

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03683

研究課題名(和文)自己反応性B細胞の単一細胞解析による天疱瘡の病態解明

研究課題名(英文)Elucidating pathophysiology of pemphigus by single cell analysis of auto-reactive B cells

研究代表者

山上 淳(Yamagami, Jun)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80327618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：天疱瘡は、皮膚の角化細胞同士の接着分子であるデスモグレイン(desmoglein; Dsg)に対する自己抗体により、皮膚および粘膜に水疱を生じる自己免疫疾患である。この研究は、天疱瘡において主要な役割を果たすDsg特異的B細胞を、患者から単一細胞レベルで分離して、その構造的・免疫学的特徴の検討を通じて病態を解明し、疾患特異的な治療法の開発につなげることを目的とした。この研究で単一細胞として分離されたDsg特異的B細胞では、非特異的なB細胞と比較して、炎症、B細胞の分化、T細胞との相互作用に関連した遺伝子の発現が上昇していることが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究を通じて、天疱瘡の病態において重要なDsg特異的B細胞の特徴について重要な知見が得られた。今後さらに検証を重ねることで、病勢を鋭敏に反映できる改良された検査系、有害な自己抗体産生機序を標的とした新たな治療法の開発などにつながることを期待される。また最新の技術を駆使して、自己免疫疾患患者から抗原特異的B細胞を単一細胞レベルで分離し、その特徴を検討することによって病態解明を進めることができる、という新たな研究手法の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Pemphigus is an autoimmune disease that causes blistering of the skin and mucous membranes due to autoantibodies against desmoglein (Dsg), an adhesion molecule between keratinocytes in the skin. In this study, Dsg-specific B cells, which play a major role in pemphigus, were isolated from patients at the single-cell level to elucidate the pathogenesis of the disease by examining their structural and immunological characteristics, leading to the development of disease-specific therapies. The results showed that Dsg-specific B cells have elevated expression of genes related to inflammation, B cell differentiation, and interaction with T cells.

研究分野：皮膚科

キーワード：天疱瘡 自己反応性B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天疱瘡は、皮膚の角化細胞同士の接着分子であるデスモグレイン (desmoglein; Dsg) に対する自己抗体により、皮膚および粘膜に水疱を生じる自己免疫疾患である。標的抗原である Dsg の遺伝子がクローニングされた 1990 年代以降、組み換え蛋白を用いた ELISA 法による患者血清における自己抗体の定量やエピトープ解析が行われ、さらに 2000 年代に入ってモデルマウスやファージ提示法から得られた Dsg に対するモノクローナル抗体を用いて、天疱瘡の病態解明が進められてきた。しかし天疱瘡において、どのような特徴をもった自己抗体が、どの程度の多様性をもって存在しており、どのような機序で活性化されることによって発症するのか、という病態に対する根本的な疑問に答えうる研究は未だなされていない。この問題を解決するには、一人の天疱瘡患者において、自己抗体およびその産生元となる自己反応性 B 細胞の特徴の多様性を、定量的に解析することが必要になる。しかし患者内で水疱を起こしているのはポリクローナルな多数の自己抗体であり、その状況を再現する実験系は技術的な困難が大きかった。

この研究では、最新の技術を駆使して天疱瘡患者から Dsg 特異的 B 細胞を単一細胞レベルで分離し、その構造的・免疫学的特徴の検討方法の確立を試みた。研究を始めるにあたって、実際に患者内で起きている病態を常に意識し、単一細胞 (Dsg 特異的 B 細胞) 個体 (天疱瘡患者)

疾患の全体像、とスケールアップして自己反応性 B 細胞のレパトアと特徴の検討を進めることで、天疱瘡の病態解明に有用な情報を集めることを心がけた。

2. 研究の目的

この研究の目的は、天疱瘡患者から Dsg 特異的 B 細胞の単離・クローニングを行い、自己抗体の構造・自己反応性 B 細胞の特徴の検討を通じて天疱瘡の病態を解明し、より疾患特異的な治療法の開発につなげることである。天疱瘡には、標的抗原である Dsg に対する自己抗体のみによって疾患が起きることが既に証明されている点で、他の自己免疫疾患よりも解析に有利な部分がある。その強みを生かして、Dsg に対する反応性を厳しく検討しながら、自己反応性 B 細胞を単一細胞として分離する点に学術的独自性を追求した。

3. 研究の方法

天疱瘡患者からの検体採取

口腔粘膜・皮膚の水疱やびらんなどの典型的な臨床症状、病変皮膚の組織学的検査での棘融解の存在、直接蛍光抗体法で角化細胞表面の IgG 沈着、血清中の Dsg1 または Dsg3 に対する IgG 型自己抗体の存在など、臨床・検査結果に基づいて天疱瘡と診断された患者 23 例、皮膚症状のない健常人 9 例、インフルエンザ HA ワクチン接種後の健常人 5 例から末梢血を収集した。末梢血から単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を分離し、E-tag および His-tag で標識された Dsg1 および Dsg3 の組み換え蛋白またはインフルエンザ HA-His 抗原蛋白を用いて、PBMC 中の抗原特異的 B 細胞を検出した。具体的には、細胞は以下のように定義して分離を進めた; Dsg 特異的メモリー B 細胞 (7AAD-CD19+CD27+IgD-Etag+Histag+)、非 Dsg 特異的メモリー B 細胞 (7AAD-CD19+CD27+IgD-Etag-Histag-)、HA 特異的メモリー B 細胞 (7AAD-CD19+CD27+IgD-Histag+)、非 HA 特異的メモリー B 細胞 (7AAD-CD19+CD27+IgD-Histag-)。

単一細胞 RNA シーケンスとトランスクリプトーム解析

上記の方法で検出されたメモリー B 細胞は、ウェルごとに単一細胞として分離した。SMART-Seq HT を用いて、単一細胞として分離されたメモリー B 細胞由来の mRNA から cDNA が合成された。PCR 法によって増幅された cDNA から、分離されたメモリー B 細胞の B 細胞受容体 (免疫グロブリン) の可変領域の配列を決定し、単一細胞発現クローニングにより Expi293F 細胞で同様の抗原特異性を持つモノクローナル抗体を作製して、Dsg との反応性が確認された。免疫グロブリンの配列データは、Trinity (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>) を用いて de novo アセンブリ解析を行い、抗体配列を再現した。抗体可変領域遺伝子は、IMGT データベース (<http://www.imgt.org>) をリファレンスとして、V, D, J 遺伝子を同定した。アイソタイプは IMGT データベースのサブクラス特異的配列を参照することにより同定した。

また、単一細胞として分離した後に凍結保存したメモリー B 細胞の溶解物に対して、SMART-seq HT キットを用いて逆転写 PCR を行った。各ウェルから得られた cDNA のサイズ分布と濃度は、マイクロチップ電気泳動システム (MultiNA) を用いたキャピラリー電気泳動によって決定された。125 pg の cDNA と Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いて、シーケンスライブラリーを作成し、NovaSeq6000 装置 (Illumina) で配列決定した。配列は、TopHat2 version 2.0.8 と Bowtie2 version 2.1.0 を用いて hg37 reference genome (UCSC) にデフォルトパラメータでマッピングされた。転写産物量は、Cufflinks (version 2.1.1) を用いて推定した。

すべてのヒトのデータは、ヘルシンキ宣言に基づき、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て収集されたものである。患者および健常人のボランティアから、書面によるインフォームドコンセントを得た。

4. 研究成果

Dsg 特異的 B 細胞を検出するため、Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域の C 末端に E-tag と His-tag をつけた組み換え蛋白を使用した。Dsg1 に特異的に結合するモノクローナル抗体 (PF-1-8-15) および Dsg3 に特異的に結合するモノクローナル抗体 (AK23) を表面に発現させた細胞を、それぞれ Dsg1 および Dsg3 の組み換え蛋白と反応させた後に、蛍光標識した抗 E-tag 抗体および抗 His-tag 抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。PF-1-8-15 を発現させた細胞は Dsg1 に結合し、Dsg3 には結合しなかった。一方、AK23 を発現させた細胞は Dsg3 のみに結合し、陰性対照となる細胞は Dsg1 にも Dsg3 にも結合しなかった (図 1)。これらの結果から、Dsg 特異的な B 細胞受容体 (抗体) を発現している細胞をフローサイトメトリーで検出できることが確認された。

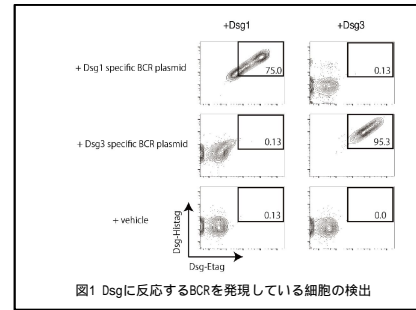


図1 Dsg1に反応するBCRを発現している細胞の検出

次に、このシステムを利用して天疱瘡患者の末梢血から Dsg 特異的 B 細胞を分離できるかを検討した。23 人の天疱瘡患者と 9 人の天疱瘡ではない健康人 (HC) の PBMC を用いて解析を行った。PBMC を B 細胞系マーカー抗体 (CD19+: 全 B 細胞、CD19+IgD+CD27- : ナイブ B 細胞、CD19+IgD-CD27+ : メモリー B 細胞) で染色し、Dsg1 または Dsg3 組み換え蛋白と反応させ、蛍光標識した抗 E-tag と抗 His-tag 抗体で染色した。その結果、血清中に Dsg1 に対する自己抗体を持つ天疱瘡患者 (PF および mcPV) では、Dsg1 特異的 B 細胞数が HC よりも多い傾向が見られた。同様に、Dsg3 特異的 B 細胞の数も、Dsg3 に対する自己抗体を持つ天疱瘡患者 (mcPV および mPV) では HC よりも多かった (図 2)。さらに Dsg 特異的 B 細胞の数は、血清中の Dsg に対する自己抗体価と有意な相関があった (図 3)。

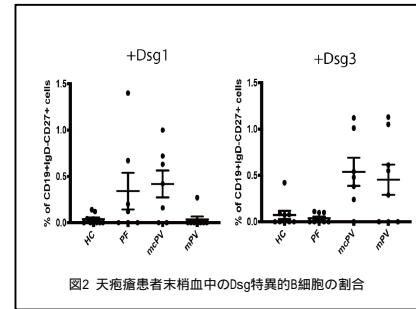


図2 天疱瘡患者末梢血中のDsg特異的B細胞の割合

天疱瘡患者から単一細胞として分離された Dsg 特異的 B 細胞が、Dsg に特異的な抗体を発現していることを確認するために、抗体の重鎖と軽鎖のペアを逆転写 PCR で増幅して抗体発現プラスミドに挿入し、培養細胞に導入した。その細胞を Dsg1 または Dsg3 の組み換え蛋白と反応させ、蛍光標識した抗体で染色してフローサイトメトリーで検出を試みた。PF 患者から分離した 22 個の細胞で抗体の重鎖と軽鎖の両方が検出され、そのうち 18 個 (82%) で Dsg1 組み換え蛋白との反応が確認された (図 4)。また分泌型として作成したモノクローナル抗体は、正常ヒト皮膚を基質として用いた間接蛍光抗体法で表皮細胞表面に反応し、ELISA 法で Dsg1 と反応した (図 5)。これらの結果から、この方法で天疱瘡患者から Dsg 特異的 B 細胞を効率的に検出できることが確かめられた。

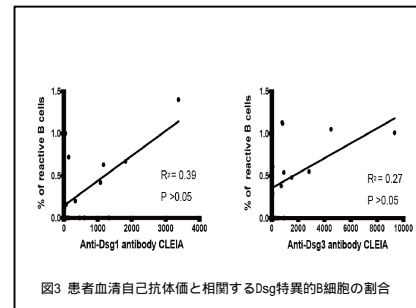


図3 患者血清自己抗体価と相関するDsg特異的B細胞の割合

Dsg 特異的 B 細胞遺伝子の発現パターンを評価するために、治療前の状態で、末梢血中に Dsg 特異的 B 細胞が比較的多く存在する 3 名の天疱瘡患者に注目した。Dsg 特異的 B 細胞 103 個と非 Dsg 特異的 B 細胞 128 個を単一細胞でソーティングし、単一細胞 RNA-seq を実施した。選別された細胞のうち、92 個の Dsg 特異的 B 細胞と 115 個の非 Dsg 特異的 B 細胞が使用された。検出された 10518 個の遺伝子のうち、ヒートマップで示した Dsg 特異的 B 細胞と非 Dsg 特異的 B 細胞とを比較して、253 個が有意な differentially expressed genes (DEGs) ($q < 0.05$) として同定された。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) により、B 細胞やリンパ球の機能と強い関連を示す DEG を選択して検討すると、炎症 (S100A8/A9, C-C motif chemokine ligand 3 [CCL3])、B 細胞の分化 (tissue

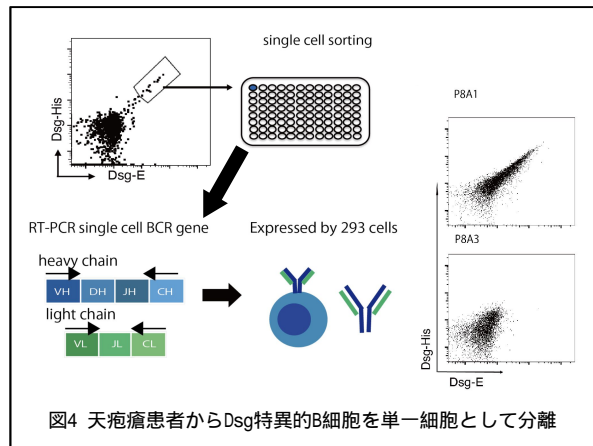


図4 天疱瘡患者からDsg特異的B細胞を単一細胞として分離

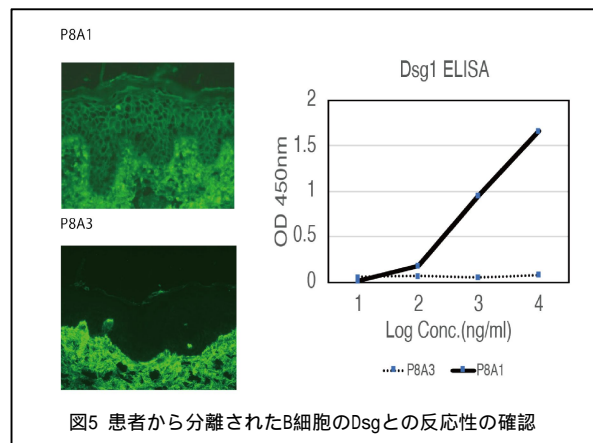


図5 患者から分離されたB細胞のDsgとの反応性の確認

inhibitor matrix metalloproteinase 1、basic leucine zipper ATF-like transcription factor [BATF]、CD9) T細胞との相互作用 (CD137 ligand [CD137L])に関連していた(図6)。一方、他の外来抗原特異的 B 細胞との比較のために、インフルエンザ HA ワクチンを接種した3人の健康なボランティアのインフルエンザ HA に特異的な B 細胞と非 HA 特異的 B 細胞の単一細胞 RNA-seq も実施した。合計で98個の HA 特異的 B 細胞と132個の非 HA 特異的 B 細胞を解析した。検出された9703遺伝子のうち、171遺伝子が HA 特異的 B 細胞で有意な DEGs として同定された。Dsg 特異的 B 細胞の DEG と重なったのは7遺伝子しかなく、IPA で抽出されるパスウェイは重複していなかった(図7)。

以上の結果から、天疱瘡の病態において主要な役割を果たす Dsg 特異的 B 細胞の特徴について重要な知見が得られた。今後さらに検証を重ねることで、病勢を鋭敏に反映できる改良された検査系、有害な自己抗体産生機序を標的とした新たな治療法の開発などにつなげていきたい。

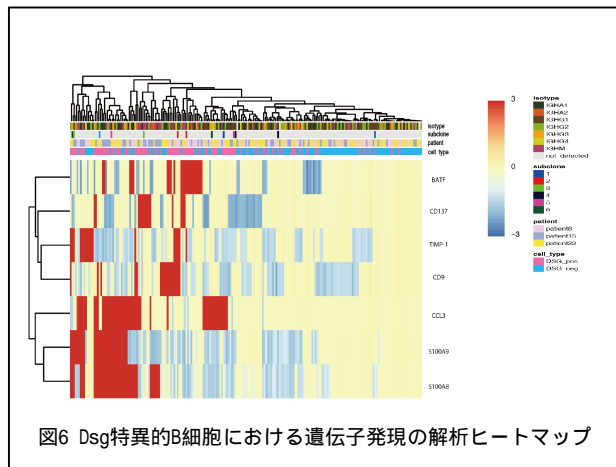


図6 Dsg特異的B細胞における遺伝子発現の解析ヒートマップ

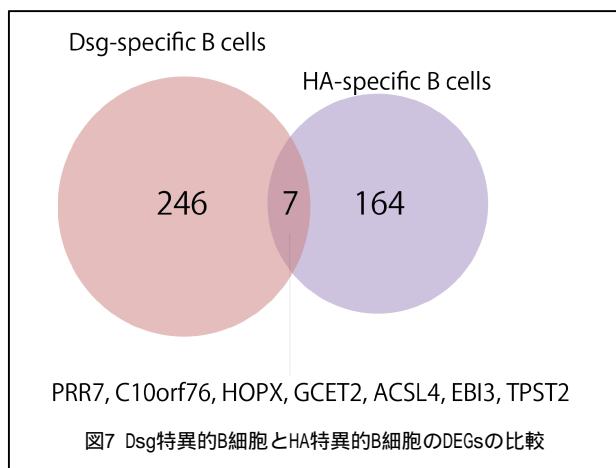


図7 Dsg特異的B細胞とHA特異的B細胞のDEGsの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shohei Egami, Jun Yamagami, Masayuki Amagai	4. 巻 145
2. 論文標題 Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1031-1047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2020.02.013	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 該当する

1. 著者名 Egami S, Suzuki C, Kurihara Y, Yamagami J, Kubo A, Funakoshi T, Nishie W, Matsumura K, Matsushima T, Kawaida M, Sakamoto M, Amagai M	4. 巻 157
2. 論文標題 Neonatal Linear IgA Bullous Dermatitis Mediated by Breast Milk-Borne Maternal IgA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAMA Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1107-1111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1001/jamadermatol.2021.2392	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 -

1. 著者名 Zhao WL, Ishii K, Egami S, Xu Z, Funakoshi T, Takahashi H, Tanikawa A, Ishiko A, Amagai M, Yamagami J	4. 巻 36
2. 論文標題 Analysis of clinical characteristics, prognosis and antibody pathogenicity of pemphigus patients positive for anti-desmoglein IgG autoantibodies in remission: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Eur Acad Dermatol Venereol.	6. 最初と最後の頁 271-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.17770	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 該当する

〔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 Shohei Egami, Takashi Watanabe, Hisashi Nomura, Hayato Takahashi, Jun Yamagami, Osamu Ohara, Masayuki Amagai
2. 発表標題 Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of auto reactive B cells in pemphigus patients
3. 学会等名 44th JSID annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019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	高橋 勇人 (Takahashi Hayato) (40398615)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	
研究分担者	渡辺 貴志 (Watanabe Takashi) (50406815)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 上級研究員 (82401)	

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
---------	---------