

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

「強直性脊椎炎に代表される脊椎関節炎及び類縁疾患の医療水準ならびに患者 QOL 向上に資する
大規模多施設研究班」分担研究報告書

本邦における体軸性脊椎関節炎病態解明に関する研究

研究代表者：富田 哲也(森ノ宮医療大学 大学院保健医療学研究科)

研究分担者：藤尾 圭志(東京大学大学院医学系研究科 アレルギー・リウマチ学)

研究協力者：土屋 遥香(東京大学大学院医学系研究科 アレルギー・リウマチ学)

研究要旨：強直性脊椎炎（AS）や乾癬性関節炎（PsA）に代表される脊椎関節炎（SpA）は、青年期に発症する原因不明の自己免疫疾患である。かねてより、一般人口における HLA-B27 保有率が数%と高い欧米では、AS 患者の HLA-B27 陽性率が 90%を超えるなど、SpA の発症と HLA-B27 の強い関連性が報告されてきた。一方、本邦の一般人口における HLA-B27 保有率は約 0.3%と低く、AS 患者の HLA-B27 陽性率は約 50%とされ、本邦の SpA 発症には、HLA-B27 とは独立した遺伝的要因や免疫学的機序が関与する可能性が考えられる。本研究は、本邦の SpA 患者を対象とし、HLA-B27 陽性例と陰性例における免疫学的特徴の解明と、プレジジョン・メディシン（精密医療）にむけた基盤構築を目的に実施した。

東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科および大阪大学医学部附属病院整形外科に通院中の AS/nr-SpA 患者、31 症例を対象とした。各患者から臨床情報（年齢・性別・推定される発症年齢・並存症・治療薬・HLA 血清対応型タイピング・疾患活動性の指標・脊椎機能および構造の指標・全般的機能の指標・画像所見など）を回収し、末梢血単核細胞（PBMC）を用いたシングルセル解析（一細胞レベルの mRNA 発現情報、Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing（CITE-seq）による細胞表面タンパク発現情報、T 細胞レセプター（TCR）および B 細胞レセプター（BCR）情報の解析）を行った。

AS/nr-SpA 患者の男女比は 2.5:1、HLA-B27 保有者は 18 例（男性 16 例、女性 2 例）、非保有者は 13 例（男性 6 例、女性 7 例）だった。末梢血の採取時、13 例が従来型抗リウマチ薬（csDMARDs）による治療を受けており、その内訳はサラソスルファピリジンが 9 例、メトトレキサートが 4 例だった。また、13 例は生物学的製剤を使用しており、全例が TNF- α 阻害剤だった。なお、4 例は、これらの免疫調整・抑制療法を受けていなかった。B27 陽性例では疾患活動性の指標である BASDAI は 2.0、ASDAS-CRP は 2.0、ASDAS-ESR は 1.8、脊椎機能および構造の指標である BASMI は 1.0、全般的機能の指標である BASFI は 0.7 だった。B27 陰性例では BASDAI は 3.4、ASDAS-CRP は 1.8、ASDAS-ESR は 2.3、BASMI は 1.0、BASFI は 1.4 だった。HLA-B27 の保有例と非保有例間で、研究リクルート時の年齢、治療薬、BASDAI、ASDAS-CRP、ASDAS-ESR、BASMI、BASFI の各項目に統計学的な有意差はなかった。現在、高速シーケンス解析により得られたシングルセルライブラリーのシーケンスデータと臨床情報の統合解析を進めている。その中で、B27 陽性例、陰性例とも Cytotoxic CD8+T 細胞のクローナルな増殖は共通していたが、B27 陽性例では MAIT 細胞のクローナルな増殖が見られた一方、B27 陰性例では Cytotoxic CD4+T 細胞のクローナルな増殖が見られるという差異が認められた。また B27 陰性では IFN-activated CD4+T 細胞の比率が疾患活動性と相関したが、B27 陽性ではそのような相関は見られなかった。

今後、本研究を基盤に、日本人の遺伝的バックグラウンドを対象としたデータベースを構築することで、本邦の SpA 患者の免疫学的な層別化や疾患責任細胞の同定、バイオマーカー抽出に繋がること期待される。

A. 研究目的

強直性脊椎炎（AS）や乾癬性関節炎（PsA）に代表される脊椎関節炎（SpA）は、青年期に発症する原因不明の自己免疫疾患である。主に脊椎や仙腸関節といった体軸関節や末梢の関節に炎症を生じ、適切な治療介入の遅れは関節の強直や可動域制限による重度の身体障害を残し

得るため、就学や労働など日常生活活動能力の著しい低下をもたらす（Robinson PC et al. Nat Rev Rheumatol. 2020）。かねてより、SpA の発症と HLA-B27 の強い関連性が報告されており、一般人口における HLA-B27 保有率が数%と高い欧米では、AS 患者の HLA-B27 陽性率が 90%を超える（Brown MA et al. Nat Rev

Rheumatol. 2020)。一方、本邦の一般人口における HLA-B27 保有率は約 0.3%と低く、AS 患者の HLA-B27 陽性率は約 50%とされる (Kishimoto M et al. J Rheumatol. 2019)。すなわち、本邦の SpA 発症には、HLA-B27 とは独立した遺伝的要因や免疫学的機序が関与する可能性がある。また、病態の差異は、治療反応性や罹患関節の分布などの個人差とも関連する。本研究は、本邦の SpA 患者を対象に、HLA-B27 陽性例と陰性例における免疫学的特徴の解明と、プレジジョン・メディシン (精密医療) にむけた基盤構築を目的とする。

本研究は、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業「脊椎関節炎の疫学調査・診断基準作成と診療ガイドライン策定を目指した大規模多施設研究」班と、「難治性疾患の継続的な疫学データの収集・解析に関する研究」班とが共同で実施した。

B. 研究方法

対象は、東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科および大阪大学医学部附属病院整形外科に通院中の AS/nr-SpA 患者とした。具体的には、各施設において文書による説明・同意を取得し、東京大学、大阪大学では合計 31 例の AS/nr-SpA 患者を本研究に組み入れた。各患者から、臨床情報 (年齢・性別・推定される発症年齢・並存症・治療薬・HLA 血清対応型タイピング・疾患活動性の指標・脊椎機能および構造の指標・全般的機能の指標・画像所見など) および末梢血 30-50 ml を回収した。各施設において、末梢血から密度勾配遠心法により末梢血単核細胞 (PBMC) を分離し、東京大学に集約した。その後、single cell RNA sequencing (scRNA-seq) 解析を実施するうえで、生細胞率を高く確保することが解析の質に直結するため、PBMC からフローサイトメトリーを用いて amine 染色陽性の死細胞を除去することで、安定的に高品質な生細胞 (CD45⁺ 生細胞) を分取した。1 症例あたり、 1×10^4 細胞をインプットとして、Chromium system (10X Genomics 社) によるシングルセルライブラリーを調整し、一細胞レベルの mRNA 発現情報、Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing (CITE-seq) による細胞表面タンパク発現情報、T 細胞レセプター (TCR) および B 細胞レセプター (BCR) 情報を同時に回収した。

(倫理面への配慮)

東京大学および大阪大学において、対象患者

から文書による説明・同意を取得した。資料および試料は、各施設で匿名化され、対応表が保管された。大阪大学の資料および試料は、匿名化が完了後に東京大学に送付された。本研究の実施にあたっては、東京大学倫理審査委員会および大阪大学倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

AS/nr-SpA 患者の計 31 例が解析対象となった。

1) 対象患者の臨床的背景について

AS/nr-SpA 患者の男女比は 2.5:1、HLA-B27 保有者は 18 例 (男性 16 例、女性 2 例)、非保有者は 13 例 (男性 6 例、女性 7 例) だった。末梢血の採取時、13 例が従来型抗リウマチ薬 (csDMARDs) による治療を受けており、その内訳はサラソスルファピリジンが 9 例、メトトレキサートが 4 例だった。また、13 例は生物学的製剤を使用しており、全例が TNF- α 阻害剤だった。なお、4 例は、これらの免疫調整・抑制療法を受けていなかった。B27 陽性例では疾患活動性の指標である BASDAI は 2.0、ASDAS-CRP は 2.0、ASDAS-ESR は 1.8、脊椎機能および構造の指標である BASMI は 1.0、全般的機能の指標である BASFI は 0.7 だった。B27 陰性例では BASDAI は 3.4、ASDAS-CRP は 1.8、ASDAS-ESR は 2.3、BASMI は 1.0、BASFI は 1.4 だった。HLA-B27 の保有例と非保有例間で、研究リクルート時の年齢、治療薬、BASDAI、ASDAS-CRP、ASDAS-ESR、BASMI、BASFI の各項目に統計学的な有意差はなかった。

