

天疱瘡の自己反応性 B 細胞に対する単一細胞解析

研究分担者 高橋 勇人 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 准教授
研究分担者 山上 淳 東京女子医科大学皮膚科 准教授

研究要旨

天疱瘡は自己抗体によって皮膚・粘膜に水疱を生じる自己免疫疾患で、標的抗原であるデスマoglein (desmoglein; Dsg) に特異的な自己反応性 B 細胞が病態に重要な役割を果たすと考えられている。今回の研究では、天疱瘡患者の末梢血から Dsg 特異的 B 細胞を単一細胞として分離する方法を確立し、B 細胞受容体のレパトアを調べるとともに、RNA シーケンス解析による包括的な遺伝子解析を試みた。非特異的な B 細胞との比較により、炎症、B 細胞の分化、T 細胞との相互作用などに関連する Dsg 特異的 B 細胞における発現変動遺伝子が抽出された。将来的には、この方法を他の自己免疫疾患にも応用することで、疾患特異的な自己免疫細胞についての理解が深まることも期待される。

A. 研究目的

天疱瘡は、皮膚および粘膜の水疱・びらんを特徴とする自己免疫疾患で、主に表皮細胞間接着に重要な役割を果たす Dsg を標的とする自己抗体により発症する。Dsg に結合する自己抗体が天疱瘡の病態を誘導することは、これまでの研究で示されてきているため、天疱瘡は抗体を介した臓器特異的な自己免疫疾患で、自己抗原に特異的な抗体が生成される自己免疫機構を解明するためのモデルになりえる。自己抗原特異的な抗体の産生に関わる自己反応性 B 細胞は、外来抗原に反応する抗体産生に関与する B 細胞とは異なり、常に標的抗原にさらされているため、異なるサブセットの遺伝子を発現している可能性が考えられる。

これまで天疱瘡の自己反応性 B 細胞に関する研究は、単鎖可変領域フラグメントを用いた B 細胞受容体 (B cell receptor; BCR) レパトアの解析などを中心に行われてきた。今回の研究では、天疱瘡患者の末梢血を用いて、メモリー B 細胞 (memory B cells; MBC) の亜集団 (CD19+IgD-CD27+) から Dsg 特異的な自己反応性 B 細胞を単一細胞として検出する方法を確立し、その特徴を検討することを目的としている。標的抗原に特異的な自己反応性 B 細胞は末梢血には少数しか存

在しないが、単一細胞解析を用いた今回の研究の手法を通じて、自己免疫疾患患者における自己反応性 B 細胞の特徴の解明につながることが期待される。

B. 研究方法

Dsg に特異的な自己反応性 B 細胞を検出するために、Dsg1 および Dsg3 の細胞外領域の C 末端に 2 種類のタグ蛋白 (E-tag および His-tag) をつけて、哺乳類細胞発現系を用いて組み換え蛋白を作製した (recombinant Dsg; rDsg1, rDsg3)。次に天疱瘡患者の末梢血に Dsg 特異的 B 細胞が存在するかどうかを調べるため、フローサイトメトリーにより患者の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を分析した。23 名の天疱瘡患者 (尋常性天疱瘡 15 名、落葉状天疱瘡 8 名) と 9 名の健常人対象 (healthy control; HC) の PBMC を B 細胞系のマーカー抗体 (CD19+: 全 B 細胞、CD19+IgD+CD27-: ナイーブ B 細胞、CD19+IgD-CD27+: MBC) で染色し、rDsg1 または rDsg3 と反応させて、蛍光標識された抗 E-tag 抗体および抗 His-tag 抗体で染色し、Dsg 特異的 B 細胞を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学医学部倫理委員会

で審査され、承認されている。

C. 研究結果

天疱瘡は、その臨床的特徴から尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris; PV) と落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus; PF) に大別されるが、患者血清から検出される自己抗体プロファイルによって、抗 Dsg1 抗体のみを持つ PF、抗 Dsg3 抗体のみを持つ粘膜優位型 PV (mucosal dominant PV; mPV)、抗 Dsg3 抗体と抗 Dsg1 抗体の両方を持つ粘膜皮膚型 PV (mucocutaneous PV; mcPV) に分類される。血清中に抗 Dsg1 抗体を有する PF および mcPV の患者の末梢血では、Dsg1 に特異的な MBC の数が HC よりも多く検出された。さらに、末梢血中の Dsg 特異的 B 細胞数は、血清中の Dsg に対する IgG 型自己抗体の力価と有意な相関が見られた。

この実験系で検出された Dsg 特異的 B 細胞が Dsg に結合する BCR を発現していることを確認するために、選別した単一の B 細胞から BCR を再現した。重鎖と軽鎖のペアからなる BCR を RT-PCR で増幅し、抗体発現プラスミドに挿入した後に 293 細胞に導入した。この BCR 発現細胞を rDsg1 または rDsg3 と反応させて、蛍光標識した E-tag および His-tag 抗体で染色した後、フローサイトメトリーで反応性を確認した。実際には、この検出系を用いて PF 患者から単一細胞として分離した 24 個の Dsg1 特異的 B 細胞のうち、22 個から重鎖と軽鎖の両方が検出され、そのうち 18 個 (82%) はフローサイトメトリーで rDsg1 との反応性が確認できた。また、再現された BCR を分泌型の IgG として作製し、正常ヒト皮膚を用いた間接蛍光抗体法で PF 患者血清と同様に表皮細胞表面に結合すること、さらに ELISA で rDsg1 との特異的な反応を示すことを確認した。以上のことから、この方法で天疱瘡患者の末梢血から Dsg 特異的 B 細胞を単一細胞として分離して解析できることが示された。

Dsg 特異的 B 細胞に特徴的な遺伝子発現を検討するため、未治療の天疱瘡患者の末梢血中から分離できた 103 個の Dsg 特異的 B 細胞と 128 個の非特異的 B 細胞について、

単一細胞から RNA シーケンス解析を行った。なお、単一細胞として分離された Dsg 特異的 B 細胞の BCR のレパトアとサブクラスを検討すると、多くの天疱瘡患者では上位 3 つの VH 遺伝子が BCR のほぼ 50% を占めており、Dsg 特異的 B 細胞の VH 遺伝子の使用には偏りがあることが示された。特に VH3-30 遺伝子を使用する Dsg 特異的 B 細胞は、すべての患者から得られている。ただし、VH3-30 は一般的な B 細胞において最も使用頻度の高い VH 遺伝子であることを考慮に入れる必要があるだろう。同一の天疱瘡患者において、同一の BCR を持つ Dsg 特異的 B 細胞が複数の単一細胞として分離されることはあったが、異なる天疱瘡患者から単離された Dsg 特異的 B 細胞の間で、同一の BCR が共有されている、あるいは共通の構造を持った BCR が検出される、といったことは観察されなかった。発現が検出された 10518 個の遺伝子のうち、Dsg 特異的 B 細胞と非特異的 B 細胞との比較において、253 個が有意な発現変動遺伝子 (differentially expressed genes; DEG) として同定された。B 細胞やリンパ球の機能と強い関連が示唆される DEG を選択すると、炎症、分化、T 細胞との相互作用に関連する遺伝子が抽出されてきた。

また、外来抗原であるインフルエンザのヘマグルチニン (hemagglutinin; HA) に特異的な B 細胞と Dsg 特異的な自己反応性 B 細胞とを比較するために、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末梢血から、HA に特異的な B 細胞と非特異的な B 細胞を単一細胞として分離して、RNA シーケンス解析を実施した。98 個の HA 特異的 B 細胞と 132 個の非特異的 B 細胞が検討され、発現が検出された 9703 個の遺伝子のうち、非特異的 B 細胞と比較して HA 特異的 B 細胞では 171 個が有意な DEG として同定された。そのうち、Dsg 特異的 B 細胞で抽出された DEG と重なった遺伝子は 7 個であった。検出された DEG の Ingenuity Pathway Analysis (IPA) により、Dsg 特異的 B 細胞ではいくつかのシグナル経路の変化が見られたが、これらは HA 特異的 B 細胞で検出された遺伝子とは重複していなかつ

た。以上のことから、自己抗原に特異的な B 細胞は、外来抗原に特異的な B 細胞と比較して、独自の遺伝子特性を有していると考えられた。

Dsg 特異的 B 細胞から抽出された DEG のうち、これまで予測されていた抗体産生に関わる遺伝子ではなく、あまり知られていない T 細胞との相互作用に関わる CD137L が注目された。CD137L は T 細胞の共刺激に関わることが知られており、通常は抗原提示細胞に発現している。Dsg 特異的 B 細胞に CD137L が発現していることを確認するため、抗 CD137L 抗体を用いたフローサイトメトリー解析を実施した結果、天疱瘡患者の非特異的 B 細胞、インフルエンザワクチン接種ボランティアの HA 特異的および非特異的 B 細胞と比較して、天疱瘡患者末梢血から単離された Dsg 特異的 B 細胞の表面には有意に高い割合で CD137L を発現していることがわかった。つまり、CD137L にシグナルが入ることにより、T 細胞では分化・増殖が促進され、抗原提示細胞ではサイトカインの産生増加と抗原提示能の向上が誘導される。さらに最近のデータでは、CD137 シグナルが濾胞性ヘルパー T 細胞の活性化を誘導することも示されている。近年、天疱瘡の病態に濾胞性ヘルパー T 細胞が関与していることも報告されており、今回の研究からは Dsg 特異的 B 細胞が抗原提示細胞として T 細胞と相互作用し、さらなる自己抗体産生を引き起こす可能性が示された。

