要である。また、メモリーCD4 陽性 T 細胞を更に3つに分画し TCR レパトア解析を実施した報告は RA では初である。増殖傾向の強い T 細胞クローンの大半は Th1 に分類され、シングルセル遺伝子発現解析と合致する結果が得られた。

シングルセル解析と NGS を併用し TCR レパトアを評価した報告はあるものの、両実験系の解析結果の一致率、相違などは十分に議論されていなかった[42]。我々の実験系では増殖傾向の強い T 細胞クローンに関しては両実験系で十分な相関があることを示した。一方で、シングルセル解析では評価が困難な低い増殖率の T 細胞クローンは参照配列が存在しないため、どの程度正確に NGS の TCR 解析に反映されるかを厳密に検証することは不可能である。現時点の NGS はどの機種や実験系を用いても TCR 解析するためには 20-40 cycle 程度の PCR 増幅が必要である。TCR 配列に依存した増幅効率の差、単細胞内での TCR の mRNA の発現量の差、発現量の低い cDNA 分子の PCR 増幅の際の確率論的な影響などは、現在のところ技術的に回避不能である。最終的には、増幅過程を要さない 1 分子シーケンシングや、1 細胞毎に異なったタグを結合した逆転写プライマーを使用するデジタルシーケンシングなどの応用によりこれらの諸問題が解決すると期待される。

ヒトの T 細胞をシングルセルソーティングし TCR レパトアを解析した報告は少なく、特に CD4 陽性 T 細胞の報告は稀である[32, 59]。主にマウスの実験系であるがシングルセルの RNA から cDNA 合成、PCR 増幅し TCR 配列をシーケンスする方法は、複数報告がある[60-62]。この中で、近年主流になっている手法が PCR による増幅の step 前の精製過程を省くことである。つまり、sorting 後に RNA 精製をせずに逆転写反応液中で細胞を溶解し、そのまま逆転写、PCR 増幅の過程に進み、その後に精製をするという流れである。我々も複数のプロトコルで条件検討を行ったが現行のプロトコルが最も効率的であり、シングルセルソーティングした細胞のうち約 8 割の細胞で TCR の CDR3 配列を同定できた。この同定率は既報に比して十分高い数値である。

今後、本研究で同定した RA の病態に関与する可能性が高い T 細胞クローンの対応抗原を検索する必要がある。長期的には pMX vector を用いて目的の TCR を HLA-DRB1*0405 陽性患者の末梢血 CD4 陽性細胞に過剰発現させ[63, 64]、抗原提示細胞との共培養下で関節抗原を含む種々の抗原を加え、対応抗原を検索する予定である。また免疫不全マウスに RA 患者の滑膜組織を移植し SCID-HuRAg を作成し[65]、TCR を過剰発現させた T 細胞を移入し、T 細胞の挙動、移植関節組織への浸潤、血清中の炎症性サイトカインの測定なども検討している。これらの *in vitro*、*in vivo* の両方の研究結果から、新たな対応抗原、T 細胞レベルでの免疫寛容破綻の機序、RA の病因に関する新規知見などが得られると期待する。

対応自己抗原が明確に同定できた場合は抗原特異的治療への応用が期待される。Celiac 病は HLA class II との関連が遺伝学的に証明されており、RA と部分的に似通った病態の自己免疫疾患であるが、T 細胞レベルでの自己抗原(gluten)が同定されている[66]。対応抗原が明確であるため gluten free diet、gluten の oral tolerance などの治療が考案され、臨床的効果が確認されている[67]。RA においても Celiac 病での成功例を参考に抗原特異的な免疫寛容の再獲得を目指す治療が開発できる可能性はある。抗原特異的治療は生物学的製剤を含めた現行の治療にはない要素であり、現行の治療が奏功しない症例に有効である可能性はある。

我々は NGS という新しい解析手法を TCR 解析とシングルセル遺伝子発現解析に応用することで、RA の病態に関与するメモリーCD4 陽性 T 細胞のクローンの候補を同定することに成功した。この手法は従来の実験系よりも仮説に依存しないものであり、新たな知見が得られる可能性はあると思われる。この実験系を拡大することで RA の病態生理の解明や、最終的には関節炎に関与する新規自己抗原の同定に繋がると考える。

参考文献

1. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep; 358(9285):903-911.
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec; 365(23):2205-2219.
3. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2000 Nov; 343(22):1586-1593.
4. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*. 2000 Nov; 343(22):1594-1602.
5. Jones G, Sebba A, Gu J, Lowenstein MB, Calvo A, Gomez-Reino JJ, et al. Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan; 69(1):88-96.
6. Yamamoto K, Sakoda H, Nakajima T, Kato T, Okubo M, Dohi M, 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*. 1992 Nov;

4(11):1219-1223.

