

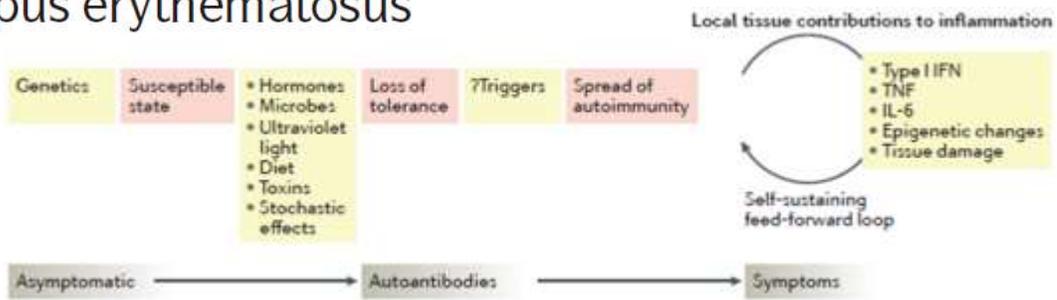
# SLEの基礎

1. 全体像について： [2016 NRR 病態] [2019 NRR 治療] [2020 NRR 自己抗体]
2. OMICS解析： [2019 Nat Immunol AMP-SLE] [2019 JCI Insight AMP-SLE] [2016 Cell SLE signature] [2020 JCI Insight SLE signature] [2022 Science SLE eQTL]
3. Type I IFN： [2018 NRR] [2020 Immunity ExFO AFC]
4. TLR： [2013 Immunity MyD88] [2020 Nature TASL] [2022 Nature TLR7 GOF]
5. B cell (ABC, DN2)： [2018 Immunity DN2]
6. T cell (Tfh, ExFO Th)： [2005 Nature sanroque] [2015 A&R Tfh] [2019 Nat Med Th10]
7. NET, LDG： [2018 NRR] [2019 ARD LDG]

# 基礎 1. 全体像について

- [2016 NRR 病態]
- [2019 NRR 治療]
- [2020 NRR 自己抗体]

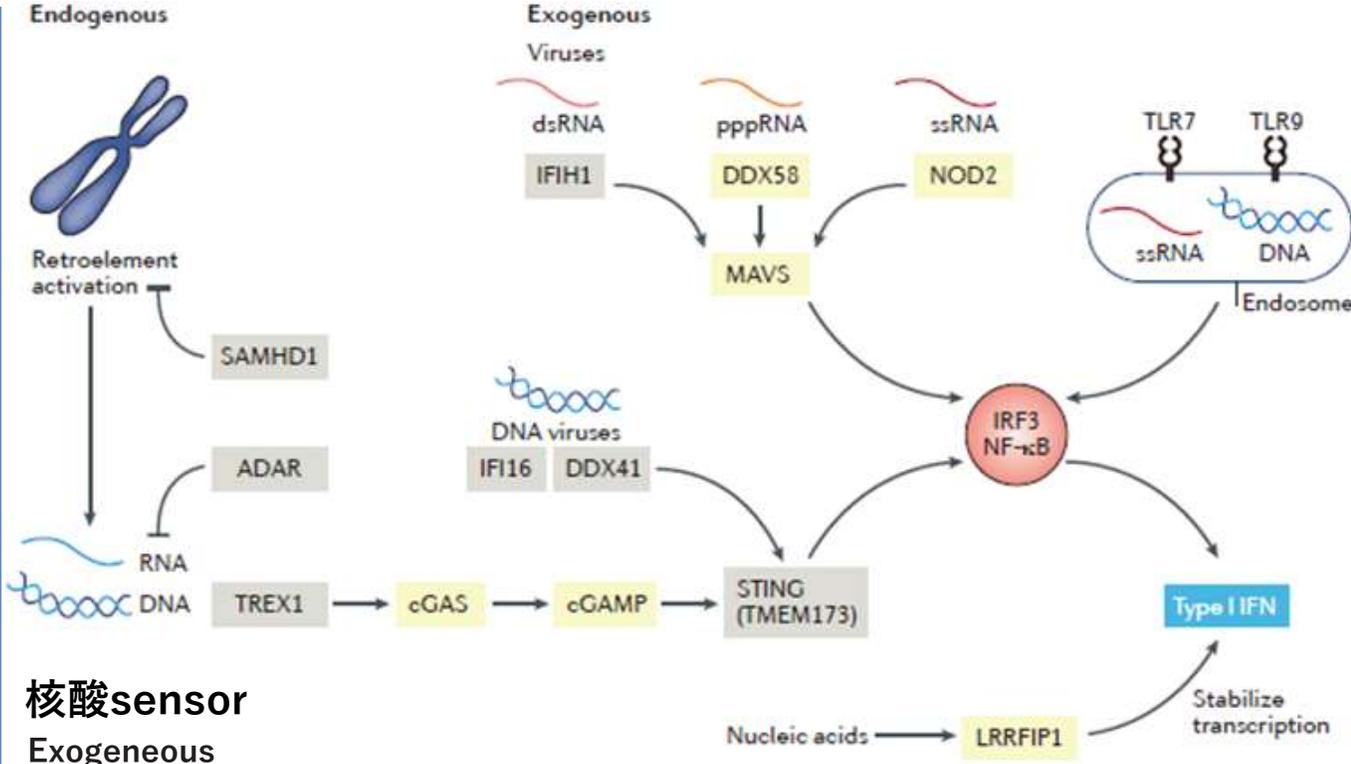
# New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus [Nat Rev Rheumatol. 2016;12(12):716-30.]



## SLEの病態のFramework

- SLEの自己抗原は通常免疫システムがアクセスできない核内抗原が多いが、細胞死の過程で細胞成分が小胞に入れられ放出される。
- 核酸を含むapoptotic debrisは、TLRの様な核酸認識レセプターを刺激する。
- TLRはウイルス、細胞内細菌を認識しtype 1 IFN産生に寄与し、この過程の異常がSLEの病態に関連する。Type 1 IFNはB細胞分化を促進しtolerance破綻に寄与する。
- B細胞は核酸抗原を直接もしくは抗原+蛋白複合体をIgM receptorを介して認識。自己抗体が産生されると、B細胞は核酸をFcRかFcを認識するBCRより取り込む。
- 自己抗体産生B細胞が活性化すると成熟・増殖し抗体産生する。SLEの自己抗体はaffinityが高くSHMを経たIgGが主で、Thの補助を受けクラススイッチしたものと考えられる。

Pathway(s)	Locs implicated in SLE and other autoimmune diseases	Locs implicated only in SLE
Lymphocyte activation	PTPN22, TNFSF4, IL10, SPRED2, STAT4, PXX, AFF1, IL12A, BANK1, TCF7, SKP1, MHC genes, IKZF1 and IKZF3, BLK, ARID5B, CD44, LYN, ETS1, FLI1, SH2B3, CSK, ELF1, CIITA, ITGAM, TYK2	IKZF2
IFN or Toll-like receptors	IFIH1, PRDM1, UHRF1BP1, TNFAIP3, IRF5-TNPO3, IRF7 and IRF8, SOCS1, PRKCB, UBE2L3, IRAK1	None
Inflammation	TNIP1	None
Immune complex or waste clearance	FCGR2A, FCGR2B, FCGR3B, ATG5, CLEC16A	NCF2, LYST
Unknown	ABHD6 (may be related to lymphocyte activation), RAD51B (may be related to IFN pathways), MECP2 (may be related to IFN pathways), RASGRP3, TMEM39A, PITG1, TNXB, JAZF1, XKR6, FAM167A-AS1, WDFY4, unknown genes: rs1167796, rs463128, rs7186852, rs7197475	SMG7 (may be related to interferon pathways), DHCR7, NADSYN1, SLC15A4, PLD2, CXorf21



## 核酸sensor

### Exogeneous

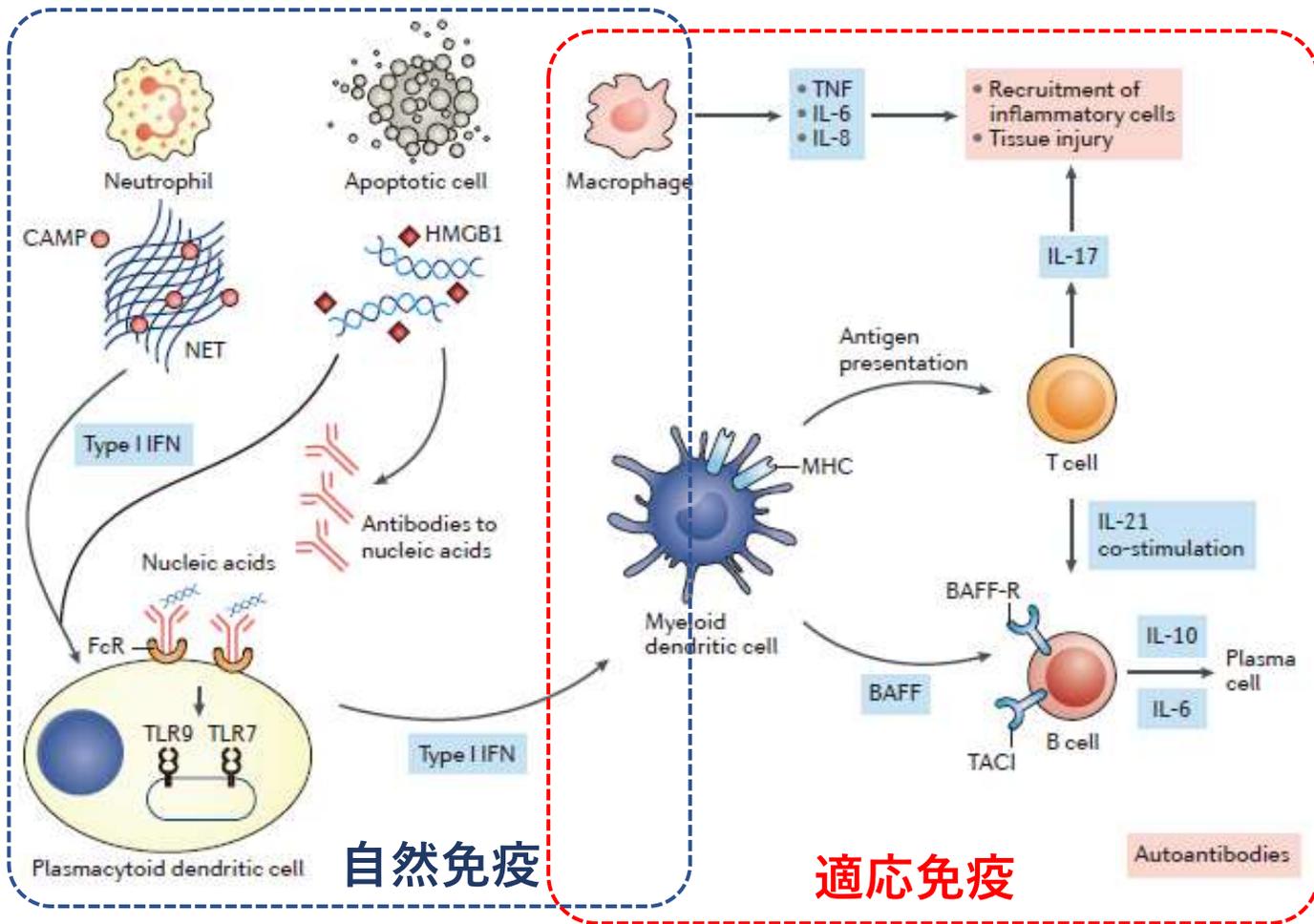
- TLR7/TLR9は主にendosome内の核酸sensorで、細胞質のsensorの補完が必要。
- IFIH1(MDA5)→dsRNA, DDX58→pppRNA, NOD2→ssRNAが細胞質の核酸sensor.これらはウイルス感染を認識し、type 1 IFNを産生して生体防御する。

### Endogeneous

- Endogenous ligandは感染と独立して炎症を惹起する。stimulator of IFN genes protein (STING, encoded by TMEM173)が核酸sensorとなる。
- いずれも2つの転写因子**IRF3**と**NF-κB**に収束し、最終的に**type 1 IFN**を産生する。

## 遺伝とSLE

- SLEに関するGWASでは40 loci以上がある (Table1, [J Autoimmun. 2013;41:25-33.]). Coding exonにはほとんど存在しないが、regulatory lesionsに影響すると考えられる。SLC15A4, Cxorf21はのちに機能解析されている ([Nature 2020;581:316-22.]).
- ①リンパ球シグナル (T/B), ②IFNシグナル (核酸sensing/IFN産生), ③ICやwasteのクリアランス. の3pathwayに分けられる。
- Transcript analysisでは、PBMCや全血ではISGのセットが発現している。ソートした細胞でも、ISGは発現が高いが、細胞種や人種、SLEの活動性で異なる。



▲ 好中球とアポトーシス細胞がSLEの病態カスケードの頂点にあり, type 1 IFN発現を促すリガンドを提供する. 好中球はNETosisを介してシトルリン化ペプチドと核酸抗原の供給源であるNETを放出する. Apoptotic debrisは, 細胞の動員に参与する炎症性サイトカインの発現を促進する. pDCはtype 1 IFNを最も大量に産生する. T細胞とB細胞は自己免疫に関与し, B細胞は最終的に自己抗体を産生する. T細胞によるIL-17産生は, 好中球による臓器浸潤にも寄与する.

## Apoptosis細胞のクリアランス

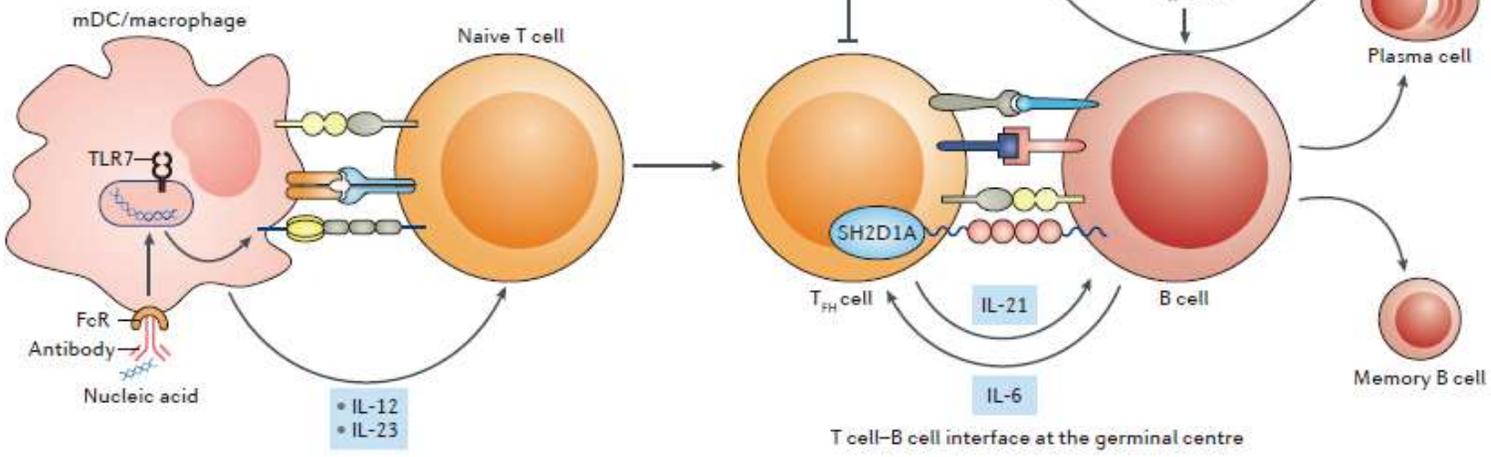
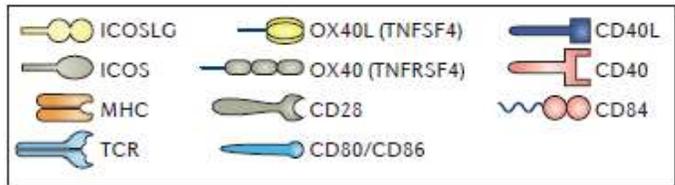
- Apoptosis細胞の産生とクリアランスの不均衡がSLEに寄与する (感染/UV/サイトカインに影響される).
- Apoptotic debrisの蓄積は, TLRと核酸sensorを活性化する. TLRは B/T/DC/MΦ, 上皮細胞, 線維芽細胞に発現する.
- Apoptosis細胞は補体C1q/CRP/pentraxin 3/amyloid Pで覆われ貪食促進される. DNase I がクロマチンを分解するがSLEでは活性低下.

## TLRの役割

- Apoptosis細胞は網内系システムで除去される. 除去能力を超えるとapoptotic debrisが免疫反応を惹起する.
- TLR3, TLR7, TLR8, TLR9は小胞体に存在する.
- **TLR7** (ssRNA)は, RNA反応性自己抗体・糸球体腎炎に重要. TLR7は炎症・自己免疫・type 1 IFN産生の中心的役割を担う.
- TLR9 (CpG motifをもつDNA) 発現B細胞と単球とdsDNA抗体は高疾患活動性SLEで増える. TLR9欠損マウスではdsDNA抗体は阻害されるが他の抗体 (Smなど) は産生される.

## サイトカイン

- Type 1 IFN, type 2 IFNは上昇する. TNFがtype 1 IFN発現亢進させる. IFNαはBAFF産生を増やし, Treg機能を低下し, PC誘導する. IFNα発現とISGはSLEの腎・皮膚浸潤細胞からも検出される.
- SLEではIL-2産生が障害→ Treg増加・機能に制限.
- SLEではIL-17が亢進→ 組織障害が亢進し, 免疫細胞を召集する, Th17はIL-23で誘導されるが, IL-23抗体でmouse lupusは改善する,
- BAFFはSLEで高いが, その状態ではB cell selectionが制限される, B細胞除去療法後はBAFF画像化し, autoreactivityが亢進する.



### T細胞

- T細胞の免疫寛容破綻は、マウスモデルよりcentralよりperipheralのtolerance破綻が主体と考えられる。
- Treg: マウスでもヒトでも機能障害や低下が示される。Low-dose IL-2でTregは増えるが効果は不明確。
- TCR: SLEでCD3ζ鎖がmTOR活性亢進のため低下し、ZAP-70がFcRγに置き換わりSYKとpairになりTCRシグナルが過剰亢進する
- IL-2: T細胞がhyperactiveだが、AP-1・CREMαの低下でIL-2産生は障害されるが、mTOR阻害 (rapamycin)により回復する、
- Th17: 腎や皮膚に浸潤している、IL-1βやIFNγ産生しB細胞分化を促す。
- Tfh: SLEでは増加し、腎炎でも増える、TLR7 (RNA含むICで活性化)を介してAPCのOX40L発現亢進し、Tfhが増加する、

### DC

- DC異常は抗原提示を異常にさせT/B tolerance破綻に寄与する。
- pDCはTLR7/TLR9を介した核酸刺激に反応してtype 1 IFNを産生する主役。pDCはFcγR II aを介してICを取り込み、endosomeの中でTLR7/TLR9へアクセスさせる。
- Conventional DCはSLEでは自己免疫亢進させ、マウスではLN進展にcritical。

### 好中球

- SLEでは貪食能が低下: 感染に弱い。ROS産生が低い。
- 短命で日々のapoptotic cellの主な細胞で、clearanceに影響大。
- SLEではNETosis傾向が強い異常好中球 (LDG) がいる。
- NETosisは感染や酸化ストレスによる細胞死で、クロマチン/核/細胞質/顆粒内容を放出する (NETsと総称)
- NETosisはpDCのtype 1 IFN産生促す (TLR9/DNAを介し)。Type 1 IFNもNeuにNETosisを促すfeedback loopある。

### B細胞

- B cellが免疫寛容を失っている点がSLEに共通でみられる特徴、
- BMから遊走したばかりのtransitional BがTLR9を介して成熟し、tolerance checkpointを回避する。
- BAFFの過剰発現が自己免疫を促す。
- IL-10 産生B細胞の機能がSLEで障害されている、

# New therapies for systemic lupus erythematosus — past imperfect, future tense

[Nat Rev Rheumatol. 2019;15(7):403-12.]