D. 考察

これまで、患者における自己免疫細胞の研究は、その希少性と正確な同定が困難と考えられてきた。天疱瘡は、IgG 型自己抗体によって発症する代表的な疾患であり、自己免疫性 B 細胞の特徴を明らかにするための理想的なモデルになりうる。今回の研究では、天疱瘡における自己抗体の標的抗原の組み換え蛋白を用いて Dsg 特異的 B 細胞を単離し、単一細胞解析技術を用いて網羅的な遺伝子解析を行った。

すでに報告されている Dsg に反応するモノクローナル抗体を用いて、天疱瘡患者と

HC の間で異なる MBC 集団を検出し、Dsg 特異的 B 細胞を分離する条件を確立した。患者末梢血中の Dsg 特異的 B 細胞の頻度が低いことは、これまでの報告と一致していたが、天疱瘡患者では HC と比較して Dsg 特異的 B 細胞の集団が明瞭で、末梢血中の Dsg 特異的 MBC の数は、血清中の抗 Dsg 抗体価と相関する傾向が示された。フローサイトメトリーのみでは偽陽性を鑑別するのは困難だったが、単離された Dsg 特異的 B 細胞の BCR を再現することにより、単離された B 細胞の約 80% が Dsg 特異的な BCR を発現していることが確認された。

末梢血から Dsg 特異的 B 細胞を比較的多く分離できた 3 人の天疱瘡患者の PBMC を用いて単一細胞 RNA シーケンス解析結果を比較したところ、Dsg 特異的 B 細胞では 253 遺伝子の発現パターンが、非特異的 B 細胞と比較して有意に異なることが明らかになった。検出された DEG は、炎症性サイトカイン、形質細胞分化、B 細胞のクラススイッチに重要な因子と考えられた。

また DEG の中で、Dsg 特異的 B 細胞において CD137L の発現が高いことも注目された。CD137L は、T 細胞共刺激分子 CD137 (4-1BB) のリガンドであり、抗原提示細胞 (antigen-presenting cells; APC) に発現している。T 細胞への CD137 シグナル伝達は、クローン拡大、分化、生存を促進し、一方で APC への CD137L シグナル伝達は細胞の活性化と成熟を誘導し、サイトカイン産生を増加させて抗原提示能力を高める。さらに最近の *in vitro* のデータでは、CD137L と CD137 シグナルが濾胞ヘルパー T 細胞を活性化することも示されている。天疱瘡の病態に濾胞ヘルパー T 細胞が関与していることが最近報告されており、Dsg 特異的 B 細胞が APC として濾胞ヘルパー T 細胞と相互作用し、抗体産生を引き起こしている可能性も考えられた。

E. 結論

今回の研究では、天疱瘡患者の末梢血から Dsg 特異的な自己反応性 B 細胞を単一細胞として分離し、その遺伝子発現パターンの特徴を解析する新しいアプローチを確立した。

Dsg 特異的 B 細胞は、非特異的 B 細胞や外来抗原に特異的な B 細胞とは異なった特徴を有していることが示され、天疱瘡の病態のさらなる解明、特に自己抗体を産生する B 細胞の特性を理解する上で有用な方法と考えられた。この手法を他の自己免疫疾患にも応用することで、将来的には疾患特異的な自己免疫細胞を網羅的に解析できる可能性も期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Egami S, Watanabe T, Fukushima-Nomura A, Nomura H, **Takahashi H**, **Yamagami J**, Ohara O, Amagai M.

Desmoglein-specific B-cell-targeted single-cell analysis revealing unique gene regulation in patients with pemphigus.

J Invest Dermatol. 143: 1919-1928, 2023.

2. 学会発表

Egami S, Watanabe T, Fukushima-Nomura A, Nomura H, **Takahashi H**, **Yamagami J**, Ohara O, Amagai M.

Desmoglein-specific B-cell-targeted single-cell analysis revealing unique gene regulation in patients with pemphigus.

ISID2023 Tokyo Satellite Meeting. International Symposium on Autoimmunity Targeting the Skin. - Pemphigus, Pemphigoid, and Beyond-

令和 5 年 5 月 14-15 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし