

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15333

研究課題名(和文) 筋内CD8陽性T細胞のトランスクリプトーム解析による自己免疫学的炎症病態の解明

研究課題名(英文) Investigating autoimmune inflammatory mechanism through transcriptome analysis of intramuscular CD8 T cells

研究代表者

作石 かおり (Sakuishi, Kaori)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70722685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋炎において細胞免疫学的な病態を解明するため、本研究では筋炎組織内のCD8細胞の細胞免疫学的病態解明を目指して、laser microdissectionにて筋内CD8細胞を切り出して、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行うことを試みた。特に、筋内にCD8陽性Tリンパ球(CD8細胞)主体の細胞浸潤を認める封入体筋炎に注目し、炎症局所のリンパ球のT細胞受容体のレパトア解析を行い、血中のレパトアが治療前後で大きく異なることを確認した。今後、臓器特異的に増殖しているT細胞を同定して、その免疫学的特徴を明らかにすることを目指すしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、今後炎症性筋疾患の担い手である免疫細胞をその抗原特性に基づいて解析していくことが期待される。臓器障害に直接関与している個々の炎症細胞の特徴を明らかにすることで、自己抗原に対する免疫寛容の破綻の持続化を促し、自己免疫性炎症の機序について理解を深めることができる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, molecular targeted disease modifying drugs have shown to be effective for treating autoimmune diseases such as multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, however this is not currently the case with idiopathic inflammatory myositis(IIM). This may be partly due to the limited understanding in cellular immuno-mechanism of this disease. To investigate the T cell biology of IIM, we have aimed to conduct transcriptome analysis of T cells within the inflamed muscle tissue by collecting these cells using laser microdissection. We have focused on Inclusion Body Myositis which is known to present with CD8 dominant T cell infiltration and found that some of the TCR clone frequency can alter greatly before and after treatment.

研究分野：神経免疫学

キーワード：炎症性筋疾患 T細胞 T細胞受容体 自己免疫疾患 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的製剤が多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫疾患で目覚ましい治療成果を挙げている一方で、特発性炎症性筋疾患ではまだ応用されるに至っていない。筋炎において細胞免疫学的な病態解明が進んでいないことが背景の一つに挙げられ、局所で増加している炎症の担い手として T 細胞の免疫学的解析を行うことは意味があることと考えた。

2. 研究の目的

従来ヒトでは困難であった臓器局所のリンパ球サブセット単位の詳細な細胞免疫学的検討を T 細胞受容体 (TCR) に注目して行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、筋内に CD8 陽性 T リンパ球 (CD8 細胞) 主体の細胞浸潤を認める封入体筋炎に注目し、laser microdissection にて筋内 CD8 細胞を切り出し RNA を抽出を行った。一方で、末梢血単核球 (PBMC) を分離後、FACS にて CD3 陽性細胞ソートし、RNA の抽出を行った。得られた RNA より cDNA を作成し TCR 遺伝子の増幅をおこなった後、次世代シーケンサーで TCR の発現解析を行った。

4. 研究成果

筋内に CD8 陽性 T リンパ球 (CD8 細胞) 主体の細胞浸潤を認める封入体筋炎 (IBM) に注目し CD8 細胞の TCR 解析を試みた。IBM と最終的に臨床診断された筋生検検体より、マイクロトームで切片の切り出しを行い、CD8 細胞炎症局所の CD8 陽性リンパ球を蛍光染色し、LMD で 100 ~ 150 個の CD8 細胞の断片を切り出した (図 1)。

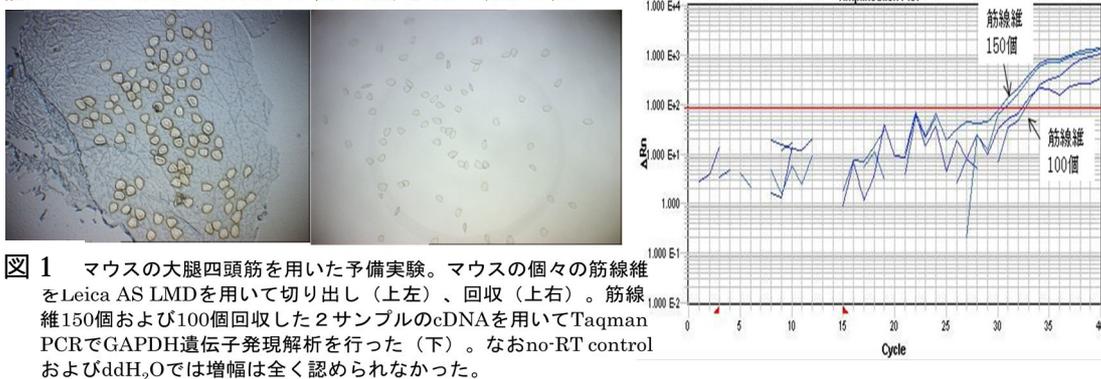


図 1 マウスの大腿四頭筋を用いた予備実験。マウスの個々の筋線維を Leica AS LMD を用いて切り出し (上左)、回収 (上右)。筋線維 150 個および 100 個回収した 2 サンプルの cDNA を用いて Taqman PCR で GAPDH 遺伝子発現解析を行った (下)。なお no-RT control および ddH₂O では増幅は全く認められなかった。

これら断片より RNA の分離を行い Bioanalyser で測定・品質の確認を行ったところ 10 ~ 20 pg/μl の濃度が得られたが、RIN は 1 ~ 3 と分解が進んでおり、トランスクリプトームの解析に用いることが難しいと考えられた。

そこで、まずは PBMC や LMD で切り出す前の凍結組織サンプルで TCR 解析を行う方針に転換した。数 1000 個という微量のリンパ球でも RIN 8 前後の良質な RNA サンプルを得ることが確認され、患者検体では数万個で解析を行っていく方針とした。また、凍結筋組織の細切片より RNA を抽出し、RIN 8 前後を維持できることも確認された。

次に、TCR 解析を行うため、田中真生氏の協力にて SMARTer RACE kit を用いて cDNA を作成し、電気泳動で像副産物を確認後、TCR 遺伝子の C 領域と V 領域に遺伝子特異的なプライマーを設計し、PCR にて増幅をおこなった。その後次世代シーケンサー解析用のライブラリを作成して Miseq でシーケンシングを行った。

次にメソトレキセート関連リンパ増殖症という腫瘍性疾患で、筋に直接 T 細胞浸潤を認める凍結筋組織より RNA を抽出して前述の方法で行ったところ、TCRβ で 90% 以上の頻度を占める単一クローンと、TCRα に 80% 占めるクローンと 10% のクローンが 2 つ確認され、これらの TCR variant を持つ T 細胞クローンが腫瘍性に増殖していることが考えられた (図 2)。

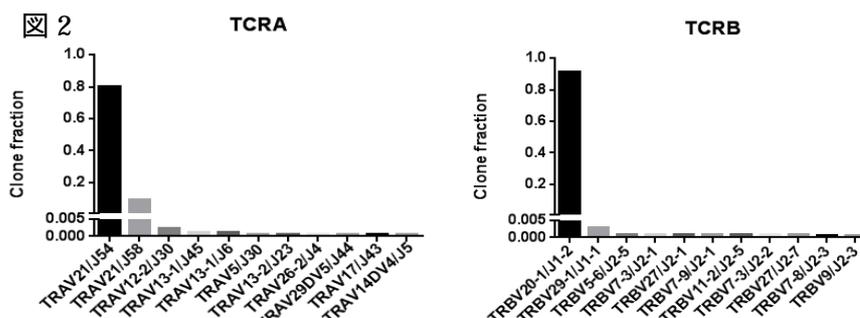
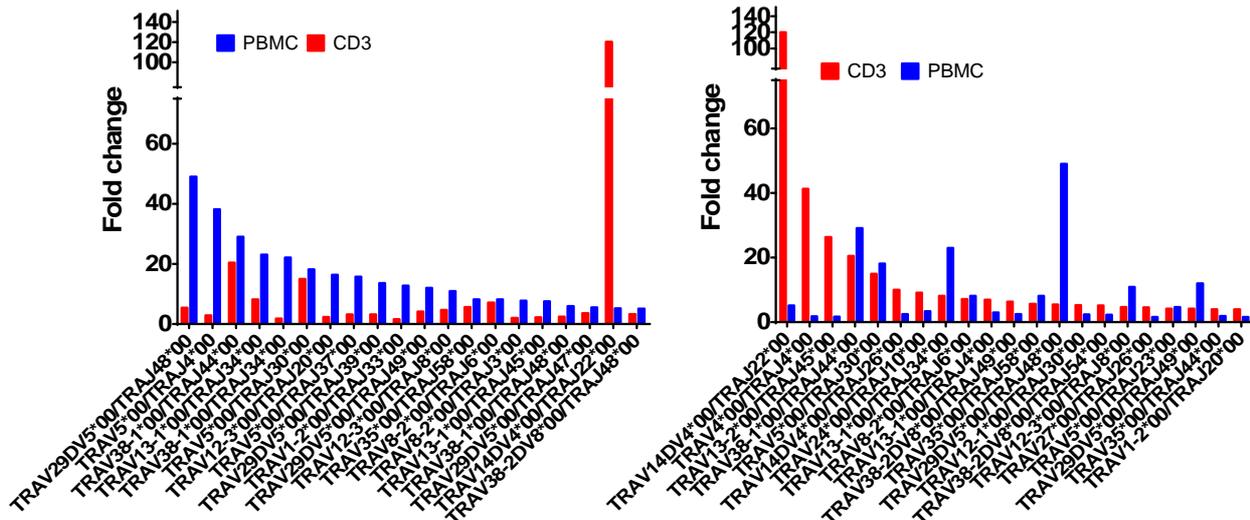


図 2

variant を持つ T 細胞クローンが腫瘍性に増殖していることが考えられた (図 2)。

次に、IBM 患者の PBMC を大量免疫グロブリン療法の前後で分離し、CD3 陽性細胞を FACS ソート行い、治療前後で増減している TCR クローンが、bulk PBMC の TCR を解析した場合と結果が一致するか検討を行った。治療後 2 倍以上増加しているクローンの内 bulk PBMC と CD3 細胞の各々で増加率の高いクローンのレパトアの約 1/10 は一致したが、具体的な増加率や順位については両者間で大きく異なることが多いことが明らかになった。



これらの基礎的検討を通して、数千個という限られた細胞数でも RNA から次世代シーケンサーを用いて T 細胞受容体のレパトア解析を行うことが可能であることを確認した。同じ検体由来であっても bulk の検討と、ソートなどによる選択的細胞抽出による検討では、選択的細胞抽出のほうが頻度 (%) が 2 ~ 10 倍ほど高く検出されており、特に相対的頻度が低い (1% 以下) のクローンについては信頼性の高いデータが得られていると考えられた。

今後筋炎局所における TCR のレパトア解析を始めとし、免疫機能に焦点を当てたトランスクリプトーム解析を進展させる上で、細胞特異的に検討することで感度よく有意義な結果が得られる可能性があるという重要な知見を得ることが出来た。課題としては、LMD 検体の RNA の品質を向上することが挙げられ、LMD 用に切片を固定する方法について今後検討を重ねていく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Morita K, Nakamura F, **Sakuishi K**, Yamamoto T, Shimizu J, Tsuji S, Kurokawa M. Successful management of chronic myeloid leukemia with a complication of anti-SRP antibody-associated myopathy. *Leuk Lymphoma*. 2017 May; 58(5):1242-1245.
2. Singer M, Wang C, Cong L, Marjanovic ND, Kowalczyk MS, Zhang H, Nyman J, **Sakuishi K**, Kurtulus S, Gennert D, Xia J, Kwon JY, Nevin J, Herbst RH, Yanai I, Rozenblatt-Rosen O, Kuchroo VK, Regev A, Anderson AC. A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. *Cell*. 2016 Sep 8; 166(6):1500-1511.
3. Kurtulus S, **Sakuishi K**, Ngiow SF, Joller N, Tan DJ, Teng MWL, Smyth MJ, Kuchroo VK, Anderson AC. TIGIT predominantly regulates response via its effect in regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2015; 125(11); 4053-62.

〔学会発表〕(計2件)

1. Kawasaki R, **Sakuishi K**, Kaneko K, Takahashi T, Hayashi T, Shimizu J, Tsuji S. Single Institutional Study on the Clinical Features of Anti-MOG Antibody-Associated Brain Lesions. XXIII World Congress of Neurology (WCN2017), Kyoto, September 18, 2017.
2. Takahashi A, Shimizu J, Tsuji S, **Sakuishi K**. Clinical Significance of Intrathecal BAFF/APRIL Axis in MS. FOCiS 17th Annual meeting 2017, Chicago, Jun 15, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 真生

ローマ字氏名：Tanaka Masao

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：30774252

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。