- B細胞標的: Rituximab, Belimumab
- Humanized anti-CD20
- Humanized anti-CD19
- BTK阻害
- IFNR阻害
- CD40L阻害
- IL-12/IL-23 阻害
- JAK阻害

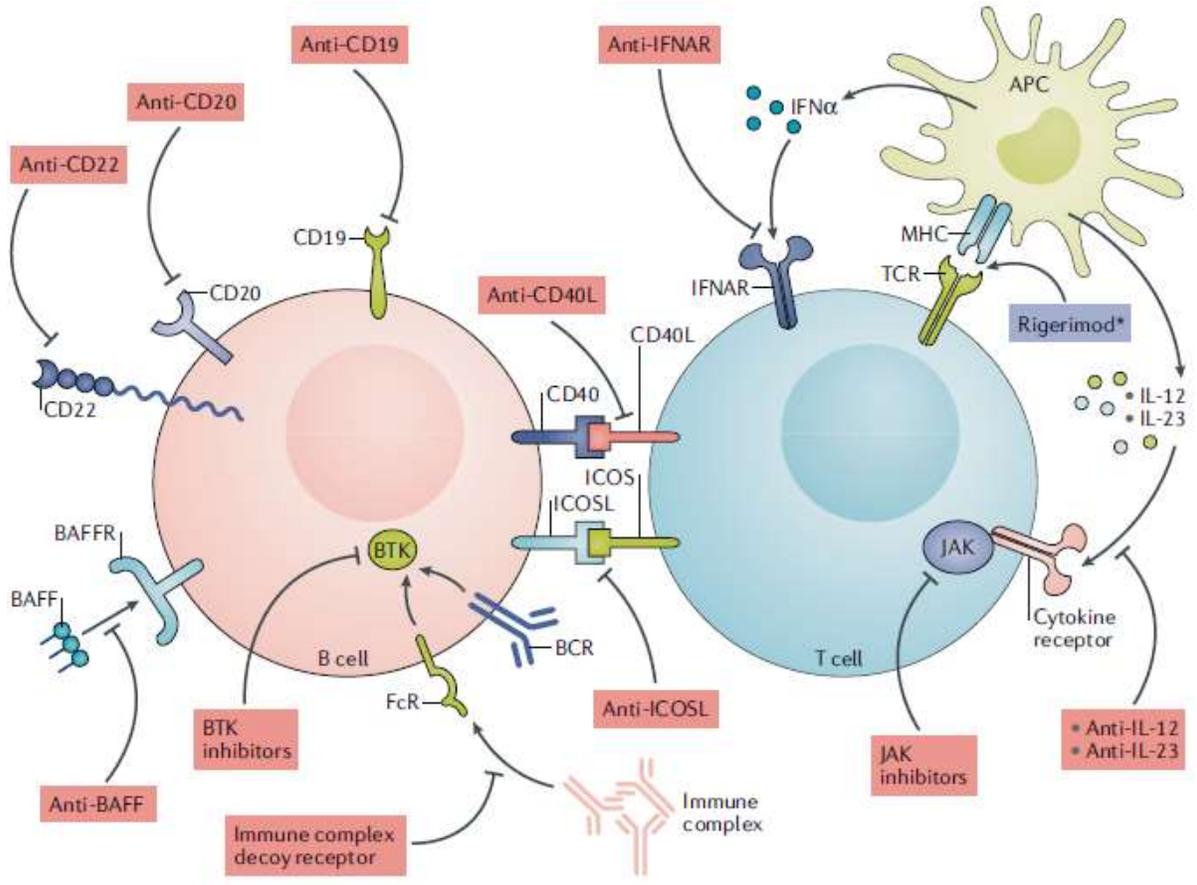
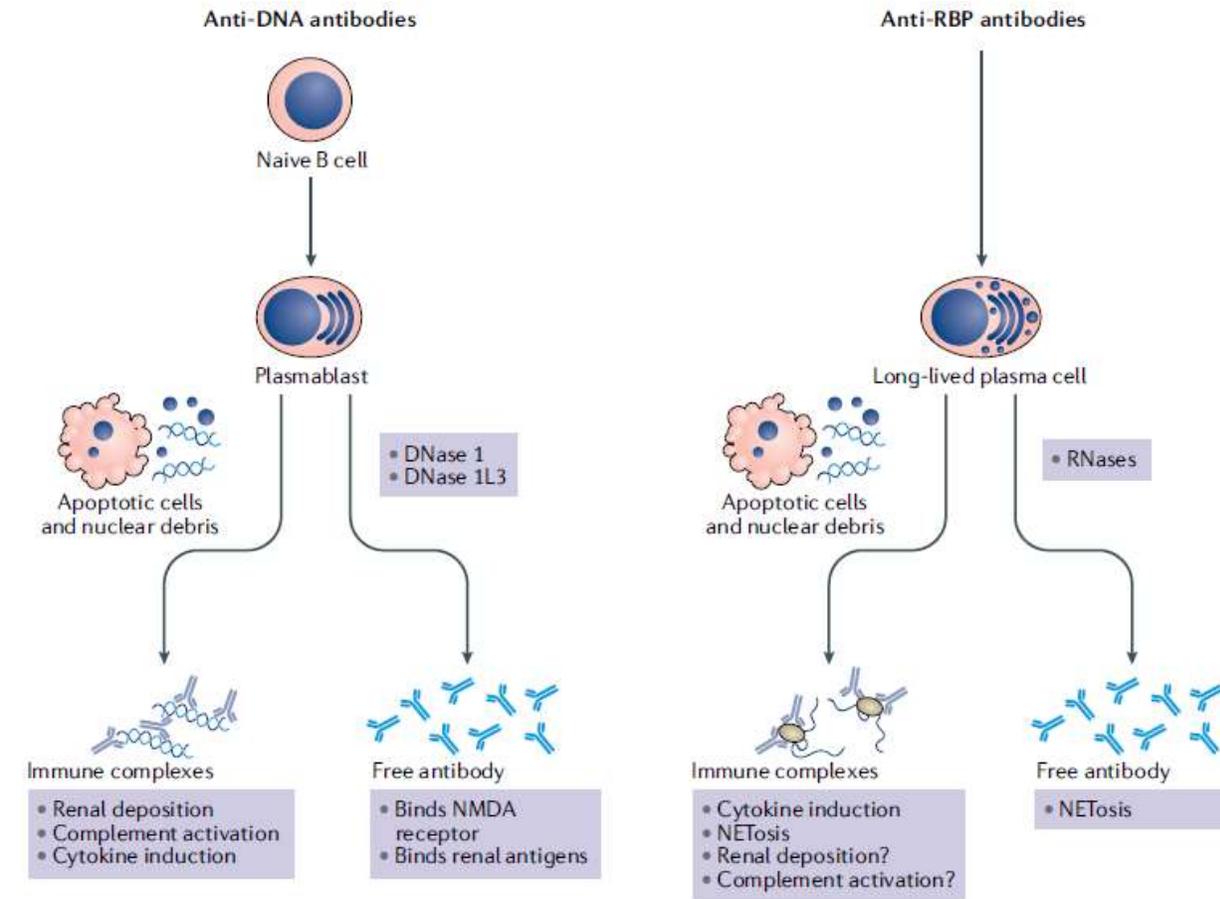


Table 2 | Ongoing clinical trials of new therapies for systemic lupus erythematosus

Therapy	Target(s)	Trial phase	Status	Size	Primary outcome	Refs
Obinutuzumab	CD20	II	Active, not recruiting	127 participants	Percentage of patients with complete renal response at 52 weeks	38
Combination therapy with rituximab and belimumab	CD20 and BAFF	II	Recruiting	Target of 30 participants	Reduction in disease-relevant autoantibodies at 28 weeks	31
		III	Recruiting	Target of 200 participants	Proportion of patients with a SLEDAI-2K score of <2 without the use of additional immunosuppression	40
		II	Active, not recruiting	Target of 50 participants	Reduction in anti-dsDNA antibodies at 52 weeks	31
GDC 0853	BTK	II	Active, not recruiting	240 participants	SRI-4 response at 48 weeks	49
Dapirolizumab pegol	CD40L	II	Active, not recruiting	182 participants	Proportion of patients with a BICLA response at 24 weeks	39
Anifrolumab	IFNAR	II	Recruiting	Target of 150 participants	Relative change from baseline in urine protein-to-creatinine ratio	30
IFN $\alpha$ kinoid	B cells to stimulate the production of anti-IFN $\alpha$ antibodies	II	Active, not recruiting	178 participants	* Change from baseline in expression of IFN-induced genes at 36 weeks * Treatment response as assessed by BICLA at 36 weeks	35
Baricitinib (BRAVE I)	JAK1 and JAK2	III	Recruiting	Target of 750 participants	Percentage of patients achieving an SRI-4 response at 52 weeks	36
Baricitinib (BRAVE II)	JAK1 and JAK2	III	Recruiting	Target of 750 participants	Percentage of patients achieving an SRI-4 response at 52 weeks	31
Tofacitinib	JAK1 and JAK3	I/II	Complete	34 participants	Safety of tofacitinib in patients with mild-to-moderate disease activity	34
Ustekinumab	IL-12 and IL-23	III	Recruiting	Target of 500 participants	Percentage of patients achieving an SRI-4 response at 52 weeks	37

Type of antibody	Examples	Redistributes CD20	Internalization of anti-CD20 monoclonal antibody complexes	Complement-dependent cellular cytotoxicity	Antibody-dependent cellular cytotoxicity	Antibody-dependent cell phagocytosis	Method of direct cell death
Type I	Rituximab, ofatumumab, ocrelizumab and veltuzumab	Yes	Yes, but highly variable	Potent	Yes	Yes	Apoptosis
Type II	Obinutuzumab and tositumomab	No	Yes, to a small extent	Weak	Yes	Yes	Non-apoptotic lysosome-mediated cell death

# New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus [Nat Rev Rheumatol. 2020;16(10):565-79.]



## 1) Anti-DNA Ab (DNA, nucleosomeに対する抗体)

- DNA, histone
- Naïve B由来 plasmablast (short-lived) が産生
- 病勢によって大きく上下する
- 反復測定に意味がある
- 免疫複合体: 腎に沈着, 補体活性化
- Free Ab: NMDA-Rに結合(神経障害), 腎抗原結合

## 2) Anti-RBP Ab (RNA, RNA-binding protein [RBP])

- Sm, RNP (U1 small nuclear RNP), SSA/Ro [Ro52/Ro60], SSB/La
- Long-lived plasma cellが産生
- 抗体値は極めて安定
- 免疫複合体: サイトカイン誘導/NETosis
- Free Ab: サイトカイン誘導

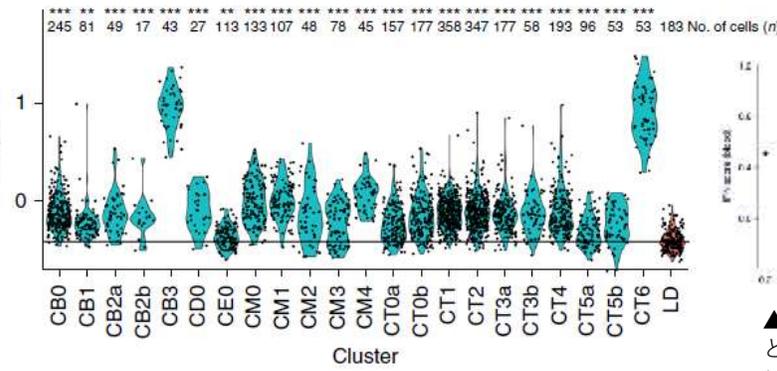
両方の抗体とも免疫複合体形成やfree antibodyとして病態に関与するが, 厳密な作用機序はまだ明らかではない.

