

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07434

研究課題名(和文)重症筋無力症患者における胸腺腫内抗原特異的B細胞の探索

研究課題名(英文)B cell maturation in thymi of myasthenia gravis patients

研究代表者

高田 和城 (Kazushiro, Takata)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20573223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗アセチルコリン受容体(AchR)抗体陽性胸腺腫合併患者において、胸腺腫摘出標本からのFACSを用いたsingle cell sortingおよびRNAシーケンスを行いB細胞および胸腺上皮細胞の解析を行った。B細胞の解析では胚中心を構成する細胞の増加およびB細胞の正常な分化・成熟が示唆されたが特異的な分子の発現は明らかではなかった。胸腺上皮細胞の解析では、抗原であるAchRの発現は検出できなかったがCXCL12などのケモカインおよびneurofilamentなどの神経発現分子を認め、胸腺上皮細胞による神経抗原の抗原提示により、病原性B細胞の成熟が促進されていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症筋無力症の患者血清を用いた研究はこれまで行われてきたが、血清中に含まれる病原性をもった抗体の産生細胞の分化・成熟についてはこれまで明らかではなかった。本研究において胸腺腫内においてB細胞の活発な分化・成熟が行われていることが示唆されただけでなく、これまであきらかではなかった病原性B細胞を分化させるための抗原提示細胞の可能性のある細胞群が明らかとなった。これらにより抗アセチルコリン受容体抗体産生の重症筋無力症の発症メカニズムの一部が明らかになり、そのことは従来の治療法とはことなった新しい治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed single cell RNA Sequencing of thymoma from Myasthenia gravis (MG) patients. Analysis of B cells revealed that memory B cells and plasmablasts were enriched in thymoma from MG patients and B cell maturation normally progressed. No protein expressing specifically in B cells of thymoma from MG patient was determined. Then, we next analyzed thymic epithelium cells which took major rule in antigen presentation in thymus. Gene-set analysis showed that one of thymic epithelium cells highly express the chemokine CXCL12/SDF-1, which was postulated to form a microenvironment that attracts lymphocytes to the thymoma. Furthermore, these cells expressed neuronal protein such as neurofilament and GABA receptor. This result could suggest pathogenic B cells were induced by these thymic epithelium cells expressing neuronal protein.

研究分野：脳神経内科

キーワード：重症筋無力症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症(Myasthenia Gravis: MG)は神経筋接合部の抗原に対する血液中の病原性を有する抗体による自己免疫疾患である。全身の易疲労感や重症患者では呼吸不全をきたし、人工呼吸管理が必要となることがある。そのため、広範囲の免疫を抑制するステロイド剤や免疫抑制剤などが用いられており、新規に補体をターゲットとする治療法も用いられ始めているが非常に高価な抗体療法であり、新規治療法が求められている。本邦で報告されるMG患者の約80%はアセチルコリン受容体(Acetylcholine receptor :AchR)に対する抗体を有することが知られている。血清からの抗AchR抗体の検出は広く行われているが、抗体産生細胞の分化・成熟や機能の解析については抗体産生細胞の分離が非常に困難であるため病原性のB細胞への抗原提示やB細胞の分化、成熟について明らかになっていない。これらの解析は新たな治療法に結び付く可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では抗アセチルコリン受容体抗体陽性患者の内、胸腺腫を有する患者の胸腺摘出サンプルを用いて、single cell sortingを行うことにより重症筋無力症患者由来胸腺腫に特徴的な分子の検索を行い、最終的には病原性を有する抗AchR抗体を産生するB細胞への抗原提示のメカニズム、B細胞の分化・成熟課程を明らかにすることである。これらをあきらかにすることにより新たな治療ターゲットにつなげていくことを目的としている。

3. 研究の方法

重症筋無力症患者の内、胸腺腫を有する患者において、胸腺摘出術のサンプルを採取。機械的に破碎し、リンパ球を回収した。各種マーカーで免疫染色を行いFACSを用いて、single cell sortingを行いそれぞれの細胞のcDNAライブラリーを作成しRNAシーケンスを行い、重症筋無力症非発症の胸腺腫の摘出サンプルと比較した。

4. 研究成果

重症筋無力症患者4例の胸腺のサンプルよりB細胞をはじめとした細胞のsingle cell sortingを行い、網羅的な細胞の発現プロファイルの解析を行い、サンプルの処理、細胞の分離およびcDNAライブラリーの作成、RNAシーケンス、データ解析までが適切に行われていることを確認した。(Figure 1.)

採取したB細胞の解析ではgerminal centerを構成する細胞の増加を認め、ナイーブB細胞からメモリーB細胞、形質芽細胞までのB細胞を認め、B細胞の分化・成熟自体は特に異常なく行われていると考えられた(Figure 2.)。また末梢血B細胞と比較し胸腺腫中では成熟B細胞の比率が増加しており、末梢と比較し胸腺腫中でより積極的な抗原提示・B細胞の分化成熟が行われていることが示唆されたが、重症筋無力症患者由来胸腺腫B細胞において特異的な発現は明らかではなかった。

そこで抗原提示をおこなっていると考えられる胸腺上皮細胞の解析も行ったところ、直接の抗原であるアセチルコリン受容体蛋白の発現は検出できなかったが MHC class II, CXCL12/SDF-1 などの抗原提示蛋白、CXCL12/SDF-1 などのリンパ球の recruitment にかかわるケモカインの有意な発現増加および neurofilament, GABA receptor などの神経発現分子を認めた。抗アセチルコリン受容体抗体陽性の重症筋無力症では、胸腺上皮細胞による神経抗原の抗原提示により、病原性B細胞の成熟が促進されていると考えられることが明らかとなった。

これらの細胞からの抗原提示の阻害はこれまでにない重症筋無力症の新しい治療法につながる可能性がある。

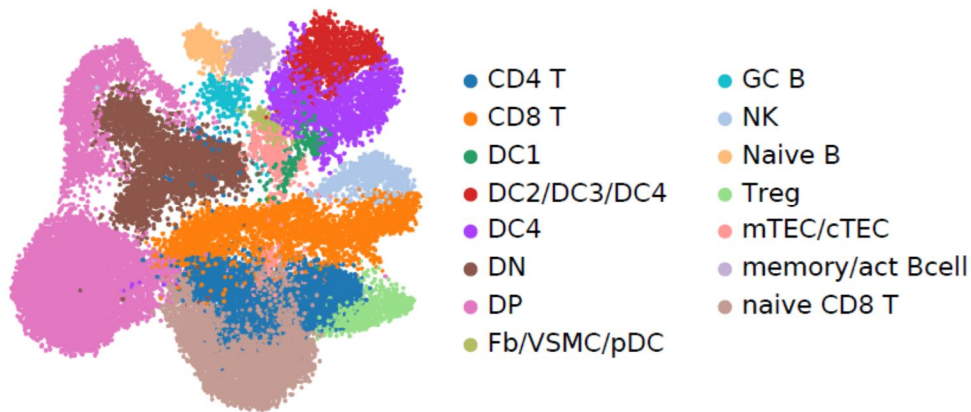


Figure 1. 重症筋無力症胸腺腫における網羅的細胞プロファイル

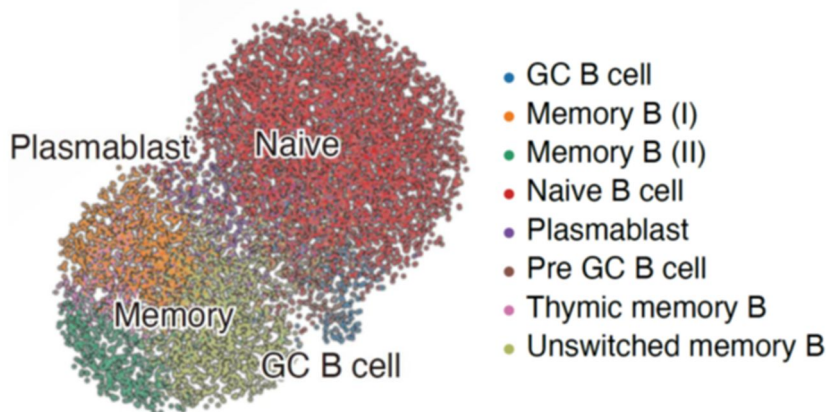


Figure 2. 重症筋無力症胸腺腫におけるB細胞プロファイル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	木下 允 (Kinoshita Makoto) (10573222)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師(常勤) (14401)	

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