



## 膠原病に伴う間質性肺疾患の免疫異常を解明

～シングルセル解析による気管支肺胞洗浄液の網羅的遺伝子解析～

### 本研究成果のポイント

○間質性肺疾患は膠原病の主要な合併症で、年々増加傾向にありますが、その病態が複雑であることから、鑑別診断や最適な治療方針決定は容易ではありません。

○臨床検体の気管支肺胞洗浄液、血液を用いた一細胞レベルの網羅的遺伝子解析を行うことにより、各膠原病疾患に合併する間質性肺疾患の免疫学的異常を解明しました。

○本研究の成果によって、**気管支肺胞洗浄液の解析が間質性肺疾患の原因の鑑別の一助になることとともに、膠原病に合併した間質性肺疾患の免疫異常に着目した新たな治療法の開発につながる**ことが期待されます。

京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 病院助教 藤井 渉、同 研修員 平野愛子、同 フューチャーステップ研究員 阪下 暁、同 病院教授 川人 豊ら研究グループは、膠原病に伴う間質性肺疾患の免疫異常を解明し、本件に関する論文が、科学雑誌『Frontiers in Immunology』に2024年10月25日付けで掲載されましたのでご報告します。

本研究は、気管支肺胞洗浄液、血液を用いた一細胞レベル網羅的遺伝子解析によるもので、膠原病に伴う間質性肺疾患の免疫異常を解明しました。本研究成果が、今後は間質性肺疾患の正確な鑑別診断の一助となるとともに、膠原病疾患の主要な合併症である間質性肺疾患の治療成績向上に資することが期待されます。

### 【論文基礎情報】

掲載情報	雑誌名 Frontiers in Immunology 発表媒体 <input checked="" type="checkbox"/> オンライン速報版 <input type="checkbox"/> ペーパー発行 <input type="checkbox"/> その他 雑誌の発行元国 スイス オンライン閲覧 可 <a href="https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1408880/full">https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1408880/full</a> 掲載日 2024年10月25日12時（日本時間）
	論文タイトル（英・日） 英語：Immunological characteristics of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Blood across

論文情報	<p>Connective Tissue Disease-associated Interstitial Lung Diseases  (日本語：膠原病関連間質性肺疾患の気管支肺胞洗浄液・血液の免疫学的特徴)  代表著者  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 藤井 渉  共同著者  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 平野愛子  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 阪下 暁  aimed analytics GmbH Kevin Baßler  京都第一赤十字病院 呼吸器内科 辻 泰佑  京都第一赤十字病院 リウマチ内科(現所属：鞍馬口医療センター) 角谷昌俊  京都第一赤十字病院 総合内科 尾本篤志  京都第一赤十字病院 呼吸器内科(現所属：東山老年サナトリウム) 平岡範也  京都府立医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学 (現所属：京都第一赤十字病院)  今林達哉  京都府立医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学 金子美子  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学(現所属：京都第二赤十字病院) 祖父江秀晃  京都府立医科大学大学院医学研究科 放射線診断治療学(現所属：済生会滋賀県病院)  前原陽介  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 妹尾高宏  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 (現所属：京都第一赤十字病院)  和田 誠  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 河野正孝  京都第一赤十字病院 リウマチ内科(現所属：京都久野病院) 福田 互  京都府立医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学 高山浩一  京都府立医科大学大学院医学研究科 放射線診断治療学 山田 恵  京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 川人 豊</p>
研究情報	<p>研究課題名 シングルセル解析による膠原病関連間質性肺疾患の病態解明(ERB-C-1471)  代表研究者 京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫内科学 病院助教 藤井 渉  資金的関与(獲得資金等) 日本学術振興会 科学研究費助成事業 研究活動スタート支援、(JP19K24000)、同 若手研究(JP21K16304)、2020年度 GSK ジャパン研究助成(A-87)、日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社との共同研究</p>

【論文概要】

1 研究分野の背景や問題点

関節リウマチ、多発性筋炎・皮膚筋炎、シェーグレン症候群、全身性強皮症などの膠原病はしばしば進行性、難治性の間質性肺疾患を合併し膠原病性間質性肺疾患(Connective tissue disease-associated interstitial lung disease: CTD-ILD)と呼ばれますが、その病因、分子病態については十分解明されておらず、特異的な治療法も確立されていません。CTD-ILDの難治性の背景には疾患間、患者間および病態に関わる免疫細胞の不均一性があると考えられています。また、臨床現場では主に画像検査および病理所見を元に診療されることが多

いですが、画像検査では自己免疫疾患である膠原病の免疫異常までは分からず、病理検査はその侵襲性の高さから全症例に行くことは困難です。

一方、気管支内視鏡検査下に採取できる気管支肺胞洗浄液は比較的低い侵襲度で行うことができ、細菌学的検査や癌細胞の検出に有用であるほか、免疫細胞の解析を行うことができますが、膠原病性肺疾患診療における気管支肺胞洗浄液の意義は未確立でした。

## 2 研究内容・成果の要点

近年発展した研究手法であるシングルセル RNA-seq は、一細胞毎の全遺伝情報(トランスクリプトーム)を得ることが可能で、この手法により CTD-ILD 患者由来の臨床検体を詳細に解析することで免疫細胞の不均一性および基礎疾患毎の分子病態の特徴を解き明かすことが期待されます。本研究は CTD-ILD の気管支肺胞洗浄液をシングルセル RNA-seq で解析した世界で初めての研究で、マイクロウェルを用いた Seq-Well という手法でシングルセル RNA-seq を行いました。

まず血液および気管支肺胞洗浄液のシングルセル RNA-seq を行い、遺伝子発現パターンに基づいてアノテーション（細胞種の同定）を行いました（図 1）。

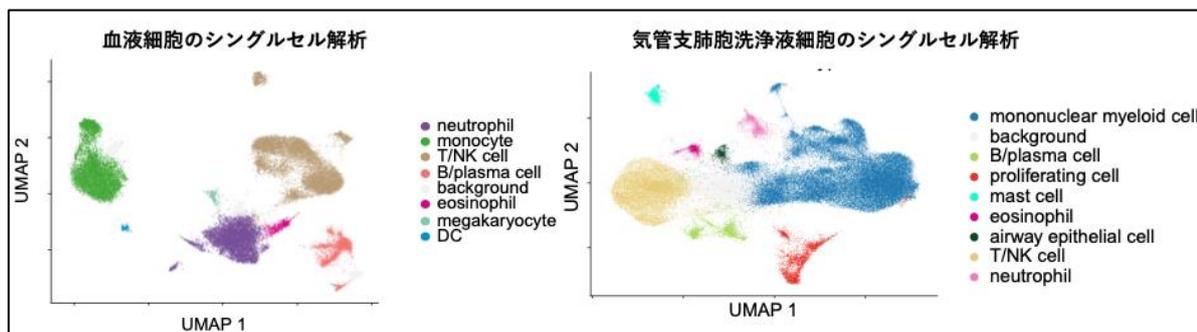


図 1: シングルセル解析による血液（左図）と気管支肺胞洗浄液（右図）中免疫細胞の同定

これを基に膠原病の免疫細胞の比率を比較したところ、血液中では有意な差を認めませんでしたが、気管支肺胞洗浄液中では関節リウマチでは好中球、シェーグレン症候群では B 細胞とマスト細胞が増加する傾向を認めました（図 2）。

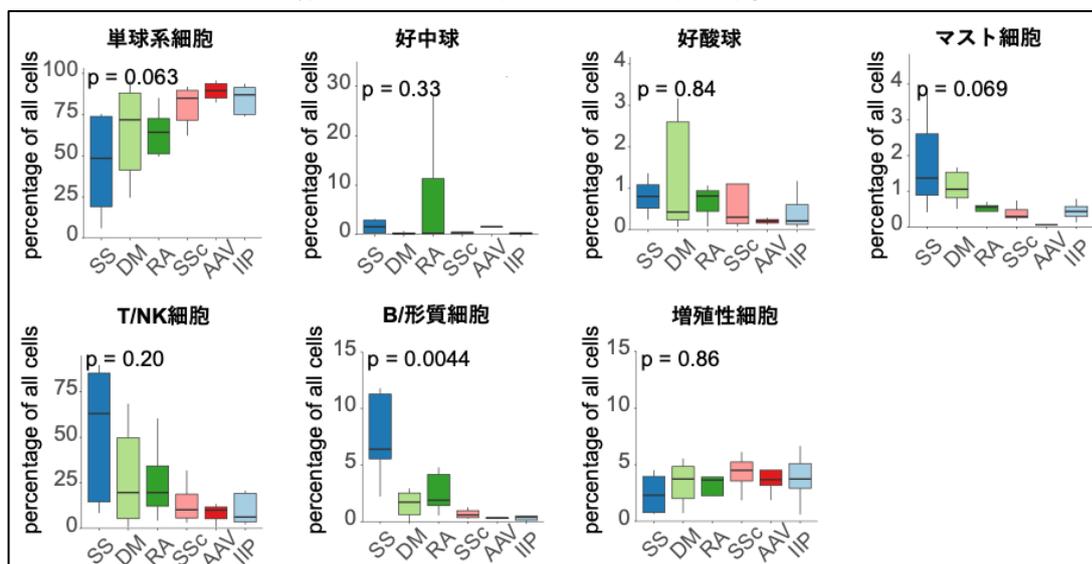


図 2: 気管支肺胞洗浄液中免疫細胞の疾患による違い. SS:シェーグレン症候群,DM:皮膚筋炎,RA:関節リウマチ,SSc:全身性強皮症,AAV:ANCA 関連血管炎,IIP:特発性間質性肺炎

さらに各免疫細胞の遺伝子発現量を比較し、Gene Ontology エンリッチメント解析(既存の遺伝子データを用いて発現変動遺伝子の機能を推測する解析方法)を行ったところ、シェーグレン症候群に合併する間質性肺疾患の気管支肺胞洗浄液中の T 細胞と B 細胞では、液性免疫反応のみならず自然免疫反応に関連する遺伝子発現が亢進していました (図 3)。

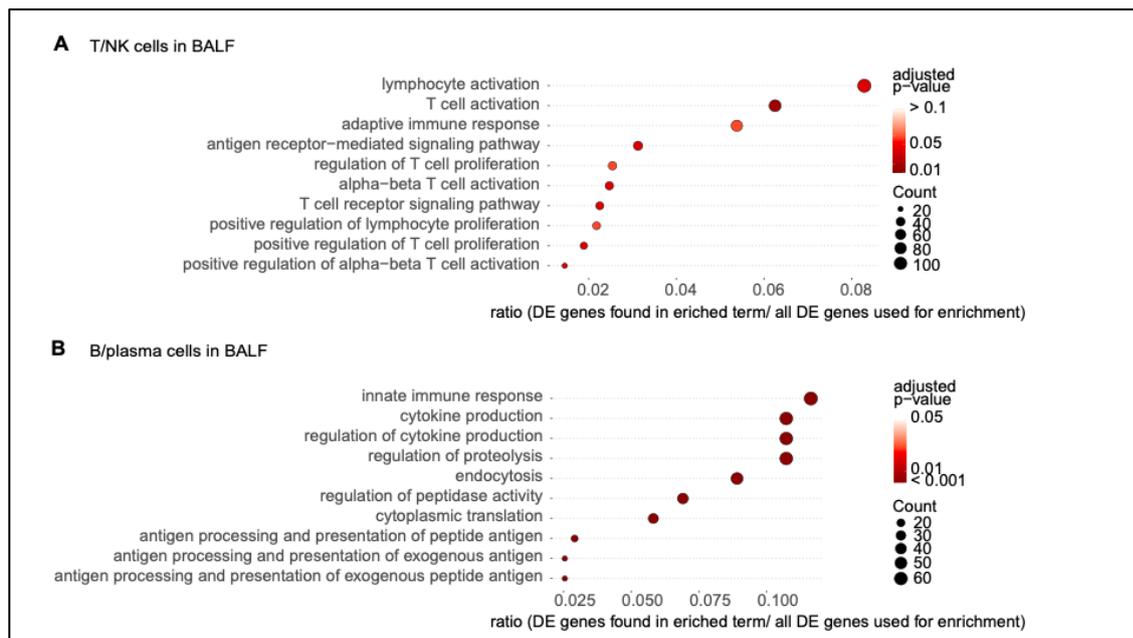


図 3: シェーグレン症候群の発現変動遺伝子の Gene Ontology エンリッチメント解析

また、皮膚筋炎ではウイルス感染防御に関連する遺伝子群 (図 4) が、関節リウマチでは NF- $\kappa$ B などの炎症に関わる遺伝子群が、全身性強皮症では小胞体機能に関わる遺伝子群の発現が亢進していました。

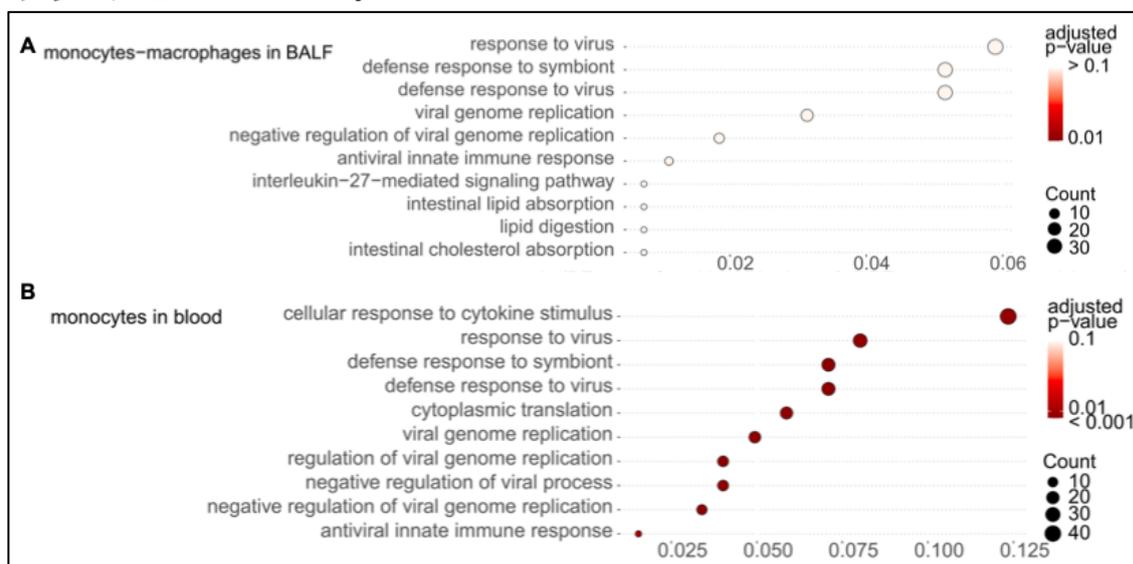


図 4: 皮膚筋炎の発現変動遺伝子の Gene Ontology エンリッチメント解析

最後に気管支肺胞洗浄液の上清成分と、血漿成分中のサイトカイン濃度を ELISA で測定したところ、皮膚筋炎の血漿では CXCL10、関節リウマチの気管支肺胞洗浄液では IL-6、シェーグレン症候群の気管支肺胞洗浄液と血漿では補体成分 C1q、気管支肺胞洗浄液では C3a、C4a が上昇する傾向を認めました (図 5)。

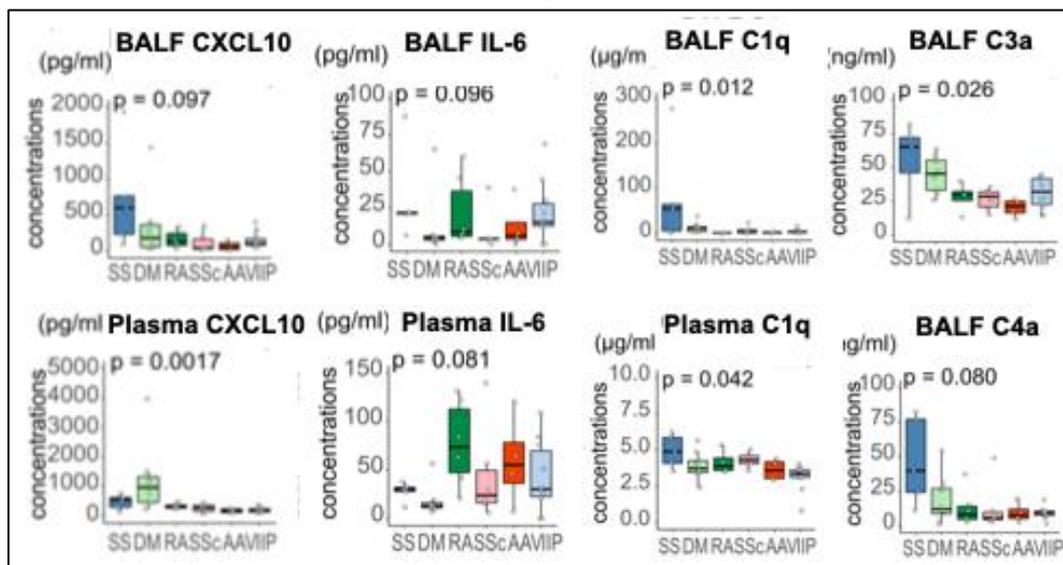


図 5: 気管支肺胞洗浄液と血漿中のサイトカイン, 補体成分解析. BALF: 気管支肺胞洗浄液

以上の解析結果から、各膠原病疾患に伴う間質性肺疾患における免疫異常が以下のとおり明らかになりました。

- ・ 関節リウマチでは気管支肺胞洗浄液中の好中球および IL-6 が増加
- ・ シェーグレン症候群では気管支肺胞洗浄液中のマスト細胞、B 細胞が増加し、T 細胞、B 細胞の液性免疫・自然免疫関連の遺伝子が亢進
- ・ 皮膚筋炎では気管支肺胞洗浄液中の T 細胞が増加し、リンパ球と単球でウイルス感染防御に関わる遺伝子が亢進
- ・ 全身性強皮症と ANCA 関連血管炎では気管支肺胞洗浄液中で単球系細胞（肺胞マクロファージ）が増加

### 3 今後の展開と社会へのアピールポイント

これらの実験結果から、CTD-ILD における各膠原病の気管支肺胞洗浄液の細胞分布の特徴が明らかとなり、これらの変化が CTD-ILD の病態に関与している可能性が示唆され、気管支肺胞洗浄液の CTD-ILD の病態解析における有用性の確立とともに、診断未確定間質性肺炎の原因鑑別への臨床応用が期待できます。

本研究は日本学術振興会 科学研究費助成事業 研究活動スタート支援(JP19K24000)、若手研究(JP21K16304)、2020 年度 GSK ジャパン研究助成から支援を受け、日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社との共同研究として実施しました。

<p>&lt;研究に関すること&gt; 免疫内科学 病院助教 藤井 渉 電 話：075-251-5507 E-mail：snufkin@koto.kpu-m.ac.jp</p>	<p>&lt;広報に関すること&gt; 事務局企画広報課 担当：堤 電 話：075-251-5804 E-mail：kouhou@koto.kpu-m.ac.jp</p>
--	---