

高精度シングルセル解析による、 生物学的性差が全身性エリテマトーデスの 病態形成に及ぼす影響の解明

High-resolution single-cell analysis to reveal the effect of sex on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus

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 中野 正博

要 約

全身性エリテマトーデス（SLE）は、妊産期の女性に好発する難治性自己免疫疾患であるが、詳細な病態寄与機構は未解明である。申請者は今回、SLEの病原性細胞とkey driver geneを精密に同定するために80例のSLE患者末梢血検体を新たに収集し、遺伝子発現と137の細胞表面マーカー蛋白を同時に評価する高精度シングルセル解析（CITE-seq）を実施した（解析中）。上記の検体収集と並行して、今年度はSLEの公共シングルセルデータ（～1,400,000細胞、269例）を用いた大規模解析を実施した。新たに定義した計118の微細な細胞集団のうち、従来注目されていなかったGZMK+GZMH+HLA-DR+ effector memory CD8+ T cells 等が重症SLE症例で増多していることを見出した。同集団は、PD-1やTIGITといった慢性抗原刺激を反映する遺伝子群やIFNGやIL16といったサイトカインを高発現しており、SLE病態において重要な病原性細胞であると考えられた。さらに申請者は、細胞種内部の質的変化、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モデルの確立にも成功し、大規模ゲノムデータ（GWAS）との統合解析も実施した。今後は、本解析モデルを今回収集したCITE-seq dataに応用することで、女性SLE患者で特異的に増多する病原性細胞を同定し、生物学的性差がSLEの病態形成に及ぼすメカニズムの解明を目指す。これらの研究成果を基点にSLEの病態理解がより進み、新たな治療薬の開発に繋げることが期待される。

緒 言

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)は、妊産期の女性に好発する難治性自己免疫疾患である。本疾患は遺伝的素因と環境素因の双方が発症に関与し、妊娠や出産を契機に発症、増悪するケースも多い。病因としてX染色体遺伝子や女性ホルモンが特定の免疫細胞（病原性細胞）の機能異常に関わると考えられているが、詳細な病態寄与機構は未解明であり、効果的かつ副作用の少ない新たな治療薬の開発が切望されている。

申請者は、過去にSLE患者における27種の免疫細胞の大規模遺伝子発現解析を世界に先駆けて実施し、SLE病態に関わる遺伝子発現パターンを多数同定した¹。しかし同研究は既知の細胞表面マーカー蛋白のみに頼って曖昧な細胞種を定義していたため

（bulk RNA-seq）、仮説に基づかない客観的な細胞集団の評価が不可能であり、病原性細胞やそのkey driver geneの精密な同定も困難であった（図1左）。このため、生物学的性差がSLEのどの免疫細胞の機能に作用し、いかに病態形成に寄与するかも不明であった。

そこで今回申請者は、遺伝子発現と細胞表面マ

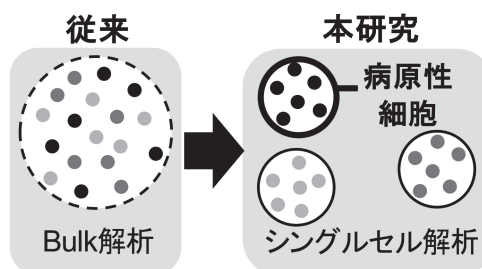


図1. Bulk解析とシングルセル解析の違い

カー蛋白を同時に評価する高精度シングルセル解析 (Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing: CITE-seq) をSLE患者の末梢血に実施し、申請者の考案する新たなシングルセル解析モデルや最先端のシングルセル解析技術を応用することで、SLEの病原性細胞とkey driver geneを精密に同定できると考えた (図1右)。これに伴い、生物学的性差がSLEの病態形成に及ぼすメカニズムを詳細に解明するとともに、SLE患者の新たな治療標的の同定に繋がる知見の獲得を目指した。

方法

1. 女性60例、男性20例を含む計80症例のSLE末梢血検体を1年かけて収集し、高精度シングルセル解析 (CITE-seq) を実施した。同一の細胞から得られるmRNAと137種の細胞表面マーカー蛋白を標識したoligo RNAから各々cDNA libraryを生成し、次世代シーケンサーによるRNA sequencingを実施した。

さらに申請者は、SLE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、SLEの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。

本研究は、所属機関の倫理委員会の承認を得たうえで実施した。

結果

1. CITE-seq dataに関しては、1年かけて全症例のシングルセル実験と次世代シーケンサーによるシーケンシングをほぼ完了した。これより本格的な解析を実施する予定である。

2. 今年度は上記と並行して、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。本データを用いた元文献²は20程度のおおまかな細胞種しか定義できていないため、今回極めて高精度の細胞集団を新たに定義することに成功したと言える。

これらの中で、SLEのhallmark signatureであるInterferon signalingにより強く活性化する細胞集団や、免疫疾患においてB細胞の強い活性化機能を有するperipheral helper T cells (Tph)³といった既知の病原性細胞に加えて、従来注目されていなかった

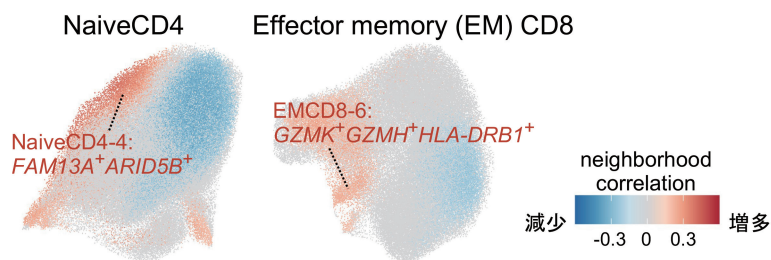


図2. SLEで増多する新たな細胞集団の同定

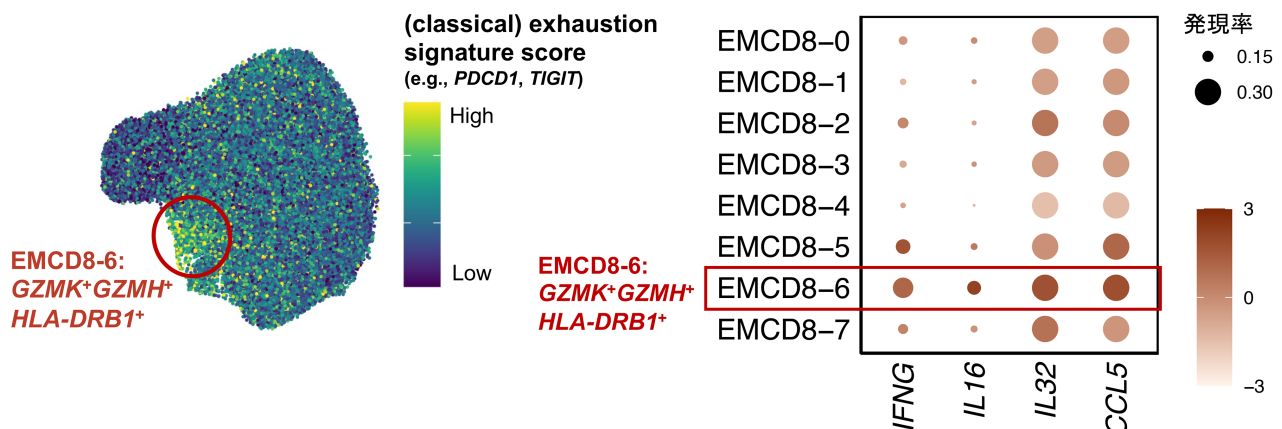


図3. GZMK+GZMH+HLA-DR+ effector memory CD8+ T cellsの遺伝子プロファイル

GZMK⁺*GZMH*⁺*HLA-DR*⁺ effector memory CD8⁺ T cells、*FAM13A*⁺*ARID5B*⁺ naive CD4⁺ T cells、*C1Q*⁺ monocytes等が特に重症SLEで増多していることを見出した (covarying neighborhood analysis、図2)。なかでも *GZMK*⁺*GZMH*⁺*HLA-DR*⁺ effector memory CD8⁺ T cellsは、*PD-1*や*TIGIT*といった慢性抗原刺激を反映するマーカー遺伝子をTphと同程度に高発現し、さらに*IFNG*や*IL16*といったサイトカインを高発現しており、SLE病態において重要な病原性細胞であると推定された (図3)。

さらに細胞種内部の質的変化、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モデル (single-cell-level negative binomial mixed effect model) の確立にも成功した。本モデルは従来のpseudobulk解析とは異なり、1細胞レベルでの発現量を観察単位として、形質情報 (SLE対健常人) と、上述したcovarying neighborhood analysisにおける細胞集団の増減情報の両方で重回帰することにより、それぞれの遺伝子が細胞種において質的変化 (1細胞レベルでの発現亢進/低下) と量的変化 (微細な細胞集団の増減) のいずれを反映するかを弁別することが可能となる。本解析において、T細胞受容体シグナルや補体系といった免疫学的に重要なシグナル経路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集積することが示された。また大規模ゲノムデータ (genome-wide association studies; GWAS)との統合解析 (stratified LD score regression;

層別化LDスコア回帰法) においては、これまで同定されたSLEのリスク多型が病原性細胞集団の量的変化を介することで疾患の病態形成に寄与することが初めて明らかとなった。

考 察

今年度、申請者の考案した新たなシングルセル解析モデルを大規模公共シングルセルデータに応用することで、SLEの新規治療標的となりうる重要な細胞集団 (病原性細胞) を新たに複数同定することができた。

今回の解析モデルを今年度収集した高精度シングルセルデータ (CITE-seq) に応用することで、女性SLE患者で特異的に増多する病原性細胞とそのkey driver geneの同定が可能になると考えている。これに伴い生物学的性差がSLEの病態形成に及ぼすメカニズムの解明が期待される。

引用文献

1. Nakano M, Ishigaki K, Fujio K *et al.* Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation. *Cell*. 2022;185(18):3375-3389.e21.
2. Perez RK, Gordon MG, Ye CJ, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals cell type-specific molecular and genetic associations to lupus. *Science*. 2022;376(6589):eabf1970.
3. Rao DA, Raychaudhuri S, Brenner MB, *et al.* Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017;542(7639):110-114.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex and female-biased autoimmune disease with unknown etiology. To identify disease-relevant cell states of SLE, we constructed new high-resolution single-cell data (CITE-seq; gene expression and 137 surface marker proteins) of peripheral blood mononuclear cells from 80 SLE patients (analysis on progress). While collecting these samples, we also developed a new efficient single-cell analytical framework and applied this to the largest-scale publicly available scRNAseq data of SLE with ~1.4 million cells from 269 donors. After the identification of 118 granular cell states in 25 cell types, we revealed that previously uncharacterized cell states such as *GZMK*⁺*GZMH*⁺*HLA-DR*⁺ effector memory CD8⁺ T cells with high expression of exhaustion signatures (e.g., *PD-1* and *TIGIT*) and key cytokines of SLE (e.g., *IFNG* and *IL16*) expanded especially in active SLE. Next, our new statistical model successfully decomposed conventional pseudobulk-level differential expression into cell state abundance signature genes (quantitative change) and dysregulated signature genes (qualitative change) at single-cell level and performed integrative analysis with genome-wide association studies (GWAS) of SLE. Now we are trying to apply this framework to new CITE-seq data to identify new cell states that expand, especially in female SLE, and to reveal the effect of sex on its pathogenesis. Our approach can contribute to a better understanding of SLE pathogenesis and the discovery of novel drug targets.