

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09972

研究課題名(和文) 関節リウマチ検体のトランスクリプトーム解析で同定された新規シグナルの検討

研究課題名(英文) Analysis of signaling pathways identified by transcriptome analysis of rheumatoid arthritis samples

研究代表者

住友 秀次 (Sumitomo, Shuji)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20392996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、関節リウマチ患者の末梢血CD4陽性T細胞亜分画のトランスクリプトーム解析を行い、疾患活動性と相関する遺伝子群でT細胞受容体・RICTOR・KDM5A関連シグナルが亢進し、アバタセプト投与で抑制されることを明らかにした。
また、健康人末梢血5分画のeQTL遺伝子カタログと関節リウマチのGWASデータを統合することで、関節リウマチの各細胞分画でのサイトカインパスウェイの推測を可能にした。また、関節リウマチのリスクSNPがB細胞上のCD83の発現に負のeQTL効果を持ち、CD27-IgD-double negative B細胞を増加させ、B細胞分化に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究開始当初は報告数の少なかった、CD4陽性T細胞亜分画を分取して遺伝子解析を行ったところに新規性がある。亜分画の解析を行うことで、細胞分画比率の変化に影響を受けずに、関節リウマチにおける各細胞分画の変動発現遺伝子、細胞内シグナル、薬剤投与の影響を明らかにすることができた。
また、本研究では、健康人末梢血細胞分画のeQTL遺伝子カタログを関節リウマチのGWASデータと統合することによって、疾患検体データが揃っていない状況であっても疾患における各細胞分画内のシグナル伝達や、細胞分画比率の相関解析を行うことが可能となり、解析の可能性が大きく広がったという意義がある。

研究成果の概要(英文)：We performed transcriptome analysis of peripheral blood CD4+ T cell subsets in patients with rheumatoid arthritis, and showed that T-cell receptor, RICTOR, and KDM5A-related signals were enhanced in genes that correlate with disease activity, and administration of abatacept suppressed these signal pathways.
In addition, by integrating the eQTL gene catalog of 5 subsets of peripheral blood taken from healthy subjects and GWAS data of rheumatoid arthritis, it was possible to estimate the cytokine pathway in each cell fraction of rheumatoid arthritis. Moreover, it was suggested that one risk SNPs for rheumatoid arthritis has a negative eQTL effect on CD83 expression on B cells, and increases CD27-IgD-double negative B cells, and influences B cell differentiation.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ トランスクリプトーム解析 パスウェイ解析 発現変動遺伝子

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、炎症性滑膜炎を特徴とする自己免疫疾患である。関節リウマチにおける自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の重要性はマウスの実験からも確立している (Nat Rev Rheumatol 2014;10:160)。CD4 陽性 T 細胞分画については、Th17 が重要とされる一方 (Arthritis Rheum 2009;60:1647)、Th1 (Ann Rheum Dis 2008;67:1299)、制御性 T 細胞 (Treg) (Nat Rev Rheumatol 2009;5:560)、濾胞性 T 細胞 (Tfh) (Immunity 2013;39:770) の重要性も報告されている。また、トランスクリプトーム解析 (transcriptome analysis) は mRNA 発現を網羅的に解析する手法で、RNA シークエンス (RNA-Seq) によって感度が向上し、重要性は益々増している。

研究開始当初は、関節リウマチ患者の末梢血のトランスクリプトーム解析の報告は、殆どが全末梢血単核球を対象としていた。細胞分画比率は結果に直接的な影響を与えるため、病態の解明には、純化した細胞分画の解析が望ましい (Ann Rheum Dis 2013;72:1118) とされるが、CD4 陽性 T 細胞 (Arthritis Res Ther 2015;17:76) や、好中球 (Rheumatology 2015;54:188) の報告はみられたが、CD4 陽性 T 細胞亜分画や、その他の細胞の報告は乏しい状況であった。

