自己免疫疾患の機能ゲノム・オミックス解析からの展望

藤尾 圭志

要 旨

医学の進歩により、従来単一の「疾患」とされてきた集団を、治療反応性や予後により層別化することの重要性が明らかとなった。まさに最近の技術的進歩は、次世代シーケンス、マスサイトメトリー等による、ヒトのゲノム、遺伝子発現、免疫担当細胞サブセットの網羅的解析を現実のものとしている。自己免疫疾患を含むcommon diseaseの疾患予後予測については、頻度が高いが、影響の小さい遺伝子多型の情報のみでは現在のところ不十分である。そこで、ゲノム情報に遺伝子発現データ等さまざまなレベルのデータを統合した解析を行う試みが進められている。従来、不均一性の高いヒト疾患検体の解析にはさまざまなハードルがあったが、近年の技術的進歩により、ヒト検体自体の解析が急速に広がりつつある。特に、海外では国家プロジェクトとして、大規模な産学連携プロジェクトが進行中であり、日本においても限られた独自の優れたリソースを戦略的に使うことが重要と考えられる。

[日内会誌 107 : 2338~2343, 2018]

Key words 自己免疫疾患, 次世代シーケンス, eQTL解析, マスサイトメトリー, 単一細胞RNAシーケンス

はじめに

医学の進歩により、多くの疾患において、臨床試験に基づいたガイドラインやリコメンデーションが作成されるようになり、医療の質が向上している。そのような医療の整備は、一方で、ある「疾患」に分類される患者の不均一性を明らかにしつつある。関節リウマチ（rheumatoid arthritis : RA）をはじめとする自己免疫疾患においても、生物学的製剤や免疫抑制薬等により、多くの症例で寛解を導入できるのに対し、十分に反応しない症例もかなりの割合に達することが判明している。

そのようななかで、2015年、アメリカで

Precision Medicineという概念が提示された。これは、従来の治療法の多くが平均的な患者向けにデザインされていたのに対し、遺伝子、環境、ライフスタイルに関する個人毎の違いを考慮した予防法や治療法を確立するという考え方である。最近の技術的進歩は、次世代シーケンスやマスサイトメトリー等による、ヒトのゲノム、遺伝子発現、免疫担当細胞サブセットの網羅的解析を可能としている（図1）。自己免疫疾患領域でも、これらのビッグデータを用いて、疾患を治療反応性や予後により層別化する試みが進められている。本稿では、自己免疫疾患に対する機能ゲノム・オミックス解析の最近の進展を概説してみたい。

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻アレルギー・リウマチ学

The Cutting-edge of Medicine ; An overview of functional genomics and omics research for autoimmune diseases.

Keishi Fujio : Department of Allergy and Rheumatology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Japan.

図1 次世代シーケンスやマスサイトメトリー等による、ヒトのゲノム、遺伝子発現、免疫担当細胞サブセットの網羅的解析

1. 遺伝子多型と自己免疫疾患

ヒトの疾患は、遺伝素因と環境要因双方の寄与により発症するが、それらの寄与の程度は疾患毎に異なる。例えば、単一遺伝子疾患は遺伝素因により発症し、外傷等は環境要因によるといえるが、高血圧や糖尿病、癌等のcommon diseaseは遺伝素因と環境要因双方の寄与により発症する。自己免疫疾患もcommon diseaseに含まれ、遺伝素因と環境要因双方が寄与する。遺伝素因の大きな部分は、一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）が担うと考えられるが、比較的集団内で頻度の高い（1～5%以上）SNPをcommon variant、より頻度の低い（1%未満）変異はrare variantと呼ばれている。2型糖尿病等のcommon diseaseでは、一般的にcommon variantの寄与が大きいとされているが、自己免疫疾患ではcommon variantより頻度の低いvariantの寄与があることがわかってきた。

I型インターフェロンは、抗ウイルス活性を担う自然免疫系のサイトカインであるが、全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）等の膠原病では、末梢血の免疫担当細胞のI型インターフェロン経路が活性化して自己抗体産生に関わっている。I型インターフェロンを制御する*TREX1* 遺伝子や*IFIH1* 遺伝子の機能異常を惹起するrare variantがあると、I型インターフェロン経路が恒常的に活性化し、脳内

石灰化や血小板減少を伴うAicardi-Goutieres症候群を発症する¹⁾。そして、Aicardi-Goutieres症候群を惹起する遺伝子にrare variantを有する症例のなかには、皮疹等SLEの分類基準を満たし、SLEとして治療されている場合があることが報告されている。また、重症SLE 30例でエキソームシーケンスを行ったところ、14遺伝子にrare variantに属する*de novo*のミスセンス変異が同定されたという報告もある。

