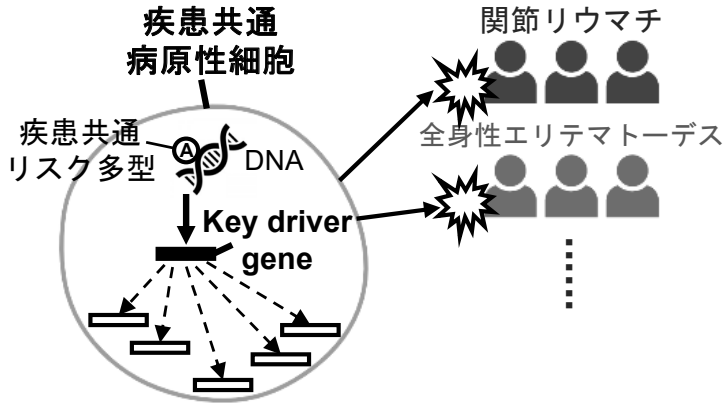
175　シングルセル統合解析による免疫疾患の共通病態の解明	中野　正博

【目的】免疫疾患は免疫システムが自己の細胞や組織を攻撃する疾患群を指し、代表的疾患に全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）等がある。過去のゲノム研究において、免疫疾患のリスク多型の一部は疾患をまたいで共有されることが明らかになり、免疫寛容の破綻に関わる共通の病因が存在することが強く示唆された。しかし過去の bulk 遺伝子発現解析では、共通の病態形成に関わる細胞集団（疾患共通病原性細胞）を厳密に同定することが困難であった。本研究では、単一細胞レベルで遺伝子発現と細胞表面マーカー蛋白を同時に評価する CITE-seq を複数の免疫疾患の患者末梢血に適用し、最先端のシングルセル解析手法と組み合わせることで、疾患共通病原性細胞を精密に同定し、疾患共通のリスク多型が疾患共通病原性細胞においてどの遺伝子の機能を制御しているのか（key driver gene）を詳細に解明することを目的とする。

【方法】SLE、RA 患者各 50 例の末梢血免疫細胞を収集し、高精度シングルセル解析（CITE-seq）を実施した。また上記と並行して、SLE 患者の大規模公共シングルセルデータ（およそ 1,300,000 細胞、SLE 174 例、対照健常人 98 例）の詳細な解析を実施した。

【結果】SLE 患者の大規模公共シングルセルデータに対して、k 近傍法に基づく細胞集約手法（Metacell）を用いて、最も類似する 10〜20 細胞の遺伝子発現情報を集約することで、シングルセルデータの最大の弱点である「1 細胞あたりの情報量の少なさ」を克服し、末梢血免疫細胞を 91 の詳細な細胞集団に分類することが可能となった。さらに k 近傍グラフを用いた neighborhood abundance analysis を実施することで、91 の細胞集団のうち 32 が健常人に比して SLE 患者で増多し、26 が減少していることが示された。さらに高疾患活動性 SLE と非活動性 SLE 患者群の比較では 22、19 の細胞集団が高疾患活動性 SLE 患者群で増多、減少していることも示された。上記と並行して、今回 SLE、RA 患者各 50 例の末梢血細胞を新たに収集し、高精度シングルセル解析（CITE-seq）を実施した（データ取得後、解析中）。上記公共データで同定した細胞集団のうち、SLE と RA で共有される病原性細胞を新たに同定し、既存の大規模ゲノムデータとの統合解析を通じて、疾患共通のリスク多型が疾患共通病原性細胞において機能を制御する遺伝子（key driver gene）の同定とその機能解明を目指す。

疾患共通病原性細胞と key driver gene



175. シングルセル統合解析による免疫疾患の共通病態の解明

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

Key words：免疫疾患，全身性エリテマトーデス，関節リウマチ，シングルセル解析

緒　言

免疫疾患は免疫システムが自己の細胞や組織を攻撃する疾患群を指し、代表的疾患に全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）等がある。過去のゲノム研究において、免疫疾患のリスク多型の一部は疾患をまたいで共有されることが明らかになり、免疫寛容の破綻に関わる共通の病因が存在することが強く示唆された［1］。免疫疾患の病態理解のためには、その共通の病態形成に関わる細胞集団（疾患共通病原性細胞）を厳密に同定することが重要である。さらに、上述した疾患共通のリスク多型が疾患共通病原性細胞においてどの遺伝子の機能を制御しているのか（key driver gene）を明らかにする必要がある。

我々は過去に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［2］。しかし同研究を含む従来の遺伝子発現研究は、既知の表面マーカー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、病原性細胞とkey driver geneの精密な同定が困難であった。

本研究では、単一細胞レベルで遺伝子発現と細胞表面マーカー蛋白を同時に評価するシングルセル解析技術（CITE-seq）をSLEとRA患者の末梢血に適用し、最先端のシングルセル解析手法と組み合わせることで、疾患共通病原性細胞を精密に同定し、key driver geneの機能を詳細に解明することを目的とする。

方　法

SLE、RA患者各50例の末梢血免疫細胞を収集し、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と各種細胞表面マーカーを標識したoligo RNAから各々cDNA libraryを生成し、次世代シークエンサーによるRNA sequencingを実施した。また上記と並行して、SLE患者の大規模公共シングルセルデータ（およそ1,300,000細胞、SLE 174例、対照健常人98例［3］）の詳細な解析を実施した。

SLE公共シングルセルデータにおいては、SEACellsを用いてk近傍法に基づく細胞集約手法（Metacell）を実施した。さらにcovarying neighborhood analysisを用いてk近傍グラフを用いたneighborhood abundance analysisを実施した。

結果および考察

1. SLE大規模公共シングルセルデータにおける精密な細胞集団の同定

本研究で新たに構築するSLE、RA患者の末梢血免疫細胞の収集とシングルセル実験に時間を要したため、これと並行してSLE患者の大規模公共シングルセルデータ（およそ1,300,000細胞、SLE 174例、対照健常人98例［3］）を、最新のシングルセル解析技術を用いて詳細に解析した。今回、k近傍法に基づく細胞集約手法（Metacell）を用いて、同一の遺伝子プロファイルを有する10〜20細胞の遺伝子発現情報を集約することで、シングルセルデータの最大の弱点である「1細胞あたりの情報量の少なさ」を克服し、本データの末梢血免疫細胞を91の詳細な細胞集団に分類

することができた（図 1）。本データを用いた元文献［3］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。

同定できた細胞集団の中には、免疫疾患の罹患組織において B 細胞の強い活性化機能を有する peripheral helper T cells（Tph）や、免疫疾患の自己抗体産生に重要な役割を果たす autoimmune-associated B cells（ABC）等も含まれた。また SLE 病態を反映して、type I interferon（IFN）signal により強く活性化された少数の細胞集団が各細胞系統で同定された。

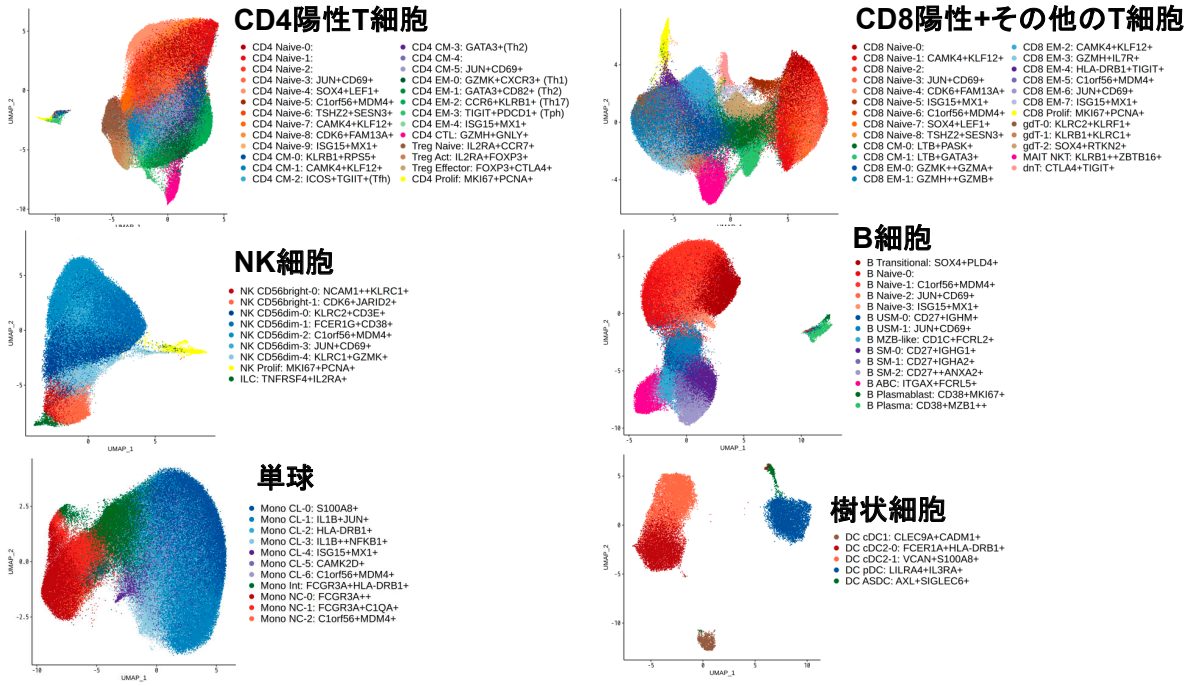


図 1. SLE 患者の末梢血免疫細胞における 91 の細胞集団
6 種の細胞系統において、各細胞を Uniform Manifold Approximation and Projection （UMAP）座標に投影し、91 の細胞集団の種類によって色付けした。

2. SLE で増多、減少する細胞集団の同定

次に、SLE 公開データに対し k 近傍グラフを用いた neighborhood abundance analysis を実施することで、上記で定義した細胞集団のうちいずれが SLE 患者で増多、減少しているかを評価した。SLE 対健常人の解析では、91 の細胞集団のうち 32 が健常人に比して SLE 患者で増多し、26 が減少していることが示された。まず、上述した Tph や type I IFN signal により活性化した細胞集団は SLE 患者で増多していることが確認された。さらに、HLA-DR 関連遺伝子と細胞障害性分子 Granzyme K を共発現する活性化した CD8 陽性 T 細胞や補体関連遺伝子を高発現する non-classical monocyte 等も SLE 患者で増多していることが新たに示された（図 2）。

さらに、高疾患活動性 SLE と非活動性 SLE 患者群の比較では 22、19 の細胞集団が高疾患活動性 SLE 患者群で増多、減少していることも示され、上述した特徴的な細胞集団はいずれも高疾患活動性 SLE 患者群で特に増多していることが明らかとなった。

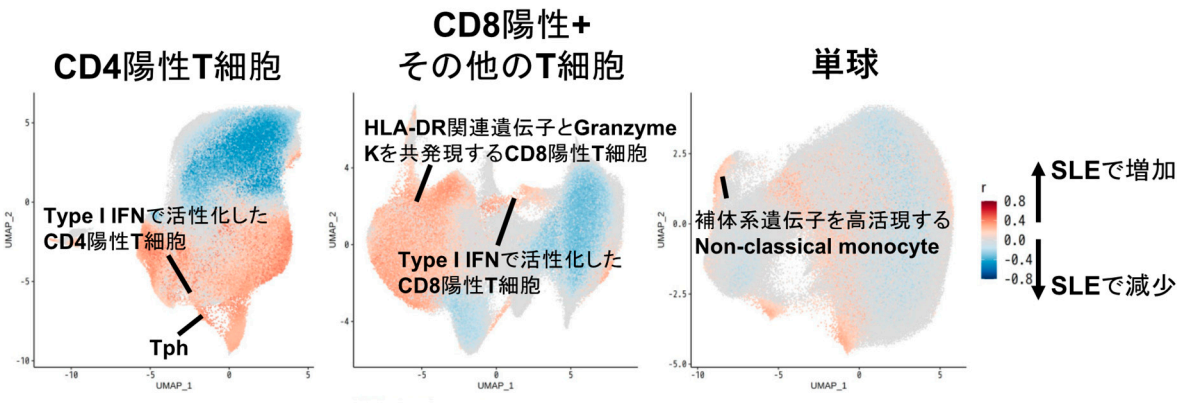


図 2. SLE 患者で増多、減少する細胞集団

各細胞系統の UMAP において、各細胞を neighborhood abundance analysis で得られた neighborhood correlation values で色付けした（赤 : SLE で増多、青 : SLE で減少）。

3. 免疫疾患共通の病原性細胞の同定と、key driver gene の機能解明

上記の公共データは数年前の古い技術で収集されたため 1 細胞あたりの情報が極めて少なく、また SLE 患者のみを対象としていたため、免疫疾患共通の病原性細胞の同定には、複数の免疫疾患患者に対して最新のシングルセル技術を適用したデータセットを新たに構築する必要があった。そこで今回 SLE、RA 患者各 50 例の末梢血細胞を収集し、高精度シングルセル解析（CITE-seq）を実施した（データ取得後、解析中）。上記公共データで同定した細胞集団のうち、SLE と RA で共有される病原性細胞を新たに同定し、既存の大規模ゲノムデータとの統合解析を通じて、疾患共通のリスク多型が疾患共通病原性細胞において機能を制御する遺伝子（key driver gene）の同定とその機能解明を目指す。

文　献

1） Yamamoto K, Okada Y. Shared genetic factors and their causality in autoimmune diseases. Ann Rhem Dis. 2019 Nov;78（11）:1449-1451. PMID: 30842123 DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-215099.

2） Nakano M, Ota M, Takeshima Y, Iwasaki Y, Hatano H, Nagafuchi Y, Itamiya T, Maeda J, Yoshida R, Yamada S, Nishiwaki A, Takahashi H, Takahashi H, Akutsu Y, Kusuda T, Suetsugu H, Liu L, Kim K, Yin X, Bang SY, Cui Y, Lee HS, Shoda H, Zhang X, Bae SC, Terao C, Yamamoto K, Okamura T, Ishigaki K, Fujio K. Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation. Cell. 2022 Sep 1;185（18）:3375-3389.e21. PMID: 35998627 DOI: 10.1016/j.cell.2022.07.021.

3） Perez RK, Gordon MG, Subramaniam M, Kim MC, Hartoularos GC, Targ S, Sun Y, Ogorodnikov A, Bueno R, Lu A, Thompson M, Rappoport N, Dahl A, Lanata CM, Matloubian M, Maliskova L, Kwek SS, Li T, Slyper M, Waldman J, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Fong L, Dall'Era M, Balliu B, Regev A, Yazdany J, Criswell LA, Zaitlen N, Ye CJ. Single-cell RNA-seq reveals cell type-specific molecular and genetic associations to lupus. Science. 2022 Apr 8;376（6589）:eabf1970. PMID: 35389781 DOI: 10.1126/science.abf1970.