

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：84519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08771

研究課題名(和文) ベーチェット病におけるHLA-B51とCD8陽性T細胞の関連についての検討

研究課題名(英文) Relationship between HLA-B51 and CD8 positive T cells in Behcet's disease

研究代表者

住友 秀次 (Sumitomo, Shuji)

地方独立行政法人神戸市民病院機構神戸市立医療センター中央市民病院(第1診療部、第2診療部、第3診療部)
・中央市民病院・医長

研究者番号：20392996

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)：我々は、ベーチェット病(BS)患者と健常人末梢血の解析を行い、BS患者でのTh17細胞の上昇と、Th17細胞におけるNFκB経路の活性化、BS患者での骨髄系樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞の活性化を明らかにした。eQTL解析では、BSに関連する形質細胞様樹状細胞(pDC)遺伝子moduleのメンバーであるYBX3の発現が、BSリスク多型rs2617170の影響を受けていることが示され、pDCにおけるYBX3がBSの発症と関連する可能性が考えられた。さらに、BSと最も強く関連する遺伝因子であるHLA-B51が、メモリーCD8陽性T細胞のIL-17関連経路と関連することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が明らかにした結果より、BSでは骨髄系樹状細胞などの抗原提示細胞が活性化しており、サイトカインやケモカインの分泌を介してTh17細胞の増加、HLA-B51陽性BSにおけるTc17細胞の分化、好中球遊走に寄与する可能性が考えられた。そして、pDCにおけるYBX3発現が、BSの発症と強く関連する可能性が示された。今後は、これらの新たな知見が、具体的にどのようなメカニズムでBS発症に関与するかを明らかにする方針である。これらの研究により、BSの治療戦略とバイオマーカーに関する新たな知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the peripheral blood of Behcet's disease (BS) patients and healthy subjects, and found that Th17 cells increased in BS patients, activation of the NFκB pathway in Th17 cells, and myeloid dendritic cells in BS patients. revealed activation of antigen-presenting cells. eQTL analysis showed that the expression of YBX3, a member of the BS-associated plasmacytoid dendritic cell (pDC) gene module, was affected by the BS risk polymorphism rs2617170, indicating that YBX3 in pDCs was associated with BS. It was thought that it might be related to onset. Furthermore, HLA-B51, the genetic factor most strongly associated with BS, was shown to be associated with IL-17-associated pathways in memory CD8+ T cells.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：ベーチェット病 eQTL解析 Th17細胞 Tc17細胞 HLA-B51

1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病(Behçet's syndrome; BS)は、口腔内アフタ・陰部潰瘍・ぶどう膜炎・皮膚病変を主症状とし、寛解と増悪を繰り返す慢性炎症性疾患である。非重篤例でも QOL 低下があり (Rheumatology 2010;49:2165) またぶどう膜炎や特殊病型(腸管型・神経型・血管型)は永続的機能障害をもたらし、致命的転帰を辿りうる(N Engl J Med 1999;341:1284)。

BS 患者では好中球の遊走能亢進がみられ (Lancet 1975;2:813) BS 病変局所には好中球が集簇している(Histopathology 2000;36:362)。また、BS で Th17 細胞の増加 (J Allergy Clin Immunol 2011;128:655) や血清 IL-17 の上昇 (Clin Exp Rheumatol 2013;31:32) が示されており、BS の病態として自然免疫と獲得免疫の異常が推測されている。

BS と最も関連する遺伝子は Human leukocyte antigen (HLA) クラス Ⅱ領域の遺伝子多型 HLA-B*51:01 であり、日本人での BS 発症の相対危険率 7.9 と極めて高い(Invest Ophthalmol Vis Sci 1992;33:3332)。HLA-B*51 による BS の病態機序として、抗原提示を介して CD8 陽性 T 細胞を制御する可能性や (Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:8867) 好中球機能を亢進させる可能性 (Arthritis Rheum 1995;38:426) が考えられているが、確定的ではない。

ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS)により、HLA-B*51 に加え IL23R-IL12RB2、IL10、STAT4、CCR1、CCR3、ERAP1 等が BS の疾患感受性遺伝子と推定された(Nat Genet 2010;42:703, Nat Genet 2013;45:202)。これらの遺伝子は Th17 分化や炎症抑制、病原体の排除機能低下、HLA クラス Ⅱ上に提示されるペプチドの制御などに関わっており、免疫応答と炎症に関係する複数の遺伝子が BS の発症に関与する可能性が示唆された。一方、各々の疾患感受性遺伝子の BS の病態における生物学的機能は、多くは明らかにされていない。BS の診断は、疾患特異的な自己抗体やバイオマーカーが不明のため症候学的になされており、より深い病態生理の知見が望まれている(Nat Rev Rheumatol 2018;14:107)。また、BS の治療は、急性炎症性発作の抑制と再燃の予防を目的として、コルヒチン、免疫抑制剤、ステロイドが併用されてきた (Ann Rheum Dis 2018;77:808) 。近年、TNF- α 阻害薬が難治性ぶどう膜炎や特殊病型に伴う病変に有効であることが示されており (J Rheumatol 2004;31:1362、J Autoimmun 2015;62:67) 、難治性病変の治療に展望が開かれつつある。ただ、病態を形成する担当細胞や疾患を特徴づける遺伝子についての把握は十分とは言えない。

網羅的遺伝子発現解析は mRNA の定量により数千~数万の遺伝子発現を評価する手法であり、疾患の特徴を反映する遺伝子発現プロファイルを得るためには、精製された単一の細胞集団を解析対象とすることが重要である (Ann Rheum Dis 2010;69:1208) 。一方、BS を対象とした解析はまだ報告が少なく、PBMC を対象とした解析 (J Immunol Res 2018;4246965) などに限られる。免疫細胞サブセットの網羅的遺伝子発現解析の報告はまだないが、病態の詳細な理解と、新たな治療標的の発見、バイオマーカーの開発をする上で必要不可欠と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、BS の病態に関連する細胞と遺伝子を明らかにし、BS の治療戦略とバイオマーカー開発の基盤となる、病態のメカニズムについての新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、BS 患者 23 人(HLA-B*51 陽性 11 人)、健常人(Healthy control:HC)28 人を対象に、末梢血単核細胞のサブセット 19 分画 (CD4 陽性 T 細胞 7 分画、CD8 陽性 T 細胞 2 分画、B 細胞 5 分画、NK 細胞、単球 2 分画、樹状細胞 2 分画) についてフローサイトメトリーによる解析と分取を行い、好中球を加えた 20 種類の免疫細胞サブセットについて RNA シークエンスを行った。

RNA シークエンス結果を用いて、BS に関連する遺伝子および BS の臨床的特徴を同定するために、各免疫細胞サブセットごとに weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) を行った。WGCNA により、共発現パターンの似た遺伝子群 (module) が同定され、臨床指標との相関を亜分画細胞ごとに検討できる。

次に、公開データベースである ImmuneXUT (<https://www.immunexut.org/>) の eQTL データベースを用いて、eQTL 解析を行い、BS の遺伝的リスク因子と関連のある細胞種と遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

我々は、BS 患者 23 人(HLA-B*51 陽性 11 人)、健常人(Healthy control:HC)28 人を対象に、末梢血単核細胞のサブセット 19 分画 (CD4 陽性 T 細胞 7 分画、CD8 陽性 T 細胞 2 分画、B 細胞 5 分画、NK 細胞、単球 2 分画、樹状細胞 2 分画) に対する解析を行った。

フローサイトメトリーによる解析では、低疾患活動性患者を含めた BS 患者で Th17 細胞の有意な上昇がみられ、Th17 細胞が BS の病態で重要な役割を果たす可能性が示唆された。

mRNA 発現解析では BS 患者の Th17 細胞における NF κ B 経路の活性化が示唆された。

次に、BS および BS の臨床的特徴に関連する遺伝子を同定するために、加重遺伝子共発現ネットワーク解析 (WGCNA) を実施した。WGCNA では、抗原提示細胞の遺伝子群 (module) が BS と関連しており、パスウェイ経路により、BS 患者で骨髄系樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞の活性化を認めた。

また、ImmuNexUT (<https://www.immunexut.org/>, Cell. 2021;184(11):3006-3021.e17.) の eQTL データベースを使用して、BS の遺伝的リスク因子とそれらの遺伝子との関係性を評価した。BS に関連する module 遺伝子をさらに調査すると、BS に関連する形質細胞様樹状細胞 (pDC) 遺伝子 module のメンバーである YBX3 の発現が、pDC の BS リスク多型 rs2617170 の影響を受けていることが示され、YBX3 が BS の遺伝的リスク因子と疾患の発症を結び付ける重要な分子である可能性が考えられた。

さらに、BS と最も強く関連する遺伝子である HLA-B51 に関連する module のパスウェイ解析により、メモリーCD8 陽性 T 細胞の IL-17 関連経路と HLA-B51 との関連が示された。したがって、IL-17 産生 CD8 陽性 T 細胞 (T cytotoxic 17; Tc17) が BS において重要な役割を果たす可能性が示唆された。我々は、本研究結果を Arthritis Research & Therapy 誌に 2022 年発表した。

BS では骨髄系樹状細胞などの抗原提示細胞の活性化しており、サイトカインやケモカインの分泌を介して Th17 細胞の増加、HLA-B51 陽性 BS における Tc17 細胞の分化、好中球遊走に寄与する可能性が考えられた。そして、pDC における YBX3 発現が、BS の発症と強く関連する可能性が新たに示された。

今後は、新たな知見である BS と抗原提示細胞の活性化の関係、HLA-B51 との関連が新たに示された Tc17 細胞、pDC における YBX3 発現が、具体的にどのようなメカニズムで BS 発症に関与するかを明らかにする方針である。これらの研究により、BS の治療戦略とバイオマーカーに関する新たな知見が得られる可能性がある。

< 引用文献 >

- 1) Okubo Mai, Sumitomo Shuji, Tsuchida Yumi, Nagafuchi Yasuo, Takeshima Yusuke, Yanaoka Haruyuki, Shirai Harumi, Kobayashi Satomi, Sugimori Yusuke, Maeda Junko, Hatano Hiroaki, Iwasaki Yukiko, Shoda Hirofumi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Ota Mineto, Fujio Keishi. Transcriptome analysis of immune cells from Behcet's syndrome patients: the importance of IL-17-producing cells and antigen-presenting cells in the pathogenesis of Behcet's syndrome. Arthritis Research & Therapy 2022;24:186.
- 2) Ota M, Nagafuchi Y, Hatano H, Ishigaki K, Terao C, Takeshima Y, Yanaoka H, Kobayashi S, Okubo M, Shirai H, Sugimori Y, Maeda J, Nakano M, Yamada S, Yoshida R, Tsuchiya H, Tsuchida Y, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Kochi Y, Okada Y, Yamamoto K, Okamura T, Fujio K, et al. Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases. Cell. 2021;184(11):3006-3021.e17.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ota M, Nagafuchi Y, Hatano H, Ishigaki K, Terao C, Takeshima Y, Yanaoka H, Kobayashi S, Okubo M, Shirai H, Sugimori Y, Maeda J, Nakano M, Yamada S, Yoshida R, Tsuchiya H, Tsuchida Y, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Kochi Y, Okada Y, Yamamoto K, Okamura T, Fujio K, et al.	4. 巻 184
2. 論文標題 Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2021.03.056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okubo Mai, Sumitomo Shuji, Tsuchida Yumi, Nagafuchi Yasuo, Takeshima Yusuke, Yanaoka Haruyuki, Shirai Harumi, Kobayashi Satomi, Sugimori Yusuke, Maeda Junko, Hatano Hiroaki, Iwasaki Yukiko, Shoda Hirofumi, Okamura Tomohisa, Yamamoto Kazuhiko, Ota Mineto, Fujio Keishi	4. 巻 24
2. 論文標題 Transcriptome analysis of immune cells from Behcet's syndrome patients: the importance of IL-17-producing cells and antigen-presenting cells in the pathogenesis of Behcet's syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-022-02867-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------