7. Pöllinger B, Junt T, Metzler B, Walker UA, Tyndall A, Allard C, et al. Th17 cells, not IL-17+ $\gamma\delta$ T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans. *J Immunol*. 2011 Feb; 186(4):2602-2612.
8. Hickman-Brecks CL, Racz JL, Meyer DM, LaBranche TP, Allen PM. Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J Autoimmun*. 2011 Feb; 36(1):65-75.
9. Jang E, Kim HR, Cho SH, Paik DJ, Kim JM, Lee SK, et al. Prevention of spontaneous arthritis by inhibiting homeostatic expansion of autoreactive CD4+ T cells in the K/BxN mouse model. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb; 54(2):492-498.
10. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012 May; 44(5):511-516.
11. Jasin HE. Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1985 Mar; 28(3):241-248.
12. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*. 1999 Nov; 286(5445):1732-1735.
13. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin

autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol.* 2001 Mar; 166(6):4177-4184.

14. Takizawa Y, Suzuki A, Sawada T, Ohsaka M, Inoue T, Yamada R, et al. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2006 Aug; 65(8):1013-1020.

15. De Rycke L, Peene I, Hoffman IE, Kruithof E, Union A, Meheus L, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis.* 2004 Dec; 63(12):1587-1593.

16. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003 Aug; 34(4):395-402.

17. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest.* 2006 Apr; 116(4):961-973.

18. He X, Kang AH, Stuart JM. Accumulation of T cells reactive to type II collagen in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000 Mar; 27(3):589-593.

19. Cope AP, Patel SD, Hall F, Congia M, Hubers HA, Verheijden GF, et al. T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated

and nonassociated HLA-DR4 alleles. *Arthritis Rheum.* 1999 Jul; 42(7):1497-1507.

20. Snir O, Rieck M, Gebe JA, Yue BB, Rawlings CA, Nepom G, 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.* 2011 Oct; 63(10):2873-2883.

21. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. 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. *J Immunol.* 2003 Jul; 171(2):538-541.

22. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2002 Feb; 2(2):85-95.

23. Klarenbeek PL, de Hair MJ, Doorenspleet ME, van Schaik BD, Esveldt RE, van de Sande MG, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jun; 71(6):1088-1093.

24. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 1988 Aug; 334(6181):395-402.

25. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Saitou M. Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nat Protoc.* 2007; 2(3):739-752.

26. Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Sep; 20(9):1131-1139.
27. Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, et al. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol.* 2013 Apr; 14(4):R31.
28. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods.* 2009 May; 6(5):377-382.
29. Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol.* 2002 Apr; 20(4):387-392.
30. Tietjen I, Rihel JM, Cao Y, Koentges G, Zakhary L, Dulac C. Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors. *Neuron.* 2003 Apr; 38(2):161-175.
31. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003 Dec; 17(12):2257-2317.
32. Sun X, Saito M, Sato Y, Chikata T, Naruto T, Ozawa T, et al. Unbiased analysis of

TCR α/β chains at the single-cell level in human CD8⁺ T-cell subsets. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40386.

33. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul; 36(Web Server issue):W503-508.

34. Li S, Lefranc MP, Miles JJ, Alamyar E, Giudicelli V, Duroux P, et al. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat Commun*. 2013; 4:2333.

35. Klinger M, Kong K, Moorhead M, Weng L, Zheng J, Faham M. Combining next-generation sequencing and immune assays: a novel method for identification of antigen-specific T cells. *PLoS One*. 2013; 8(9):e74231.

36. Warren EH, Matsen FA, Chou J. High-throughput sequencing of B- and T-lymphocyte antigen receptors in hematology. *Blood*. 2013 Jul; 122(1):19-22.

37. Sherwood AM, Emerson RO, Scherer D, Habermann N, Buck K, Staffa J, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal tumors display a diversity of T cell receptor sequences that differ from the T cells in adjacent mucosal tissue. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Sep; 62(9):1453-1461.

38. Warren RL, Freeman JD, Zeng T, Choe G, Munro S, Moore R, et al. Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen

selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes. *Genome Res.*

2011 May; 21(5):790-797.

39. Bolotin DA, Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Shagin D, Ustyugova SV, et al.

Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *Eur J Immunol.* 2012 Nov; 42(11):3073-3083.

40. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wacher A, Turtle CJ, Kahsai O, et al.

Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood.* 2009 Nov; 114(19):4099-4107.

41. Lefranc MP. Unique database numbering system for immunogenetic analysis.

Immunol Today. 1997 Nov; 18(11):509.

42. Cebula A, Seweryn M, Rempala GA, Pabla SS, McIndoe RA, Denning TL, et al.

Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature.* 2013 May; 497(7448):258-262.

43. Bragg LM, Stone G, Butler MK, Hugenholtz P, Tyson GW. Shining a light on dark

sequencing: characterising errors in Ion Torrent PGM data. *PLoS Comput Biol.* 2013 Apr; 9(4):e1003031.

44. Klarenbeek PL, Tak PP, van Schaik BD, Zwinderman AH, Jakobs ME, Zhang Z, et al.

Human T-cell memory consists mainly of unexpanded clones. *Immunol Lett.* 2010 Sep; 133(1):42-48.

45. Bashford-Rogers RJ, Palser AL, Huntly BJ, Rance R, Vassiliou GS, Follows GA, et al. Network properties derived from deep sequencing of human B-cell receptor repertoires delineate B-cell populations. *Genome Res.* 2013 Nov; 23(11):1874-1884.
46. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar; 12(3):191-200.
47. Gantsev SK, Umezawa K, Islamgulov DV, Khusnutdinova EK, Ishmuratova RS, Frolova VY, et al. The role of inflammatory chemokines in lymphoid neoorganogenesis in breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2013 Jun; 67(5):363-366.
48. Kuai J, Nickbarg E, Wooters J, Qiu Y, Wang J, Lin LL. Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis. *J Biol Chem.* 2003 Apr; 278(16):14363-14369.
49. Edwards JR, Sun SG, Locklin R, Shipman CM, Adamopoulos IE, Athanasou NA, et al. LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 May; 54(5):1451-1462.
50. Mandl JN, Monteiro JP, Vrisekoop N, Germain RN. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity.* 2013 Feb; 38(2):263-274.
51. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in

CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol.* 2000 Dec; 165(11):6590-6598.

52. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol.* 2000 Sep; 165(6):3423-3429.

53. van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, Keystone E, Kremer J, Zerbini C, et al. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate: twelve-month data from a twenty-four-month phase III randomized radiographic study. *Arthritis Rheum.* 2013 Mar; 65(3):559-570.

54. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, et al. Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug; 60(8):2294-2303.

55. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, et al. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Sep; 67(9):1299-1304.

56. Sigridin YA, Loukina GV, Skurkovich B, Skurkovich S. Randomized, double-blind trial of anti-interferon-gamma antibodies in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2001;

30(4):203-207.

57. Tamamura H, Fujisawa M, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, et al. Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett.* 2004 Jul; 569(1-3):99-104.

58. Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara H, Tsuno NH, et al. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol.* 2006 Dec; 177(11):8140-8147.

59. Qiao SW, Christophersen A, Lundin KE, Sollid LM. Biased usage and preferred pairing of α - and β -chains of TCRs specific for an immunodominant gluten epitope in coeliac disease. *Int Immunol.* 2013 Sep.

60. Dash P, McClaren JL, Oguin TH, Rothwell W, Todd B, Morris MY, et al. Paired analysis of TCR α and TCR β chains at the single-cell level in mice. *J Clin Invest.* 2011 Jan; 121(1):288-295.

61. Tahara H, Fujio K, Araki Y, Setoguchi K, Misaki Y, Kitamura T, et al. Reconstitution of CD8⁺ T cells by retroviral transfer of the TCR alpha beta-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte. *J Immunol.* 2003 Aug; 171(4):2154-2160.

62. Kamme F, Salunga R, Yu J, Tran DT, Zhu J, Luo L, et al. Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J Neurosci.* 2003 May; 23(9):3607-3615.

63. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, et al.

Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol.* 2003 Nov; 31(11):1007-1014.

64. Fujio K, Misaki Y, Setoguchi K, Morita S, Kawahata K, Kato I, et al. Functional reconstitution of class II MHC-restricted T cell immunity mediated by retroviral transfer of the alpha beta TCR complex. *J Immunol.* 2000 Jul; 165(1):528-532.

65. Maeshima K, Yamaoka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Saito K, et al. The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon- γ and interleukin-17 production by human CD4+ T cells. *Arthritis Rheum.* 2012 Jun; 64(6):1790-1798.

66. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2013 Apr; 13(4):294-302.

67. Bakshi A, Stephen S, Borum ML, Doman DB. Emerging therapeutic options for celiac disease: potential alternatives to a gluten-free diet. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2012 Sep; 8(9):582-588.

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導下さいました指導教員の山本一彦教授に深謝致します。また、実際の実験に関して懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を頂きました藤尾圭志先生、庄田宏文先生、高地雄太先生に厚く御礼申し上げます。また、共同研究者である田中栄先生、門野夕峰先生、安井哲郎先生から貴重な関節検体を複数頂き、本研究を遂行することができました。ここに深謝致します。