

シングルセルマルチオミックス解析による心臓サルコイドーシスの新規バイオマーカーの同定

片桐美香子

東京大学大学院医学系研究科 循環器内科

【研究の背景】

サルコイドーシスは、原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり、難病に指定されている。肉芽腫の形成には、マクロファージや T 細胞の関与が報告されているが、その詳細な機序は明らかになっていない^{1,2)}。肉芽腫は肺や眼など全身の臓器に生じるが、心臓病変は、伝導障害、心室性不整脈や心不全を引きおこし、本疾患の主な死因となっている。早期のステロイド治療で予後が改善するが、肉芽腫は心臓内に散在的に存在するため、心筋生検による診断陽性率は 15~20%と非常に低い。近年ではガドリニウム造影 MRI や PET-CT を用いた画像所見を含めた臨床診断基準も広く利用されているが³⁾、それでもなお、診断や治療効果の判定に時間を要することも多く見られる。心臓サルコイドーシスの病態解明が、早期診断のバイオマーカーの同定や、新規治療につながる可能性を秘めていると考えられる。

【目的】

本研究の目的は、「心臓サルコイドーシス患者の空間的解析で観察される心臓組織の特徴と、末梢血液中単核細胞 (PBMC) のシングルセル解析で見出した炎症細胞の変化から、肉芽腫に代用される新たなバイオマーカーを検索すること」、「心筋細胞・非心筋細胞の相互作用を明らかにすることにより、心臓サルコイドーシスの病態を解明し、治療につながる新規ターゲットを同定すること」である。

【方法】

心臓サルコイドーシス患者の心臓組織を用いた空間的トランスクリプトーム解析・プロテオーム解析を行い、肉芽腫に関する細胞の詳細を観察した。また、PBMC の single cell RNA-seq 解析・血漿プロテオーム解析を行い、組織中の免疫細胞の特徴と比較検討を行なった。

【結果】

心臓サルコイドーシス患者の心臓組織を用いて、3 種類の空間的解析を行なった。切片上の特定の範囲に発現している遺伝子を網羅的に観察可能な GeoMx Whole Transcriptome Atlas (Nanostring) では、肉芽腫部分における様々なサイトカインの発現上昇が観察された。さらに、解像度の高い 10x Visium CytAssist spatial transcriptomics (10x Genomics) によるトランスクリプトーム解析では、肉芽腫部分における免疫細胞の分布と、炎症サイトカインの特徴を捉えた。同一切片上で数十種類以上のタンパクマーカーを一細胞レベルで観察可能な PhenoCycler-Fusion (Akoya Bioscience) を用いたマルチプレックスプロテオーム解析では、GeoMx や Visium で遺伝子発現レベルの変化が観察されたサイトカインを含む約 40 種類のタンパクの発現について、1 細胞レベルで検討を行った。肉芽腫の中心部には CD68 陽性のマクロファージが存在し、その周囲に様々なリンパ球が集簇していた。その免疫細胞のほとんどは CD45RO 陽性であり、IFN γ や GZMB 陽性のものも多くみられ、活性化した状態で増加していることが観察された。

末梢血より密度遠心勾配法により単離した PBMC の single cell RNA-seq 解析の結果では、これまで病態の中心と考えら

れていた CD4 T 細胞ではなく、CD8 T 細胞において Naïve 分画の減少と Effector Memory 分画の増加といった細胞集団の変化と細胞活性化を認めた。また、Olink Explore HT を用いて、約 5400 種類の血漿中タンパクを測定したところ、免疫細胞の活性化や遊走に関連する因子の上昇を認めた。

【考 察】

ヒトの心臓組織を用いた詳細な空間的トランスクリプトーム解析により、心臓サルコイドーシスでは肉芽腫内ではマクロファージやリンパ球を代表とする様々な免疫細胞が集簇して、サイトカインやケモカインを放出していることが明らかになった。癌や自己免疫疾患など免疫細胞が関連する疾患では、3 次リンパ組織と呼ばれる免疫細胞の集簇が強力な炎症反応の起点となっていることが報告されており、心臓サルコイドーシスもこれらと類似の機序により、炎症性因子を誘導して、心機能低下や不整脈の発生に寄与している可能性が示唆される。また、PBMC 中における CD8 T 細胞の変化はこのような組織中のサイトカインの増加を反映している可能性があり、他の心筋症との鑑別に有用であると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

PBMC 中における CD8 T 細胞の増殖・活性化は、組織中の慢性的なサイトカインの増加を反映していると考えられ、フローサイトメトリーを用いて PBMC 中に占める割合を測定することで、他の心筋症との鑑別が容易になる可能性がある。さらに、血液のプロテオーム解析で発現に差が確認された免疫細胞の遊走・活性化に関連する因子は、サルコイドーシスで上昇し、治療開始後に有意に低下することより、治療効果の判定・治療抵抗性症例の検索に有用である可能性があり、今後臨床応用について検討を進めていく。今回の結果から、これまで注目されていなかった細胞集団の疾患への関与が明らかとなり、ステロイド抵抗性症例に対する新規治療法の確立へと繋げていきたい。

【参考・引用文献】

1. Zhou ER and Arce S. Key Players and Biomarkers of the Adaptive Immune System in the Pathogenesis of Sarcoidosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21.
2. Drent M, Crouser ED and Grunewald J. Challenges of Sarcoidosis and Its Management. *N Engl J Med.* 2021;385:1018-1032.
3. Ishizuka M, Uehara M, Katagiri M, Ishida J, Kojima T, Amiya E and Komuro I. Successful treatment of recurrent cardiac sarcoidosis with the combination of corticosteroid and methotrexate monitored by (18)F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography: case series. *Eur Heart J Case Rep.* 2022;6:ytac334.