

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16417

研究課題名（和文）単一細胞解析を用いたバセドウ病における自己反応性T細胞の解明

研究課題名（英文）To clarify the autoreactive T cells in Graves' Disease using single cell analysis

研究代表者

橋本 善隆（Hashimoto, Yoshitaka）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：70806140

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）：バセドウ病におけるTSH受容体由来抗原ペプチドに反応するT細胞を同定し、そのTCR配列発現遺伝子及び細胞表面マーカーを明らかにすることを目的として検討を実施した。Basedow病患者から採取したPBMCを用いてシングルセルシーケンスを実施した。TSH受容体LGR3のオーバーラップペプチドで刺激した際に各種T細胞で有意な変化を認めた。TCRレパートリー解析では、全細胞、Memory CD4 T-cell、Memory CD8 T-cell、T-regにおいて、TRAではTRAV29/DV5/ TRAJ42、TRBではTRBV10-3/ TRBJ2-1のペアが頻りに観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バセドウ病の病態の中核は甲状腺刺激ホルモン（TSH）受容体を刺激する自己抗体の産生であるが、これに関与する自己反応性T細胞の同定が不十分であるため、TSH受容体由来抗原ペプチドに反応するT細胞を同定し、そのTCR配列発現遺伝子及び細胞表面マーカーを明らかにすることを目的として検討をした結果、関連するTCR配列発現遺伝子及び細胞表面マーカーを明らかにすることができた。今後は今回の結果をもとにバセドウ病の早期発見や新たな創薬開発に繋げていくことが可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to identify T cells that respond to TSH receptor-derived antigen peptides in Graves' disease and to determine their TCR sequence expression genes and cell surface markers. Single cell sequencing was performed on PBMCs from patients with Graves' disease. We found the significant changes were observed in T cell. Moreover, according to the TCR repertoire analysis, we found that TRAV29/DV5/ TRAJ42 in TRA and TRBV10-3/ TRBJ2-1 pairs in TRB were frequently observed in all cells, Memory CD4 T-cells, Memory CD8 T-cells and T-reg.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：バセドウ病 T細胞 TCR配列 単一細胞解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バセドウ病は、抗甲状腺薬による内科的治療などがあるが、無顆粒球症や重篤な肝障害といった副作用での死亡例もあり、より安全な治療薬の開発が望まれる。この目的を達成するためにもバセドウ病の中心的病態である自己免疫の解明が必要である。バセドウ病の病態の中核は**甲状腺刺激ホルモン(TSH)受容体を刺激する自己抗体の産生であるが、これに関与する自己反応性 T 細胞の同定が不十分**である。このアンメットニーズを解消するため、本研究ではバセドウ病患者の甲状腺組織および末梢血の T 細胞を分取し、TSH 受容体由来自己抗原で刺激し、活性状態及び T 細胞受容体配列からバセドウ病の病態の中心となる**自己反応性 T 細胞を単一細胞解析により同定**することを目的とする。本申請により、長年期待されていたバセドウ病の自己免疫反応の病態解明が単一細胞レベルで可能となり、自己反応性 T 細胞を標的とする新たなバセドウ病の治療法の創出によるバセドウ病の根治をめざすことが可能であると考えた。

2. 研究の目的

TSH 受容体由来抗原ペプチドに反応する T 細胞を同定し、その TCR 配列発現遺伝子及び細胞表面マーカーを明らかにする。

3. 研究の方法

PBMC の抽出およびオーバーラップペプチドによる刺激

Basedow 病に対して甲状腺全摘術を実施した 8 患者から手術 3-7 日前に採取した 10mL の末梢血を CPT チューブ (BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube, BD BioSciences, San Jose, CA) に採取し、PBMC を抽出した。その後、5% ヒト AB 血清を含む RPMI を用いて、各群から 5000 個の PBMC を 96 ウェルプレートに播種した。

次に対照 (NC) 群は滅菌 PBS で、TSH 受容体 Lgr3 のオーバーラップペプチドで刺激した群 (Lgr3 群) は PepTivator® Lgr3 で、別のウェルで、0.6nmol/mL の濃度で培養し、プレートを CO₂ インキュベーター内で 37°C で 2 時間インキュベートした。

単一細胞解析

PBMC は事前にソートせず、全 PBMC をシングルセルシーケンス解析に使用した。細胞は、BD Rhapsody Human single-cell multiplexing kit と、主要なヒト免疫マーカーに対する AbSeq 抗体 (BD Rhapsody Immune Response Panel) を用いて、特定のサンプルタグで標識した。この標識プロセスは、氷上で 30 分間行った。十分な洗浄後、異なるサンプル・タグを持つ細胞を等しい割合で組み合わせ、最大 20,000 個の細胞を BD Rhapsody カートリッジにロードした。

シングルセル・キャプチャーと cDNA ライブラリー調製は、BD Biosciences 社の BDRhapsody Express シングルセル解析システムを用いて行った。免疫プロファイル (TTA)、全トランスクリプトーム (WTA)、30 の免疫細胞関連表面抗原をターゲットとした Ab タグ付きインデックス配列、および複数のサンプルタグをターゲットとした単一細胞トランスクリプトームについては、BD Rhapsody TTA および WTA 増幅キットを用いライブラリーを調製した。

mRNA 標的ライブラリーには、ヒト免疫細胞で一般的に発現する 397 遺伝子を標的としたプライマーペアを含む BD Rhapsody™ 免疫応答パネルを利用した。シーケンシングは Illumina HiSeq 6000 プラットフォーム (Novogene 社) で行った。得られた FASTQ シーケンスファイルは BD Rhapsody Analysis Pipeline v1.10.1 を用いて解析し、発現マトリックスを作成した。

シーケンスデータから得られた FASTQ ファイルは、BD Biosciences が提供するソフトウェアツール BD Rhapsody Targeted Analysis Pipeline with V(D)J processing を用いて、Seven Bridges Platform (<https://www.sevenbridges.com/d>) 上で処理した。

まず、リードの長さ、平均塩基品質スコア、最も高い塩基頻度などの基準に基づいて、低品質のリードペアをフィルターにかけた。その後、高品質の R1 リードを解析し、細胞ラベルとユニーク分子識別子 (UMI) 配列を同定した。高品質の R2 リードは、Bowtie2 プログラムを用いて、参照パネル配列および International ImMunoGeneTics Information System (IMGT.org) から入手した TCR および BCR 遺伝子セグメントにアライメントした。CDR3 領域は IGBLAST を用いて決定した。同一のセルラベル、UMI 配列、遺伝子を持つリードは 1 分子とした。得られた分子数は、BD Biosciences 社が開発したアルゴリズムを用いてエラー補正を行った。

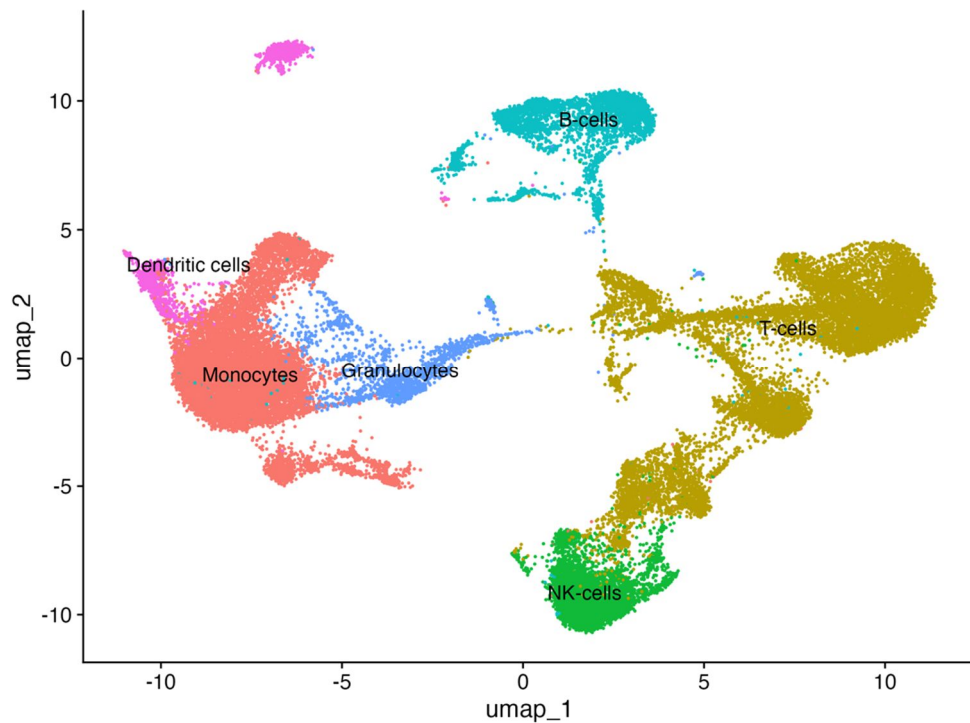
Rhapsody パイプラインによって生成された DBEC 調整済み分子数データは、Seurat でクオリティコントロール後、33627 細胞を解析対象とした。

4. 研究成果

バセドウ病患者の PBMC 細胞に対し、UMAP 解析を用いて次元削減を行い、各クラスターの

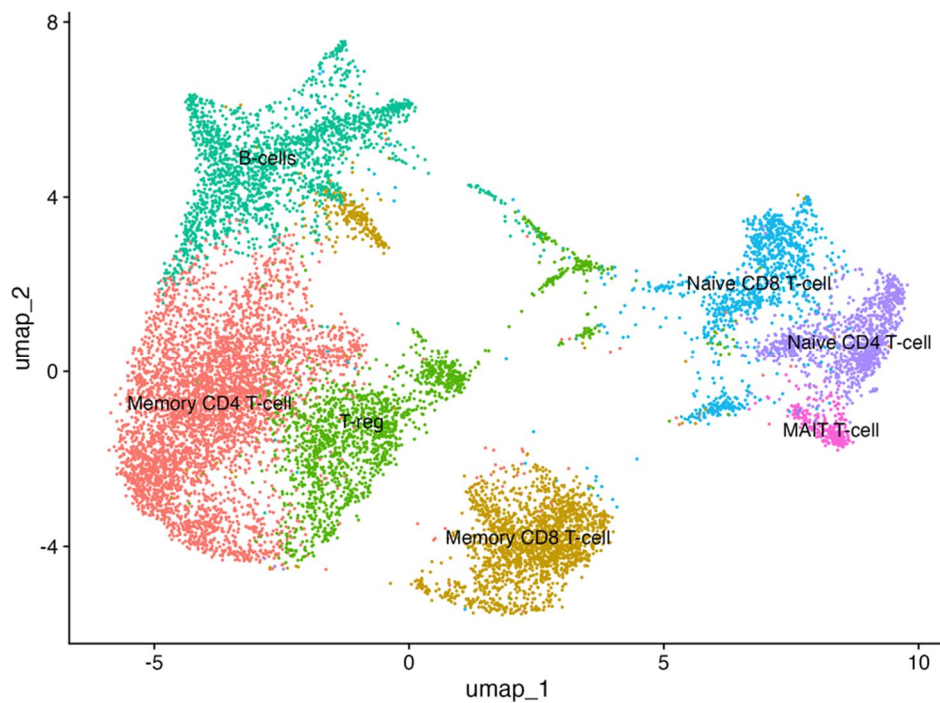
発現遺伝子top10を抽出し、The Human Protein Atlasを参考に細胞種を決定した(図1)。

図1. 全PBMCのUMAP解析



次に T cell のみ抽出し再度クラスタリングを実施した(図2)。

図2. T細胞のUMAP解析



上記により Memory CD4 T-cell、Memory CD8 T-cell、Naive CD4 T-cell、Naive CD8 T-cell、T-reg を同定した。

LGR3群では、NC群と比較して、Naive CD4 T-cell で GZMK、T-reg で GNLY、GZMB、GZMH、IL4、IL32、IFNG、Memory CD4 T-cell と Naive CD8 T-cell で IL4 が有意に高く、Memory CD8 T-cell で IL32、T-reg で IL6 が有意に低かった。

また、TCR レポートリー解析では、全細胞、Memory CD4 T-cell、Memory CD8 T-cell、T-reg において、TRA では TRAV29/DV5/TRAJ42、TRB では TRBV10-3/TRBJ2-1 のペアが頻繁に観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷲見まどか、橋本善隆、他
2. 発表標題 シングルセル・空間的トランスクリプトーム解析を用いたバセドウ病における 自己反応性T細胞の同定
3. 学会等名 第97回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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