2. 研究の目的

関節リウマチ患者と健常人末梢血の CD4 陽性 T 細胞亜分画のトランスクリプトーム解析を基盤として、シグナル経路の変化が、どの細胞分画において、どのような遺伝子によって制御され、シグナルのどの部分が関節リウマチの病態と強く関連するのかを明らかにすることを目標とした。これらの検討の結果、関節リウマチの治療戦略の基盤となる、新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 関節リウマチ患者 10 人と健常人 10 人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞 7 分画 (Naive, Treg, Tfh, Th1, Th17, Th1/17, nonTh1/17) のトランスクリプトーム解析を行い、一部の関節リウマチ患者ではアバタセプト (CTLA4-Ig 融合蛋白製剤) 投与前後の比較も行った。これらの発現変動遺伝子解析、パスウェイ解析を行い、得られたシグナル経路の変化が、どの細胞分画において、どのような遺伝子によって制御され、シグナルのどの部分が関節リウマチの病態と強く関連するのかを検討した。

(2) Weighted correlation network analysis (WGCNA) (発現の相関をもとに遺伝子を遺伝子群 (module) に分割する解析手法) を用いて、module と臨床情報の相関を検討し、関節リウマチの疾患活動性・ABT 治療と強く相関する遺伝子群について検討した。

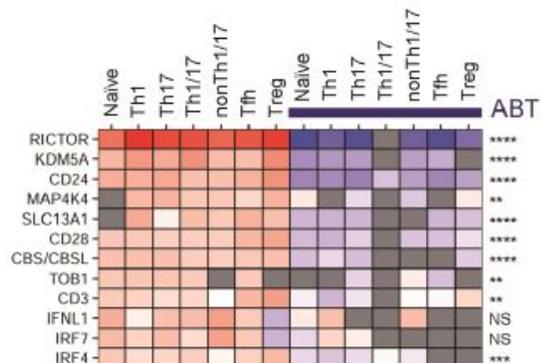
(3) 我々が作成した、健常人 105 名の末梢血 5 分画 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球) と SNP から作成した遺伝子カタログと、関節リウマチの GWAS データと統合することで、関節リウマチにおける各分画細胞におけるパスウェイについて推測を行い、また関節リウマチのリスク SNP と関連のある eQTL 効果について検討した。

4. 研究成果

(1) 関節リウマチ患者末梢血の詳細な CD4 陽性 T 細胞亜分画のトランスクリプトーム解析を、遺伝子群 (module) を用いた手法 (WGCNA) でを行い、論文発表した (Sumitomo S, et al. Journal of Autoimmunity 2018;89:21-9)。関節リウマチの疾患活動性と強い正の相関がある module の上位 30 遺伝子は JAK3、ZAP70 を含んでおり、T 細胞受容体 (TCR) 下流のシグナルが関節リウマチで亢進し、ABT 投与で抑制されていた。

本論文では、RICTOR (mTORC2 関連分子)・KDM5A (ヒストン脱メチル化酵素)・T 細胞受容体・酸化的リン酸化に関連したシグナル経路を、関節リウマチに特徴的な異常として新たに同定し、共刺激阻害剤 (CTLA4-Ig) であるアバタセプトの投与によって、これらの変化が減弱することを明らかにした。

これらの結果は、第 61 回日本リウマチ学会学術集会、第 38 回日本炎症・再生医学会、第 19 回アジア太平洋リウマチ学会 (APLAR) で発表された。第 38 回日本炎症・再生医学会では優秀演題賞を受賞し、総説を掲載した (Sumitomo S, et al. Inflamm Regen. 2018;38:21)。

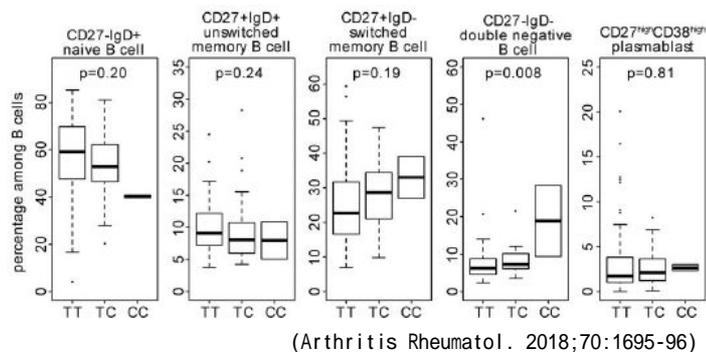


(Journal of Autoimmunity 2018;89:21-9)

(2) 健常人の 105 名の末梢血 5 分画 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球) を分取してトランスクリプトーム解析と SNP タイピングを行い eQTL 解析を行い遺伝子カタログを作成した。これに細胞特異的のエピゲノム情報と、関節リウマチの GWAS データを統合すること

で、関節リウマチにおける細胞特異的な情報を推測することができる。この方法により、関節リウマチにおいて高発現な遺伝子と関節リウマチの早期発症との相関関係が、細胞種（CD4陽性T細胞・単球）ごとに示された。また、細胞種ごとのサイトカインパスウェイ解析を行い、関節リウマチではCD4陽性T細胞におけるTNFパスウェイが活性化していることが推測された (Ishigaki K, et al. Nature Genetics 2017;49(5):110-5)。

(3) 関節リウマチに特徴的な変化を呈する分画・遺伝子群・シグナル経路の抽出に関して、T細胞以外の細胞分画にも検索対象を広げた。我々は、作成した健常人の105名の末梢血5分画（CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、B細胞、NK細胞、単球）とSNPの遺伝子カタログを、関節リウマチのGWASデータと統合することで、関節リウマチのリスクSNPであるrs12529514がB細胞上のCD83の発現に負のeQTL効果を持っていることを見出した。これは複数の報告で示されており (Nat Genet 2017;49:1120-5, Arthritis Rheumatol 2018;70:361-70)、また本SNPがNF- κ B結合部位の近傍にあることから、関節リウマチの病態に何らかの形で関与することを予想した。



我々は、健常人105人の細胞分画（フローサイトメーターで得られた）と本SNPとの関連を解析し、本SNPのハプロタイプがCD27-IgD⁻ double negative B細胞の比率と有意な正の相関があることを示した (Tsuchida Y, Sumitomo S, et al. Arthritis Rheumatol. 2018;70:1695-96)。CD27-IgD⁻ double negative B細胞は関節リウマチ患者の末梢血で増加していることが報告されており (Rheumatology (Oxford) 2018;57:164-74)、rs12529514がB細胞上のCD83の発現を抑制することで、B細胞分化に関節リウマチ患者に類似した影響を与えている可能性が示唆された。これらの結果は、第62回日本リウマチ学会学術集会、第40回日本炎症・再生医学学会で発表された。

その後、細胞表面のCD83がBCRシグナルのnegative regulatorとして働き、B細胞機能を抑制するという仮説を立てて検討し、解析をすすめた。B細胞に対するsiRNA実験は抑制効率が低いいため、刺激時間や培養条件を変えるなどの条件検討実験も行い、関節リウマチに特徴的な変化を呈するシグナル経路の抽出を試みている。

<引用文献>

- Sumitomo S, et al. Journal of Autoimmunity 2018;89:21-9
- Sumitomo S, et al. Inflamm Regen. 2018;38:21
- Ishigaki K, et al. Nature Genetics 2017;49(5):110-5
- Tsuchida Y, Sumitomo S, et al. Arthritis Rheumatol. 2018;70:1695-96

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 Sumitomo Shuji, Nagafuchi Yasuo, Tsuchida Yumi, Tsuchiya Haruka, Ota Mineto, Ishigaki Kazuyoshi, Nakachi Shinichiro, Kato Rika, Sakurai Keiichi, Hanata Norio, Tateishi Shoko, Kanda Hiroko, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Fujio Keishi, Yamamoto Kazuhiko	4. 巻 89
2. 論文標題 A gene module associated with dysregulated TCR signaling pathways in CD4 + T cell subsets in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.11.001	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 Tsuchida Yumi, Sumitomo Shuji, Ota Mineto, Tsuchiya Haruka, Nagafuchi Yasuo, Shoda Hirofumi, Fujio Keishi, Ishigaki Kazuyoshi, Yamaguchi Kensuke, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Yamamoto Kazuhiko	4. 巻 70
2. 論文標題 Reduction of CD83 Expression on B Cells and the Genetic Basis for Rheumatoid Arthritis: Comment on the Article by Thalayasingam et al	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/art.40652	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 Sumitomo Shuji, Nagafuchi Yasuo, Tsuchida Yumi, Tsuchiya Haruka, Ota Mineto, Ishigaki Kazuyoshi, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Fujio Keishi, Yamamoto Kazuhiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Transcriptome analysis of peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis: a systematic review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s41232-018-0078-5	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 Ishigaki Kazuyoshi, Kochi Yuta, Suzuki Akari, Tsuchida Yumi, Tsuchiya Haruka, Sumitomo Shuji, Yamaguchi Kensuke, Nagafuchi Yasuo, Sakurai Keiichi, Shoda Hirofumi, Okada Yukinori, Momozawa Yukihide, Kamatani Yoichiro, Yamada Ryo, Kubo Michiaki, Fujio Keishi, Yamamoto Kazuhiko, et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Polygenic burdens on cell-specific pathways underlie the risk of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/ng.3885	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土屋 遥香、太田 峰人、住友 秀次、石垣 和慶、鈴木 亜香里、坂田 豊典、高地 雄太、門野 夕峰、白髭 克彦、田中 栄、山本 一彦、藤尾 圭志
2. 発表標題 関節リウマチ患者由来滑膜維芽細胞の統合的機能ゲノム解析
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田 優美、太田 峰人、石垣 和慶、住友 秀次、山口 健介、永淵 泰雄、土屋 遥香、庄田 宏文、鈴木 亜香里、山本 一彦、高地 雄太、藤尾 圭志
2. 発表標題 刺激下でのCD4陽性T細胞における遺伝的要因による遺伝子発現の制御
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住友 秀次、永淵 泰雄、土田 優美、土屋 遥香、太田 峰人、石垣 和慶、神田 浩子、立石 晶子、鈴木 亜香里、高地 雄太、藤尾 圭志、山本 一彦
2. 発表標題 関節リウマチ患者の末梢血CD4+T細胞で同定された疾患活動性と相関する遺伝子群とアパタセプトの影響
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住友 秀次、永淵 泰雄、石垣 和慶、土田 優美、土屋 遥香、太田 峰人、花田 徳大、神田 浩子、立石 晶子、鈴木 亜香里、高地 雄太、藤尾 圭志、山本 一彦
2. 発表標題 関節リウマチ患者の末梢血CD4+T細胞亜分画のmodule解析
3. 学会等名 第22回リウマチフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumi Tsuchida, Shuji Sumitomo, Kazuyoshi Ishigaki, Mineto Ota, Haruka Tsuchiya, Akari Suzuki, Yuta Kochi, Keishi Fujio, Kazuhiko Yamamoto
2. 発表標題 Genetic perturbation of immunological gene expression in T cells under different polarizing conditions
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumi Tsuchida, Shuji Sumitomo, Mineto Ota, Kazuyoshi Ishigaki, Kensuke Yamaguchi, Yasuo Nagafuchi, Haruka Tsuchiya, Hirofumi Shoda, Akari Suzuki, Kazuhiko Yamamoto, Yuta Kochi, Keishi Fujio
2. 発表標題 A Reduction in the Expression of CD83 on B Cells May Underlie the Genetic Predisposition for Rheumatoid Arthritis
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住友 秀次, 永淵 泰雄, 石垣 和慶, 土田 優美, 土屋 遥香, 太田 峰人, 仲地 真一郎, 加藤 里佳, 櫻井 恵一, 花田 徳大, 神田 浩子, 立石 晶子, 高地 雄太, 藤尾 圭志, 山本 一彦
2. 発表標題 関節リウマチ患者の末梢血CD4+T細胞で同定された疾患活動性と相関する遺伝子群とアバタセプトの影響
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 住友 秀次, 永淵 泰雄, 石垣 和慶, 土田 優美, 土屋 遥香, 太田 峰人, 仲地 真一郎, 加藤 里佳, 櫻井 恵一, 花田 徳大, 神田 浩子, 立石 晶子, 高地 雄太, 藤尾 圭志, 山本 一彦
2. 発表標題 関節リウマチ患者の末梢血CD4+T細胞で同定された疾患活動性と相関する遺伝子群とアバタセプトの影響
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shuji Sumitomo, Yasuo Nagafuchi, Yumi Tsuchida, Haruka Tsuchiya, Mineto Ota, Kazuyoshi Ishigaki, Shinichiro Nakachi, Rika Kato, Keiichi Sakurai, Norio Hanata, Shoko Tateishi, Hiroko Kanda, Akari Suzuki, Yuta Kochi, Keishi Fujio, Kazuhiko Yamamoto
2. 発表標題 A gene module associated with dysregulated TCR signaling pathways in CD4+ T cell subsets in rheumatoid arthritis
3. 学会等名 19th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----