

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10228

研究課題名(和文) 尋常性白斑の病態へのHLA-Aの関与とその発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of HLA-A in the pathogenesis of autoimmune vitiligo and regulatory mechanism of HLA-A expression

研究代表者

林 昌浩 (HAYASHI, MASAHIRO)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：30396569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：白斑は皮膚メラノサイトに対する自己免疫疾患であるが、なぜメラノサイトに対する免疫寛容が破綻するのか、その発症メカニズムは明らかにはなっていない。日本人白斑患者を対象にした以前の研究で、白斑の発症リスクに関係する一塩基多型(SNP)が、メラノサイトに対する免疫反応に深く関連するHLA-A近傍にあることが示された。本研究では、発症リスクの高まるSNPを持つ人では持たない人と比較して末梢血リンパ球のHLA-A mRNA発現が比較的高く(P=0.065)、メラノサイト関連抗原がリンパ球表面のHLA-Aにより多く提示されることにより、免疫寛容の破綻と自己免疫反応が起こりやすくなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA-Aは免疫反応に関連する重要な分子の一つで、皮膚メラノサイトに対する自己免疫疾患である白斑において、細胞表面での自己抗原提示・認識に関与することで病態に重要な役割を果たしている。日本人白斑患者を対象にした以前の研究で、白斑の発症リスクに関係する一塩基多型(SNP)が、HLA-A近傍にあることが示された。本研究では、発症リスクの高まるSNPを持つ人では持たない人と比較して末梢血リンパ球のHLA-A mRNA発現が比較的高いことを示され、メラノサイト関連抗原がHLA-Aによって、より多く提示されることにより、免疫寛容の破綻と自己免疫反応の惹起につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vitiligo is an autoimmune disease targeting skin melanocytes. The pathogenesis for vitiligo, including why the immune tolerance to melanocytes is broken or what the risk factor for vitiligo is, is still unclear. Previous study for Japanese patients with vitiligo revealed that the risk of vitiligo is associated with several single nucleotide polymorphisms (SNPs) located near HLA-A, which is closely associated with the immune response to melanocytes. In current study, the expression level of HLA-A mRNA of peripheral lymphocytes was higher in patients with high risk SNP than without these SNPs (P=0.065). This finding suggests that higher level of HLA-A expression on the cell surface of lymphocyte facilitates the recognition of melanocyte related antigen, may lead to the disruption of immune tolerance and development of autoimmune response to melanocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：HLA-A 白斑 発症リスク 一塩基多型 eQTL

1. 研究開始当初の背景

尋常性白斑は皮膚メラノサイトを標的とする自己免疫疾患で、人口の約 1%に発症するとされている比較的一般的な皮膚疾患である。臨床的に、境界明瞭な不整形の大小の脱色素斑(白斑)が全身皮膚に生じる。病因としては、真皮内の CD8 陽性リンパ球がメラノサイトを認識して攻撃し、メラノサイトがアポトーシスを起こすことにより症状が出現する。疫学的に関節リウマチ、自己免疫性甲状腺疾患、エリテマトーデスなど他の自己免疫疾患との合併頻度が高いとされており²⁾、またルーマニアでの血族結婚が多く見られる村で、これらの自己免疫疾患とともに尋常性白斑が高頻度に見られるという報告があり³⁾、遺伝的素因が病態に関与していると考えられているが、いまだに明らかではない。

2010年に米国コロラド大学医学部の Spritz 教授のグループから発表された、白人尋常性白斑の患者を対象とした genome wide association study (GWAS)において、6q21.3に位置する一塩基多型(SNP)が発症リスクに強く関連し、*HLA-A*02:01*と連鎖していることが示された¹⁾。この SNP は *HLA-A* の約 20kb 下流に位置している。*HLA-A*02:01* アレルは tyrosinase などのメラノサイト関連抗原ペプチドを細胞表面に提示することから、メラノサイト・メラノーマ細胞に対する免疫反応に重要な役割を果たすことが知られている。また最近、日本人の尋常性白斑患者を対象した解析でも *HLA-A*02:01* が白斑のリスクに関連していることが同グループから示された⁴⁾。

HLA-A はヒトのほとんどの細胞で発現され、内因性抗原を細胞表面に提示し、CD8 陽性リンパ球に認識されることにより様々な免疫反応に関与する。Tyrosinase、TRP2、MC1R、GP100 等多くのメラノサイト関連抗原が *HLA-A*02:01* でコードされる *HLA-A2* により細胞表面に提示される。このことから、*HLA-A* は尋常性白斑の病態に密接に関連していると考えられる。

研究代表者(林 昌浩)は 2011 年~2015 年の米国コロラド大学医学部の Spritz ラボ在籍中に、白人の尋常性白斑発症リスクに関連する SNP が *HLA-A* アレルだけでなく、血中 *HLA-A* mRNA の発現量にも関連していることを見出した⁵⁾。この SNP を含む約 5kb の領域は多数の転写因子結合部位、ヒストン修飾に富む未知のアクティブな転写調節領域であり、*HLA-A* プロモーター領域とクロマチンループを形成して相互作用し、*HLA-A* mRNA の発現調節に関与していることが示唆される。このことからこの SNP と周囲の転写調節領域は白人において、*HLA-A* アレルを規定するとともに *HLA-A* mRNA 発現を調節することにより、尋常性白斑の病態に関与していると考えられる。

日本人においては尋常性白斑発症リスクに関連する SNP が白人と異なっており⁴⁾、*HLA-A* 下流に位置するこの転写調節領域の機能、意義についても未知である。本研究の目的は、日本人を対象に尋常性白斑発症リスクに基づいた *HLA-A* mRNA の発現量の解析および *HLA-A* 下流の転写調節領域の機能解析を行い、日本人の尋常性白斑の発症リスクと *HLA-A* mRNA 発現量の関係、およびその発現調節機構を明らかにすることである。

2．研究の目的

尋常性白斑は皮膚メラノサイトを標的とする自己免疫疾患であり、近年の Genome wide association study (GWAS) により、いくつかの疾患感受性遺伝子・領域が同定された¹⁾。その一つである HLA-A は、メラノサイト関連抗原ペプチドを細胞表面に提示することにより病態に関与していると考えられているが、詳細については未だに解明されていない。本研究では、尋常性白斑の病態における HLA-A の関与およびその発現調節機構を、分子生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。HLA-A は本研究で対象としている尋常性白斑だけでなく、様々な自己免疫疾患、腫瘍免疫にも関与しているため、この発現調節機構を明らかにすることは、尋常性白斑の発症メカニズムを明らかにするのみならず、免疫学全体にインパクトを与える研究結果であると考えられる。

3．研究の方法

日本人ボランティアの末梢血から genomic DNA を抽出する。その DNA を用いて日本人における尋常性白斑の発症リスクに関与する SNP の genotype を PCR、ダイレクトシーケンスにより決定する。その genotype に基づいて、ハイリスクのホモ接合、ヘテロ接合、非ハイリスクのホモ接合の 3 群に分けて各約 5 人の末梢血から RNA を抽出し、*HLA-A* mRNA を測定する。研究代表者の白人検体を用いた研究結果⁵⁾から、ハイリスク群では *HLA-A* mRNA 発現が高いことが推測される。

次に *HLA-A* mRNA 発現が最も高い人、低い人の genomic DNA から、*HLA-A* 下流にある転写調節領域 (約 6kb) をサブクローニングしてルシフェラーゼアッセイを行い、それぞれのハプロタイプの転写調節活性を測定する。この転写調節領域は転写因子結合部位に富むアクティブな領域であり、塩基配列を明らかにしたのちに転写因子結合部位予測オンラインソフト (TRANSFEC) により、ハイリスク、非ハイリスク由来のハプロタイプ間での相違を見出す。各ハプロタイプ間の予測された転写因子結合部位の違いによって、この領域をいくつかに分割するようにしてサブクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行う。

4．研究成果

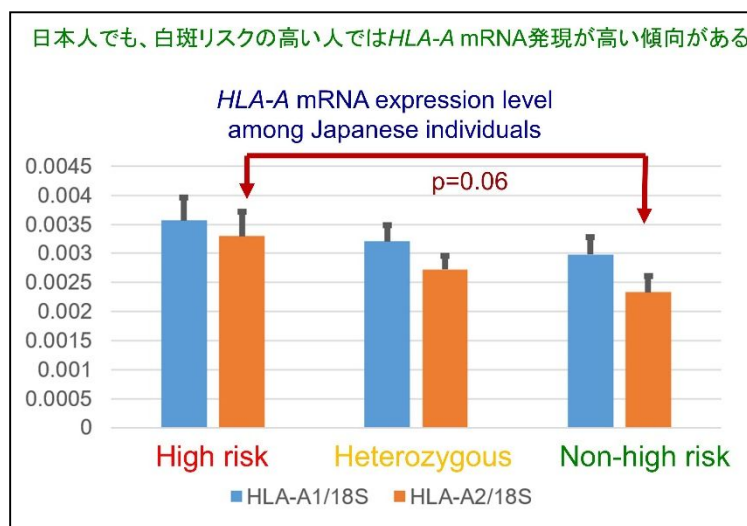
本研究の目的・意義について説明し、書面にて同意された日本人ボランティアから口腔粘膜を採取し、以前報告された、日本人の白斑発症リスクに関連する一塩基多型 (SNP) を調べた。最も発症リスクと関連する SNP である rs3823375 に基づいて、高リスク、非高リスク、高リスク・非高リスクのヘテロ接合、の 3 群に分類した。ボランティアを約 80 名募って、その内訳は高リスク 6 名、非高リスク 9 名、ヘテロ 8 名であった。SNP 周囲に多くの挿入・欠失多型が存在するため、分類不能のボランティアが約 60 人に上った。

次に、白斑発症リスク分類が可能であったボランティアの末梢血を採取し、*HLA-A* mRNA の発現量を定量的 PCR で解析したところ、高リスクでは *HLA-A* mRNA の発現量が高く、ヘテロ接合、非高リスクでは順に発現量が少なかった (下図)。高リスク群と非高リスク群の違いは統計学的に境界領域で有意ではなかったが ($P=0.065$)、一定の傾向が認められた。この SNP は、米国および欧州の複数の研究組織で行っている GTEx (Genotype-Tissue Expression) プロジェクトの、量的形質遺伝子座による発現 (expression Quantitative Trait Locus, eQTL) データベース上

においても、genotype と HLA-A mRNA 発現が関連していた。

統計学的有意差を得るためにボランティアを増やして、新たに検討する予定であったが、新型コロナウイルスの感染拡大に伴いボランティアを募集することが困難となっており、状況を観ながら進めていく。

また、HLA-A mRNA 発現の最も高い・低い人の HLA-A mRNA 発現調節領域を用いた機能解析についても、今後も解析を継続していく予定である。



<文献>

1. Jin Y, Birlea SA, Fain PR et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *New Engl J Med* **362**:1686-1697, 2010
2. Spritz RA. The genetics of vitiligo. *J Invest Dermatol* **131**: E18-20, 2011
3. Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. A Romanian population isolate with high frequency of vitiligo and associated autoimmune diseases. *Arch Dermatol* **144**: 310-316, 2008
4. Jin Y, Hayashi M, Fain PR et al. Major association of vitiligo with HLA-A*02:01 in Japanese. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**: 360-262, 2015
5. Hayashi M, Jin Y, Yorgov D et al. Autoimmune vitiligo is associated with gain-of-function by a transcriptional regulator that elevates expression of HLA-A*02:01 in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 1357-1362, 2016

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hayashi M, Okamura K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Janus kinase inhibitor tofacitinib does not facilitate the repigmentation in mouse model of rhododendrol-induced vitiligo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14879	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Hayashi, Ken Okamura, Yuko Abe, Yutaka Hozumi, Imi Saito, Tamio Suzuki
2. 発表標題 Janus kinase inhibitor tofacitinib does not facilitate the repigmentation in mice model of rhododendrol-induced leukoderma
3. 学会等名 International Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔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	鈴木 民夫 (Suzuki Tamio) (30206502)	山形大学・医学部・教授 (11501)	