

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09341

研究課題名(和文)日本人多発性硬化症の全ゲノム関連解析に基づく T細胞と自然免疫を標的とした治療

研究課題名(英文)Therapy for multiple sclerosis targeting gamma-delta T cells and innate immunity based on genome-wide association studies in Japanese population

研究代表者

松下 拓也(Matsushita, Takuya)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：00533001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)患者の障害度に関連する遺伝因子を genome-wide association study (GWAS)により明らかにした。MSにおける末梢血の T細胞受容体(TCR)の特徴を明らかにした。私たちがMS発症リスクとして報告したT細胞受容体鎖遺伝子の欠失型 copy number variation (CNV)の有無とTCRのレパトア解析では、CNVあり群ではなし群と比較してTRGJ1発現が有意に低下していた。TRAおよびTRBのTCR多様性は健康者群よりもMS群で高かったが、TRGおよびTRDについては多様性に有意な差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：We detected associated genetic loci with disability index of multiple sclerosis (MS) in Japanese population. We compared immunophenotype of T cells between Japanese patients with multiple sclerosis (MS) and healthy controls (HC) by flow cytometry. The percentages of V₂₊ and V_{2+V₉₊} cells in T cells were negatively correlated with the disability index. Presence of deleted type copy number variation at TRG, which had been clarified to be associated with MS susceptibility, were associated with the decreased expression of TRGJ1.

研究分野：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 T細胞 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は中枢神経系に時間的・空間的に多発する脱髄炎を特徴とする疾患であり、自己免疫機序によって発症し、環境要因と遺伝要因がその発症に影響する complex disease と考えられている。MS の遺伝要因としてはヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) が古くから知られているが、ヨーロッパ系人種 MS を対象とし、全ゲノムに散在する SNP をマーカーとした genome-wide association study (GWAS) が施行されており、現在、HLA を含む major histocompatibility complex (MHC) 領域以外に 110 のリスク SNP が同定されている。また MS の有病率には人種間で差があり、ヨーロッパ系人種で高く、アフリカ系、アジア系人種では低いことが知られている。今までの GWAS はヨーロッパ系人種でのみ施行されており、他の人種においてもヨーロッパ系人種と遺伝的リスクを共有しているかどうかは明らかではなかった。

私たちは Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium (JMSGC) を 2009 年に設立し、MS・NMO の臨床データと DNA 試料 (HLA 解析済み) を収集してきた。さらに 2013 年には医薬基盤研究所 (基盤研) と共同して MS/NMO 生体試料バンクを立ち上げ、DNA、血清、髄液等の生体試料の収集を開始した。JMSGC では収集した試料により GWAS を行い、アジア人で初めて MS の発症に関連する遺伝領域を明らかにした。MS との関連が示唆された MHC 領域以外の 26 の遺伝領域のうち 2 つ以外は、ヨーロッパ系人種の GWAS では確認されていない新規の領域であった。ヨーロッパ系人種の MS で同定された HLA 領域以外の 110 のリスク SNP のうち、日本人集団では 98 の SNP が利用可能であったが、そのうち 13 の SNP のリスクが再確認された。

一方、GWAS データを用いた CNV 解析では MS 者群において 7 番・14 番染色体上の T

細胞受容体 (T cell receptor: TCR) γ 鎖・ α 鎖遺伝子に存在する欠失型 CNV が発症リスクであることを明らかにした。

これらの結果は日本人においては MS 発症に至る自己免疫応答形成には自然免疫系と $\gamma\delta$ T 細胞が重要な役割を果たしていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では①候補遺伝子の中で自然免疫に関連する遺伝子に着目し、多型によるヒト単球系での機能変化および②CNV による T 細胞受容体レパートリーの偏倚による抗原提示以降の免疫応答修飾、③自然免疫と $\gamma\delta$ T 細胞応答に関わる抗原として *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) に着目し、同感染の MS 発症のリスクと免疫応答への影響を明らかにし、新規治療法・予防法の開拓につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 日本人 MS の疾患表現型に対する GWAS

日本人 MS 患者を対象とした genome-wide SNP genotyping データを用いて、発症年齢、IgG オリゴクローナルバンド、障害度 (Expanded Disability Status Scale: EDSS、MS Severity Score: MSSS) との全ゲノム関連解析を行った。

(2) MS における $\gamma\delta$ 細胞の機能的分画と健常者との比較

MS 患者 (疾患修飾役非導入例) と健常者を対象に末梢血を採取し、単核球 (PBMC) を分離、 $\gamma\delta$ T 細胞 ($CD3^+TCR\gamma\delta^+TCR\alpha\beta^-$) は -V δ 1、V δ 2、V γ 9 抗体でその分画をフェノタイプングし、細胞内サイトカイン産生については IL-17A と IFN の細胞内染色を行った。 $\alpha\beta$ T 細胞については $CD4^+$ および $CD8^+$ T 細胞に区分し、さらに naïve T (T_{naïve}, CCR7⁺CD45RA⁺)、central memory T (T_{cm}, CCR7⁺CD45RA⁻)、effector memory T (T_{em},

