

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17905

研究課題名（和文）CyTOFを用いた自己免疫疾患病態におけるセマフォリンと免疫細胞動態の網羅的解析

研究課題名（英文）Immunophenotyping based on semaphorin in patients with autoimmune disease by using CyTOF

研究代表者

森田 貴義（Morita, Takayoshi）

大阪大学・医学系研究科・助教（常勤）

研究者番号：90728685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では免疫細胞を解析する最新装置であるCyTOFを用いてSLE患者のセマフォリン発現を評価した結果、CD8T細胞でセマフォリン4Dが強く発現しており、SLE患者ではその発現が低下している可能性を発見しました。このことはSLE患者のCD8T細胞が活性化している可能性を示唆しています。また、この解析の中で免疫細胞集団を評価する一つの指標として増殖活性マーカーが有用である可能性も明らかにできました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまではSLE病態を評価する上で液性因子の測定や免疫細胞集団の割合が測定されてきた。本研究においては、SLE病態における免疫細胞をセマフォリンや増殖活性マーカーで免疫細胞の活動性をCyTOFを用いて包括的に評価することができる可能性を見出した。この技術を用いることで今まで臨床的に十分捉えきれなかったSLE患者の免疫動態をより詳細に把握することができるように考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, semaphorin expression in patients with SLE was assessed using CyTOF, instrument for analyzing immune cells in detail. It found that semaphorin 4D is strongly expressed on CD8 T cells in healthy donors and that its expression may be reduced in patients with SLE. This suggests that CD8 T cells in patients with SLE may be activated in its pathology. In this analysis, we were also able to identify the potential usefulness of proliferative activity markers, Ki-67, as one indicator to assess the immune cell population.

研究分野：免疫学

キーワード：SLE セマフォリン マスサイトメトリー Ki-67

1. 研究開始当初の背景

患者の血液や組織を用いて免疫細胞の動態を評価する手法として、フローサイトメーター (flow cytometer: FCM) が広く用いられている。しかし FCM では、一般的に一度の測定で 1 細胞当たり 6 種類程度の発現蛋白の解析が限界であった。そのため多くの蛋白を評価する場合、異なる蛋白の組み合わせで同様の実験を複数回繰り返す必要があり、多くの患者検体が必要であった。検体量が得られにくい滑膜やリンパ組織などでは、詳細な評価が困難だった。また FCM は、基本的に 2 種類の蛋白発現を 2 次元的に評価する方法が一般的であり、特定細胞において測定した蛋白の発現パターンの多次元的な解析や、測定した情報全てを捉えた上で特定の細胞間の特徴の比較も困難であった。そのような背景の中で、2009 年よりマスサイトメーターである CyTOF が開発された。CyTOF の測定原理は抗原抗体反応を利用する点で FCM と同様の技術を用いているが、FCM が蛍光標識を用いているのに対し、CyTOF では重金属標識を採用し質量分析により標識された蛋白を解析できる。その結果、CyTOF では 1 細胞当たり 40 種類の発現蛋白を一度の解析で測定可能となった。さらに、測定可能な蛋白数が増えるメリットだけではなく蛋白発現情報を統合し、各細胞の特徴を蛋白発現レベルの類似性から 2 次元プロットとして地図のように描出することで、今まで着目していなかった新しい細胞集団を視覚的に比較的容易に見出すことが可能となった。また、一度の解析で検体内に存在する様々な細胞を同時に解析することができるため、臨床的に貴重な検体や少量しか得られないような組織の評価にも有用である。さらに、CyTOF 研究の既成品にはない一般的に知られていない蛋白や研究中の蛋白に対して、それに対する抗体さえ入手できれば金属標識キットを用いて独自に CyTOF 用抗体を準備することが可能であるため、今まで捉えることができなかった新規蛋白を網羅的に評価できる。このことから、本研究は今までにない新たな免疫細胞の分類を提唱でき、患者検体を用いた臨床研究領域にブレイクスルーをもたらすものであると確信する。

セマフォリンは、神経ガイダンス因子として知られていたが、研究代表者が所属する研究室の熊ノ郷淳教授により、免疫応答において重要な因子であることが発見され、免疫セマフォリンという新しい研究領域が開かれた。セマフォリン 4A は近年注目されている免疫抑制機能の要である制御性 T 細胞 (Treg) の機能に影響することが指摘され自己免疫反応を考える上で興味深い因子である。また、当教室では、セマフォリン 4D が関節リウマチや ANCA 関連血管炎の病態に関与しており、それら疾患の治療ターゲットとなる可能性をリウマチ領域における臨床系トップジャーナルに報告してきた (Yoshida T. et al. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jun;67(6):1481-90)(Nishide M et al. *Ann Rheum Dis.* 2017 Aug;76(8):1440-1448)。また、セマフォリン分子群は免疫反応に影響を及ぼす骨代謝、血管新生、細胞内の代謝を制御することも報告してきた (Kang S. et al. *Nature Immunol.* 2018 Jun;19(6):561-570)。

2. 研究の目的

セマフォリン分子群に関するこれまでの研究成果を考慮すると、これまで報告して来た関節リウマチや ANCA 関連血管炎以外の免疫疾患にも関与していることが推察されるが、他の多くの免疫疾患ではセマフォリン分子群の解析はなされていない。本研究の目的はさまざまな自己免疫疾患の免疫動態において免疫セマフォリン (Sema3E, 4A, 4D, 6D, 7A) やその受容体であるプレキシンと他の免疫関連分子群の免疫細胞における発現パターンを、CyTOF を用いて一度に網羅的・多次元的に解析し、今まで捉えることができなかったセマ

フォリン分子群を新たな項目として加えた免疫細胞の新分類を提唱するとともにセマフォリン研究を臨床応用へと発展させる突破口を開くことである。

3. 研究の方法

健常者、初発 SLE 患者から末梢血を採取し、PBMC を回収し液体窒素内で凍結保存した。また右図に示した CyTOF 用抗体パネルを準備した(右表)。プレリミナリー実験として SLE 患者、健常者それぞれ 10 名ずつの PBMC を用いて、シスプラチン処理、細胞外染色、Fixation と Permeabilization、細胞内染色、イリジウム (Cell barcode) 処理をし、CyTOF 測定を実施し、EQbeads を用いて測定結果のノーマライズを実施した。ノーマライズされた測定データ解析は Cytobank を用いた。多次元圧縮として viSNE 解析、クラスタリング解析として FlowSOM 解析を実施した。

表面マーカーを中心とした抗体パネル

label	target	label	target
141Pr	CCR6 (Th17)	159Tb	CCR7 (naive)
142Nd	CD19 (B)	160Gd	Sema6D
143Nd	CD5 (B1-B)	161Dy	CTLA4 (Treg)
144Nd	CD69 (activation)	162Dy	Foxp3 (Treg)
145Nd	CD138 (plasma)	163Dy	BAFF (monocyte)
146Nd	CD8a (T)	164Dy	Sema7A
147Sm	CD11c (APC)	165Ho	CD61 (fibroblast)
148Nd	CD16 (NK activation)	166Er	Sema4A
149Sm	CD25 (Treg)	167Er	CD27 (B memory)
150Nd	CD86 (APC)	168Er	Ki-67 (proliferation)
151Eu	CD14 (monocyte)	169Tm	CD45RA (naive)
152Sm	CD95/Fas	170Er	CD3 (T)
153Eu	CXCR5 (Tfh)	171Yb	CCR5 (Th1)
154Sm	CD45	172Yb	CD57 (NK)
155Gd	PD-1 (Tfh/exhaust)	173Yb	HLA-DR (APC)
156Gd	Sema4D	174Yb	CD4 (T)
158Gd	CCR4 (Th2/Treg)	175Lu	RANK (pOC)
		176Yb	CD127 (memory)
		209Bi	CD11b (Mc)

4. 研究成果

まず PBMC 上のセマフォリン発現を評価した結果、この系ではセマ 4D と 6D をしっかり観察できることが確認された(セマ 4A と 7A では抗体の問題か各細胞の発現レベルが低いいためか、陽性細胞を捉えることは困難であった)。Cytobank での解析結果として健常者においてセマ 6D は主に単球系に、セマ 4D は CD 8 T 細胞に発現していることが確認された(図 1)。SEL 患者の PBMC では CD 8 T 細胞のセマフォリン 4D 発現が優位に低下することが見出された(図 2)。セマフォリン 4D は炎症病態等で細胞膜表面から切断されやすいことが知られており、SLE 病態でもセマ 4D が切断され CD 8 T 細胞が活性化している可能性が示唆された。同じ実験系の中で同時に増殖活性マーカーである Ki67 を測定していたところ多くの免疫細胞で Ki67 が上昇していることが判明し、免疫細胞の増殖活性レベルも SLE 病態を反映する可能性が示唆された。ここから本格的にセマフォリン測定を進める予定であったが、条件検討などさらに必要と考えられ、それとは平行して SLE 患者の Ki67 を用いた増殖活性と I 型 IFN の状態を確認しておこうと考え CyTOF を測定を実施していた中で COVID-19 の流行が起これ、そちらの研究に CyTOF 測定や解析を優先しないといけないことになってしまい本研究におけるさらに詳細なセマフォリン評価を進めることが困難となってしまった。ただ、増殖活性マーカーの測定は終了していたため、COVID-19 研究の中で、少しずつ解析を続けており、SLE 患者において免疫細胞集団の増殖活性パターンがいくつか見出され、そのパターンと SLE 病態に関連性あることを発見した。SLE 患者の免疫細胞の活性化の程度をセマフォリンや Ki-67 を用いて評価することで、それぞれの SLE 患者病態でどの免疫細胞が活動性高くなっているのかを捉えることができるきっかけを捉えることができたと考えている。また、このような解析をする上でマスサイトメーターである CyTOF が包括的に全ての免疫細胞集団の特徴を捉えることができることも確認することができ、今後細胞をターゲットとした病態把握を進める上で今回の研究成果が非常に役立つものと信じている。

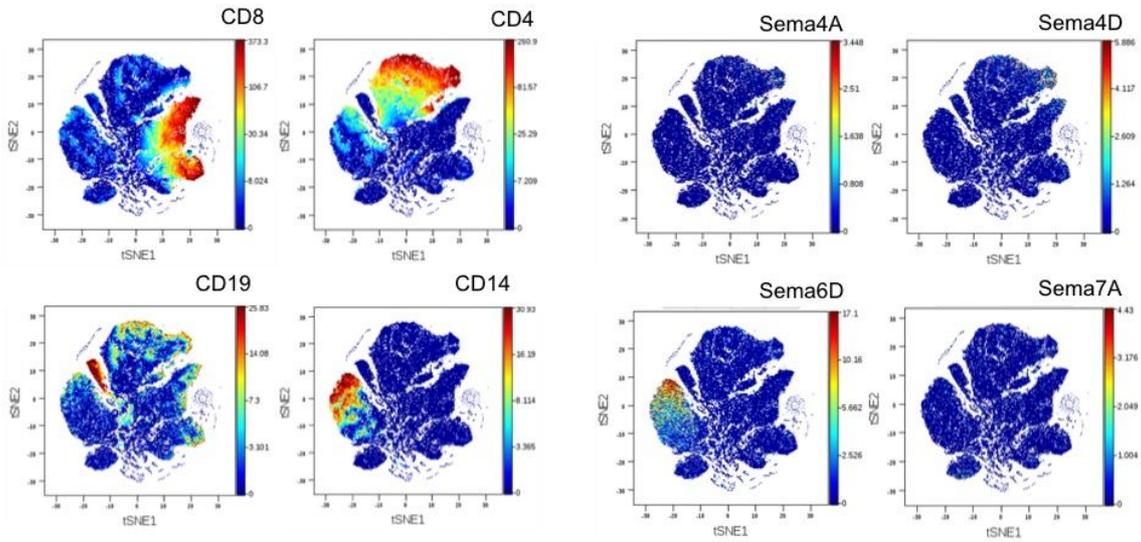


図 1 : viSNEによるPBMC中のセマフォリン発現

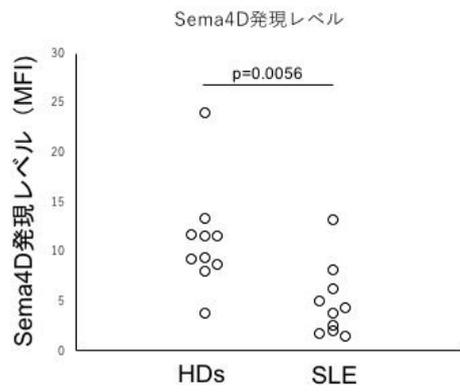


図 2 : CD8⁺T細胞におけるSema4D発現レベル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梶原亜紀子、森田貴義、加藤保宏、小中八郎、西出真之、前田悠一、高松漂太、平野享、嶋良人、榑崎雅史、熊ノ郷淳
2. 発表標題 マサイトメトリーを用いた全身性エリテマトーデス患者におけるT細胞、B細胞、単球の特徴的集団の検出
3. 学会等名 日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayoshi Morita, Akiko Kajihara, Kato Yasuhiro, Hachiro Konaka, Hyota Takamatsu, Atsushi Kumanogoh
2. 発表標題 Evaluation of the association between bioactivity of type I interferon and activated immune cell population in patients with new-onset systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (MMCB) 2020+1 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田貴義
2. 発表標題 Introduction of a human immunology research by using mass-cytometry(CyTOF)
3. 学会等名 日本免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森田貴義、熊ノ郷淳	4. 発行年 2020年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 炎症と免疫 ヒト免疫細胞のマサイトメトリー解析	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------