

CD4⁺T 細胞の自己免疫疾患における細胞応答が明らかに —シングルセルメタアナリシスによる大規模自己免疫疾患プロファイリング—

キーワード：自己免疫疾患、CD4⁺T 細胞、シングルセル RNA-seq

【研究成果のポイント】

- ◆ 末梢血 CD4⁺T 細胞から 18 細胞種、12 遺伝子プログラムを同定し、リファレンスを構築した。
- ◆ 20 疾患、953 人、1,809,668 CD4⁺細胞によるメタアナリシスを行い、自己免疫疾患特異的な CD4⁺T 細胞変化を同定した。
- ◆ CD4⁺T 細胞遺伝子プログラムへの遺伝要因の集積を明らかにした。
- ◆ CD4⁺T 細胞プロファイリングを通じた未来の精密医療へ。

❖ 概要

大阪大学大学院医学系研究科の安水 良明さん、森本 玲生さん(博士後期課程)、大阪大学医学部医学科 竹内 大貴さん(学部学生)、大倉 永也特任教授(基礎腫瘍免疫学/IFReC)、坂口 志文特任教授(IFReC 実験免疫学)らの研究グループは、シングルセル解析を通じて詳細な CD4⁺T 細胞のリファレンス構築と自己免疫疾患における大規模なプロファイリングを行いました。

シングルセル RNA-seq^{※1} を用いて末梢血 CD4⁺T 細胞から 18 細胞種、12 遺伝子プログラムを同定し、リファレンスを構築しました。このリファレンスにより、様々なデータセットにおいて詳細な CD4⁺T 細胞プロファイリングを可能にします。このフレームワークを使用して、公共データを統合することで、20 疾患、953 人、1,809,668 CD4⁺T 細胞によるメタアナリシスを行い、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患特異的な CD4⁺T 細胞変化を同定しました。さらに、ゲノムワイド関連解析^{※2} と統合解析を行うことで、CD4⁺T 細胞遺伝子プログラムへの遺伝要因の集積を明らかにしました。

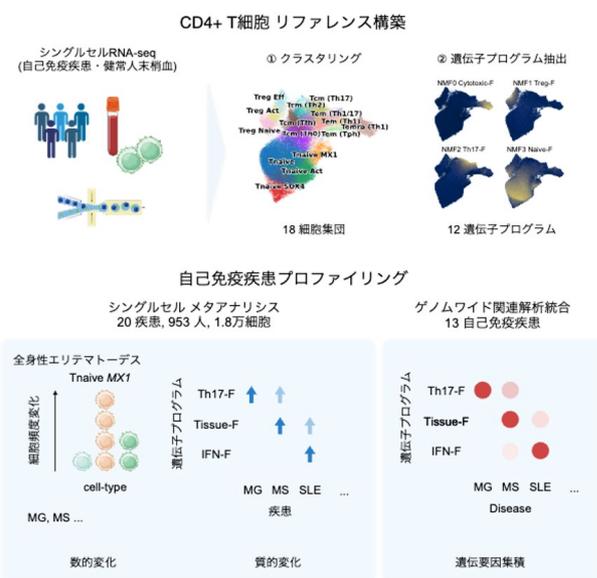


図 1
本研究の概要。1. CD4⁺T 細胞リファレンス構築 2. 自己免疫疾患プロファイリングを行った。

本研究では CD4⁺T 細胞の多様性と自己免疫疾患との関連を結びつけることに成功しました。このことは今後の自己免疫疾患治療の標的を考える戦略として役立つ可能性があります。さらに、メタアナリシスを通じて CD4⁺T 細胞が疾患によって特徴的なプロファイルを示すことを明らかにしました。この結果は CD4⁺T 細胞プロファイリングが自己免疫疾患診断に応用される可能性を示しています。

❖ 研究の背景

自己免疫疾患は免疫細胞が異常に自己に対して反応してしまうことで起きる疾患の総称で、多発性硬化

症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチを始め多くの疾患が含まれます。これまで、CD4⁺T 細胞の異常が自己免疫疾患の原因となることが報告されていました。一方で CD4⁺T 細胞はナイーブやメモリーなどの細胞状態や Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg などの細胞極性を有する多様な細胞集団であり、その複雑性のため、全体像が明らかになっていませんでした。また近年ではシングルセル RNA-seq 解析によりその複雑性の一端は明らかになりつつありましたが、その解釈にはコンセンサスがありませんでした。そのため、CD4⁺T 細胞のうち、どの要素が自己免疫疾患発症に関わっているかは明らかになっていませんでした。そこで本研究は 1) 多様な CD4⁺T 細胞のリファレンスを構築し、2) そのどの要素と各自己免疫疾患が関連しているかを明らかにすることを目的として行われました。

❖ 研究の内容

本研究ではまず、シングルセル RNA-seq を用いて末梢血 CD4⁺T 細胞のプロファイリングを行いました。まず、既存手法を用いて 18 個の細胞種を同定しました。そして、独自のパイプラインを構築することで、新たな末梢血シングルセル RNA-seq において今回同定した細胞種分類を予測することを可能にしました。更に、CD4⁺T 細胞はなだらかに変化する細胞集団であり、恣意的に境界を引きクラスタリングを行う従来の解析手法が適していなかったのではないかと考えました。そこで機械学習手法である非負値行列分解を適用することで、線引きをせずに連続的な遺伝子プログラムと細胞要素に分解しました。その結果、Treg らしさや Tfh らしさ、一型インターフェロン反応などからなる 12 の独立な遺伝子プログラムを同定しました。さらに、独自に開発したソフトウェア (NMFproj) により様々なバルクおよびシングルセル RNA-seq データセットにおいて今回同定した 12 の遺伝子プログラムの強度を測定することを可能にしました。このリファレンスにより、様々なデータセットにおいて細胞分類による数的評価と遺伝子プログラムによる質的な評価を同時に行うことができるようになりました。

次に、このフレームワークを使用して、自己免疫疾患による CD4⁺T 細胞の数的・質的変化の評価を試みました。これまで多くの論文で自己免疫疾患における末梢血のシングルセル RNA-seq 解析が行われてきましたが、一部の情報を使用するにとどまっておき、一貫性のない細胞分類による解析が行われていました。そこで、今回構築したフレームワークを使用して、公共データを含めた統合解析を行うことで疾患横断的な比較を通じた各自己免疫疾患の CD4⁺T 細胞応答を抽出することができるのではないかと考えました。20 疾患、953 人、1,809,668 CD4⁺細胞によるメタアナリシスを行い、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患特異的な数的・質的な CD4⁺T 細胞変化を明らかにしました。たとえば、多発性硬化症において Th1 や Th17 細胞、重症筋無力症において Th17 細胞、全身性エリテマトーデスにおいてインターフェロン反応性ナイーブ T 細胞集団や活性化 Treg などが増加していることが明らかになりました。更に、機械学習手法を用いて CD4⁺T 細胞プロファイルのみからある程度自己免疫疾患が予測できることも明らかにしました。

最後に、ゲノムワイド関連解析と統合解析を行うことで、CD4⁺T 細胞の各遺伝子プログラムへの遺伝的要因の集積の明らかにしました。たとえば炎症性腸疾患や関節リウマチ、重症筋無力症などでは Treg らしさに関わる遺伝子プログラムへの遺伝的要因の集積が検出されました。他にも、Th17 プログラムへの炎症性腸疾患、重症筋無力症、多発性硬化症との関連、一型インターフェロン反応と SLE、PBC、Th1 プログラムと多発性硬化症との遺伝的要因の集積が明らかとなりました。本研究を通じて、自己免疫疾患において、遺伝的要因が様々な CD4⁺T 細胞の特徴と関連していること、その表現型として CD4⁺T 細胞の数的・質的変化が生じていることが明らかとなりました。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究では CD4⁺T 細胞の多様性を明らかにし、今後の研究に使用可能なリソースを提供しています。このリソースにより、今後様々な疾患状態における CD4⁺T 細胞変化を正確かつ詳細に捉えやすくなると考えられます。さらに、CD4⁺T 細胞と自己免疫疾患との関連を細胞種単位・遺伝子プログラム単位で結びつけることに成功しました。このことは今後の自己免疫疾患治療の標的を考える戦略として役立つ可能性があります。さらに、メタアナリシスを通じて CD4⁺T 細胞が疾患によって特徴的なプロファイルを示すことを明らかにしました。この結果は CD4⁺T 細胞プロファイリングが自己免疫疾患診断に応用される可能性を示しています。

❖ 特記事項

本研究成果は、2024 年 1 月 4 日(水)(日本時間)に米国科学誌「Cell Genomics」に掲載。

タイトル: “Single-cell transcriptome landscape of circulating CD4⁺ T cell populations in autoimmune diseases”

著者名: Yoshiaki Yasumizu^{1,2,3,13}, Daiki Takeuchi^{1,4,13}, Reo Morimoto^{1,13}, Yusuke Takeshima¹, Tatsusada Okuno², Makoto Kinoshita², Takayoshi Morita⁵, Yasuhiro Kato^{5,6}, Min Wang^{7,8}, Daisuke Motooka^{3,9}, Daisuke Okuzaki^{3,9}, Yamami Nakamura¹, Norihisa Mikami¹, Masaya Arai¹, Xuan Zhang⁸, Atsushi Kumanogoh^{3,5,6,10}, Hideki Mochizuki^{2,3}, Naganari Ohkura^{1,11,*}, Shimon Sakaguchi^{1,12,*}(*責任著者)

所属:

1. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学
2. 大阪大学 大学院医学系研究科 神経内科学
3. 大阪大学 先導的学際研究機構(OTRI) 生命医科学融合フロンティア研究部門
4. 大阪大学 医学部医学科
5. 大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学
6. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター(IFReC) 感染病態分野
7. Clinical Immunology Center, ..., Beijing, China
8. Department of Rheumatology, Beijing Hospital, ..., Beijing, China
9. 大阪大学 微生物病研究所遺伝情報実験センターゲノム解析室
10. 大阪大学感染症総合教育研究拠点(CiDER)
11. 大阪大学大学院医学系研究科 基礎腫瘍免疫学
12. 京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学
13. 同等貢献

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100473>

本研究は、日本学術振興会の特別推進研究「制御性 T 細胞による免疫応答制御の包括的研究」ならびに国立医療研究開発機構(AMED)の Leading Advanced Projects for medical innovation「制御性 T 細胞を標的とした免疫応答制御技術に関する研究開発」、大阪大学サイバーメディアセンターの大規模計算機システム公募方利用制度、大阪大学医学部 MD 研究者育成プログラム、武田科学振興財団の協力を得て行われました。

❖ 用語説明

※1 RNA-seq

RNA をシーケンスすることで、遺伝子発現を網羅的に定量する手法。通常は多細胞を対象にするバルク RNA-seq を指すが、近年は 1 細胞ごとの RNA-seq を行うシングルセル RNA-seq も技術として確立してきた。

※2 ゲノムワイド関連解析

全ゲノム上で疾患・形質と関連する座位を網羅的に同定する手法。

【安水 良明 大学院生のコメント】

シングルセル RNA-seq を通じて T 細胞を眺めているとその複雑さに驚かされる一方で、既存の解析ではまだまだ包括的に捉えることができませんでした。また、一疾患だけに着目して免疫細胞を評価していると、それがその疾患だけに特異的な変化なのか、自己免疫疾患で一様に見られる変化なのかがわかりませんでした。これらを解決することを目標に本研究を始めました。