# 基礎 2. OMICS解析

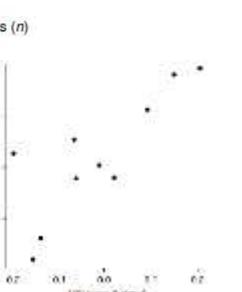
- [2019 Nat Immunol AMP-SLE]
- [2019 JCI Insight AMP-SLE]
- [2016 Cell SLE signature]
- [2020 JCI Insight SLE signature]
- [2022 Science SLE eQTL]

# The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis

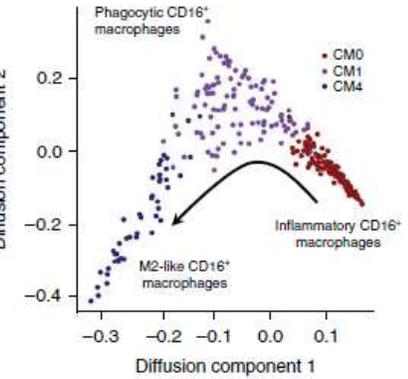
with lupus nephritis [Nat Immunol. 2019;20(7):902-14.]



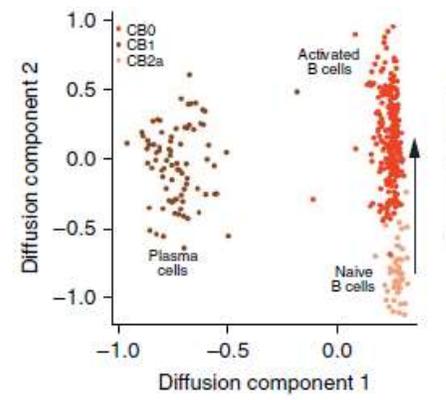
▲ 腎の細胞群のIFN score. 青: SLE(LN), 赤: LD (living donor). CB: B cell, CE: 上皮細胞, CM: MΦ/DC, CT: T cell. LNでIFN score高い.



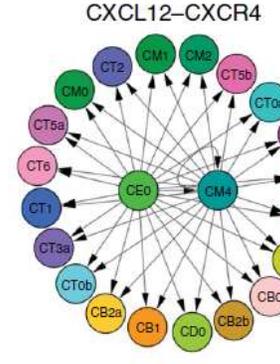
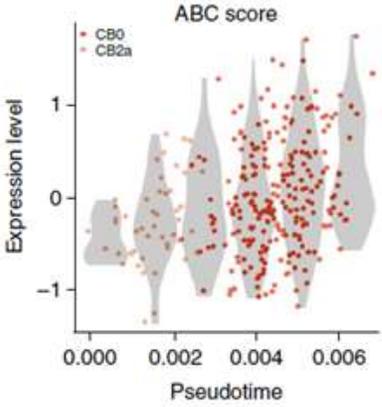
▲ LN患者(n10)末血と腎IFN scoreの相関 ( $\rho=0.733, P=0.016$ ), IFN responseはexternal processと推測



▲ CM0/1/4は連続的で、腎組織内で分化し炎症補助すると推測.



▲ CB0 (activated B), CB1 (PC), CB2a (Naive B) を二元配置するとnaiveとABCは連続的, ABC scoreも連続的に上昇する. ABCはpre PCと推測されているが, PCとNaive/ABCの連続性は乏しかった.



▲ producers-consumers解析: ほぼすべての細胞でCXCR4発現する..  
▶ Myeloid細胞の多くでCX3CR1発現する.(MΦ/NK/CLT).



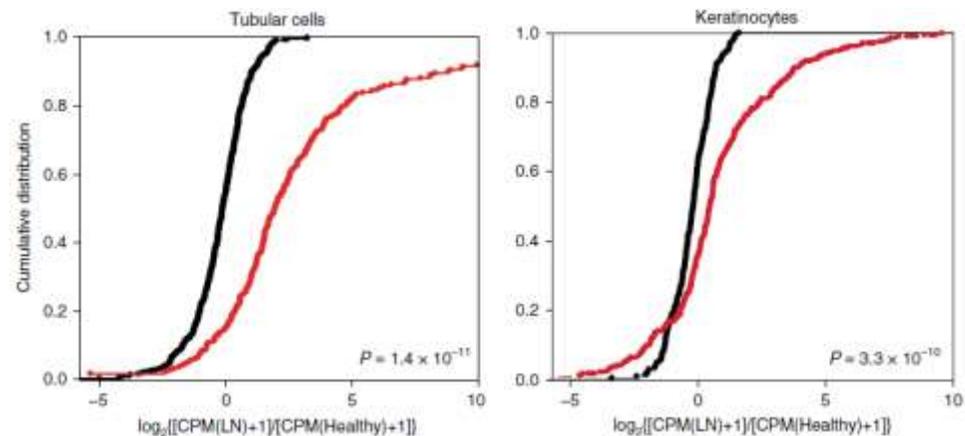
Kidney		CM0	CM1	CM2	CM3	CM4	CT0b	CT1	CT2
Urine	CM0 (n = 18)	0.92	0.90	0.83	0.85	0.80	0.73	0.74	0.75
	CM1 (n = 452)	0.90	0.95	0.90	0.90	0.88	0.75	0.75	0.76
	CM2 (n = 14)	0.82	0.87	0.89	0.85	0.86	0.72	0.70	0.71
	CM3 (n = 8)	0.80	0.83	0.86	0.90	0.79	0.76	0.72	0.74
	CM4 (n = 27)	0.80	0.85	0.84	0.81	0.87	0.69	0.68	0.68
	CT0b (n = 9)	0.72	0.71	0.72	0.77	0.65	0.92	0.82	0.87
	CT1 (n = 25)	0.77	0.76	0.75	0.79	0.71	0.86	0.95	0.93
	CT2 (n = 9)	0.74	0.73	0.73	0.77	0.68	0.87	0.89	0.91

◀ 尿はMyeloid細胞が主体でT細胞は少ない. 細胞を限って腎と尿の遺伝子発現の相関をみると高い (0.85-0.95).

- AMP-SLE 腎生検/尿 の初報告
- LN(n24)/HC(n10) 腎 scRNA-seq → 21免疫細胞(B/T/NK/Mono/DC/Neu)+上皮細胞
- LN腎の大多数の細胞でIFN score高く, 末梢血のIFN scoreと相関する.
- **Myeloid cell:** CM0 (炎症性CD16+MΦ), CM1 (貪食性CD16+MΦ), CM2 (HC腎にもある組織MΦ), CM3 (cDC), CM4 (M2様CD16+MΦ). CM0~1~4は連続的で, 腎組織内での分化s/o.
- **CTL/NK:** 分裂細胞多く, IFN- $\gamma$ 産生や細胞障害活性が高い. Exhaustion marker低い.
- **CD4+T:** Tfh含む5 cluster
- **B:** CB0 (活性化B, Age-associated Bと関連), CB1 (Plasma cell), CB2a (naïve), CB3 (ISG-high B).
- ABCはpre PCと推測されているが, LN腎のBはPCとNaive/ABCの連続性は乏しい.
- CXCR4/CX3CR1が広く発現 (Trafficking)
- 尿と腎のgene expressionが相関する.

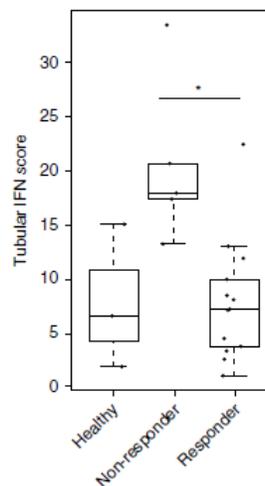
# Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways

[Nat Immunol. 2019;20(7):915-27.]

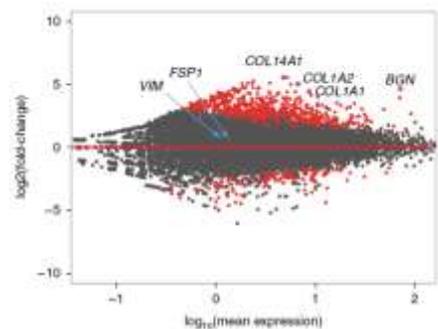


▲ 腎尿細管細胞 (SLE 1112 cell, HC 109 cell) のubiquitously expressed genes (黒), 212 IFN response gene (赤) のcumulative distribution. IFN response geneの発現がSLEで高い。

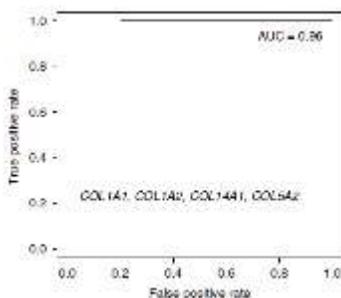
▲ 皮膚ケチサイト (SLE 1776 cell, HC 173 cell) のubiquitously expressed genes (黒), 212 IFN response gene (赤) のcumulative distribution. IFN response geneの発現がSLEで高い。



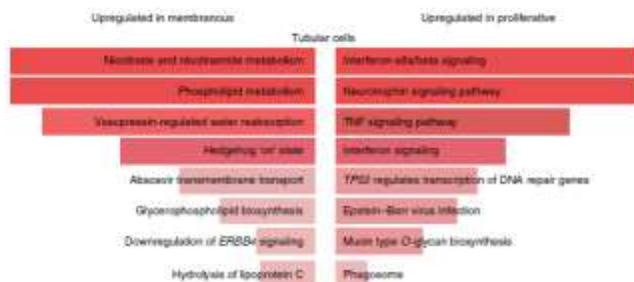
▲ LN non-responderの尿細管細胞IFN scoreは高い。



▲ LN responder (n=13) と non-responder (n=5) の尿細管細胞のMA plot. 301 DEG (赤)のenrichment解析ではECM関連遺伝子が主体。



▲ Responder/non-responderのDEGから選択したFibrotic gene signature (COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL14A1) でLN反応性良vs不良の弁別可能 (AUC 0.96)。

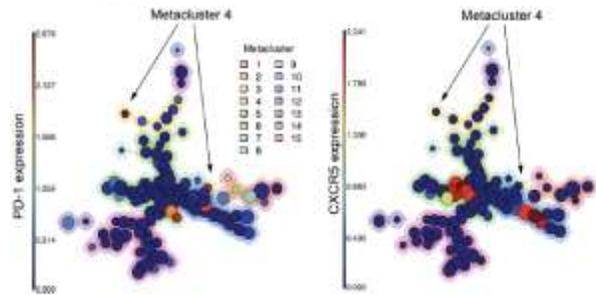
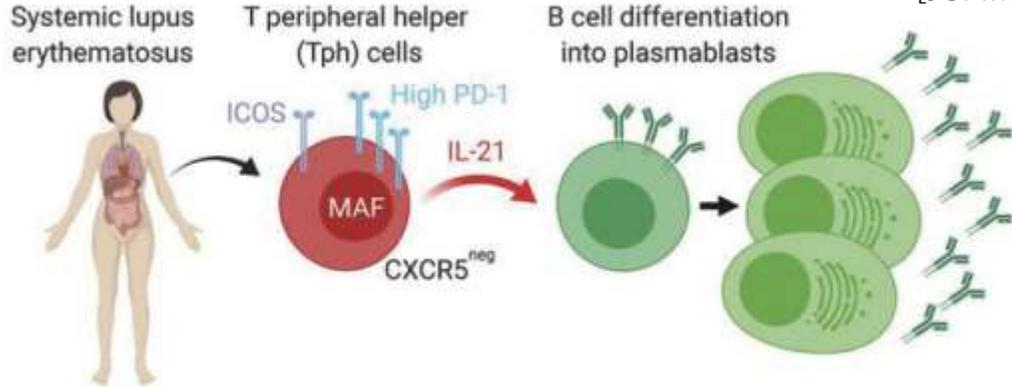


▲ 増殖性LN (Class III/IV) と膜性LN (Class V) の尿細管細胞の遺伝子発現を比較したDEGから抽出したpathway解析. 増殖性LNでは, type 1 IFN pathway, TNF pathwayが亢進する。

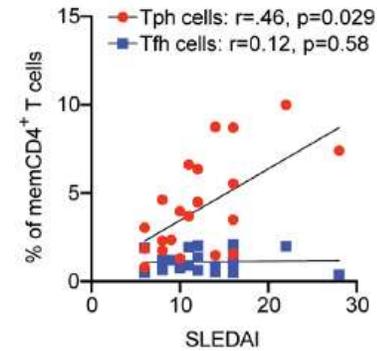
- AMP-SLE, LN腎と皮膚生検のscRNA-seq
- 尿細管細胞, Keratinocyteのtype 1 IFN-response signatureがLN患者と健常人を弁別できる。
- 尿細管細胞のIFN-response signatureとfibrotic signatureが, LN治療不応性と関連する。
- 尿細管細胞の炎症・線維化のpathwayと, 腎病理所見 (増殖性・膜性・mixed) が関連する。
- Keratinocyte/汗腺/メラノサイト (Fig 2), 尿細管細胞(近位・遠位・ループ) (Fig 3) はclustering可能。
- 皮膚と尿細管のIFN score (Fig 4d), 皮膚と尿細管のfibrosis score (Fig 5d)は相関する。
- 増殖性LN (Class III/IV), 膜性LN (Class V) の尿細管細胞を比較したpathway解析で, 増殖性LNでtype 1 IFNとTNFのpathwayが亢進する (Fig7)。

# PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>-</sup> T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21

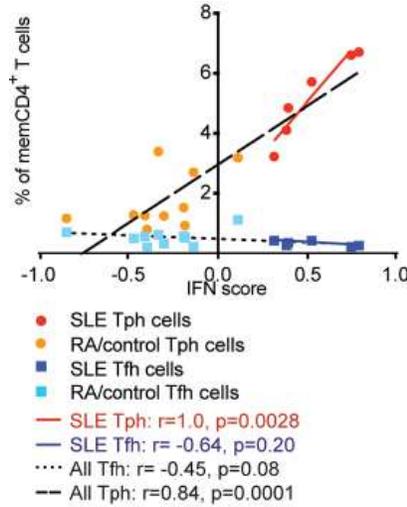
[JCI Insight. 2019;4(20):e130062.]



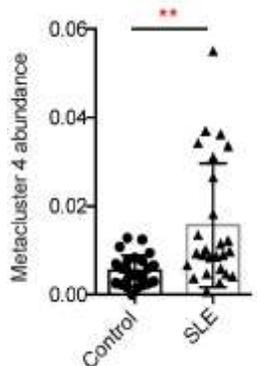
▲ CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T(PBMC) mass cytometry data of FlowSOM analysis. 15MetacusterのMetacuster 4がPD-1<sup>hi</sup> CXCR5<sup>-</sup>でTphと類似する。



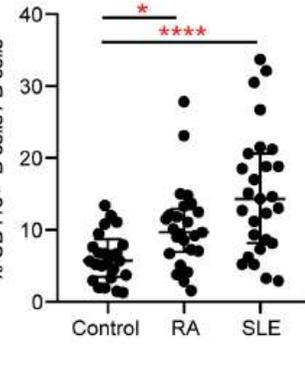
▲ TphはSLEDAIと相関 (Tfhは相関せず)



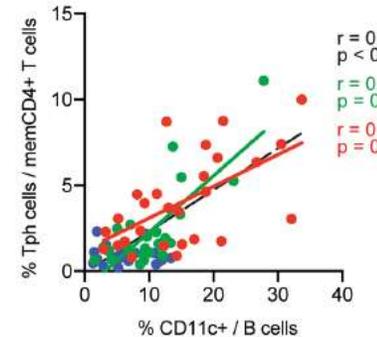
▲ TphはIFN scoreと相関する (SLE/Allとも) (Tfhは非相関)



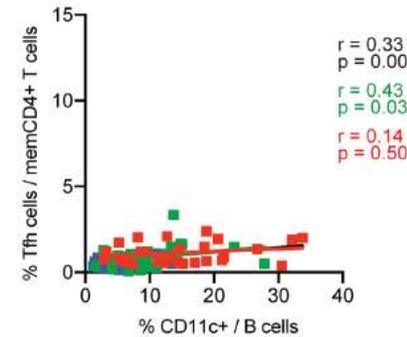
▲ Metacuster 4はSLEで多い



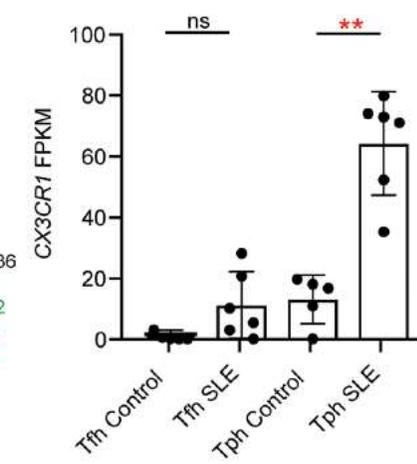
▲ CD11c<sup>+</sup> B細胞はSLEで多い (ABCと考えられる)



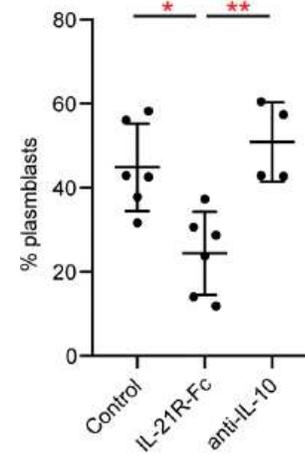
▲ Tphの比率はCD11c<sup>+</sup> Bの比率と相関する (赤SLE, 緑RA, 青HC, 黒線全体)



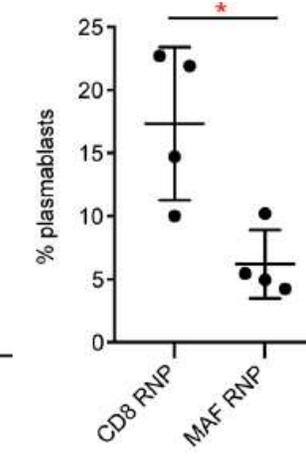
- AMP-SLEでのPBMC-CD4<sup>+</sup>T解析 (n=52)
- PD-1<sup>hi</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cellがSLEで著増 (治療前SLE含む) → markerも, 機能的にもTph (IL-21を介しB細胞を活性化)
- Tphの率は, 疾患活動性亢進と, CD11c<sup>+</sup> B (ABC) の率と相関する (Tfhは相関せず)
- PD-1<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> Tは, LN腎臓中にもあり腎のB細胞数と相関する.
- IL-21 中和もしくはCRISPRでのMAF除去すると, Tphのmemory B→PB分化誘導作用が減弱した.
- SLEではTph増加しpathologic Bを刺激する



▲ LNの腎の免疫細胞で高発現するCX3CR1をSLE Tphは高発現し, 炎症巣への遊走に寄与すると推測される。



▲ SLE Tphを抗IL-21Rで中和しHC-memory Bと共培養するとPBへの分化が抑制される,



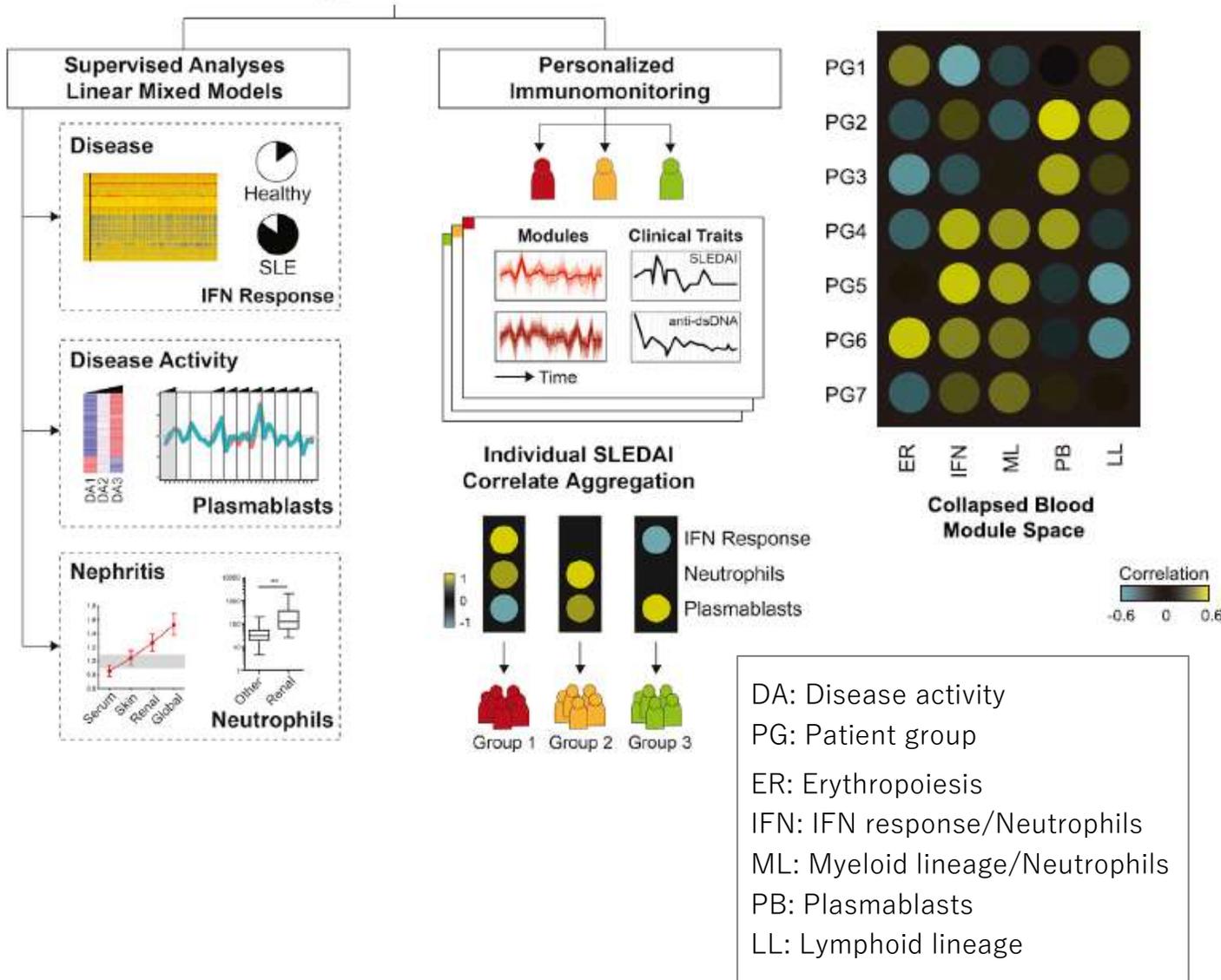
▲ CRISPRでTphのMAF除去しMemory Bと共培養するとPBへの分化が抑制される,

# Personalized Immunomonitoring Uncovers Molecular Networks that Stratify Lupus Patients



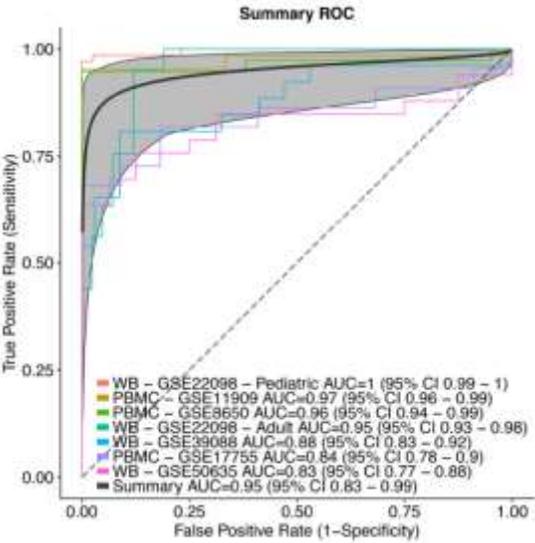
SLE Cohort

[Cell. 2016;165(3):1548-50.]

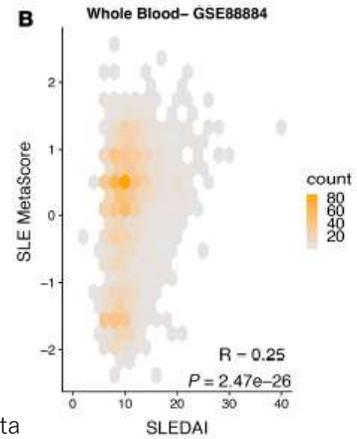


- 小児SLE患者158人の縦断的 (4年) 全血 RNA-seqより, module解析を行った.
- SLEとHCの比較で最も差があるのがIFN Response modules.
- Disease activityと関連がrobustなのが Plasmablast modules.
- 治療では, Neutrophils modulesがGCと関連強い. PB modulesは全ての治療で低下するが, MMF/CYで最も強く低下.
- 活動性腎炎への進展と関連が強いのが Neutrophils modules.
- 患者末梢血RNA-Seqとclinical traitで WGCNAを行い, SLEDAIと最も相関する moduleを選定
  - ER, IFN, ML, PB, LL moduleと相関出す
  - pattern毎に患者群 (PG) を層別化
  - 例: PB modulesとSLEDAI moduleが相関するのはPG3, IFNとML moduleが相関するのはPG5,
- SLE患者は7群に層別化され, SLEの分子学的heterogenicityが推測される.

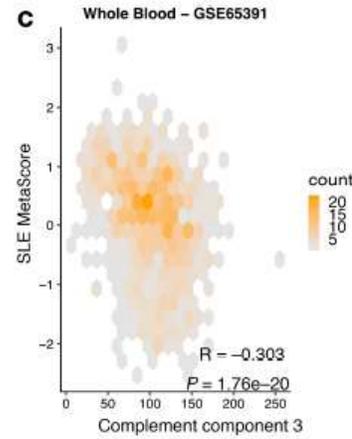
# Integrated, multicohort analysis reveals unified signature of systemic lupus erythematosus [JCI Insight. 2020;5(4):e122312.]



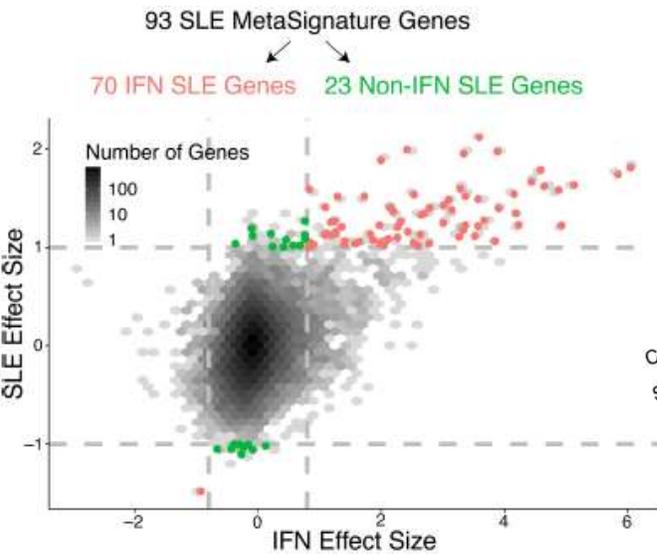
Discovery dataでSLEとHCを区別するAUROC: 0.94 [95%CI: 0.83-0.99]



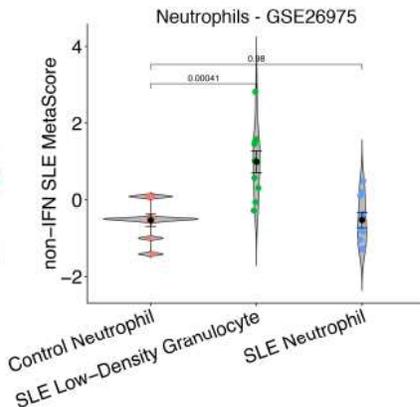
SLE MetaSignatureのscoreとSLEDAI, C3との相関。SLEDAIと正の相関, C3と負の相関。



- Public SLE data (7471 samples/40 studies): HCと比較して有意にSLEで発現し, SLEを自己免疫/炎症/感染から弁別する93-gene signature (SLE MetaSignature)同定.
- Discovery (370 samples) → Validation (2407 samples)/Extended (4694 samples)
- SLE MetaSignatureは, SLEDAI/炎症と関連.
- 小児SLE (HC, JIA, SLE)で前向きvalidation: 正確な弁別 (AUROC=0.94), SLEDAIとの相関 (Spearman' correlation=0.307, P=0.045).

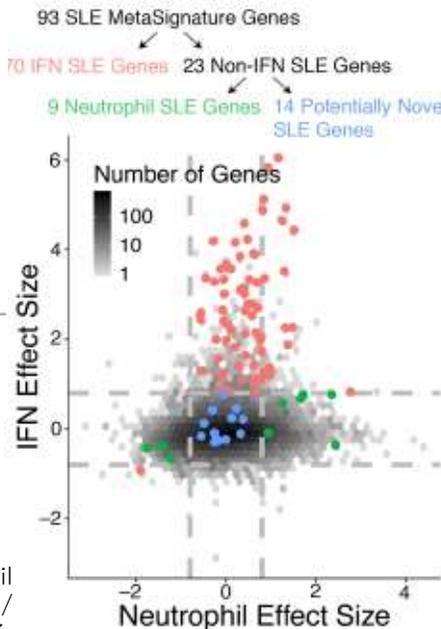


SLE MetaSignature の93 geneを, IFN effect sizeとSLE effect sizeで展開. 70 geneはtype 1 IFN-induced gene, 23 geneはIFNと独立した遺伝子.



Non-IFN SLE geneに限定したscoreは, SLEの好中球 (特にLDG) で高い, NETosisサンプルでも高い

IFN effect sizeとNeutrophil effect sizeで展開. 14 geneはIFN/好中球と関連がない新規遺伝子.



- SLE MetaSignature 93 geneは, 70 geneがtype 1 IFN関連, 23 geneがIFN非関連 (SLE好中球で発現高く, NETosisと好中球産生と関連する).
- Type 1 IFN, 好中球と関連しない14 gene: metallothionein family (MT1E, MT1F, and MT1HL1; 酸化ストレスと関連し, 重金属排出に関連する), 免疫細胞で発現 (KLRB1, GPR182, CD1C, ELANE), vitB12代謝 (TCN2)など.

# Single-cell RNA sequencing sheds light on cell-type specific gene expression in immune cells [Nat Rev Rheumatol. 2022;18(7):363.]

## [Perez RK, et al, Science. 2022;376(6589):eabf1970.]

- 162人SLE/99人 HC [Asian/European]のPBMCからの120万細胞のmultiplex scRNA-seq (mux-seq)
- SLEはNaïve CD4<sup>+</sup>Tが少なく, CTLが多い.
- SLEでは11細胞種でISG (type 1 interferon-stimulated genes) が高く, 特にclassical monocyteでISGが高い
- 8細胞種特異的Cis-eQTL geneを検討し, 1細胞以上の細胞特異的535 cis-eQTL gene, 全細胞種共通の1203 cis-eQTL geneを同定
- どの細胞種がheritabilityに関与するかがわかった.
- cell type-specific cis-eQTLを用いて, SLEと関連する新たな遺伝子73を同定した.

## [Yazar S, et al. Science. 2022;376(6589):eabf3041.]

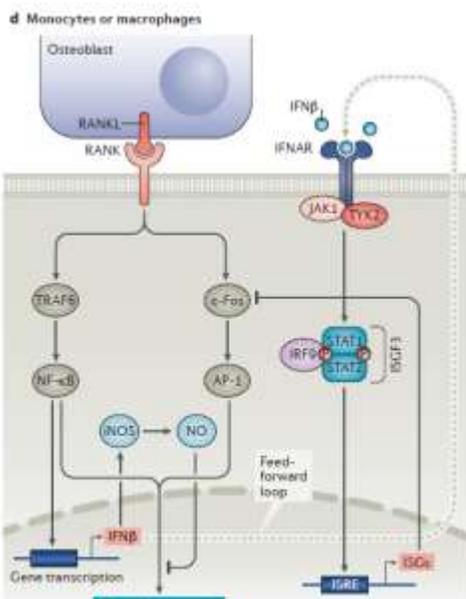
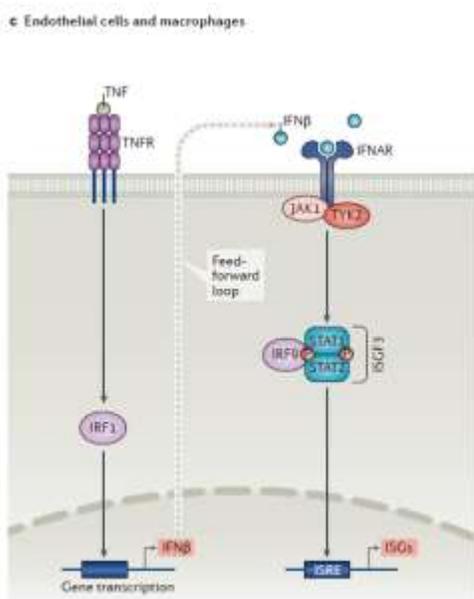
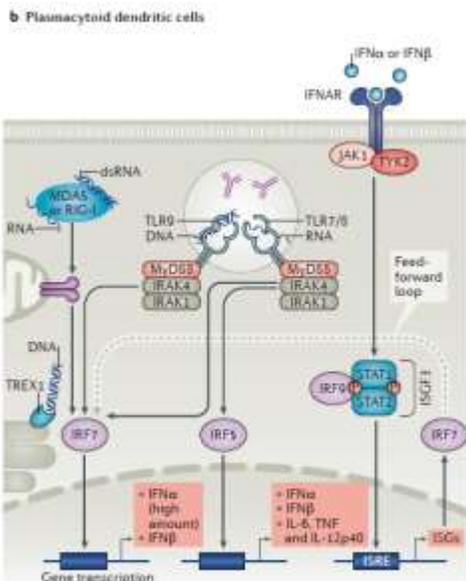
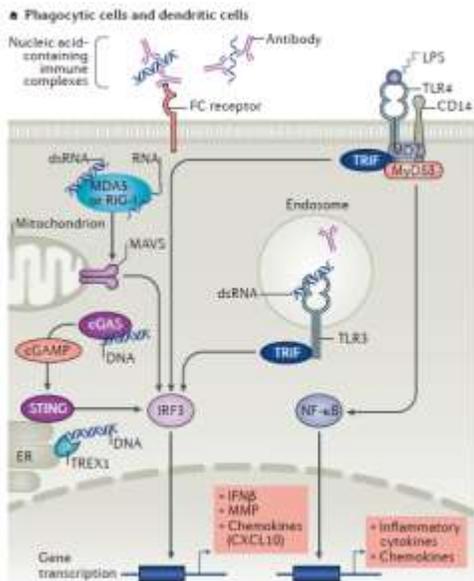
- 982人 HC [Northern European]のPBMC 127万細胞のscRNA-seq (14細胞種)
- Single-cell eQTLを行い, 26,597 cis-eQTLと990 trans-eQTLを同定した. 多くがcell type specific.
- SLE, RAを含む7自己免疫疾患のgenetic variantとco-localization analysisを行った.
- 305 lociがcell-type specific causal effectを持っており, 疾患のrisk lociの働き (しばしばcell-type 特異的) が明らかとなった.

# 基礎 3. Type I IFN

- [2018 NRR type 1 IFN]
- [2020 Immunity ExFO AFC]

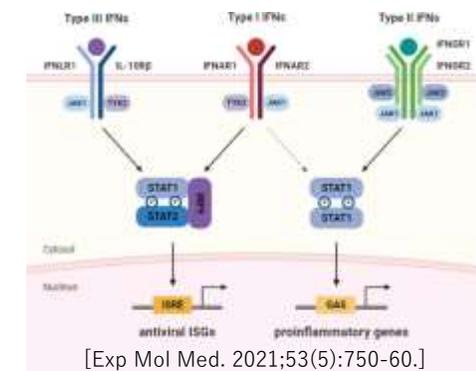
# Type I interferon in rheumatic diseases

[Nat Rev Rheumatol. 2018;14(4):214-28.]



## Interferonとは？

- 感染・腫瘍・炎症・自己免疫で主に働くサイトカイン。
- 抗ウイルス作用が50年以上前に同定
- Type I / II / III: レセプターが異なる. Type I : IFNAR1/ IFNAR2, JAK1/TYK2. Type II : IFNGR1/IFNGR2, JAK1/JAK2, Type III : IL-28Ra/IL-10Rβ, JAK1/TYK2
- Type I : IFNα(12 subtype), IFN-β, IFN-ω, IFN-κ, IFN-ε



## Interferonの産生

- IFN-α: pDCが産生 (IRF7発現が元々高い), 他細胞はIRF7発現のprimingが必要
- IFN-β: 多彩な細胞(fibroblast, DC, 上皮細胞)が産生
- 産生のための刺激を受けるPRR(pattern recognition receptor): TLRsと, cytosolの核酸 sensor(MDA5/RIG-1/STING [dsRNA/ssRNA])
- 細菌の細胞壁LPS→表面TLR4, endosome内のICに含まれる核酸→endosomal TLR (TLR3[dsRNA]/7/8[RNA]/9[DNA])
- IRFはPRRの下流で活性化され核に移行し, 転写因子として働く。
- 貪食細胞やDCで: TLR3/4→ IRF3を活性化 (TRIF介して)
  - MDA5/RIG-1/STING→ IRF3を活性化→ IFNB1を活性化, MAVS→IRF3 ↑
- pDCで: MAVS→IRF7 ↑, 核酸認識TLR7/TLR8/TLR9→ MyD88とIRAK1/IRAK4→ IRF5/IRF7 ↑. IRF7はtype 1 IFNのみ, IRF5はtype 1 IFNと炎症サイトカイン(TNF/IL6/IL12p40) ↑.

## Interferonを受けた側のシグナル伝達

- Type 1 IFN→IFNAR→JAK1/TYK2 ↑ → STAT活性化.
- ISGF3 (STAT1/STAT3/IRF9で構成)→ 古典的抗ウイルス遺伝子を発現
- STAT1 homodimer→ 向炎症サイトカイン遺伝子発現 ↑, STAT3 homodimer→ 向炎症性サイトカイン遺伝子 ↓
- IFN-αシグナルはAPCを活性化し, CD86発現 ↑ MHC1/2発現 ↑ → 自然免疫と適応免疫を橋渡し重要
- IFN-βはIFN-αと多くのシグナルは重複するが, 炎症抑制/増殖抑制作用も併せもつ,
- IFNRの下流→ MAPK, NFκB, AKT pathway→ ISG発現に影響

## Interferonの血中測定

- IFN signatureの問題点: Type 1 IFNとType 2 IFNで重複がありType 1 IFN sigの弁別が難しい, Bulkで解析する場合分画の割合に大きく左右されてしまう。
- 細胞毎にsortすると, 細胞型の下流のtype 1 IFN応答が非常に多様であることが示されている
- Type 1 IFNの一般的なELISAの信頼度は低く測定は難しい,.

ISG: interferon-stimulated gene; ISRE: interferon-sensitive response element

# Type I interferon in rheumatic diseases

[Nat Rev Rheumatol. 2018;14(4):214-28.]

## Type 1 interferonとSLE initiation

- HCVに対するIFN- $\alpha$ 治療後, SLEを発症する報告がみられ, 中止で通常改善する. SLE initiationに関連すると考えられる.
- SLEやSLE家族で血中type 1 IFN activityが高い. Type 1 IFN activityが高いこととSLE heritabilityの関係は, 人種背景に関わらず共通している.
- Type 1 IFN activityは, 発症1年前に上昇しており(48), SLE initiationとの関連が推測される.

## IRFとSLE: IRFはIFNとISGの発現を調整する

- **IRF5**: type 1 IFN産生と向炎症性サイトカインの両方を産生する(自然免疫細胞で). B細胞では, TLR刺激の下流の反応に影響する.
- IRF5 はSLE, SS, SSc, RA, JIAの疾患感受性 risk variantが同定されている.
- SLEでのIRF5 risk variantは,血中type 1 IFN activityの高さと関連する. 抗dsDNA抗体, 抗RNA-binding protein抗体とも関連する(60, 61). 自己抗原刺激持続→TLR system 過剰反応→慢性的なtype 1 IFN過剰産生 loopが示唆される.
- 健常人でもIRF5 risk variantがあると自己抗体が高い. B細胞のTLR pathway亢進→核酸含むIC産生↑→TLR system過剰↑のloop
- IR7, IRF8もSLE risk variantがあり, あるとtype 1 IFN反応が亢進している,

**他のIFN-related genes** • SLE risk gene (**STAT4, MAVS, IFIH1**(MDA5), **PTPN22**)もtype 1 IFN pathwayに影響を与える

**組織発現** • IFNK (coding IFN $\kappa$ )はCLEのrisk多型がある. 本variantは皮膚pDCからのtype 1 IFN↑, TLRago/UVへのkeratinocyteのIL-6産生↑

## Heterogeneity

- SLEの40-50%ではtype 1 IFN activityが正常であり(46), type 1 IFNがpathogenicityの主体でない患者もいるはずだ.
- Type 1 IFN活性は, 抗RBPs (SSA/Ro抗体, RNP抗体)と強く関連している(39, Arthritis Rheum. 2011;63,1044–53.). 抗体価不変なのでtype 1 IFN活性も高いままか?,
- Type 1 IFN 高 vs 低 を比較 ([5] Genes Immun. 2015;16:15–23., [47] (Arthritis Res. Ther. 2010;12:R151.), PRKG1, PNP, ANKSIA risk loci 同定. これらはDCとNKの機能に影響する (NKがDCに影響してIFN $\alpha$ 産生させる).
- PNP (purin nucleotide phosphorylase) loss of functionのvariantはS期entryを阻害しtype 1 IFNを活性化する(83:A&R 2017). ヒポキサンチン/アデニンがPNP欠損を改善させる.

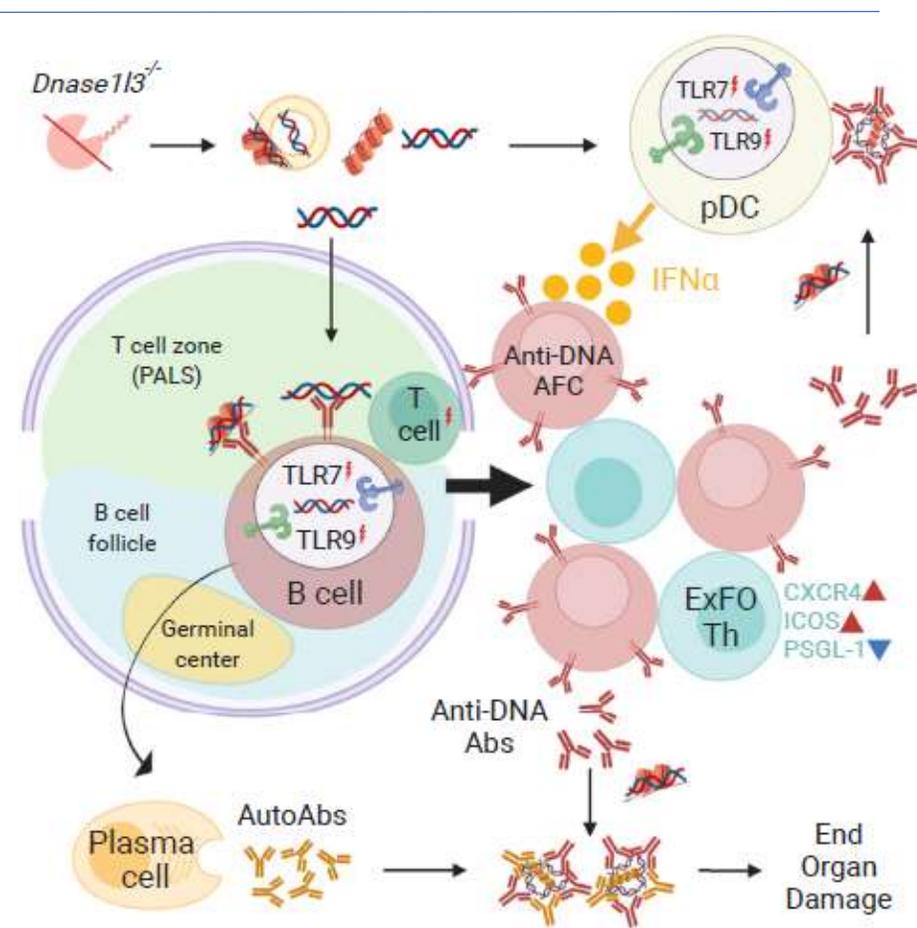
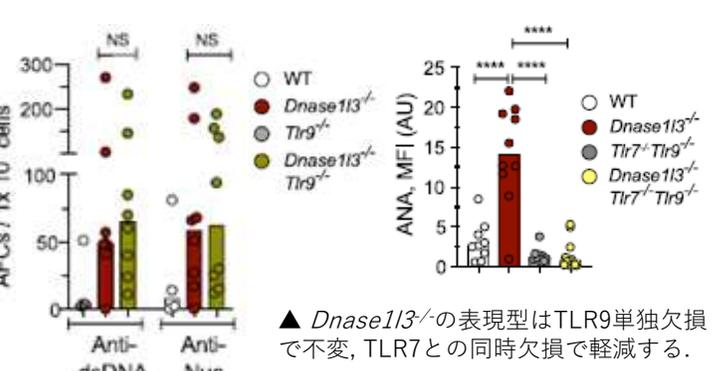
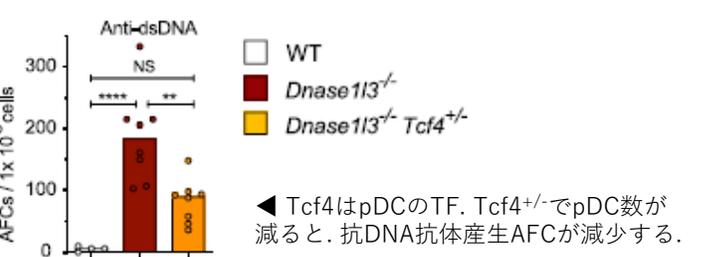
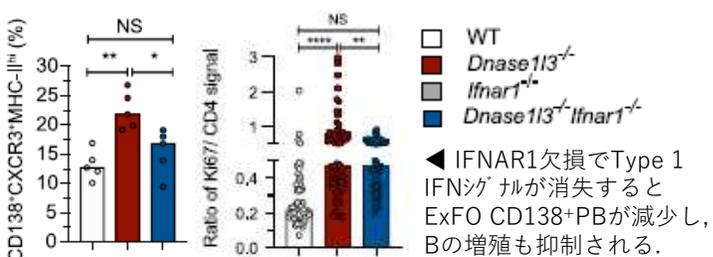
## 臨床的意義

- SLEでは, 血液type 1 IFN activityが疾患重症度と関連する ([2] PNAS 2003;100:2610–15.). Retroにみると, 高activity群で腎, CNS, 血球異常が疾患の履歴中認める [2].
- しかし, IFN sigはSLEのflareを予測はしない ([84] ARD 2009;68:1440-46., [85] Lupus 2009;18:980-89.).
- 再燃はCXCL10, CCL2, CCL19で予測される(IFN以外の要素が再燃に関与するのではないかと推測される) ([86] AR 2009;60:3098-107).
- 疾患活動性には, 非type 1 IFN-gene signature (例: plasmablast signature) がIFN-sigよりも強く関与する.([37] Cell 2016;165:1548–50.).
- Type 1 IFNは, 再燃よりも, 疾患のinitiationと疾患早期で重要であることが推測される,

# Plasmacytoid Dendritic Cells and Type I Interferon Promote Extrafollicular B Cell Responses to Extracellular Self-DNA

[Immunity. 2020;52(6):1022-38.]

*Dnase113*<sup>-/-</sup> mouse



- DNASE1L3欠損はmouse/ヒトとも抗DNA抗体陽性のSLE様phenotypeを示す.
- 抗DNA抗体産生には, CD40のT細胞helpは必須だがGCは必須でない.
- 抗dsDNA/nuc抗体のmain sourceは, 濾胞外の short-lived CD138<sup>+</sup> PBであった. パトリ解析ではPBはGCで受けるSHM乏しく, 濾胞外にあることを示唆する.
- Type I IFN signalは, 抗DNA抗体産生する濾胞外CD138<sup>+</sup> PBの増殖と分化を直接的に促進する.
- pDCが, type 1 IFNを産生し, 直接濾胞B細胞を分化させ, 抗DNA抗体産生させる.
- TLR9単独欠損ではANA, AFC, ExFO Bも不変でむしろ脾腫↑. TLR9/TLR7同時欠損で初めて抗DNA抗体産生が改善する.
- 本マウスでは, pDCとtype 1 IFNによって extrafollicular B cellがshort-lived plasmablastsへ分化し抗DNA抗体が産生される. またendosomeのTLR7/TLR9は共同で寄与することが示された.