

# 高精度シングルセル解析による関節リウマチ重症化機構の解明

中野正博

理化学研究所 生命医科学研究センター ヒト免疫遺伝研究チーム

## 【研究の背景】

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は関節滑膜が侵される自己免疫疾患であり、既存の治療に反応不十分な重症予後不良群が臨床での重要課題である。RA の重症化には特定の細胞集団 (病原性細胞) が関与し、その機能は特定の遺伝子 (key driver gene) により制御されると想定される。シングルセル研究ではこのような病原性細胞の同定に最適のツールであるが、1 細胞ごとの情報量の少なさ (sparsity) の問題もあり、多くの研究が 20-40 程度の粗大な細胞集団を定義するに留まっており、病原性細胞の精密な同定とその詳細な機能解明に至っていない。

## 【目 的】

本研究では、高精度シングルセル解析を RA 患者末梢血に応用することで、重症 RA 患者で増多する病原性細胞とその key driver gene を精密に同定し、その機能を明らかにすることを目的とする。

## 【方 法】

重症、軽症を含む RA 90 症例の末梢血検体を収集し、遺伝子発現と細胞表面マーカーを同時に評価する Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing (CITE-seq) による高精度シングルセル解析を実施した。さらに申請者は、RA 病原性細胞と key driver gene の精密な同定のためには、従来の研究よりも微細な細胞集団を定義し、既存のシングルセル解析手法とは異なる解析パイプラインが必要になると考え、今年度は上記の CITE-seq データ収集と並行して、大規模公共シングルセルデータを用いた新たな解析手法の開発を試みた。

## 【結 果】

RA 末梢血検体に関しては、現状全サンプルの収集とシングルセル実験、次世代シーケンサーによるシーケンシングを完了し、これより本格的な解析を実施する予定である。

今年度は上記と並行して、RA と並ぶ代表的自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) の大規模公共シングルセルデータ (~1,400,000 細胞、269 例) を用いた新たな細胞集団の定義手法の開発を試みた。今回申請者は、まず末梢血単核球細胞を 25 の大まかな細胞種に分類した後に、各々の細胞種に対してさらに精密な clustering を実施することで、総計 118 の微細な細胞集団を同定、定義することに成功した。これらの中で、従来注目されていなかった  $FAM13A^+ARID5B^+$  naive  $CD4^+$  T cells、 $GZMK^+GZMH^+HLA-DR^+$  effector memory  $CD8^+$  T cells、 $C1Q^+$  monocytes が特に重症 SLE で増多していることを見出した。

さらに細胞種の内部の質的変化、量的変化を弁別できない従来のシングルセル解析手法 (pseudobulk 解析) の弱点を克服した、新たなシングルセル解析パイプラインの確立にも成功した。この中で重要な免疫系路や大規模ゲノムデータ (genome-wide association studies; GWAS) のシグナルは微細な細胞集団の増減 (量的変化) を反映する遺伝子群に強く集積することを初めて明らかにした。

## 【考 察】

本解析手法を今回収集した RA CITE-seq データに応用することで、既存治療に抵抗性の患者群で増多する病原性細胞を精密に同定することが可能となる。今後は、関節滑膜組織のシングルセルデータとの統合解析や、細胞間ネットワーク解析、GWAS データや量的形質遺伝子座 (expression quantitative trait loci; eQTL) データとの統合解析を実施することで、key driver gene の同定を目指す。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

RA の病原性細胞と key driver gene の機能を詳細に解明することで、RA のさらなる病態理解と新規治療標的に繋がる知見を得ることが可能となる。