

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22763

研究課題名（和文）重症筋無力症患者における抗原特異的B細胞の探索

研究課題名（英文）Detection of pathogenic B cells in myasthenia gravis patients

研究代表者

高田 和城（Takata, Kazuhiro）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20573223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は重症筋無力症の約80%で存在するアセチルコリン受容体抗体が陽性である患者の内、これらの抗体を産生するB細胞の存在が示唆されている胸腺腫の手術検体を用いて、抗体産生細胞の分離・解析を行うことを目的としている。これまで胸腺中のB細胞の機能解析のための胸腺腫摘出標本からのFACSを用いたsingle cell sortingおよびRNAシーケンスを行うための手術サンプルの処理、RNAシーケンスに至る一連の実験手法の確立を行うことができ、試験的に4例を行い、採取したB細胞の解析で胸腺腫中に分化成熟したB細胞が存在していることを確認し、引き続き発現マーカーの解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症筋無力症は眼周囲や四肢の筋力低下をきたす自己免疫疾患である。今回のデータより抗原特異的な抗体産生B細胞の分化・成熟は胸腺腫中で行われていることが示唆され、ひきつづき確立した実験手技や今回のデータの解析を進めることにより病原性を有する抗原特異的なB細胞の分離およびその機能の解析を行うことができ、抗原特異的抗体産生B細胞をターゲットとした、従来の治療法の免疫全体を抑えるステロイド療法や免疫抑制剤、あるいは非常に高価な抗体療法と異なったより有用な治療法の開発につながる可能性がある

研究成果の概要（英文）：To separate pathogenic anti-acetylcholine receptor antibody producing B cells in thymoma samples from patients of myasthenia gravis, we established experimental methods of single cell RNA sequence analysis from thymoma samples and conducted pilot studies of four thymoma samples from thymoma positive myasthenia gravis patients. Our preliminary data showed increase of activated B cells in germinal centers and existence of B cells at different maturation stages. We continue to analyze the expression profile of B cells in thymoma from myasthenia gravis patients

研究分野：脳神経内科

キーワード：重症筋無力症 B細胞

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症(Myasthenia Gravis: MG)は神経筋接合部の抗原に対する血液中の病原性を有する抗体による自己免疫疾患である。全身の易疲労感や重症患者では呼吸不全をきたし、人工呼吸管理が必要となることがある。そのため、広範囲の免疫を抑制するステロイド剤や免疫抑制剤などが用いられており、新規に補体をターゲットとする治療法も用いられ始めているが非常に高価な抗体療法であり、新規治療法が求められている。本邦で報告されるMG患者の約80%はアセチルコリン受容体(Acetylcholine receptor :AchR)に対する抗体を有することが知られている。血清からの抗AchR抗体の検出は広く行われているが、抗体産生細胞の分化・成熟や機能の解析については抗体産生細胞の分離が非常に困難であるためほとんど行われていない。

先行研究ではMG患者の内、胸腺腫を有する抗AchR抗体陽性患者では胸腺腫中で病原性を有する抗体を産生するB細胞の分化、成熟が行われていることが示唆されている。

病原性抗体を産生するB細胞の解析はこれまでなされておらず、これらの解析は新たな治療法に結び付く可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では抗アセチルコリン受容体抗体陽性患者の内、胸腺腫を有する患者の胸腺摘出サンプルを用いて、single cell sortingを行うことにより重症筋無力症患者由来胸腺腫に特徴的な分子の検索を行い、最終的には病原性を有する抗AchR抗体を産生するB細胞の分離・解析をおこなうことである。抗AchR抗体産生B細胞のレパトア解析によりB細胞の成熟課程の解析を行うことができるため、末梢血単核球のレパトア解析と合わせ抗AchR抗体産生B細胞の成熟機序の解析を行うことができる。また重症筋無力症患者由来の胸腺腫のB細胞のRNAシーケンスをおこなうことにより抗AchR抗体産生B細胞の発現プロファイルの特徴を明らかにし、新たな治療ターゲットにつなげていくことを目的としている。

3. 研究の方法

重症筋無力症患者の内、胸腺腫を有する患者において、胸腺摘出術のサンプルを採取。機械的に破碎し、リンパ球を回収した。各種マーカーで免疫染色を行いFACSを用いて、single cell sortingを行いそれぞれの細胞のcDNAライブラリーを作成しRNAシーケンスを行った。

4. 研究成果

重症筋無力症患者4例の胸腺のサンプルよりB細胞をはじめとした細胞のsingle cell sortingを行い、網羅的な細胞の発現プロファイルの解析を行い、サンプルの処理、細胞の分離およびcDNAライブラリーの作成、RNAシーケンス、データ解析までが適切に行われていることを確認した。

採取したB細胞の解析ではgerminal centerを構成する細胞の増加を認め、naïve B cellからmemory B cell, plasmablastまでのB細胞を認め、B細胞自体の分化・成熟は比較的行われていると考えられた (Figure 1.)。

またpreliminaryなデータではあるが末梢血B細胞と比較し胸腺腫中では成熟B細胞の

比率が増加しており、末梢と比較し胸腺腫中でより積極的な抗原提示が行われていることが示唆された。

現在、今回得られたサンプルでの RNA シークエンスを行い、重症筋無力症患者で特異的に発現している分子発現プロファイルの解析を行っており、得られるデータより重症筋無力症患者で特異的に発現している表現マーカーがあれば、それをもとにした single cell sorting を行い抗アセチルコリン受容体抗体産生 B 細胞の分離およびその成熟課程の解析を継続していく方針である。

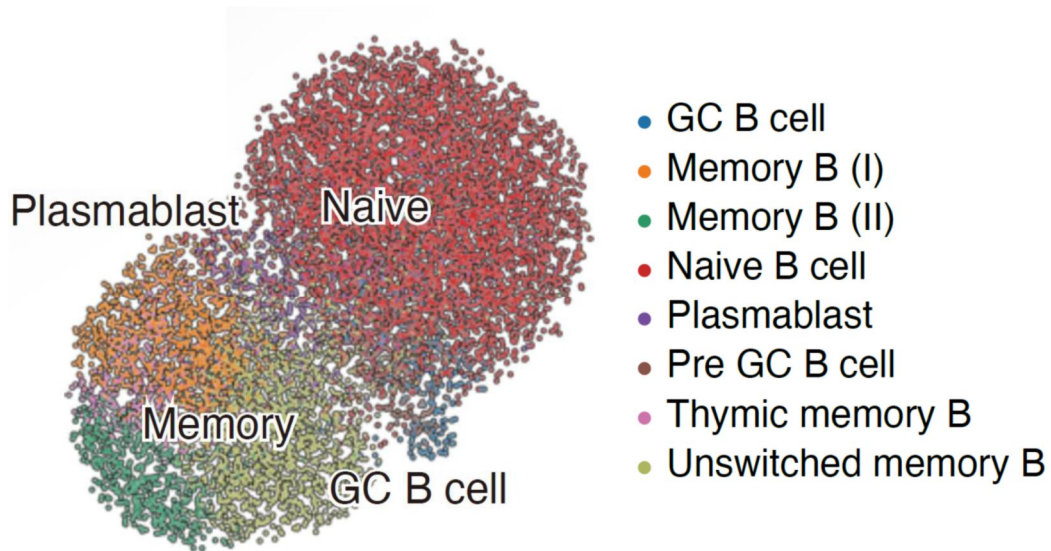


Figure 1. UMAP for B cell clusters of thymoma

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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