

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー疾患実用化研究分野))
研究分担報告書

RA 患者末梢血リンパ球における遺伝子発現に注目した寛解の条件とその誘導に関する研究

研究分担者 山本 一彦 東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科 教授
研究協力者 藤尾 圭志 東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科 講師
住友 秀次 東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科 助教
永淵 泰雄 東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科 大学院生
高地 雄太 理化学研究所統合生命医科学研究センター 上級研究員

研究要旨

関節リウマチ(RA)は免疫学的疾患であり、免疫学的異常の全体像や臨床像との関連の解明が、予後予測および患者の層別化には重要であると考えられる。RA には CD4 陽性 T 細胞の寄与が疑われるが、その遺伝子発現プロファイルの詳細は分かっていない。そこで健常人および RA の末梢血、RA の関節中の CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現を次世代シーケンス(NGS)で検討した。まず RA 患者の末梢血と関節中および健常人の末梢血の CD4 陽性 T 細胞において、single-cell レベルでのトランスクリプトーム解析を NGS により実施した。また RA 患者 3 例及び健常人 3 例の末梢血の CD4 陽性 T 細胞を、ナイーブ T 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、TFH 細胞、CD25 陽性 Treg の各集団に分けてセルソーターによるソーティングで回収し、同様にトランスクリプトームを解析した。RA 患者 2 例については関節液中の CD4 陽性 T 細胞についても解析した。シングルセル解析では、滑膜に浸潤傾向が強い CD4 陽性 T 細胞クローンで Th1 型の遺伝子発現が亢進しており、RA の病態に関与するクローンであると考えられた。CD4 陽性 T 細胞サブセットの遺伝子発現解析において、関節の CD4 陽性 T 細胞が発現遺伝子全体としては、シングルセル解析と同様に Th1 細胞に類似したパターンを持ちつつ、101 の RA 感受性遺伝子の発現に絞ってみると、CD25 陽性 Treg に類似したパターンを示すことが判明した。また興味深いことに、RA と健常人の末梢血のナイーブ T 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、TFH 細胞、CD25 陽性 Treg を比較すると、RA のすべての T 細胞サブセットにおいて T 細胞レセプター及び I 型インターフェロンの下流の遺伝子の発現亢進を認めた。RA の末梢血と関節の CD4 陽性 T 細胞を比較すると、関節 CD4 陽性 T 細胞において IFN- γ 下流の遺伝子および細胞分裂に関連する遺伝子の発現亢進を認めた。今回の解析は例数が限られているが、少なくとも一部の RA 症例の末梢血の CD4 陽性 T 細胞ではナイーブ T 細胞も含めた T 細胞全体に、T 細胞レセプター刺激及び I 型インターフェロン刺激が入っていることが明らかとなった。そして関節の CD4 陽性 T 細胞ではそれらの刺激に加え、さらに IFN- γ の刺激が入っていることが示唆された。従来 RA の末梢血全体において I 型インターフェロンの刺激が入っていることが報告されているが、我々の解析により CD4 陽性 T 細胞が広範に I 型インターフェロンの刺激を受けていることが推測された。今回、RA の CD4 陽性 T 細胞の発現遺伝子解析により、病態に関わる経路が同定できることが示され、このアプローチにより RA の生物学的製剤を含む治療への反応性や、寛解維持のしやすさを層別化できる可能性等が明らかになった。

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)の免疫学的異常の全体像や臨床像との関連は明らかになっていない。最大のリスク遺伝子がヒト

MHC クラス II 分子の遺伝子である HLA-DRB1 であることから、CD4 陽性 T 細胞の寄与が疑われるが、RA における CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルの詳細は分か

っていない。RAはheterogenousな疾患と考えられているが、RA感受性HLA-DRハプロタイプが存在や抗シトルリ化ペプチド抗体の出現などの共通点があり、RAのCD4陽性T細胞に特徴的な遺伝子発現が存在し、治療反応性に影響している可能性がある。そこで健常人およびRAの末梢血、RAの関節中のCD4陽性T細胞の遺伝子発現を次世代シーケンス(NGS)で検討した。

B. 研究方法

RA患者の末梢血と関節中および健常人の末梢血のCD4陽性T細胞のsingle-cellレベルでのトランスクリプトーム解析をNGSにより実施した。またRA患者3例及び健常人3例の末梢血のCD4陽性T細胞を、ナイーブT細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、TFH細胞、CD25陽性Tregの各集団に分けてセルソーターMoFloXDPによるソーティングで回収し、NGS用ライブラリーを作製し、トランスクリプトームを解析した。RA患者2例については関節液中のCD4陽性T細胞について同様に解析した。

(倫理面への配慮)

すべての研究は各施設の遺伝子倫理委員会の審査を受け、承認を受けた研究計画に則って実施された。

C. 研究結果

シングルセル解析では、滑膜に浸潤傾向が強いCD4陽性T細胞クローンでTh1型のgene set, CXCR4, JAK3の発現が亢進しており、RAの病態に関与するクローンであると考えられた。CD4陽性T細胞サブセットの遺伝子発現解析において、関節のCD4陽性T細胞が発現遺伝子全体としては、シングルセル解析と同様にTh1細胞に類似したパターンを持ちつつ、101のRA感受性遺伝子の発現に絞ってみると、CD25陽性Tregに類似したパターンを示すことが判明した。また興味深いことに、RAと健常人の末梢血のナイーブT細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、TFH細胞、CD25陽性Tregを比較すると、RAのすべてのT細胞サブセットにおいてT細胞レセプター及びI型インターフェロンの下流の遺伝子の発現亢進を認めた。RAの末梢血と関節のCD4陽性T細胞を比較すると、関節CD4陽

性T細胞においてIFN- γ 下流の遺伝子および細胞分裂に関連する遺伝子の発現亢進を認めた。またこのようなCD4陽性T細胞サブセット全体の共通した遺伝子発現の変化以外に、各T細胞サブセットに特有の遺伝子発現の変化も認められた。T細胞サブセットの中ではCD25陽性Tregに最も多くのサブセット特異的に変化する遺伝子が認められた。

D. 考察

今回の解析は例数が限られているが、少なくとも一部RA症例の末梢血のCD4陽性T細胞ではナイーブT細胞も含めたT細胞全体に、T細胞レセプター刺激及びI型インターフェロン刺激が入っていることが明らかとなった。そして関節のCD4陽性T細胞ではそれらの刺激に加え、さらにIFN- γ の刺激が入っていることが示唆された。従来RAの末梢血においてI型インターフェロンの刺激が入っていることが報告されているが、今回の解析によりCD4陽性T細胞が広範にI型インターフェロンの刺激を受けている可能性が示された。

またT細胞サブセットの中では、CD25陽性Tregに最も多くのサブセット特異的に変化する遺伝子が認められたことは、RAにおいてCD25陽性Tregに対する修飾が病態に関与している可能性を示唆していると考えられた。どのような修飾が加わっているかは、今後の遺伝子多型やスプライスバリエーションを含めたインフォマティクスの解析で明らかにできる可能性がある。

生物学的製剤使用下に寛解状態となった症例で、生物学的製剤中止後に寛解を維持している症例とそうでない症例の末梢血CD4陽性T細胞の遺伝子発現を比較すれば、生物学的製剤が中止できる症例の層別化が可能となる可能性がある。

またNGSデータをさらに詳細に解析することで、T細胞レセプター及びI型インターフェロンの下流の遺伝子以外の経路も解析でき、RAの新たな病態経路の解明が期待される。

E. 結論

RAのCD4陽性T細胞の発現遺伝子解析により、病態に

関わる経路が同定できることが示された。このアプローチによりRAの生物学的製剤を含む治療への反応性や、寛解維持のしやすさを層別化できる可能性があると考えられた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Autoantigen BiP-derived HLA-DR4 epitopes differentially recognized by effector and regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Shoda H, Fujio K, Sakurai K, Ishigaki K, Nagafuchi Y, Shibuya M, Sumitomo S, Okamura T, Yamamoto K. Arthritis & Rheumatology. 2015 in press.
2. Okada Y, et al(+94人), Yamamoto K and Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature.506;376-381 (2014)
3. Kochi Y, Suzuki A, Yamamoto K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. Biochem Biophys Res Commun. 452;254-62 (2014)
4. Takeuchi T, Yamamoto K, Yamanaka H, Ishiguro N, Tanaka Y, Eguchi K, Watanabe A, Origasa H, Shoji T, Miyasaka N, Koike T. Early response to certolizumab pegol predicts long-term outcomes in patients with active rheumatoid arthritis: results from the Japanese studies. Mod Rheumatol.20;110 (2014)
5. 免疫学的に見た関節リウマチの病因・病態 藤尾圭志 Pharma Medica 2014年12月号

2.学会発表

- 1.関節リウマチの病態に關与するCD4陽性T細胞クローンの候補の同定 石垣和慶、庄田宏文、高地雄太、藤尾圭志、安井哲郎、門野夕峰、田中栄、山本一彦 第58回日本リウマチ学会 ワークショップ 2014年4月26日
- 2.関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み

永淵泰雄、庄田宏文、住友秀次、仲地真一郎、加藤里佳、土田優美、駒井俊彦、山口健介、立石晶子、神田浩子、藤尾圭志、山本一彦 第58回日本リウマチ学会 ワークショップ 2014年4月25日

- 3.関節リウマチの病態に關与するCD4陽性T細胞クローンの候補の同定 石垣和慶、庄田宏文、高地雄太、安井哲郎、門野夕峰、田中栄、藤尾圭志、山本一彦 第42回日本臨床免疫学会総会 ワークショップ 2014年9月26日

- 4.関節リウマチ患者における包括的臨床免疫解析の試み 永淵泰雄、庄田宏文、住友秀次、仲地真一郎、加藤里佳、土田優美、駒井俊彦、立石晶子、神田浩子、山口健介、石垣和慶、鈴木亜香里、高地雄太、藤尾圭志、山本一彦 第42回日本臨床免疫学会総会 ポスター 2014年9月25日

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし