

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分担研究報告書

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(大阪大学大学院医学系研究科 運動器バイオマテリアル学)

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、35 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 3:1 で、研究リクルート時の年齢（中央値 [IQR]）は 44 [33-55] 歳、罹病期間（中央値 [IQR]）は 6 [3-13] 年、HLA-B27 保有者は 54.3%だった。末梢血の採取時、17.1%が従来型抗リウマチ薬（csDMARDs）であるサラソスルファピリジン、28.6%がメトトレキサートによる治療を受けていた。また、40%が生物学的製剤である TNF- α 阻害剤、2.9%が IL-17 阻害剤を使用していた。疾患活動性の指標である BASDAI（中央値 [IQR]）は 2.2 [1.4-3.7]、ASDAS-CRP（中央値 [IQR]）は 1.8 [1.4-2.3]、ASDAS-ESR（中央値 [IQR]）は 2.1 [1.4-2.9] だった。脊椎機能および構造の指標である BASMI（中央値 [IQR]）は 1.0 [1.0-2.6]、全般的機能の指標である BASFI（中央値 [IQR]）は 1.0 [0.5-1.7] 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。

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から、quality control を通過した 128,460 細胞、24 クラスターを検出した。そのうち 1 つのクラスターはインターフェロン（IFN）シグナル関連遺伝子の発現亢進で特徴づけられる CD4⁺ T 細胞集団（IFN-activated CD4⁺ T cells; IFNact）であった。細胞クラスターと臨床情報を、一般化線形混合モデル（generalized linear mixed model; GLMM）を用いて統合解析したところ、IFNact の割合増加は HLA-B27 非保有例において ASDAS-CRP と有意に関連することが判明した（ $P = 0.00012$ ）。この関係性は HLA-B27 保有例では認めなかった（ $P = 0.94$ ）。さらに IFNact とその他の細胞クラスターの関係性を cell-to-cell interaction 解析により評価したところ、IFNact は CD56^{bright} NK クラスターとのリガンド-レセプター共有が最も多くみられ、IFNact は CD56^{bright} NK クラスターへの刺激を介して HLA-B27 非保有例の病態形成に寄与する可能性が示唆された。また、GLMM を CD56^{bright} NK クラスターの遺伝子発現に適用し、HLA-B27 保有/非保有によるケモカイン・ケモカイン受容体発現の違いを検証したところ、HLA-B27 非保有例では保有例と比較し *CCL3* や *CXCR6* などを高発現していた。

これまでに、CD56^{bright} NK 細胞は AS 患者の末梢血で増多していることや、末梢性 SpA を代表する PsA では滑膜で増加していることが指摘されている。また、*CCL3* や *CXCR6*、*CXCL16* は AS 患者において健常人よりも血清濃度が高いことも報告されており、AS/nr-SpA 病態における CD56^{bright} NK 細胞の重要性が支持される。今回の研究はその上流に位置する IFNact の存在を示唆するものであり、IFNact-CD56^{bright} NK axis に着目することで、HLA-B27 非保有例の早期診断や治療につながる可能性がある。

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、東京大学では 31 例、大阪大学では 4 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 24 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 3:1 で、研究リクルート時の年齢 (中央値 [IQR]) は 44 [33-55] 歳、罹病期間 (中央値 [IQR]) は 6 [3-13] 年、HLA-B27 保有者は 54.3% だった。

末梢血の採取時、17.1% が従来型抗リウマチ薬 (csDMARDs) であるサラソスルファピリジン、28.6% がメトトレキサートによる治療を受けていた。また、40% が生物学的製剤であ

る TNF- α 阻害剤、2.9%が IL-17 阻害剤を使用していた。

疾患活動性の指標である BASDAI (中央値 [IQR]) は 2.2 [1.4-3.7]、ASDAS-CRP (中央値 [IQR]) は 1.8 [1.4-2.3]、ASDAS-ESR (中央値 [IQR]) は 2.1 [1.4-2.9] だった。脊椎機能および構造の指標である BASMI (中央値 [IQR]) は 1.0 [1.0-2.6]、全般的機能の指標である BASFI (中央値 [IQR]) は 1.0 [0.5-1.7] 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

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から、quality control を通過した 128,460 細胞、24 クラスターを検出した。そのうち 1 つのクラスターはインターフェロン (IFN) シグナル関連遺伝子の発現亢進で特徴づけられる CD4⁺ T 細胞集団 (IFN-activated CD4⁺ T cells; IFNact) であった。細胞クラスターと臨床情報を、一般化線形混合モデル (generalized linear mixed model; GLMM) を用いて統合解析したところ、IFNact の割合増加は HLA-B27 非保有例において ASDAS-CRP と有意に関連することが判明した ($P=0.00012$)。この関係性は HLA-B27 保有例では認めなかった ($P=0.94$)。

さらに IFNact とその他の細胞クラスターの関係性を cell-to-cell interaction 解析により評価したところ、IFNact は CD56^{bright} NK クラスターとのリガンド-レセプター共有が最も多くみられ、IFNact は CD56^{bright} NK クラスターへの刺激を介して HLA-B27 非保有例の病態形成に寄与する可能性が示唆された。

GLMM を CD56^{bright} NK クラスターの遺伝子発現に適用し、HLA-B27 保有/非保有によるケモカイン・ケモカイン受容体発現の違いを検証したところ、HLA-B27 非保有例では保有例と比較し *CCL3* や *CXCR6* などを高発現していた。

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。

上述の背景から、scRNA-seq 解析により得られた一細胞レベルの遺伝子発現情報をもとに新たな細胞分類を行うことで、疾患の病態を多角的に解明する流れが加速している。scRNA-seq を用いることで、未知の細胞種の unbiased な探索的解析が可能になるのみならず、細胞種分化の軌跡を追う trajectory 解析により、細胞種同士の分化関係も推測できる。

実際に、PsA の関節液と末梢血を用いた scRNA-seq 解析において、関節液中では、末梢血中と比較し memory CD8 陽性 T 細胞の割合が約 3 倍増加していることが報告された (Frank

Penkava et al. Nat Commun. 2020)。しかし、研究のサンプルサイズが小さく（3例）、臨床的状況（HLA ハプロタイプや疾患活動性、治療反応性など）との統合解析や、PsA の症例グループ間における免疫学的特徴の差異は検討されていない。また、同研究内では、TCR レパトア解析により、関節内における CD8 陽性 T 細胞の clonal expansion が確認され、この集団は組織へのホーミングマーカールなどを高発現することから、関節炎形成に直接的に関与することが示唆されている。一方、健常人においても、末梢血と比較し腱附着部に常在する CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞はホーミングマーカールを高発現し、同時に免疫制御にかかわる IL-10 や TGF- β を発現することで免疫制御性のフェノタイプを示すことが報告されている（Watad A et al. Ann Rheum Dis. 2020）。実際に、腱附着部における Cytomegalovirus や influenza A virus 応答性 T 細胞の clonal expansion が認められ、これらが局所炎症の制御に寄与する可能性が示唆されている。すなわち、SpA の病態形成を理解するうえでは、一細胞レベルの遺伝子発現情報のみならず、TCR や BCR 解析の併用が有用と考えられる。

また、乾癬患者 11 例の皮膚病変と健常人 5 例の皮膚に浸潤する CD8 陽性 T 細胞を用いた scRNA-seq 解析では、CXCL13 を高発現する Tc17 細胞が、乾癬病変で特に多いことがわかった（Jared Liu et al. J Allergy Clin Immunol. 2021）。実際に、乾癬患者の血清 CXCL13 濃度は皮膚病変の重症度と相関し、anti-IL-23 治療により低下することが報告されている。scRNA-seq 解析から得られた知見が、疾患責任細胞の同定やバイオマーカー探索に有用である可能性を示唆している。

本研究から、HLA-B27 非保有 AS/nr-SpA における疾患活動性と IFNact の強い関連が示され、さらに IFNact により活性化される CD56^{bright} NK クラスタールは、一部のケモカイン・ケモカイン受容体を HLA-B27 非保有例で保有例と比較し高発現することが示された。これまでに、CD56^{bright} NK 細胞は AS 患者の末梢血で増多していることや、末梢性 SpA を代表する PsA では滑膜で増加していることが指摘されている（Ren C et al. J Cell Mol Med. 2022, Yang M et al. Clin Exp Immunol. 2019）。また、CCL3 や CXCR6-CXCL16 は AS 患者において健常人よりも血清濃度が高いことも報告されており（Yang M et al. Clin Exp Immunol. 2019, Zhang P et al. Curr Pharm Biotechnol. 2021）、AS/nr-SpA 病態における CD56^{bright} NK 細胞の重要性が支持される。今回の研究はその上流に位置する IFNact の存在を示唆するものであり、IFNact-CD56^{bright} NK axis に着目することで、HLA-B27 非保有例の早期診断や治療につながる可能性がある。

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
第 44 回日本炎症・再生医学会
第 10 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

別添4

3. その他

なし