CCR7⁺CD45RA⁻)、 effector T (T_{eff}, CCR7⁺CD45RA⁻) および分類した。それぞれの分画を MS と健常者で比較した。また、欠失型 CNV 存在例と非存在例間でも比較を行った。

(3) $\gamma\delta$ T 細胞 TCR レパトアの多様性と欠失型 CNV がレパトアに及ぼす影響の解析

MS 患者および健常者末梢血から PBMC を分離、total RNA を抽出し、Adaptor-ligation PCR (AL-PCR)法を用いた次世代シーケンスを行った。TCR $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ 鎖 (TRA/TRB/TRG/TRD) のレパトア解析を行った。

(4) MAP 抗原に反応する抗体の存在と HLA との関連

MAP オーバーラッピングペプチドを用いて MS および健常者の血清との反応を ELISA により確認する。また HLA-DRB1 アリルとその陽性率について関連を解析した。

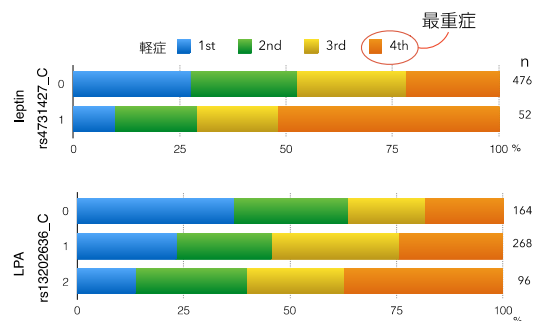
(5) 日本人 MS の GWAS 情報を用いたパスウェイ解析

日本人 MS 患者と関連する SNP の統計量 (p 値) を gene P value に変換し、FANTOM5 情報から構築された細胞・組織特異的共発現ネットワーク (Marbach D, et al. Nat Methods, 2016) との関連についてパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 日本人 MS の疾患表現型に対する GWAS

疾患表現型との GWAS では *lipoprotein A* (LPA) や *leptin* に位置する SNP と障害度 (MSSS) とに関連が見られた。



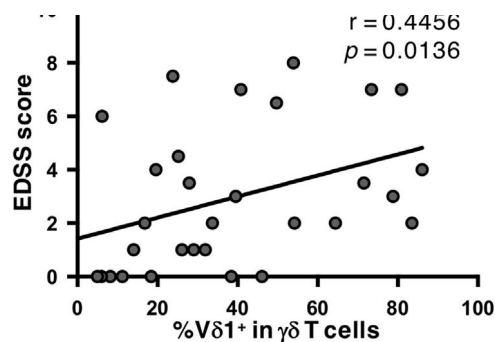
また、MS と健常者の比較では血清中レプ

チン濃度は MS で高く、LPA についてはリスクアリルを保有するほど血中濃度が低下する傾向が見られた。

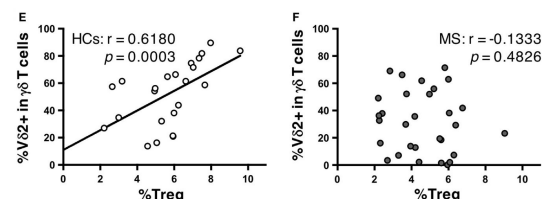
MS 内での IgG オリゴクローナルバンド陽性との関連は MHC 領域内にもっとも強い関連が認められた。

(2) MS における $\gamma\delta$ 細胞の機能的分画と健常者との比較

MS 患者では健常者群と比較して $\gamma\delta$ T 細胞中の V δ 2⁺ および V δ 2⁺V γ 9⁺ 細胞比率が有意に低下し、V δ 1/V δ 2 比率が上昇していた。 $\gamma\delta$ T 細胞中の V δ 2⁺ および V δ 2⁺V γ 9⁺ 細胞比率は臨床的重症度と逆相関していた。



V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T 細胞中の IFN γ ⁺ および IFN γ ⁺IL17A⁺ 細胞比率は健常者群と比較して MS 群で有意に減少していた。健常者群では V δ 2⁺ および V δ 2⁺V γ 9⁺ 細胞の CD3⁺ 細胞中の比率は調節性 T 細胞の表現型である CD25⁺CD127^{low/-} の CD4⁺ 細胞中の比率と強く正に相関したが、MS 群ではこの相関は存在しなかった。

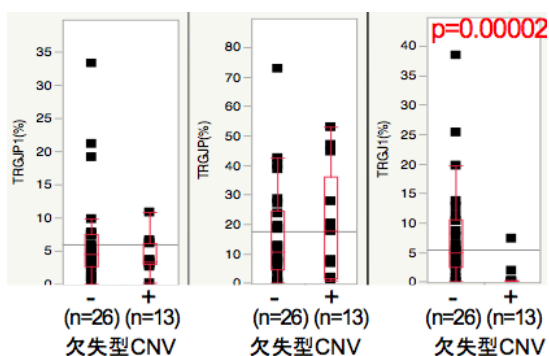


(3) $\gamma\delta$ T 細胞 TCR レパトアの多様性と欠失型 CNV がレパトアに及ぼす影響の解析

TCR レパトアの多様性は年齢と逆相関する傾向が見られたが、年齢で補正しても T cell receptor alpha locus (TRA) と T cell receptor beta locus (TRB) については HC より MS で高か

