

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 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：15K09343

研究課題名(和文) 多発性硬化症に特異的な病原性Th17細胞でのレトロエレメント挿入多型とその作用

研究課題名(英文) Retro-element insertion polymorphism in pathogenic Th17 cells specific for multiple sclerosis and its action

研究代表者

河野 祐治 (Yuji, Kawano)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20333479

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)：生きたままの病原性Th17細胞の分離に関しては、各試薬との至適反応時間の設定、を行い、セルソーターを使った細胞分離と、その後の至適培養法などを確立した。また一卵性双生児の片方がMSを発症し、もう片方が発症していない不一致例の2家系4例での全ゲノム塩基配列解析のデータを基に、レトロエレメントの挿入のみならず、各種の構造多型から、各サンプルごとの一塩基レベルの多型まで網羅的に予測・検出できる実験系の確立が間近になり、他プロジェクトとのデータ(これまでに行なってきたサイトカインのデータ、並行して行なっていた他の疾患関連遺伝子との複合解析など)とを総合して発表の予定としている。

研究成果の概要(英文)：Regarding the isolation of viable pathogenic Th17 cells, we set up the optimal reaction time with each reagent, and established cell separation using cell sorter and subsequent optimal culture method. Based on the data of whole genome nucleotide sequence analysis in 4 families of 2 families with inconsistent cases where one of the identical twins developed MS and the other did not develop, not only insertion of retroelements but also various From the structural polymorphism, the establishment of an experimental system that can comprehensively predict and detect up to single base level polymorphism for each sample is nearing, and data with other projects (data on cytokines that have been done in parallel, parallelism Combined analysis with other disease-related genes that we were doing) and plan to announce.

研究分野：神経免疫学 神経遺伝学

キーワード：レトロエレメント 多発性硬化症 Th17細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)は、遺伝的な疾患感受性と環境要因の両者の相互作用により発症すると推定されている。遺伝的要因に関しては、全ゲノム関連解析(genome-wide association study, GWAS)により、既知の HLA 遺伝子領域以外にも疾患感受性遺伝子として IL7RA をはじめとして 100 以上の疾患関連 single nucleotide polymorphisms (SNPs)が同定されている。しかし、この GWAS は、common variant 仮説、すなわち同じ疾患の患者では同じ変異を持つという仮説の下では有効であり、その仮説の正当性を示す例であった。しかし GWAS によって見出される疾患感受性 SNPs はどれも単独では疾患発症に与える影響力が小さく、疾患の病態機序の全貌を理解できるまでには至っていない。一方、multiple rare variants 仮説、すなわち一つの疾患は、別々の変異を持つさまざまな患者小グループの集合体であるという仮説の下では、目的とする遺伝子変異の疾患への影響力は強いが、GWAS では検出困難である。実際に Parkinson 病での glucocerebrosidase A (GBA)変異のように multiple rare variants 仮説に従うものも報告されている。

神経疾患の遺伝的要因の検索には、GWAS が普及したことや検出の容易さから、これまでは主に SNPs 多型や小さな挿入/欠失を多数例で検討する方法が用いられてきた。しかしゲノムの多様性はそのような小規模の変異にとどまらない。最近ではゲノムの持つ様々な構造多型も注目されるようになった。そのようなものの一つとして、レトロエレメントの挿入部位多型がある。レトロエレメントは、現在もヒトゲノム中で複製活性があり、生殖細胞で活性化されている他、放射線等のストレスといった環境要因によってもその複製活性が制御されるため、個々人、あるいは組織や細胞種類ごとでも挿入部位や個数に多型が生じ得る。

レトロエレメントの挿入は、短期的には遺伝子の破壊による機能喪失、レトロエレメントが持つプロモータ活性による遺伝子機能亢進といった遺伝子機能の変化を起こす。長期的にはゲノムの進化に大きな影響を及ぼしてきたことが示されている。具体的な疾患との関連性では、福山型筋ジストロフィをはじめ、多数の疾患に関係していることが分かっている。さらに、統合失調症の脳においては、シナプスや統合失調症に関連した遺伝子への挿入が観察され、病態への影響が示唆されている。レトロエレメント挿入は、周辺の遺伝子への影響も大きく、その意味でも重要と考えられる。強い影響のある疾患感受性遺伝子に偶然挿入が入って、発症への最終的なトリガーとなることも十分考えられる。このようなレトロエレメントの挿入多型の網羅的解析が、次世代シーケンサーの普及により実行可能な時代になってきた。

私たちは、最近、一卵性双生児の片方が MS を発症し、もう片方が発症していない不一致例(discordant twin pair)の 2 家系 4 例での全ゲノム塩基配列解析を実施した。この解析により、リファレンスゲノムには無く、MS 患者においてのみ LINE-1 や Alu 配列の挿入が認められる遺伝子領域が存在することを見出した。

一方、MS のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) では myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) や proteolipid protein (PLP)などの髄鞘抗原が、炎症惹起抗原として用いられ、EAE は髄鞘抗原特異的 T 細胞が惹起する。EAE は IFN を産生する Th1 細胞でも IL-17 を産生する Th17 細胞でも惹起されるが、MS では再発期に Th17 細胞が増加し、髄液で IL17 が上昇することから、Th17 細胞の関与が示唆されてきた。最近、Th17 細胞の中でも、multi-drug resistance type 1 (MDR1)を発現する Th17 細胞サブセットや、IL-17 と IFN

の両者を産生する Th17 細胞が、pathogenic Th17 細胞サブセットであるとして注目されている(Ramesh et al, 2014)。私たちは、自験 MS 例で IL17 と IFN を産生する pathogenic Th17 細胞が、末梢血で有意に増加していることを見出している(未発表)。しかし、免疫系が多数の抗原に反応できるように進化しているため、健常者を含めた全てのヒトが髄鞘抗原特異的 T 細胞を持つ結果になっている。そのうち一部の例でしか発症しないのは、遺伝的要因や環境要因、あるいは制御機構の破綻をきたす要因が加わっているためと考えられている。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を元に私たちは、

- 1) MS の発症には、疾患関連遺伝子へ挿入されたレトロエレメントによる病原性 Th17 細胞の機能異常が関与している、
- 2) 機能異常をきたした病原性 Th17 細胞の中に髄鞘抗原特異的 T 細胞が含まれているため発症につながる、との仮説を立てた。

そこで、本研究では、上記の仮説をレトロエレメントの網羅的解析と挿入による Th17 細胞の機能変化の解析から立証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 病原性 Th17 細胞の分離

細胞を PMA+ionomycin で刺激し、cytokine capture assay 法にて IL-17 産生細胞を生きたまま蛍光ラベルする。さらに、Rh123 にてラベルする。この時、Rh123 でラベルされず (Rh123 を排出した細胞 = MDR1 を持った細胞、Rh123 efflux assay)、IL-17 を産生していた細胞をセルソーターで分取する(病原性 Th17 細胞)。Rh123 でラベルされた IL-17 産生細胞は、その他の Th17 細胞として別途分取する。

## 1.2) レトロエレメント挿入部位の決定と機能変化予測

病原性 Th17 細胞、その他の Th17 細胞それぞれにおいて、Ewing AD と Kazazian HH Jr (Genome Res. 20(9):1262-70, 2010) によって開発された方法を用いて、LINE-1, Alu, SVA それぞれのレトロエレメントに特異的なプライマーを用いた hemi-specific PCR によってレトロエレメント挿入部のゲノム配列を濃縮増幅し、次世代シーケンサーによって配列を決定し、得られた配列のリファレンスゲノム上へのマッピングとクラスターの検出を行う。遺伝子内や遺伝子近傍に挿入されたものを選択するが、その際に挿入により遺伝子機能が a) 遺伝子の破壊や発現減少による機能低下と予想されるもの、b) 発現増強による機能増強と予想されるもの、それぞれに分けた上で解析を行う。MS 患者および健康者、病原性 Th17 細胞とその他の Th17 細胞それぞれにて比較し、レトロエレメント挿入の結果、MS での病原性 Th17 細胞において有意に機能低下あるいは機能増強と予測される遺伝子、逆に健康者の病原性 Th17 細胞において有意に機能低下あるいは機能増強と予測される遺伝子、それぞれを抽出する。その上でパスウェイ解析を行い、Th17 細胞の機能に最も関連した遺伝子を選択する。

レトロエレメント挿入部位に関しては、a) 挿入部位多型であるもの、b) 患者個人で新たに生じた挿入であるもの、それぞれの可能性がある。個人の中でのアリル頻度が 1 や 0.5 である場合は前者と考えられる。一方、アリル頻度が 0.5 未満であったり、病原性 Th17 細胞とその他の細胞でのアリル頻度が大きく異なったりする場合は後者と考えられる。前者の場合は、挿入部位特異的プライマーの設計を行い、PCR での検出系を樹立する。後者の場合は、該当遺伝子を含んだ領域をキャプチャーできるカスタムプローブを設計し、それを用いてサンプル DNA から当該領域を分離濃縮し、次世代シーケンサーにより多サンプルを同時に解析する系を樹立する。

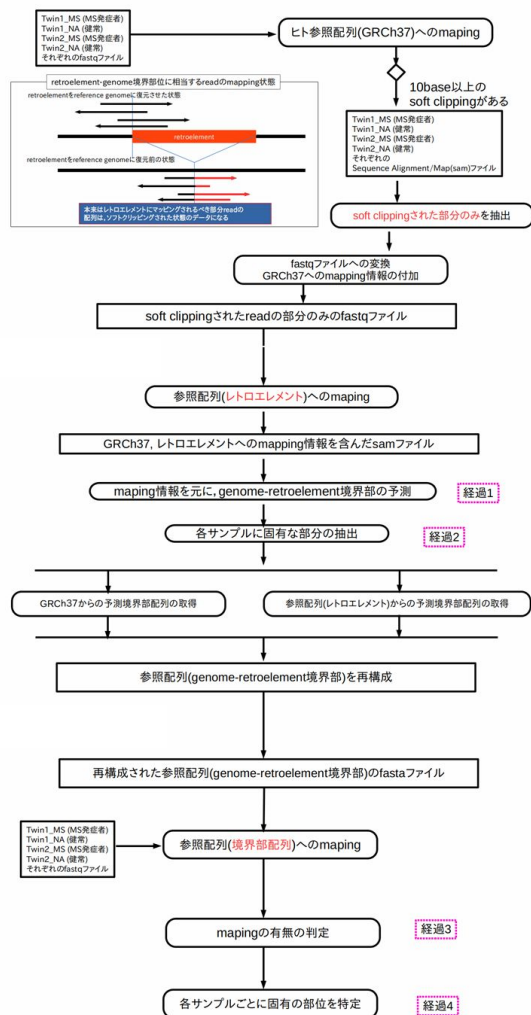
## 4. 研究成果

生きたままの病原性 Th17 細胞の分離に関しては、正確な分離のための基礎実験として、フローサイトメトリーによる条件の決定を行った。Th17 細胞に関しては数が極めて少ないために難航したが、採血量、Rh123 との至適反応時間の設定を行った。また刺激方法も、申請時に予定した PMA+ionomycin のみならず、PHA、抗 CD3 抗体、抗 CD3 抗体+IL2、Cytostim 試薬といった様々な方法を試した。そして、それぞれの方法の至適用量設定、および至適刺激時間の設定、Rh123 排泄に要する至適培養時間などを検討した。その結果、安定して他の細胞分画と区別できた。さらにセルソーターを使った細胞分離、および、分離後の純度検定、生存率の検定、その後の培

養の至適方法などをそれぞれ検討した。本申請期間中には、レトロエレメント挿入部位決定法の問題が残ったため、実際の患者サンプルまでは用いてないが、後述の方法が完成次第、患者サンプルでの解析を行う予定である。

レトロエレメント挿入部位の決定と機能変化予測に関して、当初は前述のような方法で行い、準備を進めていた。しかしその方法では、LINE-1 などに特異的なプライマーとはいっても、実際の配列には多様性があり、網羅的な増幅に漏れてしまう挿入部位がでてくる恐れがあること。レトロエレメント自体の挿入しかわからず、広く染色体の転座や重複といった構造多型を検出できないことなどの弱点が明らかになった。そこで、下記の図のように、whole genome sequencing のデータを用いた方法に変更した。その方法では、レトロエレメントの挿入のみならず、各種の構造多型から、各サンプルごとの一塩基レベルの多型まで網羅的に予測・検出できる可能性が期待された。

### データ解析方法

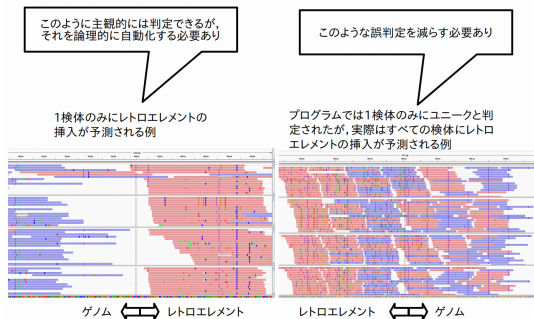


この方法でパイロット的に行った結果を下記に示す。

## 結果

予測された挿入部位数	Twin1_MS (MS発症者)	Twin1_NA (健常)	Twin2_MS (MS発症者)	Twin2_NA (健常)
経過1	10,234	9,885	8,552	8,681
経過2	6,783	6,320	5,500	5,313
経過3				
判定条件1	887	628	559	529
判定条件2	552	128	122	177
経過4				
判定条件1	200	114	44	60
判定条件2	205	51	19	41

このようにレトロエレメント挿入部位の候補の絞り込みがうまくいってなかった(各サンプルに固有な挿入部位は極めて少ないと考えられる)。さらに予測された挿入部位を個々に調べていくと、下記のように明らかな誤判定が目立った。



そこで、元データのゲノムへのマッピング方法の際の各種パラメータ、マッピングプログラムの選択、を行なったが、結果は芳しくなかった。さらに予測を絞り込むため、マッピングクオリティー、挿入部周囲の配列の特徴、根拠となるリードのクオリティーなどの様々な情報を基に絞り込みを続けているが、その組み合わせの数が膨大であること、元データのゲノムへのマッピングだけでも2週間かかるなどの時間的制約のため、まだ完全ではないが、次第に絞り込み数を減らすことができている。今後は、本プロジェクト、および他プロジェクトとのデータ(これまでにこなってきたサイトカインのデータ、並行して行っていた他の疾患関連遺伝子との複合解析など)とを総合して発表の予定としている。

## 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15件)

1) Novel disease-modifying anti-rheumatic drug iguratimod suppresses chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating activation of macrophages/microglia through an NF- $\kappa$ B pathway. Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsushita T,

Kira JI. Sci Rep. 2018 Jan 31;8(1):1933. doi: 10.1038/s41598-018-20390-5. 査読有

2) Parallel fluctuation of anti-neurofascin 155 antibody levels with clinico-electrophysiological findings in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Fujita A, Ogata H, Yamasaki R, Matsushita T, Kira JI. J Neurol Sci. 2018 Jan 15;384:107-112. doi: 10.1016/j.jns.2017.11.035. 査読有

3) Re-emergence of a tumefactive demyelinating lesion after initiation of fingolimod therapy. Hashimoto Y, Shinoda K, Tanaka E, Uehara T, Matsushita T, Yamasaki R, Kira JI. J Neurol Sci. 2017 Aug 15;379:167-168. doi: 10.1016/j.jns.2017.06.002. 査読有

4) HLA-DRB1\*04:05 allele is associated with intracortical lesions on three-dimensional double inversion recovery images in Japanese patients with multiple sclerosis. Shinoda K, Matsushita T, Nakamura Y, Masaki K, Yamasaki R, Yamaguchi H, Togao O, Hiwatahi A, Kira JI. Mult Scler. 2018 Apr 1;1352458517707067. doi: 10.1177/1352458517707067. 査読有

5) Early strong intrathecal inflammation in cerebellar type multiple system atrophy by cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles: a case control study. Yamasaki R, Yamaguchi H, Matsushita T, Fujii T, Hiwatahi A, Kira JI. J Neuroinflammation. 2017 Apr 24;14(1):89. doi: 10.1186/s12974-017-0863-0. 査読有

6) Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira JI. Sci Rep. 2016 Dec 8;6:38387. doi: 10.1038/srep38387. 査読有

7) Allergic Inflammation Leads to Neuropathic Pain via Glial Cell Activation. Yamasaki R, Fujii T, Wang B, Masaki K, Kido MA, Yoshida M, Matsushita T, Kira JI. J Neurosci. 2016 Nov 23;36(47):11929-11945. 査読有

8) Latitude and HLA-DRB1\*04:05 independently influence disease severity in Japanese multiple sclerosis: a cross-sectional study. Nakamura Y, Matsushita T, Sato S, Niino M, Fukazawa T, Yoshimura S, Hisahara S, Isobe N, Shimohama S, Watanabe M, Yoshida K, Houzen H, Miyazaki Y, Yamasaki R, Kikuchi S, Kira JI; Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. J Neuroinflammation. 2016 Sep 6;13(1):239. doi: 10.1186/s12974-016-0695-3. 査読有

9) Early and extensive spinal white matter involvement in neuromyelitis optica. Hayashida S, Masaki K, Yonekawa T, Suzuki SO, Hiwatashi A, Matsushita T, Watanabe M, Yamasaki R, Suenaga T, Iwaki T, Murai H, Kira JI. Brain Pathol. 2017 May;27(3):249-265. doi: 10.1111/bpa.12386. Epub 2016 Jun 29. 査読有

10) Efficacy of intravenous methylprednisolone pulse therapy in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. Yamasaki R, Matsushita T, Fukazawa T, Yokoyama K, Fujihara K, Ogino M, Yokota T, Miyamoto K, Niino M, Nomura K, Tomioka R, Tanaka M, Kawachi I, Ohashi T, Kaida K, Matsui M, Nakatsuji Y, Ochi H, Fukaura H, Kanda T, Nagaishi A, Togo K, Mizusawa H, Murai H, Kira J. Mult Scler. 2016 Sep;22(10):1337-48. doi: 10.1177/1352458515617248. 査読有

11) Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. Ogata H, Yamasaki R, Hiwatashi A, Oka N, Kawamura N, Matsuse D, Kuwahara M, Suzuki H, Kusunoki S, Fujimoto Y, Ikezoe K, Kishida H, Tanaka F, Matsushita T, Murai H, Kira J. Ann Clin Transl Neurol. 2015 Oct;2(10):960-71. doi: 10.1002/acn3.248. 査読有

12) Copy number variations in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. Sato S, Yamamoto K, Matsushita T, Isobe N, Kawano Y, Iinuma K, Niino M, Fukazawa T, Nakamura Y, Watanabe M, Yonekawa T, Masaki K, Yoshimura S, Murai H, Yamasaki R, Kira J; Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Ann Neurol. 2015 Nov;78(5):762-74. doi: 10.1002/ana.24511. 査読有

13) Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are uncommon in Japanese opticospinal multiple sclerosis. Ramanathan S, Sato S, Matsushita T, Masaki K, Yamasaki R, Dale RC, Kira J, Brilot F. Mult Scler. 2016 Jan;22(1):127-8. doi: 10.1177/1352458515586089. 査読有

14) Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. Song ZY, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, Matsuse D, Murai H, Matsushita T, Kira J. PLoS One. 2015 Apr 28;10(4):e0124923. doi: 10.1371/journal.pone.0124923. 査読有

15) A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T,

Hirotsu M, Murai H, Kira J. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016 Jan;87(1):29-36. doi: 10.1136/jnnp-2014-309831. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1) 河野祐治, 松下拓也, 佐藤真也, 山本健, 吉良潤一. 多発性硬化症一卵性双生児不一致例での高精度レトロエレメント挿入部位予測プログラム. 第57回日本神経学会学術大会. 2016年.

2) 河野祐治, 松下拓也, 眞崎勝久, 米川智, 佐藤真也, 吉良潤一, 土井晃一郎, 吉村淳, 森下真一, 辻省次, 多発性硬化症一卵性双生児不一致例での新たなレトロエレメント挿入の可能性 第56回日本神経学会学術大会. 2015年.

〔図書〕(計1件)

河野祐治. ADEMやアトピー性脊髄炎はどのように診断しますか. 神経内科 Clinical Questions & Pearls. 中枢脱髄性疾患. 中外医学社, 2018年2月1日発行, 215ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 祐治 (KAWANO Yuji)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号: 20333479

### (2) 研究分担者

松下 拓也 (MATSUSHITA, Takuya)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 00533001

山崎 亮 (YAMASAKI Ryo)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 10467946

吉良 潤一 (KIRA Jun-ichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 40183305

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし