

論文の内容の要旨

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

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。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が、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、低い有効性、重篤な副作用の存在などの観点からも不完全なものである。RA の病態に關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。RA の病態における CD4 陽性 T 細胞の中心的役割は多数の研究結果から確認されているが、現在の技術では T 細胞の対応抗原を網羅的に探索する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。我々は仮説に依存しない形で新規自己抗原を探索するためには、RA の病態に關与する CD4 陽性 T 細胞クローンの候補を網羅的に検索することが重要と考えた。この候補となる T 細胞クローンは TCR レパトア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と各クローンの遺伝子発現情報とを併せて解析することで、推測が可能であると思われる。我々は上記の考察に基づき、シングルセル解析と次世代シーケンサー技術 (Next generation sequencing、以下 NGS) を併用し、網羅的な TCR レパトア解析とシングルセルレベルでの遺伝子発現解析の実験系の確立を目指した。

方法

東大病院に通院する RA 患者から 5 症例を選択し血液検体を採取し、うち 4 例から関節検体を回収した。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すると考え、この分画を本研究の対象とした。シングルセル解析、NGS 解析用のサンプルは全て FACS によるソーティングにより回収した。シングルセル解析では RNA 精製の過程を省き cDNA 合成、ポリアデニル化を経て、20 サイクルにて 1st PCR を実施した。その産物を更に PCR 増幅し、TCR 解析用、遺伝子発現解析用のサンプル調整を行った。TCR 配列解析では TCR β 鎖の complementarity-determining region 3 (以下、CDR3) に注目し解析した。NGS は Ion PGM (Applied Biosystems) を使用した。

結果

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 CDR3 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 解析を繰り返し行い、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を確認した。シングルセル解析では解析細胞数が 100 細胞程度であり TCR

レパトアの極一部の評価に留まっていたため、我々は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することを目指した。まず、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有意に相関することを確認し、ここで設定された条件にて以降のNGSによるTCRレパトア解析を実施した。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、ECが多く含まれることが示唆され、一部のECは関節内に浸潤することが確認された。次に、RAの滑膜検体から分離されたEC4細胞、non-EC9細胞の遺伝子発現解析を実施した。ECではTNFSF14 (LIGHT)、Th1関連の遺伝子、細胞分裂のM期に関連した遺伝子、CD5、CXCR4の発現が高いことが示された。

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いことが示唆された。この網羅的解析で認めたECの一部は関節内に浸潤し、そのうち1クローンは関節局所で強い増殖傾向を示し、TNFSF14 (LIGHT)、Th1のマーカー遺伝子、CD5、CXCR4、JAK3などの発現が高いことを確認した。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、CD5は自己反応性T細胞と、CXCR4は関節炎の発症との関連が報告されており、このEC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。RAの関節組織におけるCD4陽性T細胞の多くはTh1細胞であることが報告されており、また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る。これらの報告から、RAの関節における自己抗原特異的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。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、CD4/CD8を区別せずに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、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。NGSによるTCRレパトア解析の妥当性の評価として、シングルセル解析と比較することが最も信頼できる方法である。ECの評価に関しては両解析間に良好な相関関係を確認できており、我々のNGSによるTCRレパトアの解析系は妥当な評価方法だと考える。但し、NGSによる解析系がシングルセル解析では評価が困難な低い増殖率のT細胞クローンをどの程度正確に評価できるかに関しては、現状の技術では確認することは不可能であり、本研究の限界である。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CD4陽性細胞に過剰発現させ、抗原提示細胞との共培養下で種々の抗原を加え、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、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、対応抗原に関する知見がある程度得られると期待する。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り得ると考える。