

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07990

研究課題名(和文) 多発性硬化症におけるT細胞介在性B細胞活性化機序とその臨床的意義

研究課題名(英文) The mechanism of T cell-mediated B cell activation in multiple sclerosis and its clinical significance

研究代表者

作石 かおり (Sakuishi, Kaori)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：70722685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年B細胞の活性化が多発性硬化症(MS)の病態活性化に関与していると考えられている。本研究ではB細胞を活性化する濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞が疾患活動性に関与すると考え、MS再発時の末梢血単核球からCXCR5陽性CD4陽性CD3細胞を分離して次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。今回の研究で健常者のそれと比較し、TGF- β シグナル伝達関連遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症(MS)の病態機序は均一でなく異質性が存在すると考えられている。治療法に対する反応性も異なり、免疫学的機序を反映した疾患活動性マーカーに基づいた治療アルゴリズムの構築が待たれる。本研究でB細胞の活性化機序の一端を担う濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)においてMS再発時にTGF- β シグナル伝達関連分子の遺伝子発現が亢進していることが明らかになり、Tfh細胞に発現している本分子がMSの一群の免疫学的機序を反映した疾患活動性並びに治療反応性マーカーとなる可能性が考えられ、今後MS治療アルゴリズム構築への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：B cell activation has recently been implicated as a factor incrementing the disease activity of multiple sclerosis. Follicular helper T cell (Tfh) is a cell with high potential in activating B cells. In our research, applying next generation sequencing method, we have analyzed the gene expression profile of Tfh cells sorted by flow cytometry from peripheral blood monocytes of relapsed MS patients. Among the genes significantly up-regulated in Tfh cells of relapsed patients, we found a molecule related to TGF- β signaling pathway as a candidate biomarker involved in promoting MS disease activity.

研究分野：神経免疫学

キーワード：多発性硬化症 濾胞性ヘルパーT細胞 B細胞 遺伝子発現解析

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、再発寛解型多発性硬化症 (RRMS) に対して IFN- β 1a , - β 1b , fingolimod , glatiramer acetate , dimethyl fumarate (DMF) , natalizumab など再燃予防目的の疾患修飾薬 (DMT) が相次いで臨床応用され、病勢コントロールは改善されつつある。一方、多様化した DMT のいずれを用いるべきかについて病態機序に基づいた明確な指標はない。

RRMS における疾患活動性バイオマーカーの同定を困難にしている要因の一つとして、近年 RRMS から分離された視神経脊髄炎に代表されるように、RRMS と臨床診断された中に病態機序が異なる亜型が混在することが挙げられる。病態を反映した疾患活動性マーカーが見出されることで、病態に即した DMT を選択することが可能となり、安全性を維持しながらより高い治療効果を得ることが期待できる。

近年 MS において B 細胞除去療法の有効性が示されつつあるが、効果は一定ではない。T 細胞のみならず B 細胞も MS の病態に寄与していることは明らかであるが、B 細胞系の免疫応答が MS の特異な一群に生じるものか、それとも MS に病態に共通する修飾因子であり特定の炎症の病期で出現してくるものなのか、詳細については不明である。今後どのような患者に B 細胞を標的とした治療が有効であるか免疫学的な検討を進めることは急務であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、発症初期から中枢神経系に B 細胞の活性化所見が認められる RRMS 症例でその後の治療に難渋する傾向があることに着目し、B 細胞の活性化を促す T 細胞機能において MS の病態に特徴的な機序があるのではないかと考え検討した。

3. 研究の方法

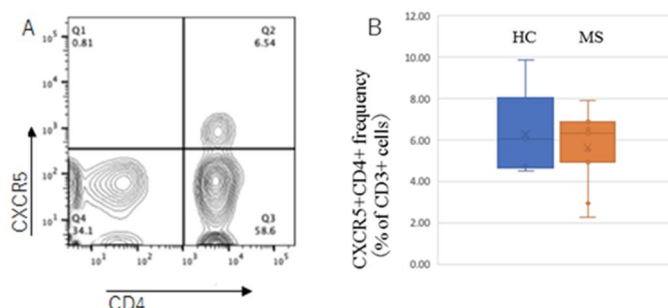
B 細胞の活性化機能が知られている濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) に注目した。健康者 (healthy subject ; HS) 6 名と再発時の MS 患者 13 名の末梢血単核球細胞 (PBMC) より、Tfh 細胞の表面マーカーである CXCR5 を指標とし、CXCR5 陽性 CD4 陽性 CD3 陽性細胞をフローサイトメトリー法で分離した。分離した CXCR5 陽性細胞より total RNA を抽出し、逆転写を行い、次世代シーケンサーを用いて RNA シークエンス法による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

再発時 MS おける Tfh 細胞の頻度の検討

PBMC の FACS 解析にて既報告とは異なり、CXCR5 陽性 CD4 陽性 CD3 陽性細胞の頻度が MS 再発時に増えているということは必ずしも言えないことを確認した (図 1)。

図1 末梢血中のCXCR5陽性CD4陽性CD3陽性細胞の頻度



末梢血中 CXCR5 陽性 Tfh 細胞の微量 total RNA から次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析を行う方法を確立

MS 患者の末梢血より得られる数万個前後の CXCR5 陽性 Tfh 細胞より抽出された 1 ng 以下の微量な RNA から、網羅的解析に耐え得る量と質の cDNA ライブラリーを作成することに成功し、Tfh 細胞のシグネチャー遺伝子である ICOS, CXCR5, Bcl6 の発現が Tfh 細胞として矛盾しないものであることを確認した。

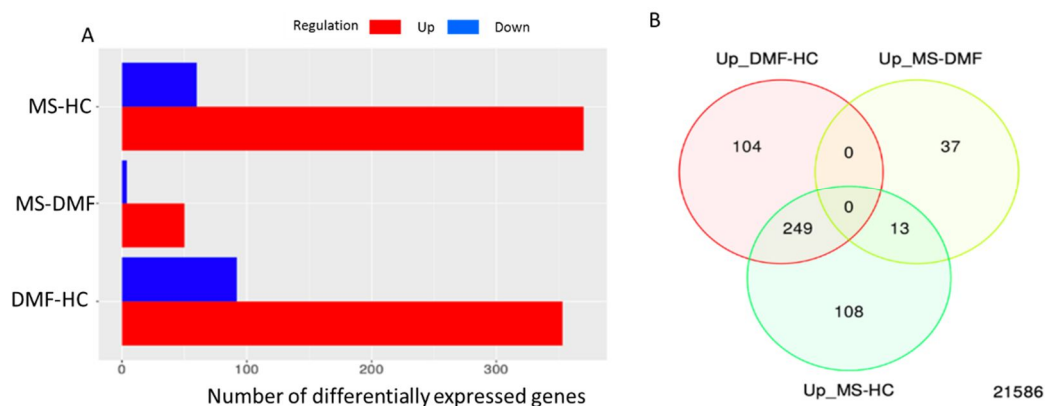
HS vs 再発時 MS の遺伝子発現の差異に注目したパスウェイ解析

HS と MS 再発患者の CXCR5 陽性 T 細胞の発現解析の比較を行い、有意差を認めた発現遺伝子についてパスウェイ解析を行った。「B 細胞の活性化」、「MHC class II」、並びに「微小小胞分泌」の 3 つのパスウェイが上位を占め、これらの機序に關与する遺伝子が Tfh 細胞では再発時 MS に差次的に発現していると考えられた。

HS vs 治療薬フリーの再発患者 vs ジメチルフルマール酸投与下での再発患者の遺伝子発現解析

MS 再発患者を DMF 投与下の患者（「DMF」と記載）5 名と DMF を含めた DMT 非投与下の患者（ここでは「MS」と記載）8 名に分けて各々について HS に比して有意に発現が増加している遺伝子は各々 353 個、357 個あった（図 2A）。この内、両者に共通するものは 249 個あり、これら遺伝子の発現は DMT 投与の有無に関わらず MS 再発時に CXCR5 陽性 T 細胞で亢進していると考えられた（図 2B）。このうち有意確率が上位にある遺伝子を検討したところ、元来、制御性 T 細胞の機能に關わるとされる TGF- β 1 シグナル伝達關連分子が明らかになった。Tfh 細胞において本分子の働きは今までに検討されたことがなく、MS 再燃において特異的な働きをようする可能性が考えられ、今後臨床経過との比較解析を進めることで、MS の病態を反映した疾患活動性マーカーとしての可能性を検討していく。

図2 発現に差異がある遺伝子の数



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 Matsuda K.M., Koguchi A., Toyama T., Sakuishi K., Kobayashi M., Miura S., Miyazaki M., Suga H., Asano Y., Toda T., Sato S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Concurrence of polyarteritis nodosa and multiple sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.16107	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 Kurihara Masanori, Sasaki Takuya, Sakuishi Kaori, Terao Yasuo, Murakawa Tomohiro, Shinozaki-Ushiku Aya, Okada Satoshi, Toda Tatsushi, Tsuji Shoji	4. 巻 410
2. 論文標題 Isolated seizure as initial presentation of GABAA receptor antibody-associated encephalitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2020.116666	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 Kawai Mizuho, Mano Tatsuo, Naito Tatsuhiko, Honda Akira, Nakai Yudai, Toyama Kazuhiro, Fujioka Yosei, Makise Norihiro, Hasegawa Hirotaka, Sakuishi Kaori, Kurokawa Mineo, Toda Tatsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Disseminated necrotizing leukoencephalopathy after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and methotrexate administration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 155 ~ 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ncn3.12466	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 作石かおり	4. 巻 79(10)
2. 論文標題 再発寛解型多発性硬化症の急性増悪期の治療と予後予測因子	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1567-1571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 作石かおり	4. 巻 80(増刊号5)
2. 論文標題 MSの臨床・検査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 144-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ayako Koguchi, Ryosuke Yusa, Tatsushi Toda, Kaori Sakuishi
2. 発表標題 GFAP distinguishes active AQP4-NMO/SD from other inflammatory spinal cord lesions but does not correlated with MRI lesion load
3. 学会等名 FOCIS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Reiko Kawasaki, Toshiyuki Kakumoto, Kaori Sakuishi, Tatsushi Toda
2. 発表標題 Clinical Significance of intrathecal single clonal immunoglobulin band in MS and related disorders
3. 学会等名 日本神経免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aya Koguchi, Manato Hara, Hirokazu Uchigami, Nanako Yamaguchi, Kenichiro Sato, Kaori Sakuishi, Tatsushi Toda
2. 発表標題 Effect of artificial reproductive technology on relapsing-remitting multiple sclerosis
3. 学会等名 日本神経学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小口絢子, 川崎怜子, 高橋利幸, 作石かおり, 戸田達史
2. 発表標題 当院における抗MOG抗体関連疾患の10症例の診断経緯及び臨床的特徴
3. 学会等名 日本神経学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小口絢子, 川崎怜子, 長島優, 山本知孝, 作石かおり, 戸田達史
2. 発表標題 再発寛解型多発硬化症に対するNatalizumab使用例におけるPMLリスクの検討
3. 学会等名 日本神経学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎怜子, 小口絢子, 作石かおり, 戸田達史
2. 発表標題 多発性硬化症におけるステロイドパルス療法後の肝障害の臨床的特徴
3. 学会等名 日本神経学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎怜子, 小口絢子, 作石かおり, 戸田達史
2. 発表標題 神経症状から診断に至る悪性リンパ腫の臨床的特徴と髄液IL-10の有用性に関する検討
3. 学会等名 日本神経免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村悠弥子, 馬場悠輔, 秋場健史, 越川浩明, 三枝亜紀, 栗田正, 作石かおり
2. 発表標題 Preclinical lupusを疑う血清学的異常を背景にCOVID-19ワクチン接種後に視床病変を呈した一症例
3. 学会等名 日本神経免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村悠弥子, 馬場悠輔, 秋場健史, 越川浩明, 三枝亜希, 栗田正, 作石かおり
2. 発表標題 急性散在性脳脊髄炎の経過を呈し広範な脊髄病変を示唆する感覚自律神経障害を認めた抗MOG抗体関連疾患の32歳男性例
3. 学会等名 日本神経学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2022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
研究協力者	小口 絢子 (Koguchi Ayako)	東京大学・脳神経内科・大学院生 (12601)	
研究協力者	川崎 怜子 (Kawasaki Reiko)	東京大学・脳神経内科・大学院生 (12601)	

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