

氏名	小山 光那
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第7439号
学位授与の日付	令和8年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	シェーグレン症候群患者の制御性T細胞に特徴的な非翻訳長鎖RNAの同定
論文審査委員	秋山 謙太郎 教授 井澤 俊 准教授 大野 充昭 准教授

学位論文内容の要旨

【諸言】

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome : SS) は、主に外分泌腺を標的とする慢性炎症性自己免疫疾患であり、唾液腺や涙腺の破壊による乾燥症状を主徴とする。SSの発症には、遺伝的素因や環境因子に加え、樹状細胞, T細胞, B細胞の異常活性化が関与し、免疫寛容の維持に重要な制御性T細胞 (regulatory T cell : Treg) の異常が病態形成に深く関与すると考えられている。Tregの分化・機能はエピジェネティクスにより制御されており、特にDNAメチル化やヒストン修飾に加え、近年は非翻訳長鎖RNA (long non-coding RNA : lncRNA) の関与が注目されている。lncRNAは転写因子やクロマチン修飾酵素と相互作用し、遺伝子発現を多層的に制御することが知られているが、SSにおけるTregとlncRNAの関係は明らかになっていない。そこで本研究は、SS患者のTregに特徴的なlncRNAを同定することを目的とした。

【材料と方法】

対象は一次性SS患者および健常ボランティア3名ずつとし、末梢血の採血を行った。Ficoll-Paque PLEMIUMを用いた密度勾配遠心法で、末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーによってCD4⁺CD25⁺CD127^{low} 細胞をTregと定義し、ソーティングした。その後、Illumina NovaSeq 6000を用いたRNAシーケンシングを実施した。

得られたデータからDESeq2を用いてlncRNAとmRNAの発現量の差を解析し、 $\text{padj} < 0.05$ かつ $\text{fold change} \geq 2$ を有意な発現変動とした。さらに、Metascapeを用いて細胞タイプシグネチャー解析およびlncRNAに関連して転写因子が標的とする遺伝子解析を行い、lncRNAと転写制御ネットワークとの関連を検討した。

【結果】

SS群とHealthy群の間で、CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregの割合に有意差はなかった。

RNAシーケンシング解析の結果、SS群のTreg内において発現が上昇したlncRNAが5種、発現が低下

したlncRNAが9種同定された。また、mRNAでは発現上昇が105遺伝子、発現低下が135遺伝子認められた。

細胞タイプシグネチャー解析では、ソーティング後に得られた細胞群は、Tregの純度を直接評価していない点はあるものの、その発現プロファイルは、T細胞系譜に属する発現特性を反映していた可能性が考えられる。

lncRNAに関連して転写因子が標的とする遺伝子解析では、発現が上昇したlncRNA群に対してHBZ、SOX10、そしてNCOA6などの免疫活性化に関与する転写因子群が、発現が低下したlncRNA群に対してMEF2C、SOX3、そしてSETBP1といった免疫抑制や細胞の恒常性維持に関わる転写因子群が、有意に関連していた。また、SS群で発現が上昇したmRNA群には、IL6ST、TNFAIP8、そしてITGB1といった免疫応答やサイトカインシグナル伝達経路に関与する遺伝子が多く含まれていた。一方で、発現が低下したmRNA群には、CXCR4、IL2RG、そしてBECN1といった免疫抑制に関与する遺伝子が多く含まれていた。

【考察】

本研究では、SS患者のTregにおいてlncRNAとmRNAの双方に発現の顕著な変動が見られ、lncRNAを介した転写因子ネットワークの破綻がTreg機能の異常を引き起こしている可能性が示唆された。今回、発現が上昇していたlncRNA群は、転写促進や翻訳活性化に関与する転写因子の標的遺伝子と関連しており、炎症応答やサイトカインシグナル経路を活性化していると考えられる。実際SS群でIL6STやTNFAIP8といった炎症性mRNA群の発現が上昇していたことから、Treg内での転写および翻訳活性が過剰に促進された可能性がある。通常、Tregは低代謝・低翻訳状態を維持することで抑制能を維持するが、過剰な翻訳活性化は酸化ストレスや刺激応答の持続化を招き、Tregの安定性を損なう一因となる可能性がある（Di Giorgio, *et al.* Front Immunol. 2021）。一方、発現が低下していたlncRNA群ではMEF2CやSOX3など免疫抑制や細胞恒常性維持に関与する転写因子の標的遺伝子と関連していた。特にMEF2CはFoxP3依存的転写プログラムの維持に関与し、Tregの安定性や抑制機能に重要な役割を担うとされる（Shi H, *et al.* Front Immunol. 2019）。本研究でCXCR4やIL2RGといった免疫抑制関連mRNAの低下が認められたことは、MEF2C経路の抑制を反映していると考えられる。このように、上昇lncRNAによる炎症経路の過剰活性化と、低下lncRNAによる抑制経路の減弱が同時に進行することで、Treg内の転写ネットワーク全体のバランスが崩壊し、結果としてTreg機能の不安定化に関与している可能性が示唆された。

さらに、今回SS群とHealthy群でTreg割合に差を認めなかったことから、疾患発症にはTregの数的異常よりも機能異常が関与している可能性が考えられる。今後はCRISPR-Cas9システムを用いて同定されたlncRNAの発現を人為的に制御し、それに伴うmRNAの発現変動の検証を行う予定である。

【結論】

健常者群とSS群の間でTregの割合に有意差はなかった。一方で、SS患者のTregにおいて14種類のlncRNAが有意に発現変動しており、その内5種類が発現上昇、9種類が発現低下していた。

論文審査結果の要旨

【諸言】

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome:SS)は、外分泌腺を標的とする慢性炎症性自己免疫疾患であり、唾液腺および涙腺の破壊による乾燥症状を特徴とする。SSの病態には、樹状細胞、T細胞ならびにB細胞の異常活性化に加え、免疫寛容の維持に重要な制御性T細胞(regulatory T cell:Treg)の機能異常が関与すると考えられている。Tregの分化・機能は、エピジェネティクスにより制御されており、近年では非翻訳長鎖RNA(long non-coding RNA:lncRNA)の関与が注目されている。しかし、SSにおけるTregとlncRNAの関与については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、SS患者のTregに特徴的なlncRNAの同定を目的とした。

【方法】

一次性SS患者および健常ボランティア(Healthy)各3名の末梢血から、Ficoll-Paqueによる密度勾配遠心法で単核球を分離し、フローサイトメトリーによりCD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregを分取した。これらの細胞群におけるlncRNAおよびmRNAの発現を、Bulk RNA-sequence解析を用いて網羅的に解析した。RNA発現量の差はDESeq2を用いて解析し、Padj < 0.05 かつ fold change \geq 2を有意な発現変動と定義した。さらに、Metascapeを用いて細胞タイプシグネチャー解析および転写因子標的遺伝子解析を行い、lncRNAと転写制御ネットワークとの関連を検討した。

【結果】

SS群とHealth群との間で、末梢血T細胞中におけるCD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregの割合に有意差は認められなかった。SS群Tregにおいて、発現が有意に変動していたlncRNAは14種類(発現上昇遺伝子5種類、発現低下遺伝子9種類)、mRNAは240種類(発現上昇遺伝子105種類、発現低下遺伝子135種類)であった。細胞タイプシグネチャー解析では、これらの遺伝子群が、胸腺細胞や骨髄ナイーブT細胞と関連しており、解析対象が適切なTreg集団であることが確認された。転写因子標的遺伝子解析では、発現が上昇したlncRNA群は免疫活性化に、発現が低下したlncRNA群は免疫抑制と恒常性維持に関連していた。さらにSS群では、免疫応答やサイトカインシグナル伝達に関与するmRNA群の発現が上昇し、免疫抑制に関与するmRNA群の発現が低下していた。

【考察】

SS患者Tregにおいて、lncRNAとmRNAの発現が有意に変動しており、lncRNAを介した転写因子ネットワークの破綻がTregの機能異常に関与する可能性が示唆された。その機序の一つとして、発現が上昇したlncRNAによる炎症経路の活性化と、発現が低下したlncRNAによる抑制経路の減弱が同時に生じることで、Treg内の転写ネットワーク全体のバランスが崩れ、Treg機能の破綻を誘導した可能性が考えられた。また、Treg割合に差が認められなかったことから、SSの病態形成にはTregの数的異常よりも機能異常が主要な役割を果たしている可能性が示唆された。

本研究では、SS患者Tregにおいて健常者と比較して発現が変動する14種類のlncRNAを同定し、RNAシークエンシング解析を通じてTregの機能異常に関連する転写因子ネットワークの破綻の可能性が示唆された。これらの知見は、SSの病態解明に資する重要な成果であると考えられる。以上より、本審査委員会は本申請論文が博士(歯学)の学位論文として十分な価値を有するものと認める。