どの程度の自己免疫疾患患者にrare variantが関与するのかわからないが、臨床現場で診療する多くの症例のなかには、発症と関連するrare variantを有する症例が含まれる可能性がある。そこで、自己免疫疾患のこれからの医療においては、common variantだけでなく、rare variantの理解も必要であると考えられる。

2. 遺伝子多型による予後予測の試み

自己免疫疾患とcommon variantの関連は、2000年代以降に発展したゲノムワイド関連解析（genome-wide association study：GWAS）により明らかとなった。例えば、RAにおいては、発症に関連する100以上の遺伝子多型が報告されている。遺伝子多型が発症に深く関与するのであれば、その情報は疾患の予後予測等の層別化にも有用である可能性があり、さまざまな解析が行われてきた。特にRAは症例数も多く、治

療反応性の評価も明確であることから、自己免疫疾患の層別化のプロトタイプになると期待された。2016年に、TNF (tumor necrosis factor) 阻害薬による治療を受けたRA 2,706例のcommon variant (頻度1%以上) 情報を用い、TNF阻害薬に対する反応性の予測モデル構築の試みが報告された。残念なことに、全世界から73の解析チームがチャレンジしたが、臨床情報による予測モデルに遺伝子多型情報を加えることによる予測精度の向上は認められなかった²⁾。この結果は、common variantの情報のみでは今後の層別化が困難であることを示唆している。その理由としては、rare variantの情報を含まないこと、RAの発症に対する遺伝素因の寄与が半分程度であること、また、遺伝子情報から疾患発症に至るまでの間に、遺伝子発現、タンパク機能、細胞機能等さまざまなレベルの生命現象が存在することが挙げられる。

そこで、遺伝子多型情報に焦点を当てたGWASの次の段階として、機能ゲノム解析という考え方が出てきている。機能ゲノム解析は、遺伝子多型情報等の遺伝子情報を用い、遺伝子、タンパク等の発現と機能をシステムワイドに解析するアプローチである。

3. 量的形質遺伝子座解析

機能ゲノム解析の1つのポイントは、量的形質遺伝子座 (quantitative trait locus: QTL) 解析である。これは遺伝子多型が遺伝子発現量等の量的形質に及ぼす影響を解析することで、遺伝子多型の機能を評価する手法である。免疫疾患の疾患感受性遺伝子のなかで、タンパクをコードするコーディング領域に存在するものは10%程度しかなく、半数以上は染色体上のエンハンサー領域に存在する。エンハンサーは染色体の立体構造上プロモーターに近接し、エンハンサーに転写因子が結合することで、プロモーター活性が制御される。エンハンサー領域に遺

伝子多型が存在すると、転写因子の結合性が変化し、その結果として、近傍の遺伝子の発現量に変化することがある。このような遺伝子発現量に対する遺伝子多型の影響をexpression quantitative trait locus (eQTL) 効果と呼ぶ。ある遺伝子多型Xの近傍のある遺伝子Aに対するeQTL効果を確認できれば、その遺伝子多型Xは遺伝子Aを介して疾患に関連している可能性があり、eQTL解析は疾患発症に重要な遺伝子を同定する手掛かりとなる (図2)。また、エンハンサーは細胞や臓器特異性が高く、eQTL効果が強い細胞や臓器があれば、その細胞や臓器における遺伝子多型の機能が疾患に関連することが推測可能である。

2015年、BenthamらはSLE患者のGWAS解析に、既に公開されている主に健康人からのさまざまなリンパ球の遺伝子発現データによるeQTL解析を組み合わせで解析した。それにより、GWAS単独の解析よりも、疾患の原因の候補となる遺伝子を絞ることができ、その候補には転写因子がIKZF2等16種類含まれ、SLEの原因遺伝子に転写因子が有意に濃縮されていることが示唆された³⁾。

筆者らと理化学研究所は共同で、健康人105例の末梢血のリンパ球サブセットをセルソーターを用いてCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、B細胞、NK細胞、単球に分けて回収し、その後、RNA (ribonucleic acid) シークエンスにより発現遺伝子情報を取り、遺伝子多型情報と併せて健康人のリンパ球サブセット毎のeQTLデータベースを構築した⁴⁾。このデータベースを用いることで、遺伝子多型から疾患発症前の遺伝子発現量の予測が可能となる。実際に既存のRA患者4,645例と健康人8,397例の遺伝子多型での予測遺伝子発現量を比較すると、例えば、RA患者CD4陽性細胞でTNF- α 経路やIFN- γ 経路の遺伝子発現が亢進し、単球ではGM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 経路の遺伝子発現が亢進していることが明らかと

図2 疾患感受性多型による近傍の遺伝子へのeQTL効果

なった。

2017年にはCrohn病で、感受性遺伝子多型からのeQTL効果が認められる29の遺伝子をピックアップし、それらの遺伝子の腸管局所の発現量をスコア化するモデルtranscriptional risk score (TRS)を作成することで、疾患の発症と病型の重篤さの一定の予測ができることが報告された⁵⁾。これらの知見は、機能ゲノム解析が疾患の層別化につながる可能性を示している。

4. システム免疫学

前述のような機能ゲノムアプローチ以外にも、トランスクリプトーム等の網羅的な解析データから分子と細胞の相互関係に着目する、システム免疫学 (system immunology) のアプローチが進展してきている。2015年、McKinneyらは、ANCA関連血管炎44例とSLE 23例のCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の遺伝子発現データを取り、解析の次元を圧縮するために、変動の類似した遺伝子をモジュールとしてまとめるWGCNA解析を行った⁶⁾。すると、CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の遺伝子発現は、ANCA関連血管炎及びSLEで疾患活動性ではなく、再燃等の予後と関連した。一方、SLEのI型インターフェ

ロン応答は予後ではなく、疾患活動性と関連した。さらに、遺伝子機能を解析すると、CD4陽性T細胞の共刺激に関連するモジュールと再燃率に関連があり、CD8陽性T細胞に慢性ウイルス感染時等にみられるexhaustion signatureがある場合に長期予後が良いことがわかった。CD4陽性T細胞の共刺激経路のマーカーは、抗アポトーシス活性のあるKAT2遺伝子の発現であった。この知見は、T細胞応答のバランスがANCA関連血管炎やSLE等の自己免疫疾患の予後に影響することを示唆している。

2016年、Banchereauらは小児SLE 158例を数年間に亘ってフォローアップし、延べ924回の末梢血の遺伝子発現解析を行った⁷⁾。高疾患活動性で発現が亢進する遺伝子は、インターフェロン応答、形質細胞、細胞周期、好中球、ヒストン及びB細胞の経路に関連し、SLEで特に重要なループス腎炎とは好中球関連の遺伝子発現が相関を示した。さらにWGCNA解析を行い、5回以上解析している80例において、モジュールによるクラスタリングを行ったところ、7つのグループに分類された。興味深いことに、3つ目のグループでは形質細胞のモジュールが疾患活動性と相関するのに対し、5つ目のグループではインターフェロンとミエロイド細胞のモ

ジュールが疾患活動性と相関した。これはSLE患者の病態形成が均一ではないことを示唆している。この解析では、末梢血全体の遺伝子発現をみており、相対的に優位な細胞に関連する遺伝子発現が優位となるため、遺伝子発現の変動以外の要素も含んでいる点には注意が必要である。しかし、遺伝子発現によるSLEの層別化の可能性を示唆した点で重要な研究である。この研究からは、SLEは初期にはインターフェロンとミエロイド細胞の活性化を生じ、その後、形質細胞分化が促進されると、それによる炎症を呈し、さらに、好中球が活性化すると、腎炎等の臓器障害を発症する可能性も考えられる。その場合、リツキシマブ等によるB細胞除去はある時期のSLEには有用であるが、腎炎を生じたSLEにはさらに好中球を抑制する治療が必要なのかもしれない。

我々の研究室においても、住友、永渕らは、RAのCD4陽性T細胞サブセットのアバタセプト治療前後の遺伝子発現を解析し、T細胞レセプター近傍の遺伝子発現亢進が疾患活動性と関連し、この遺伝子発現亢進はT細胞レセプターの共刺激を阻害するアバタセプト治療により補正されるという知見を得ている⁸⁾。これらの報告にみられるように、遺伝子発現はゲノムよりも疾患という形質に近く、自己免疫疾患の層別化には有用であることが期待される。

5. マスサイトメトリーと 単一細胞RNAシーケンス

従来、細胞の解析にはフローサイトメトリーが用いられ、特定の抗原に対する抗体を蛍光標識でラベルして、この抗体の染色性でタンパク発現を評価していた。このフローサイトメトリーにより、ある細胞が発現する抗原を同時に評価することができるようになり、免疫細胞の機能解析は大きく進展した。しかし、フローサイトメトリーでは、蛍光色素をレーザーで励起し

て光の波長を調べるため、お互いに波長の重ならない蛍光色素を組み合わせる必要があり、同時に解析できる抗原は18種類程度という制限があった。それに対し、最近開発されたマスサイトメトリーという手法では、抗体を重金属で標識するのが特徴である。標識した金属は質量分析により同定されるため、シグナルの重複が少なく、同時に40種類以上の標識抗体の解析が可能である。すなわち、マスサイトメトリーでは、細胞表面の蛋白を40種類以上同時に測定できることで、細胞の特徴を同定することが大幅に容易になった。特に、血球細胞のなかの新しく出現したサブセット等の同定に威力を発揮するといわれている。

Raoらは、RAにおいて、患者由来の関節組織内の活性化T細胞を、マスサイトメトリーを用いて解析した⁹⁾。すると、関節リウマチ患者の関節では、PD-1 (programmed cell death 1) 高発現CXCR5陰性CD4陽性のT細胞集団が著しく増加していることが明らかになった。この細胞集団はIL (interleukin)-21, CXCL13, ICOS及びMAF等、B細胞の機能を促進する因子を発現し、「末梢ヘルパーT (peripheral helper T : TPH) 細胞」と命名された。TPH細胞は炎症を起こしている非リンパ組織内で、B細胞応答と抗体産生を促進するユニークなサブセットであると考えられた。

病態解析を進めるうえで強力なもう1つの手法として、単一細胞RNAシーケンスが広まりつつある。Corsieroらは、RA関節滑膜のCD19陽性B細胞をセルソーターで単一細胞として回収し、RNAより得られたB細胞レセプター配列から59のIgG1サブクラスのリコンビナントモノクローナル抗体を作製した¹⁰⁾。これらのモノクローナル抗体の抗原反応性を蛋白アレイで調べると、約4割がシトルリン化ヒストン (H2A) に反応することがわかった。好中球が放出するneutrophil extracellular traps (NETs) は自然免疫を介した炎症の惹起に重要でシトルリン化ヒ

ストンを含むが、シトルリン化ヒストンに結合する抗体はNETsに結合した。

このように、マスサイトメトリーや単一細胞RNAシーケンスにより、単一細胞レベルの情報を網羅的に調べることで、疾患の免疫応答を精密に解析することが可能となる。実際に、米国National Institutes of Health (NIH) と製薬企業が出資するAccelerating Medicines Partnership (AMP) というプロジェクトや、イギリスのMedical Research Council (MRC) のプロジェクトでは、RAの関節やSLEの腎臓でマスサイトメトリーと単一細胞のRNAシーケンスデータを組み合わせ、eQTL解析等機能ゲノム解析・オミックス解析を行う研究が進行しつつある。これらの解析により、従来は技術的にアプローチ困難であった、自己免疫疾患の詳細な病態の解明が進むことが期待される。

おわりに

従来、不均一性の高いヒト疾患検体の解析にはさまざまなハードルがあり、マウスモデルの研究が強力なツールであった。最近の技術的進

歩はヒト疾患検体の精密な解析を可能とし、ヒト検体自体の解析が急速に広がりつつある。また、本稿においては言及していないが、腸内細菌叢等のマイクロバイオーーム解析も大きな進展をみせている。CT (computed tomography) やMRI (magnetic resonance imaging) 等の画像の進歩は医療のレベルを一変させたが、機能ゲノムやシステム免疫学、さまざまなオミックス解析等のアプローチは従来の医療を一変させる可能性を示している。これらの研究は多くのリソースを必要とし、日本では、さまざまな制約から、全ての面で海外に伍することは現実的ではないが、日本独自の優れたリソースを戦略的に利用し、今後の医療の発展に貢献することが重要と考えられる。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：藤尾圭志；講演料 (サノフィ、田辺三菱製薬、中外製薬、ファイザー、 Bristol・マイヤーズスクイブ)、研究費・助成金 (塩野義製薬、武田薬品工業、中外製薬、日本イーライリリー、 Bristol・マイヤーズスクイブ)、寄附金 (アステラス製薬、エーザイ、田辺三菱製薬、中外製薬、 Bristol・マイヤーズスクイブ)、寄附講座 (アッヴィ、あゆみ製薬、大正富山医薬品、田辺三菱製薬、中外製薬、日本化薬、ユーシービージャパン)

文献

- 1) Lee-Kirsch MA : The Type I Interferonopathies. *Annu Rev Med* 68 : 297-315, 2017.
- 2) Sieberts SK, et al : Crowdsourced assessment of common genetic contribution to predicting anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Nat Commun* 7 : 12460, 2016.
- 3) Benthall J, et al : Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 47 : 1457-1464, 2015.
- 4) Ishigaki K, et al : Polygenic burdens on cell-specific pathways underlie the risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 49 : 1120-1125, 2017.
- 5) Marigorta UM, et al : Transcriptional risk scores link GWAS to eQTLs and predict complications in Crohn's disease. *Nat Genet* 49 : 1517-1521, 2017.
- 6) McKinney EF, et al : T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* 523 : 612-616, 2015.
- 7) Banchereau R, et al : Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients. *Cell* 165 : 1548-1550, 2016.
- 8) Sumitomo S, et al : A gene module associated with dysregulated TCR signaling pathways in CD4⁺ T cell subsets in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 2017. pii : S0896-8411 (17) 30514-0.
- 9) Rao DA, et al : Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 542 : 110-114, 2017.
- 10) Corsiero E, et al : Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann Rheum Dis* 75 : 1866-1875, 2016.