

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02960

研究課題名（和文）全身性エリテマトーデスの遺伝的リスクと関連する病原性B細胞分化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of pathogenic B cell differentiation associated with genetic risk for systemic lupus erythematosus.

研究代表者

藤尾 圭志 (Fujio, Keishi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70401114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：世界最大規模の機能ゲノムデータベースImmuNexUTを用いてAge associated B cells (ABCs)の分化を促進するT細胞として、Age associated T(ThA)細胞を同定、その表現型をZEB2が規定することを明らかにした（Science Immunol 2024）。ZEB2のcontext dependent QTL効果を網羅的に評価し、ZEB2の標的遺伝子としてROR2, THEMIS2, PADI6, PLOD1を同定した。またLRRC25欠損マウスが、血清IgG産生の亢進、脾臓B細胞、形質芽細胞の分化異常、早期死亡などの自己免疫病態をきたすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、抗体産生促進能と細胞傷害活性を併せ持ち、加齢と自己免疫疾患で増加する新しいThA細胞を同定した。ThA細胞の遺伝子変動は、SLEの疾患活動性を非常に強く反映しており、ThA細胞が自己免疫疾患の新たな治療ターゲットになる可能性が示唆された。加齢で増加するThA細胞が自己免疫疾患において中心的役割を果たしていることから、ThA細胞の更なる研究は、自己免疫応答と健康長寿の違いを知ることができる可能性を内包しており、今後の治療応用への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Using the world's largest functional genome database, ImmuNexUT, we identified Age-associated T cells (ThA cells) as T cells that potentially promote the differentiation of Age-associated B cells (ABCs). We revealed that their phenotype is defined by ZEB2 (Science Immunol 2024). We comprehensively assessed the context-dependent QTL effects of ZEB2 and identified ROR2, THEMIS2, PADI6, and PLOD1 as target genes of ZEB2. Additionally, we discovered that LRRC25-deficient mice exhibit autoimmune pathologies such as enhanced serum IgG production, abnormal differentiation of spleen B cells and plasmablasts, and early mortality.

研究分野：膠原病リウマチ内科

キーワード：自己免疫疾患 疾患感受性多型 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE) は全身性自己免疫疾患であるが、難治性であり長期間の免疫抑制療法を必要とするため、平均死亡年齢が 60-70 歳程度と長期予後は予後不良である。予後改善のためには、SLE の層別化と新規治療標的を可能にする責任分子または責任経路の同定が不可欠である。これまでは SLE で I 型インターフェロンシグナルが亢進していることは分かっているものの、遺伝的リスクや臓器障害に関わる免疫担当細胞などは不明であった。しかし近年の技術的進歩により、その病態の一端が明らかとなりつつある。ヒトとマウスにおいて加齢により増加する B 細胞集団、Age-associated B cells (ABCs) が報告された。ABCs は double negative B cell (DNB) 分画に含まれ、サイトカイン産生能が高く、抗原提示能を持つばかりでなく、自己抗体産生細胞に分化する性質を持つ。さらアメリカの NIH が主導する AMP コンソーシアムが、ループス腎炎組織でシングルセル RNA シークエンスを行ったところ、健常腎組織ではみられない ABCs が集積していることが明らかとなった。これらの知見は、臨床研究における抗 CD20 抗体などの B 細胞除去抗体や、B 細胞を刺激する BlyS に対する抗体製剤であるベリムマブの有効性と併せて、SLE の臓器障害における B 細胞の重要性を示唆している。そこで SLE における適応免疫応答の解明は極めて重要と考えられる。

2. 研究の目的

疾患の病態解明の一つの手がかりは遺伝素因であり、遺伝素因と関連する分子や経路は、疾患の結果よりも原因に近いことが想定される。我々は SLE を含む免疫疾患 418 例において、末梢免疫担当細胞 28 サブセットのトランスクリプトームと全ゲノムシークエンスからなる機能ゲノムデータベース ImmuNexUT を構築した。その中で、SLE の遺伝的リスクがメモリー B 細胞のオープンクロマチン領域に集積していること、メモリー B 細胞の代謝経路遺伝子発現が SLE の臓器障害指標である SDI と関連することを見出した。なかでも、rs1560117 は DNB を含む B 細胞の LRRC25 に対し cis-eQTL 効果を発揮し、リスクジェノタイプでは LRRC25 の発現量が増えていた。また LYST は SLE の感受性遺伝子と報告されていたが、どのサブセットに作用するかは分かっていたなかった。SLE の感受性多型 rs9782955 は、DNB を含む B 細胞上の LYST にリスクジェノタイプで発現量が増加する cis-eQTL 効果を発揮した。この結果は B 細胞上の LRRC25 と LYST が SLE の発症に寄与することを強く示唆している。

さらに申請者らは cis-eQTL 効果の大きさ自体に影響する遺伝子を同定する context-dependent QTL (co-eQTL) 解析を行った。Co-eQTL は遺伝子多型部位に結合する因子 (proxy gene) の発現量による、当該遺伝子多型の cis-eQTL 効果への影響を見るものである。Co-eQTL は従来の単なる遺伝子発現の類似性よりも高精度に、転写制御機構の類似したモジュールを同定することが可能であり、申請者らは免疫担当細胞ごとに I 型インターフェロン、細胞周期、細胞傷害活性、加齢などに関連するモジュールを同定した。さらに同定されたモジュールの一つは ABCs を含む分画である DNB および CD4 陽性 T 細胞上で形成され、ABCs に特徴的に発現すること報告されている遺伝子である (Jenks et al. *Immunity* 2018;49:725-739) ZEB2, TBX21, FCRL5, FCRL3 などを含んでいた。このことは従来不明であった ABCs の転写制御の中心となる遺伝子群に近いモジュールが同定できたことを示唆している。そして興味深いことにこのモジュール内に、LRRC25 が含まれており、LRRC25 の ABCs 上の機能が SLE 発症に関与する可能性が考えられた。

LRRC25 は leucine-rich repeat containing protein 25 の略である。leucine-rich repeat

containing (LRR) protein ファミリーには、NALP3, NOD2, TLR4 など多くの免疫系で重要な遺伝子が含まれている。LRRC25 は RIG-I のオートファジーによる分解を促進することで I 型インターフェロンのシグナルを抑制することが知られているが、生体内の B 細胞を中心とする免疫応答における役割は知られていない。

既報及びこれらの知見は SLE における ABCs の重要性を示唆し、co-eQTL の DNB 上の ABCs 関連モジュールのネットワーク解析を行うと、転写因子 ZEB2 が中心的な役割を果たすことが示唆された。ZEB2 は Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2 の略であり、悪性腫瘍との関連が多く報告されている転写因子である。免疫系では ZEB2 は CD8 陽性エフェクター細胞の分化に必須であることが報告されているが、B 細胞上の機能や SLE との関連は知られていない。よって LRRC25 の機能を ABCs 転写制御の key regulator の可能性のある ZEB2 と組み合わせつつ調べることで、ABCs 分化機構に詳細に解明できると期待される。そこで本研究では LRRC25 および ZEB2 に着目して、全身性エリテマトーデスの遺伝的リスクと関連する病原性 B 細胞である ABCs の分化機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ImmuNexUT のヒトデータと遺伝子欠損マウスの解析を組み合わせ、LRRC25 の機能を ZEB2 との関連を評価しつつ解析する。そのことにより LRRC25 の、ABCs の分化制御を中心とした液性免疫応答と SLE 病態への関与を、精密に解析する。

a) B 細胞における LRRC25 機能解析

SLE の新規感受性遺伝子 LRRC25 は発現が血球系細胞に限られているが、上記の様に IFN シグナル抑制能とオートファジー促進能を持ち、全身性自己免疫疾患を促進する作用と抑制する作用の双方が想定される。ヒト B 細胞における LRRC25 機能解析として、健康人および SLE の B 細胞を LRRC25 の siRNA 存在下に刺激培養し、LRRC25 の B 細胞機能への影響を評価する。マウス全体での LRRC25 欠損マウスに能動免疫及びイミキモド投与による SLE モデル誘導を行い、LRRC25 の液性免疫応答における作用を評価する。特に ABCs 分化における LRRC25 の作用を、重点的に解析する。必要に応じて LC3-GFP マウスを掛け合わせオートファジーへの影響を検討する。

b) ZEB2 の機能解析

ZEB2 多くのコファクターと作用する転写因子であり、転写の促進と抑制の双方に作用する。神経分化や悪性腫瘍における機能の報告は集積しているが、適応免疫応答における機能は報告されていない。ヒト B 細胞と T 細胞における ZEB2 の機能解析として、健康人および SLE の B 細胞と T 細胞を ZEB2 の siRNA 存在下に刺激培養し、ZEB2 の B 細胞機能への影響を評価する。

4. 研究成果

a) B 細胞における LRRC25 機能解析

LRRC25 欠損マウスを作成したところ、血清 IgG 濃度の上昇が認められた。抗 dsDNA 抗体産生、NP-KLH 免疫時の抗 NP8-IgM 抗体産生には野生型との差は見られなかった。LRRC25 欠損マウス脾臓の FACS では、extrafollicular TFH 細胞、marginal zone B 細胞の増加、follicular B 細胞の減少が認められた。LRRC25 欠損マウス脾臓の形質細胞では、分化に重要な Xbp1 と Prdm1 の発現が低下しており、形質細胞分化の低下の可能性が考えられた。LRRC25 欠損 B 細胞を LPS と R848 で刺激すると、IgM, IgG の産生は野生型よりも低下していた。オートファジーについては野生型と明らかな差は認められなかった。また 30 週前後で体重減少、運動障害および早期死亡を認めた。以上の結果はマウスでは LRRC25 は液性免疫応答を正に制御する分子であることが示唆さ

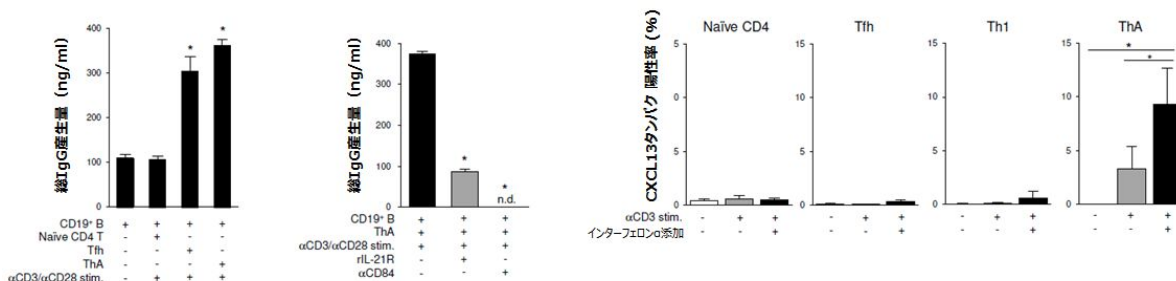
れた。

b) ZEB2 の機能解析

当初 ABC における ZEB2 の機能解析を予定していたが、海外の複数のグループが ABC における ZEB2 に注目しているという情報が得られた。上記の Co-QTL では ZEB2 は B 細胞だけでなく T 細胞上でも加齢と関連するモジュールの中心分子であり、T 細胞における ZEB2 の機能解析を進めた。

我々は ImmuNexUT 構築時のフローサイトメトリーから、若年健常人では少なく、自己免疫疾患、高齢者で増加を認め、過去には報告の無い細胞集団として ThA 細胞を発見した。ThA 細胞は、既知のヘルパー CD4 陽性 T 細胞とは重複の無いエフェクターメモリー T 細胞のうち、細胞表面の CXCR3 という分子が中程度に発現する細胞として同定され、加齢により増加することが分かった。

ThA 細胞の網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、ThA 細胞は、既知の 8 種の CD4 陽性 T 細胞とは異なる独自の遺伝子発現の特徴を有し、細胞傷害性の強い分子をとて高く発現していた。ThA 細胞は、多彩な自己抗体産生を特徴とする自己免疫疾患である SLE において、増加していた。RNA シークエンスのデータを用いて健常人と遺伝子発現の違いを確認したところ、健常人よりも、B 細胞の抗体産生誘導に関わる IL-21 と CXCL13 の発現が著しく亢進していた。実際に、試験管内の実験においても、ThA 細胞は強い抗体産生誘導能を認め、ThA 細胞による B 細胞の抗体産生を誘導する作用は、これまで、最も強い抗体産生を導くことが知られている濾胞性 CD4 陽性 T (Tfh) 細胞と同程度であった。



図：B 細胞の抗体産生を強く誘導する ThA 細胞

さらに本研究では、ThA 細胞が ZEB2 および TBX21 という 2 つの転写因子を強く発現していることを同定し、ThA の機能発現においては特に ZEB2 遺伝子がマスター制御遺伝子として機能することを明らかにした。また、ThA 細胞は T 細胞受容体の多様性が、他の T 細胞と比べ著しく低いことから、ThA 細胞が生体内の抗原特異的に増殖していることが示唆された。

SLE 症例の臨床情報と、ThA 細胞を含む 9 つの T 細胞サブセットの RNA シークエンスデータとの統合解析を行った。その結果、他の T 細胞の遺伝子変動と比べて、SLE の疾患活動性の影響を最も強く受けるのは ThA 細胞であった。また、ThA 細胞における発現変動遺伝子のほとんどが疾患活動性に関わるということを知見を得た。

2024 年 1 月の Science に ZEB2 が ABC の分化を規定する転写因子であることが報告された。我々の結果から、ZEB2 が加齢に関連する B 細胞である ABC だけではなく、加齢に関連する T 細胞である ThA 細胞の重要な制御分子であり、SLE の治療標的である可能性が示唆された。本成果は 2024 年 2 月の Science Immunology に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuchida Yumi, Shoda Hirofumi, Nakano Masahiro, Ota Mineto, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Kurano Makoto, Yatomi Yutaka, Fujio Keishi, Sawada Tetsuji	4. 巻 31
2. 論文標題 Autotaxin is a potential link between genetic risk factors and immunological disturbances of plasmacytoid dendritic cells in systematic lupus erythematosus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 1578 ~ 1585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/09612033221128494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsukumo Shin-ichi, Subramani Poorani Ganesh, Seija Noe, Tabata Mizuho, Maekawa Yoichi, Mori Yuya, Ishifune Chieko, Itoh Yasushi, Ota Mineto, Fujio Keishi, Di Noia Javier M., Yasutomo Koji	4. 巻 8
2. 論文標題 AIF3, a susceptibility factor for autoimmune diseases, is a molecular facilitator of immunoglobulin class switch recombination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabq0008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abq0008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Masahiro, Ota Mineto, Fujio Keishi	4. 巻 185
2. 論文標題 Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3375 ~ 3389.e21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.07.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwasaki Yukiko, Takeshima Yusuke, Nakano Masahiro, Okubo Mai, Ota Mineto, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Okamura Tomohisa, Endo Takaho, Miki Ichiro, Sakurada Kazuhiro, Yamamoto Kazuhiko, Fujio Keishi	4. 巻 62
2. 論文標題 Combined plasma metabolomic and transcriptomic analysis identify histidine as a biomarker and potential contributor in SLE pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 905 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keac338	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ota M, Nagafuchi Y, Fujio K, et al.	4. 巻 184
2. 論文標題 Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3006-3021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2021.03.056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshima Y, Iwasaki Y, Nakano M, Narushima Y, Ota M, Nagafuchi Y, Sumitomo S, Okamura T, Elkoussy K, Ishigaki K, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K, Fujio K.	4. 巻 epub
2. 論文標題 Immune cell multionics analysis reveals contribution of oxidative phosphorylation to B-cell functions and organ damage of lupus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2021-221464.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Izuka Shinji, Komai Toshihiko, Itamiya Takahiro, Ota Mineto, Nagafuchi Yasuo, Shoda Hirofumi, Matsuki Kosuke, Yamamoto Kazuhiko, Okamura Tomohisa, Fujio Keishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Machine learning driven immunophenotypic stratification of mixed connective tissue disease, corroborating the clinical heterogeneity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keae158	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuuki Hayato, Itamiya Takahiro, Nagafuchi Yasuo, Ota Mineto, Fujio Keishi	4. 巻 15
2. 論文標題 B cell receptor repertoire abnormalities in autoimmune disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2024.1326823	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Manaka, Takahashi Hideyuki, Itamiya Takahiro, Nakano Masahiro, Nagafuchi Yasuo, Hatano Hiroaki, Kawahata Kimito, Yamamoto Kazuhiko, Shoda Hirofumi, Ishigaki Kazuyoshi, Ota Mineto, Okamura Tomohisa, Fujio Keishi	4. 巻 9
2. 論文標題 Age-associated CD4+ T cells with B cell promoting functions are regulated by ZEB2 in autoimmunity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.adk1643	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ota Mineto, Nakano Masahiro, Nagafuchi Yasuo, Kobayashi Satomi, Hatano Hiroaki, Yoshida Ryochi, Akutsu Yuko, Itamiya Takahiro, Ban Nobuhiro, Tsuchida Yumi, Shoda Hirofumi, Yamamoto Kazuhiko, Ishigaki Kazuyoshi, Okamura Tomohisa, Fujio Keishi	4. 巻 82
2. 論文標題 Multimodal repertoire analysis unveils B cell biology in immune-mediated diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1455 ~ 1463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/ard-2023-224421	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Natsumoto Bunki, Shoda Hirofumi, Nagafuchi Yasuo, Ota Mineto, Okumura Takashi, Horie Yumi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Tsuji Motonori, Otsu Makoto, Taniguchi Hideki, Fujio Keishi	4. 巻 139
2. 論文標題 Functional evaluation of rare OASL variants by analysis of SLE patient-derived iPSCs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 103085 ~ 103085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2023.103085	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Keishi Fujio
2. 発表標題 The skewing of the B cell receptor repertoire in unswitched memory B cells correlates with the disease activity of systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 The 52nd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岡村 僚久 (Okamura Tomohisa) (10528996)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------