った。一方で gamma、delta locus (TRG、TRD) については HC と有意な差は見られなかった。

TRG における欠失型 CNV の有無で実際の TRG レパトア J 領域の発現パターンを比較すると、欠失型 CNV 陽性例において TRGJ1 の発現が低いことが明らかになった。MS 全体と健常者の比較では TRG レパトアの多様性に有意な差は見られなかった。

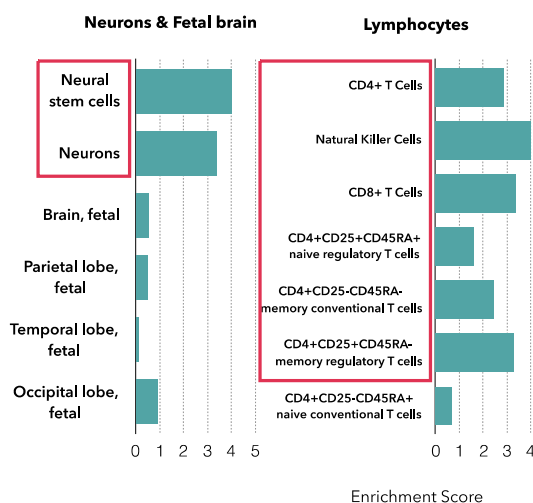


(4) MAP 抗原に反応する抗体の存在と HLA との関連

ヒト T 細胞受容体 γ 鎖の C 領域と交差反応する MAP295-303 のみに対して抗体陽性率が MS 全体で 11/120 (9.2%)、健常対照で 1/50 (2.0%) で、MS 症例での陽性者は、有意に MS の疾患感受性遺伝子アリルである *HLA-DRB1*15:01* アリルの保有率が健常対照より高かった ($p=0.0298$)。

(5) 日本人 MS の GWAS 情報を用いたパスウェイ解析

日本人 MS に関連する遺伝子については neuron stem cell、neuron、CD4+CD25+CD45RA-memory regulatory T cells、Natural killer cell の共発現ネットワークとの関連が認められた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- Maimaitijiang G, Shinoda K, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Isobe N, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira J-I. Association of Decreased Percentage of $V\delta 2+V\gamma 9+ \gamma\delta$ T Cells With Disease Severity in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:748.

[学会発表] (計 7 件)

- Maimaitijiang G, Shinoda K, Nakamura Y, Matsushita T, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira J. Deviated Repertoire of $\gamma\delta$ T Cells is Associated with Disease Severity of Multiple Sclerosis. 10th Congress of the Pan-Asian-Committee-for-Treatment-and-Research-in-Multiple-Sclerosis (PACTRIMS). Ho Chi Minh, Vietnam, 2017. (Oral presentation)
- Shinoda K, Maimaitijiang G, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira J. A distinct repertoire of the $\gamma\delta$ T cell population is associated with disease severity of multiple sclerosis 6th Joint Triennial Congress of the European and Americas Committees for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Paris,

- FRANCE, 2017. (Poster presentation)
3. Maimaitijiang G, Shinoda K, Nakamura Y, Masaki K, Matsushita T, Yamasaki R, Yoshikai Y, Kira J: Distinct Repertoires of CD4 and CD8 T Cells in Multiple Sclerosis Patients with and without Deletion-type Copy Number Variations. 9th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple-Sclerosis (PACTRIMS). Bangkok, Thailand, 2016. (Oral presentation)
 4. Matsushita T, Sato S, Yamamoto K, Zhuang J, Nakamura Y, Kira J: Genetic factors associated with clinical phenotypes of multiple sclerosis in the Japanese. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). London, UK, 2016. (Poster presentation)
 5. Matsushita T, Sato S, Yamamoto K, Nakamura Y, Kira J, the Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium: Genome-Wide Association Study (GWAS) for Clinical Phenotypes of Multiple Sclerosis in The Japanese. 8th Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS). Seoul, KOREA, 2015. (Oral presentation)
 6. Kira J, Matsushita T, Sato S, Yamamoto K: A genome-wide association study (GWAS) in the Japanese population reveals novel genetic risk factors for multiple sclerosis and neuromyelitis optica. 22nd World Congress of Neurology. Santiago, CHILE, 2015. (Poster presentation)
 7. Matsushita T, Sato S, Yamamoto K, Nakamura Y, Kira J, the Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium: Genetic factors associated with disability progression and age at onset of multiple

sclerosis in the Japanese. Asia Pacific School of Neuroimmunology. Tokyo, Japan, 2015. (Poster presentation)

8.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 拓也 (MATSUSHITA, Takuya)
九州大学病院神経内科・講師
研究者番号：00533001

(2) 研究分担者

山崎 亮 (YAMASAKI, Ryo)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・准教授
研究者番号：20596390