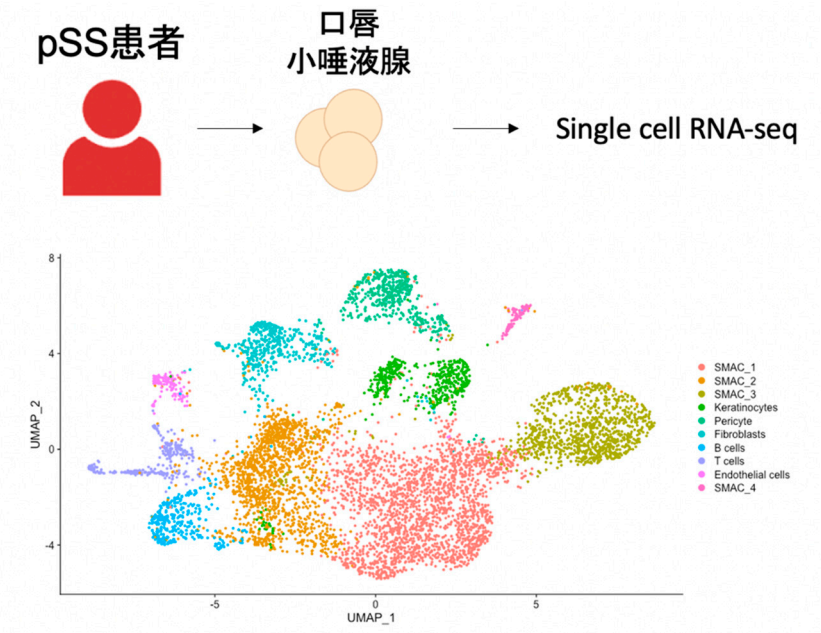
164　T-B細胞間相互作用に着目したSjogren症候群の病態解明	浅島　弘充

【目的】シェーグレン症候群（Sjogren syndrome : SS）は外分泌腺のリンパ球性炎症を特徴とする自己免疫疾患である。以前よりマウスモデルやヒト血液検体などで獲得免疫である T 細胞や B 細胞の病態への関与が報告されている。しかし、実際に SS 患者の炎症病変局所である小唾液腺におけるこれら細胞の役割は不明な点が多い。本研究では SS 患者の口唇小唾液腺を用いて一細胞遺伝子発現解析（single cell RNA-seq : scRNA-seq）を行い、病変局所における細胞分布を俯瞰的に評価すると共に、特に T 細胞と B 細胞の相互作用を評価し病態解明に繋げることを目的とする。

【方法】未治療である一次性 SS 患者 4 例を対象とした。全例抗 SS-A 抗体陽性であり、2016 年 ACR/EULAR の SS 分類基準を満たした。口唇小唾液腺を採取後、コラゲナーゼ処理を行い、細胞懸濁液を準備した。10x genomics 社の Chromium Next GEM シングルセル 5' キット v2 for Dual index のキットを用いて scRNA-seq を行った。NovaSeq にてシークエンスを行い、Seurat のソフトウェアを用いてクオリティチェック、データ統合および解析を行った。各クラスターの遺伝子発現を評価すると共に、特に T 細胞および B 細胞に着目して解析を行った。

【結果】遺伝子発現の違いから合計 10 個のクラスター（T 細胞、B 細胞、周皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、腺房細胞）を検出した。腺房細胞は更に 4 つに分けられ、一部は Profibrotic なマーカーが高発現していた。細胞間コミュニケーションの解析を行ったところ T - B 細胞間だけでなく、他の T 細胞 - 非免疫細胞間の相互シグナルも認められ、ダイナミックな細胞間コミュニケーションによる病態形成が示唆された。現在、本サンプルの TCR-seq（T 細胞受容体シークエンス）を行うと共に、小唾液腺の Spatial Transcriptomics（空間トランスクリプトーム解析）の解析に向けて準備中である。

研究全体像



164. T-B 細胞間相互作用に着目した Sjogren 症候群の病態解明

浅島　弘充

筑波大学 医学医療系 膠原病リウマチアレルギー内科学

Key words：シェーグレン症候群，口唇小唾液腺，single cell RNA-seq，細胞間相互作用

緒　言

シェーグレン症候群（Sjogren syndrome : SS）は慢性唾液腺炎や乾燥性角結膜炎など外分泌腺のリンパ球性炎症を特徴とする自己免疫疾患である。本邦の有病率は約 68,000 人と比較的多い疾患であるが対症療法が主であり、根治的治療法の確立が最重要課題である。我々は、マウスモデルにおいて M3 ムスカリン作働性アセチルコリン受容体（M3R）抗原特異的 $CD4^{+}$T 細胞が SS 類似の唾液腺炎を誘導することに着目し、TCR 親和性の異なる M3R アナログペプチドが T 細胞をアナジー誘導し唾液腺炎発症を抑制できることを報告した[1]。また、ヒト SS 患者においても M3R 反応性 $CD4^{+}$T 細胞が末梢血中に存在することを確認した［2]。以上のように SS 病態において抗原特異的 $CD4^{+}$T 細胞の役割が示唆されているが、一方で SS では抗 SS-A 抗体など自己抗体の検出も認められ、B 細胞の病態への関与も重要である。

我々は B 細胞にも研究分野を広げ、B 細胞から T 細胞へのネガティブフィードバック機構不全が多発性硬化症（Multiple Sclerosis : MS）患者の病態悪化に繋がることを報告した［3]。また、COVID-19 をモデルとした急性期ウイルス感染においては PD-1^{high}CXCR5^{-} Peripheral helper T（Tph）細胞が B 細胞に働きかけることで somatic hypermutation の少ない抗体産生を誘導し、病態改善に寄与することを確認した［4]。このように T 細胞 - B 細胞は相互に作用し合いながら働くことで免疫ホメオスタシスに関わり、その不均衡が MS など自己免疫疾患の病態に関わっていることが確認されたが、SS においてはどのように病変局所で T - B 細胞間相互作用が認められ、病態に寄与するか不明な点が多い。また、これらの免疫細胞は組織の構成成分である非免疫細胞とも相互作用することが近年知られてきているが、それらと病態との関係も不明である。

以上より、SS 患者の病変局所である口唇小唾液腺の scRNA-seq を行い、1 細胞レベルで病態評価を行うことを目的とした。

方　法

本研究で口唇小唾液腺を処理した SS 患者背景は表 1 に示す通りである。全例が抗 SS-A 抗体陽性であり、2016 年 ACR/EULAR の SS 分類基準［5］を満たした。また、全例が未治療患者であり、ステロイドや免疫抑制剤使用歴は認めなかった。

局所麻酔下で口唇小唾液腺を摘出し、15 分 37℃でコラゲナーゼ処理を行った。その後、細胞懸濁液を調製し、10x genomics 社の Chromium Next GEM シングルセル 5' キット v2 for Dual index のキットを用いて scRNA-seq を行った。ライブラリー作製後、NovaSeq にてシークエンスを行った。シークエンスデータは Cell Ranger のソフトウェアパッケージを用いて前処理を行い、Seurat［6］のソフトウェアを用いてデータの正規化や他解析を行った。

尚、本研究はヒトサンプルを用いた研究であり、SS 患者からの試料提供が必須である。本研究は、「筑波大学附属病院臨床研究倫理委員会」及び「人間総合科学研究科の医の倫理委員会」の承認を得ている。試料を提供頂く患者さんに対して説明を行い、本人から文書での同意を得るなど倫理面や個人情報の管理について、十分な

配慮が行われた。

表 1. 患者背景

Sample #	年齢	性別	ESSDAI	ESSPRI	Greenspan grade	IgG (mg/dl)	抗SS-A抗体	無刺激唾液分泌量（ml/15 min）
SS1	54	女	2	8	2	1125	+	0.7
SS2	39	女	9	5	4	1738	+	1.1
SS3	31	女	5	3	3	1224	+	0.5
SS4	33	女	6	5	4	2233	+	0.6

本症例で口唇小唾液腺生検を行った患者背景である。全例が未治療患者であり、2016 年 ACR/EULAR の SS 分類基準を満たした。

結　果

1. UMAP 解析

4 検体のデータ統合を行い、クオリティチェック後 SS 患者の口唇小唾液腺より合計 7,232 細胞を抽出した。遺伝子発現により合計 10 個のクラスターが検出された（T 細胞、B 細胞、周皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、腺房細胞）。腺房細胞（Seromucous acinar cells：SMAC）は遺伝子発現の違いにより更に 4 つに分類された（図 1）。4 検体において検体毎の細胞分布に大きな違いは認めず、腺房細胞が半分近くを占めていた。

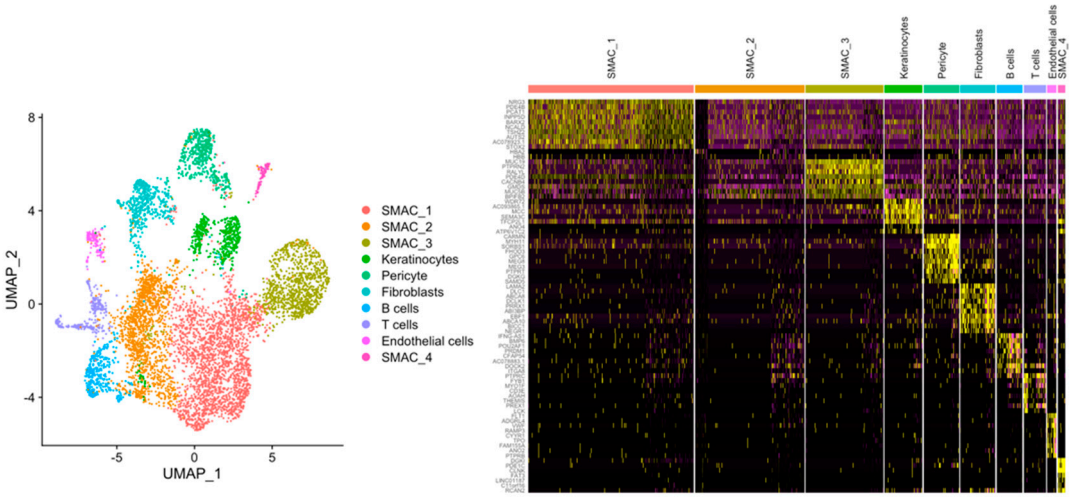


図 1. 遺伝子発現による UMAP（左）および Heatmap（右）
遺伝子発現の違いにより合計 10 個のクラスターに分類した。腺房細胞（Seromucous acinar cells：SMAC）に関しては、更に 4 つに分類できた。

2. 腺房細胞の特徴

それぞれの腺房細胞（SMAC1_4）の特徴を図 2 に示す。既報［7］にもあるように、SMAC_2 は *AQP5* の発現が低い一方で *ZG16B* 発現が高かった。また、SMAC_3 に関しては、*MUC5B* 発現が高く、より分化した粘液産生細胞であることが確認された。興味深いことに、SMAC_1 および SMAC_4 に関しては、*RUNX2* や *EGFR* などの発現が高かった。

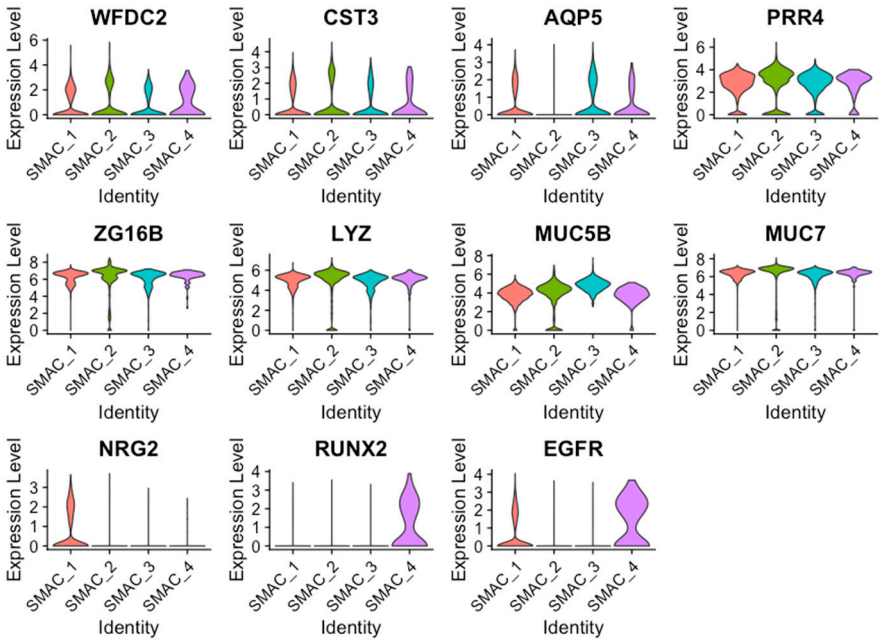


図 2. 腺房細胞（SMAC）における遺伝子発現パターンの検討
SMAC_2 は *AQP 5* 発現が低く、SMAC_3 は *MUC5B* 発現が高いことから既報と類似の腺房細胞が検出された。一方、SMAC_1 や SMAC_4 に関しては *NRG2* や *RUNX2*、*EGFR* など線維化に関わる遺伝子発現が認められた。

3. T - B 細胞間相互作用

各細胞間サブセットによる相互作用に関して、CellChat［8］を用いて解析を行った。推測された細胞連関数は、T - B 細胞間のみならず、T 細胞 - SMAC_1、T 細胞 - SMAC_4 など非免疫細胞と免疫細胞の連関も確認できた。現在、TCR-seq を用いた clonal 解析を行っており、clonally expanded T 細胞と B 細胞もしくは非免疫細胞との関係性も解析を進めている。

考　察

近年はビッグデータの技術的整備が進み、多くの疾患において生体内の分子を網羅的に解析し、それらを統合評価するマルチオミックス解析が進められている。本研究においても、scRNA-seq の解析技術を用いて一細胞レベルでの炎症病変局所における網羅的解析を行った。

クラスター解析において腺房細胞（SMAC）は遺伝子発現から 4 つのクラスターに分類できたが、そのうち SMAC_2 および SMAC_3 は既報［7］と類似する遺伝子発現パターンを示した。興味深いことに、SMAC_1 および SMAC_4 は、*NRG2* や *RUNX2*、*EGFR* といった遺伝子が特異的に高発現していた。これらは、線維化の促進にかかわることが報告されており［9, 10］、これまで唾液を分泌する細胞としてのみ考えられていた細胞が、「炎症・線維化」を誘導しうる可能性が示唆された。実際に、細胞間コミュニケーションに関してもこれらの細胞サブセットは T 細胞や B 細胞など免疫細胞とも関連することが示唆されており、単なる唾液腺の構成細胞だけでなく SS 病態のドライネスに寄与する可能性が考えられた。

尚、本研究は現在も進行中であり、具体的には、1）TCR-seq も含む scRNA-seq 解析による末梢血と病変局所での T 細胞の表現系解析、2）口唇小唾液腺の空間トランスクリプトーム解析を行う予定である。1）のために同一患者の末梢血単核球から $CD3^+CD14^-CD19^-CD56^-$Dead-細胞を sorting した後に TCR-seq を含む scRNA-seq を行っており、また、2）の解析を目的として口唇小唾液腺の一部は液体窒素及びイソペンタンを

用いて O.C.T.コンパウンドで瞬間凍結させ切片とし、－80℃で保存している。本解析結果は、特定のシグナル経路や細胞サブセットに着目し病態を解析するのみならず、複数のシグナル経路の関係性や細胞間相互作用も含めた多角的な視野で病変局所を理解することに繋がると期待する。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1） Asashima H, Tsuboi H, Takahashi H, et al. The anergy induction of M3 muscarinic acetylcholine receptor-reactive CD4+ T cells suppresses experimental sialadenitis-like Sjogren's syndrome. Arthritis Rheumatol. 2015 67(8): 2213-25. PMID: 25891013 DOI: 10.1002/art.39163

2） Iizuka-Koga M#, Asashima H# (#co first-authors), Ando M, et al. Functional Analysis of Dendritic Cells Generated from T-iPSCs from CD4+ T Cell Clones of Sjogren's Syndrome. Stem Cell Reports. 2017 8(5): 1155-1163. PMID: 28494936 DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.04.010

3） Asashima H, Axisa PP, Pham THG, et al. Impaired TIGIT expression on B cells drives circulating follicular helper T cell expansion in multiple sclerosis. J Clin Invest. 2022 132(20): e156254. PMID: 36250467 DOI: 10.1172/JCI156254

4） Asashima H, Mohanty S, Comi M, et al. PD-1highCXCR5-CD4+ peripheral helper T cells promote CXCR3+ plasmablasts in human acute viral infection. Cell Rep. 2023 42(1): 111895. PMID: 36596303 DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111895

5） Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjogren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. Arthritis Rheumatol. 2017 69(1): 35-45. PMID: 27785888 DOI: 10.1002/art.39859

6） Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. Cell. 2019 177(7): 1888-1902.e21. PMID: 31178118 DOI: 10.1016/j.cell.2019.05.031

7） Warner B, Pranzatelli T, Perez P, et al. GZMK+CD8+ T cells Target a Specific Acinar Cell Type in Sjogren's Disease. Res Sq. 2023 Dec 19:rs.3.rs-3601404. PMID: 38196575 DOI: 10.21203/rs.3.rs-3601404/v1

8） Jin S, Guerrero-Juarez CF, Zhang L, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. Nat Commun. 12(1): 1088. PMID:33597522 DOI: 10.1038/s41467-021-21246-9

9） Olbrecht S, Busschaert P, Qian J, et al. High-grade serous tubo-ovarian cancer refined with single-cell RNA sequencing: specific cell subtypes influence survival and determine molecular subtype classification. Genome Med. 2021 13(1):111. PMID: 34238352 DOI: 10.1186/s13073-021-00922-x

10） Parvizi R, Gong Z, Jarnagin HC, et al. RUNX1 is Expressed in Subpopulation of Dermal Fibroblasts and Higher RUNX1 Levels are Associated with the Severity of Systemic Sclerosis. bioRxiv. 2024.04.03.587966. DOI: https://doi.org/10.1101/2024.04.03.587966.