

GLIPH 法による多発性硬化症特異的 T 細胞受容体の同定とその意義

研究分担者：吉良 潤一	九州大学大学院医学研究院神経内科学 福岡中央病院脳神経センター脳神経内科 国際医療福祉大学トランスレーショナルニューロサイエンスセンター
共同研究者：林 史恵 磯部 紀子 Jacob Glanville	九州大学大学院医学研究院神経内科学 九州大学大学院医学研究院神経内科学 Computational and Systems Immunology Program, Stanford University School of Medicine, US
松下 拓也 Guzailiayi Maimaitijiang	九州大学大学院医学研究院神経内科学 国際医療福祉大学トランスレーショナルニューロサイエンスセンター
福元 尚子	九州大学大学院医学研究院神経内科学
渡邊 充	九州大学大学院医学研究院神経内科学
眞崎 勝久	九州大学大学院医学研究院神経内科学

研究要旨

多発性硬化症 (MS) の病態に関連する T 細胞受容体 (TCR) の特徴を明らかにすること、さらに MS リスクアレルに関連して MS に特徴的な TCR ならびに標的抗原を同定することを目的として、TCR のレパトア解析を行った。39 人の MS 患者と 19 人の健常者から末梢血単核細胞を採取し、TCR α 鎖、 β 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖のレパトアについて次世代シーケンシングを行い、TCR レパトアの多様性、各 V 遺伝子や J 遺伝子の使用頻度を分析した。次に、MS 群に特徴的な TCR を同定するため、新規クラスタリング法である GLIPH (Grouping of Lymphocyte Interactions by Paratope Hotspots) を用いて、MS 群と健常者群で TCR β 鎖のレパトアを比較した。結果、TCR の多様性が全鎖で加齢とともに低下すること、TCR α 鎖と β 鎖の多様性が健常者と比較して MS 患者で有意に高いこと、*TRAJ56* と *TRBV4-3* の使用頻度が MS 群で有意に高いことが示唆された。GLIPH 解析の結果 MS 患者群に特徴的な 2 個の TCR クラスタが同定され、そのうちの 1 個は *TRBV4-3* を有し、CMV のペプチドを認識する TCR であり、これを CMV-TCR と命名した。CMV-TCR 陽性患者では、CMV-TCR 陰性患者と比較して MS severity score (MSSS) が有意に低下していた ($p = 0.037$)。

続いて、追加コホート (MS 患者 113 人、健常者 93 人) のサイトメガロウイルス (CMV) 抗体を測定し、フローサイトメトリーを用いて CD4 陽性 T 細胞に占める制御性 T 細胞の割合を測定した。その結果、*HLA-DRB1*04:05* 陽性群では、CMV 抗体が陽性であることと MSSS が低いことが有意に関連していた ($p = 0.0053$) が、*HLA-DRB1*04:05* 陰性群では関連性が見られなかった。*HLA-DRB1*04:05* 陽性群では *HLA-DRB1*04:05* 陰性群と比較して CMV 抗体価が高かった ($p = 0.017$)。CMV 抗体陽性患者では CMV 抗体陰性患者と比較して制御性 T 細胞の割合が高い傾向にあった ($p = 0.054$)。

以上から、*HLA-DRB1*04:05* 陽性 MS 患者では CMV が保護的な役割を果たすことが示唆された。

A. 研究目的

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は遺伝的要因と環境要因が病態で重要な役割を担う炎症性脱髄性疾患である¹。ヒト白血球抗原 (*human leukocyte antigen; HLA*) クラス II 領域は MS の感受性に最も強い遺伝的影響を与え、日本人 MS 患者では *HLA-DRB1*15:01* と *HLA-DRB1*04:05* が頻度の高いリスクアレルである²。*HLA* の違いにより病態が違ふことが知られており、*HLA-DRB1*04:05*

を有する日本人 MS 患者では病態進行の程度が緩やかであると報告されている^{2,3}。

1980 年代から、MS の T 細胞が認識する標的抗原を探索する多くの研究が行われてきたが⁴、未だに明確な標的抗原は同定されていない。2009 年以降、免疫レパトアの高性能配列シーケンシングが可能になり、高度なバイオインフォマティクス手法を用いたレパトア研究が発展した⁵。最近開発された Grouping of Lymphocyte Interactions by

Paratope Hotspots (GLIPH) は、T細胞受容体 (T cell receptor; TCR) の配列類似性の他、V遺伝子の使用頻度、CDR3の長さ、クローン性増殖、保有するHLAアレル等の多因子をもとにTCRクラスタリングを行い、抗原特異的TCRを高精度に予測することができる画期的解析手法である⁶。

本研究では多発性硬化症に特徴的なTCRならびに標的抗原を同定することを目的とする。

B. 研究方法

39人のMS患者と19人の健常者から末梢血単核細胞を採取した。TCR α 鎖、 β 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖のレパトアの次世代シーケンシングを行い、TCRレパトアの多様性、各V遺伝子やJ遺伝子の頻度を分析した⁷⁾。続いてMS群に特徴的なT細胞受容体を同定するため、新規クラスタリング法であるGLIPH⁶⁾を用いて、MS群と健常者群でTCR β 鎖のレパトアを比較した。追加コホート (MS患者113人、健常者93人) も含め、血清サイトメガロウィルス (CMV) 抗体を測定した。フローサイトメトリーを用いて末梢血CD4陽性T細胞に占める制御性T細胞の割合 (Treg%) を測定した。

(倫理面への配慮)

臨床、倫理の両側面について、九州大学で倫理委員会の倫理審査にかけ、承認された。

C. 研究結果

TCRの多様性は、健常者でもMS患者でも α 鎖、 β 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖の全てで加齢とともに低下した。TCR α 鎖と β 鎖の多様性は健常者と比較してMS患者で有意に高く (それぞれ $p = 0.0015$ 、 $p = 0.024$)、年齢で補正しても同様の結果であった。MS患者群では健常者群と比較して、*TRAJ56* と *TRBV4-3* の使用が有意に多かった (それぞれ $p^{corr} = 0.027$ 、 $p^{corr} = 0.040$)。

MS患者群全体で見られた208,674種類のTCRに対しGLIPH法を用いてクラスタリング解析を行い、1,294個の候補クラスターを同定した。さらにその中から日本人MSの発症リスクに関わるHLA-DRB1*04:05アレルと、HLA-DRB1*15:01アレルのいずれか一方のアレルを有するMS患者に特に多く見られるクラスターに注目したところ、HLA-DRB1*04:05陽性MS患者群に特徴的な2個のTCRクラスターが同定された。そのうちの1個は*TRBV4-3*を有し、CMVのペプチドを認識するTCRであり、これをCMV-TCRと命名した。CMV-TCR陽性患者では、CMV-TCR陰性患者と比較してMS severity score (MSSS) が有意に低下していた ($p = 0.037$)。一般にHLA-DRB1*04:05陽性MSでは他アレルを有するMSと比べて軽症であることが報告さ

れていることから³、HLA-DRB1*04:05陽性MS患者に限って比較したが、同様にCMV-TCR陽性患者ではCMV-TCR陰性患者よりもMSSSが有意に低かった ($p = 0.042$)。追加コホートにおいて、CMV抗体陽性MS群でCMV抗体陰性MSに比べ、MSSSが有意に低かった ($p = 0.046$)。このCMV抗体陽性であるとMSSSが低いという違いは、特にHLA-DRB1*04:05陽性MSにおいて顕著で ($p = 0.0053$)、HLA-DRB1*04:05陰性MS群では見られなかった。疾患の有無に関わらず、HLA-DRB1*04:05陽性者では、HLA-DRB1*04:05陰性者よりもCMV抗体価が高かった ($p = 0.017$)。CMV抗体陽性患者ではCMV抗体陰性患者と比較してTreg%が高い傾向にあった ($p = 0.054$)。健常者群と比較して、MS群全体、あるいは、HLA-DRB1*04:05陰性CMV抗体陰性群では、Treg%が有意に低下していた (それぞれ $p = 0.0055$ 、 $p = 0.022$) が、HLA-DRB1*04:05陽性CMV抗体陽性群ではTreg%の低下は軽度で、健常者群との有意差は見られなかった。

D. 考察

加齢に伴いTCRレパトアの多様性が減少する理由として、i) 胸腺の老化による胸腺からのナイーブT細胞の供給量の減少、ii) テロメアの短縮によるナイーブT細胞の数の減少、iii) 加齢に伴うDNA損傷によるナイーブT細胞の数の減少、などが考えられる⁷⁻⁹。TCR α 鎖/ β 鎖/ δ 鎖/ γ 鎖の多様性が、疾患の有無にかかわらず加齢に伴って変化するという知見が得られたことで、MSでTCRの多様性を議論する際には加齢を考慮する必要があることが示唆された。

TCR α 鎖およびTCR β 鎖レパトアの多様性は、年齢を調整した後でも、MS患者で健常者よりも有意に大きかった。MS患者では、胸腺からの最近の移動を示すマーカーであるsignal joint T cell receptor excision circleが少なく、ナイーブT細胞におけるKi-67増殖抗原の発現レベルが高いことから、ナイーブT細胞の恒常性増殖を促進する末梢性 (非胸腺性) のメカニズムが示唆されている⁸。

MS患者では、健常者と比べてTCRの多様性が増加していたが、GLIPHを用いることでMS患者で有意に多く認められる疾患特徴的TCRを同定しえた。同定された2つのクラスターのうちの1つは*TRBV4-3*拘束性であり、HLA-DRB1*04:05陽性MS患者者に有意に多く保有されており、CMV pp65ペプチドを認識することが同定された。MSとCMVの関係について、CMVがMSの危険因子であるとする説から保護的であるとする説まで様々であるが^{1,10-14}、MSとCMVの関係を評価する際にHLAの遺伝的背景を考慮に入れたものはほとんどなかった。JCウイルス¹⁵⁻¹⁷やEBウイルス^{18,19}のように、特定のHLA class IIを有することでウイルスへの免疫応答

やMSの発症リスクが変化するという報告があることから、MSにおける特定のウイルスの役割を調べる際には、HLAの背景を考慮に入れることが重要であると考えられる。

HLA-DRB1*04:05 陽性患者では活動性のウイルス複製がない状態でも CMV-TCR が有意に増加していることから、HLA-DRB1*04:05 陽性 MS 患者と HLA-DRB1*04:05 陰性 MS 患者では CMV に対する免疫応答が異なることが示唆された。また、HLA-DRB1*04:05 は CMV-IgG 抗体価を増加させるが、CMV-IgG 陽性率には影響を与えなかったことから、HLA-DRB1*04:05 はウイルス感染への感受性は変化させず、感染後の液性免疫応答のみに影響することが示唆された。

CMV は、自らの生存を守るために Treg やナチュラルキラー (NK) 細胞を介して宿主への免疫抑制作用を持つ。Treg% は、本研究では先行研究²⁰と同様に MS 患者で減少したが、CMV-IgG 陽性 HLA-DRB1*04:05 陽性の MS 患者では部分的に回復した。このことから、MS で元々見られる Tregs の減少を CMV 感染が打ち消すことで、障害の進行を防いでいる可能性がある。

以上から、HLA-DRB1*04:05 をもつ MS 患者では CMV に感染した後の免疫応答が異なり、CMV-DNA が検出されなくなった後も CMV-TCR が血中で長く存在するとともに、MS で一般的に見られる Treg の減少傾向が軽減される可能性が示唆され、このことが MS の重症度を抑制している可能性が考えられた。

E. 結論

今回の TCR レパトア研究では、MS 患者の TCR α 鎖と TCR β 鎖の多様性が年齢で補正した後も高いこと、その現象は TCR δ 鎖と TCR γ 鎖では見られないこと、健常者と比較して *TRBV4-3* と *TRAJ56* の使用頻度が高いことが明らかになった。さらに、HLA-DRB1*04:05 を有する MS 患者で健常者と比較して有意に多く認められる2つの TCR クラスタを GLIPH により同定した。これらのクラスタのうちの1つは、*TRBV4-3* 拘束性で、CMV pp65 ペプチドを認識した。CMV pp65 ペプチドに対する TCR を有すること及び CMV-IgG 陽性であることは、HLA-DRB1*04:05 陽性患者における障害度が軽度であることと関連していたことから、HLA-DRB1*04:05 陽性 MS 患者では CMV が保護的な役割をもつことが示唆された。

1. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2016;13:26–36.
2. Nakamura Y, Matsushita T, Sato S, et al. Latitude and HLA-DRB1*04:05 independently influence disease severity in Japanese multiple

sclerosis: A cross-sectional study. *J Neuroinflammation* 2016;13

3. Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, et al. Genetic and infectious profiles influence cerebrospinal fluid IgG abnormality in Japanese multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2014;9:e95367.
4. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol* 2016;15:317–331.
5. Miho E, Yermanos A, Weber CR, et al. Computational Strategies for Dissecting the High-Dimensional Complexity of Adaptive Immune Repertoires. *Front Immunol* 2018;9:224.
6. Glanville J, Huang H, Nau A, et al. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* 2017;547:94–98.
7. Britanova O V., Putintseva E V., Shugay M, et al. Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling. *J Immunol* 2014;192:2689–2698.
8. Duszczyszyn DA, Beck JD, Antel J, et al. Altered naive CD4 and CD8 T cell homeostasis in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Thymic versus peripheral (non-thymic) mechanisms. *Clin Exp Immunol* 2006;143:305–313.
9. Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, et al. Naive T cell maintenance and function in human aging. *J Immunol* 2015;194:4073–4080.
10. Milovanovic J, Popovic B, Milovanovic M, et al. Murine cytomegalovirus infection induces susceptibility to EAE in resistant BALB/c mice. *Front Immunol* 2017;8:1–13.
11. Vanheusden M, Broux B, Welten SPM, et al. Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Sci Rep* 2017;7:1–11.
12. Sanadgol N, Ramroodi N, Ahmadi GA, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection and its role in total immunoglobulin pattern in Iranian patients with different subtypes of multiple sclerosis. *New Microbiol* 2011;34:263–274.
13. Makhani N, Banwell B, Tellier R, et al. Viral exposures and MS outcome in a prospective cohort of children with acquired demyelination. *Mult Scler* 2016;22:385–388.
14. Vanheusden M, Stinissen P, 't Hart BA, Hellings N. Cytomegalovirus: A culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med* 2015;21:16–23.
15. Sundqvist E, Buck D, Warnke C, et al. JC polyomavirus infection is strongly controlled by human leucocyte antigen class II variants. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004084.
16. Jelcic I, Aly L, Binder TMC, et al. T Cell

Epitope Mapping of JC Polyoma Virus-Encoded Proteome Reveals Reduced T Cell Responses in HLA-DRB1*04:01+ Donors. *J Virol* 2013;87:3393–3408.

17. Watanabe M, Nakamura Y, Isobe N, et al. Two susceptible HLA-DRB1 alleles for multiple sclerosis differentially regulate anti-JC virus antibody serostatus along with fingolimod. *J Neuroinflammation* 2020;17:206.
18. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, et al. Antibody response to common viruses and human leukocyte antigen-DRB1 in pediatric multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2013;19:891–895.
19. Waubant E, Lucas R, Mowry E, et al. Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann Clin Transl Neurol* 2019;6:1905–1922.
20. Kouchaki E, Salehi M, Reza Sharif M, et al. Numerical status of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) and CD8(+)CD28(-) regulatory T cells in multiple sclerosis. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17:250–5.

HLA-DRB1*04:05. 第 61 回日本神経学会学術大会
2020 年 8 月、岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fumie Hayashi, Noriko Isobe, et al. A new clustering method identifies multiple sclerosis-specific T-cell receptors. *Ann Clin Transl Neurol.* 8(1):163-176, 2021.

2. 学会発表

1) Hayashi F, Isobe N, Glanville J, Matsushita T, Kira J. Disease-characteristic TCRs recognize CMV in Japanese MS with HLA-DRB1*04:05; a novel approach with GLIPH. 第 60 回日本神経学会学術大会、2019 年 5 月、大阪.

2) 林史恵、磯部紀子、Jacob Glanville、松下拓也、吉良潤一. HLA-DRB1*04:05 陽性 MS 患者におけるサイトメガロウイルス関連 T 細胞受容体の同定. 第 31 回日本神経免疫学会学術大会、2019 年 9 月、千葉.

3) Hayashi F, Isobe N, Watanabe M, Nakamura Y, Matsushita T, Glanville J, Kira J. Disease-characteristic TCRs recognize CMV in Japanese MS patients with HLA-DRB1*04:05; a novel approach with GLIPH. 35th ECTRIMS, Sep 2019, Stockholm, Sweden.

4) Hayashi F, Isobe N, Matsushita T, Glanville J, Kira J. Disease-characteristic TCRs recognize CMV in Japanese MS patients with HLA-DRB1*04:05; a novel approach with GLIPH. Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS), Nov 2019, Singapore.

5) Hayashi F, Isobe N, Glanville J, Maimaitijiang G, Matsushita T, Kira J. MS-related TCR recognizes CMV which protects disability progression in patients with