2) scRNA-seq 解析について

現在、高速シーケンス解析により得られたシングルセルライブラリーのシーケンスデータと臨床情報の統合解析を進めている。その中で、B27 陽性例、陰性例とも Cytotoxic CD8⁺T 細胞のクローナルな増殖は共通していたが、B27 陽性例では MAIT 細胞のクローナルな増殖が見られた一方、B27 陰性例では Cytotoxic CD4⁺T 細胞のクローナルな増殖が見られるという差異が認められた。また B27 陰性では IFN-activated CD4⁺T 細胞の比率が疾患活動性と相関したが、B27 陽性ではそのような相関は見られなかった。

D. 考察

近年、次世代シーケンサーを使用した免疫担当細胞の網羅的トランスクリプトーム解析により、自己免疫疾患の病態理解が飛躍的に発展した。一方で、既知の細胞サブセット内の不

均一性やサブセット間の可塑性が報告され、細胞集団の平均として観察する旧来の手法（microarray 解析や bulk RNA sequencing 解析）の限界が明らかとなってきた。

例えば、SpA 患者と慢性腰痛を持つ健常人の PBMC の遺伝子発現を microarray 解析により比較した研究では、TNF- α や IL-17 により誘導される RGS1 が健常人と比較し SpA で高発現し、両群に対して高い識別能力を持つことが示された (Gu J et al. Arthritis Rheum. 2009)。一方、同様に SpA と健常人の PBMC の遺伝子発現を microarray 解析により比較した別の研究では、健常人と比較し SpA における NR4A2、TNFAIP3、CD69 の低発現が報告されたが、前述の Gu J らの研究結果は再現されなかった (Duan R et al. Ann Rheum Dis. 2010)。末梢血や組織の遺伝子発現は、サンプル間で非常に不均一な細胞種の割合によって大きく変動するが、過去の研究の多くは、広範な細胞種を含む全血や未分類の PBMC が使用されており (Gu J et al. Rheumatology. 2002, Wang XB et al. Genes Immun. 2017, Costantino F et al. Front Immunol. 2018)、このことが、異なるコホート間における再現性の乏しさを生む一つの要因であり、細胞種特異的で免疫学的に重要なプロセスの検出を阻んでいると考えられる。

米国では GTE_x コンソーシアムによる大規模データベースが構築され、ゲノム研究による治療標的探索を目的とした「医療促進パートナーシップ (AMP)」により、プレジジョン・メディシン (精密医療) の基盤が着実に整備されている。一方、疾患の病態には人種差があることも明確となる中、日本人の遺伝的バックグラウンドを対象とした研究基盤の整備が喫緊の課

題である。

その中で本研究により、日本人に多い B27 陰性 AS/nr-SpA 患者への CD4 陽性 T 細胞の関与が示唆されたことは重要な意義がある可能性がある。AS/nr-SpA 患者では Cytotoxic CD8 陽性 T 細胞の関与は共通しつつ、B27 陽性 AS/nr-SpA 患者では MAIT 細胞、B27 陰性 AS/nr-SpA 患者では Cytotoxic CD4 陽性 T 細胞と IFN-activated CD4 陽性 T 細胞が関与するというモデルは今後の AS/nr-SpA の病態理解の重要な手掛かりになると考えられる。

E. 結論

AS/nr-SpA のシングルセル情報と臨床情報を統合解析することにより、HLA-B27 保有の有無による免疫フェノタイプの差異や、HLA-B27 とは独立した AS/nr-SpA の発症メカニズムの解明に繋がることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中
2. 学会発表
発表準備中

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし