

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16696

研究課題名（和文）新規RNAseq解析データベースの樹立に基づく関節リウマチの新規病原性細胞の同定

研究課題名（英文）Identification of novel pathogenic cells in rheumatoid arthritis based on the establishment of a novel RNAseq database

研究代表者

松田 光太郎（Matsuda, Kotaro）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・客員研究員

研究者番号：00815540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチは患者数が最も多い自己免疫疾患のひとつであるが、その病態形成の全貌は明らかになっていない。近年、シングルセルRNA-seqによって関節リウマチの滑膜に集簇する多彩な細胞集団の知見が得られるようになった。しかし、関節リウマチの患者背景は多様であり、個々のデータベースは検体数が少ないため、統合・再構築することで真の病原性細胞を同定することが可能となる。本研究では、複数のデータベースを統合して遺伝子を抽出し、それらの遺伝子のノックアウトマウスに関節炎を誘導することで、関節リウマチの新たな病原性遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは、生物学的製剤やJAK阻害剤など近年の薬物療法の進歩によって、臨床的寛解も達成できるようになってきたが、未だに治療困難例が存在する。また、病態形成や治療抵抗性に関わる遺伝子の全貌は明らかになっていない。本研究では、複数のデータベースを統合して関節リウマチの病原性遺伝子の候補群を抽出し、それらの遺伝子のノックアウトマウスに関節炎を誘導することで、当該遺伝子の自己免疫性関節炎における役割を検討した。本研究は関節リウマチの病原性遺伝子と病原性細胞サブセットの一部を明らかにすることで、関節リウマチの新規治療の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) is considered one of the most prevalent autoimmune diseases; however, a comprehensive understanding of its pathogenesis remains elusive. Recent studies have provided insights into the diverse populations of cells clustering in the synovium of RA through the utilization of single-cell RNA sequencing. Nevertheless, the backgrounds of RA patients exhibit substantial diversity, and individual databases suffer from limitations in sample sizes. Consequently, the integration and reconstruction of these databases offer the potential to identify true pathogenic cells. In this study, we integrated multiple databases to extract genes and identified novel pathogenic genes of RA by inducing arthritis in knockout mice of those genes. The findings of this research provide valuable insights into novel subsets of pathogenic cells in RA.

研究分野：整形外科

キーワード：関節リウマチ シングルセル解析 遺伝子改変マウス 自己免疫性関節炎 病原性細胞サブセット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは罹患率が人口の約1%と比較的頻度の高い自己免疫疾患である。滑膜炎による関節破壊が進行し、不可逆的な身体機能障害に至る。メトトレキサート、生物学的製剤、JAK 阻害剤などの導入によって臨床的寛解も得られるようになってきたが、治療不応例の予後は依然として不良であり、画期的な治療法の確立が喫緊の課題である。

近年、シングルセル RNA-seq によって関節リウマチの滑膜炎に集簇する細胞の多彩なクラスターが認識されるようになってきた。しかし、個々のデータベースは検体数が少なく、病原性遺伝子、病原性細胞サブセットの探索にはそれらの統合、再構築が必要である。また、遺伝子改変マウスを用いて生体レベルでの自己免疫性関節炎への寄与を証明することで、真の病原性遺伝子を同定することが出来る。

### 2. 研究の目的

関節リウマチ滑膜炎のバルク RNA-seq とシングルセル RNA-seq のデータを比較・統合し、新規遺伝子改変マウスで機能評価を行うことによって、関節リウマチの発症や治療抵抗性に寄与する新規病原性遺伝子や病原性細胞サブセットを解明することである。

### 3. 研究の方法

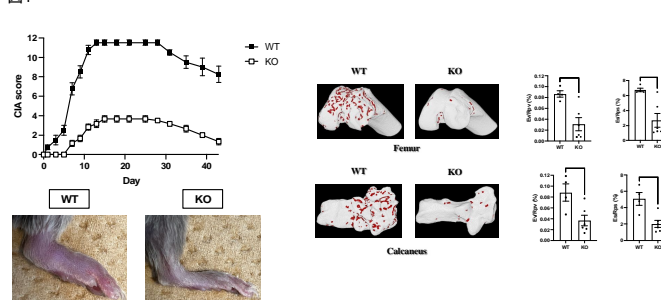
本研究は、関節リウマチ滑膜炎のバルク RNA-seq で病原性遺伝子の候補群をスクリーニングし、独自データベースのシングルセル RNA-seq で病原性遺伝子と病原性細胞を同定し、遺伝子改変マウスで関節炎における役割を検討して、関節リウマチの発症や治療抵抗性のメカニズムに関わる遺伝子や細胞サブセットを解明する。

### 4. 研究成果

2021 年度は、公共データベースや既報論文から取得した関節リウマチ滑膜炎のバルク RNA-seq データとシングルセル RNA-seq データを統合し、申請者独自の RNA-seq データベースを確立した。発症早期無治療および発症早期で治療介入した関節リウマチ群と非リウマチ群の滑膜炎を比較し、バルク RNA-seq で早期関節リウマチにおいて発現上昇し、薬剤投与で発現低下した遺伝子群を選定した。さらに、シングルセル RNA-seq で関節リウマチの滑膜炎に集簇する細胞のクラスター解析を行なった。T 細胞、B 細胞、骨髄系細胞・単球、滑膜線維芽細胞のクラスターで特異的に上昇している遺伝子を抽出し、それらをバルク RNA-seq で選定した遺伝子群と比較して、それぞれの細胞種別の病原性遺伝子の候補としてリストアップした。この中から、現時点で免疫系での機能が明らかになっていない濾胞性ヘルパー T 細胞サブセットの遺伝子 X、形質細胞サブセットの遺伝子 Y、滑膜線維芽細胞サブセットの遺伝子 Z に着目し、CRISPR-Cas9 法でそれぞれのノックアウトマウスをコラーゲン誘導性関節炎感受性の DBA1/J 系統で作製した。このうち

遺伝子 X のノックアウトマウスにコラーゲン誘導性関節炎を誘導すると、関節炎と骨破壊が顕著に抑制された(図1)。形質細胞サブ

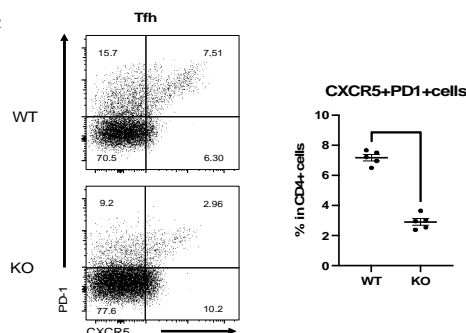
図1



セットの遺伝子 Y と滑膜線維芽細胞の遺伝子 Z に関してはそれぞれのノックアウトマウスにコラーゲン誘導性関節炎を導入しても関節炎や骨破壊の程度は野生型と差はなく、その他の遺伝子との協調が多く、単一遺伝子の欠損では自己免疫性関節炎の病態に影響を及ぼさないものと考えられた。

2022 年度は、遺伝子 X のノックアウトマウスで自己免疫性関節炎が抑制される機序を解析した。遺伝子 X のノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して、胎性致死はなく、発育は正常であった。また、骨髄、脾臓、リンパ節、胸腺などの免疫器官の発達に差はなかった。一方で、コラーゲン誘導性関節炎環境下では、所属リンパ節と滑膜炎の濾胞性 T 細胞の細胞数が著明に減少していた(図2)。

図2



また、それと同時に胚中心のB細胞も著名に減少し、それぞれのサブクラスの自己抗体(2型コラーゲン抗体)の産生も低下していた(図3)。

続いて、遺伝子Xのノックアウトマウスの濾胞性ヘルパーT細胞への分化誘導能を確認した。フローサイトメーターを用いて遺伝子XのノックアウトマウスからナイーブT細胞を単離し、濾胞性T細胞への分化条件(IL-6とIL-21)で刺激した。遺伝子Xのノックアウトマウスは、野生型と比較して濾胞性ヘルパーT細胞への分化能が著明に低下していた(図4)。以上から、遺伝子Xは生理的環境下では明らかな影響はないが、関節炎環境下で濾胞性T細胞への分化を制御しており、それによって遺伝子Xのノックアウトマウスでは関節炎や骨破壊が抑制されると考えられた。

図3

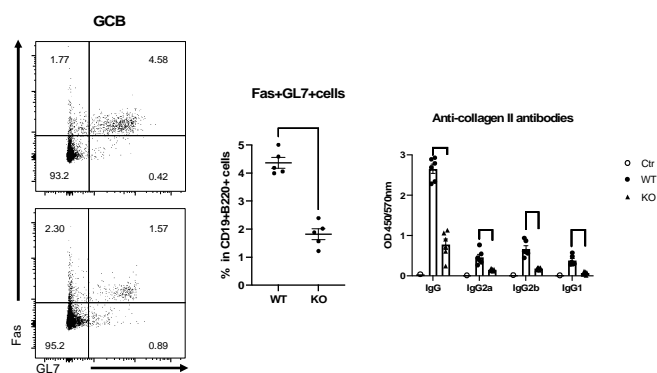
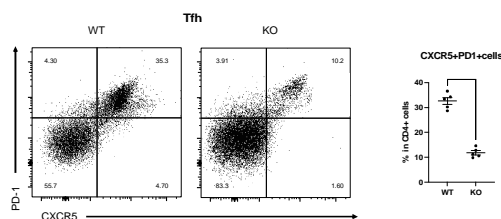


図4



近年、ヒトの関節リウマチ滑膜では末梢性ヘルパーT細胞が重要な役割を果たしていると考えられているが、従来の濾胞性ヘルパーT細胞と遺伝子発現や機能の共有が多い。また、現時点ではマウス関節炎における末梢性ヘルパーT細胞は明らかにされていない。そのため、本研究では濾胞性ヘルパーT細胞を中心に解析して関節炎への影響を検討しているが、マウスの自己免疫性関節炎における末梢性ヘルパーT細胞の観点からは検証が充分でない。濾胞性T細胞と末梢性T細胞をそれぞれ明確に定義し区別した上で関節炎への寄与を解析することで、より自己免疫性の炎症や、局所でのシグナル伝達の重要性が明らかになると考えられる。今後は、マウスの末梢性ヘルパーT細胞を同定し、濾胞性ヘルパーT細胞と遺伝子Xを含む遺伝子発現の相違を評価すること、ヒトのデータベースを再解析し、遺伝子Xが治療標的となっていることを示すことで、遺伝子Xと末梢性ヘルパーT細胞もしくは濾胞性T細胞に着目した新規治療法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotaro Matsuda, Naoto Shiba, Koji Hiraoka	4. 巻 24
2. 論文標題 New Insights into the Role of Synovial Fibroblasts Leading to Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 5173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24065173	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 Kotaro Matsuda, Yasuo Sugita, Takuya Furuta, Mayuko Moritsubo, Koichi Ohshima, Motohiro Morioka, Kenji Takahashi, Koichi Higaki, Akiyoshi Kakita	4. 巻 72
2. 論文標題 Elevated expression of transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) reflects aggressiveness of primary central nervous system lymphomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 437-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13264	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 Iwata Shintaro, Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG), Kawai Akira, Ueda Takafumi, Ishii Takeshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Symptomatic Venous Thromboembolism in Patients with Malignant Bone and Soft Tissue Tumors: A Prospective Multicenter Cohort Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 3919-3927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09308-6	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 松田 光太郎、高柳 広	4. 巻 95
2. 論文標題 整形外科医が知ってほしい骨代謝に関する基礎知識	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1135-1143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------