

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20213

研究課題名(和文)小児扁桃肥大への濾胞ヘルパーT細胞の関与と分化誘導解析によるSAS治療への応用

研究課題名(英文)The relationship between follicular helper T cells and pathogenesis of tonsillar hypertrophy in patients with child OSAS

研究代表者

坪松 ちえ子(Tsubomatsu, Chieko)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40468096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児閉塞性睡眠時無呼吸(SAS)は扁桃肥大により起こりアデノイド扁桃手術で治療される。組織学的には扁桃胚中心の肥大と特異的液性免疫のための胚中心でのB細胞と濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)の活性化が特徴である。このため、これらの細胞とSAS患者でのリンパ増殖の関連性を検討した。SAS患者の扁桃Tfh細胞は他疾患の扁桃と大きく異なることが分かった。さらに、脂質メディエーターであるリポキシンA4やロイコトリエンB4はナイーブT細胞からTfh細胞への分化へ関与していることが分かった。これらのメディエーターの調節はSASの保存的治療の候補となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) in childhood is caused by adeno-tonsillar hypertrophy, and adeno-tonsillectomy is commonly performed as a treatment. Histologically, tonsillar hypertrophy is characterized by prominent germinal centers (GCs). Antigen specific humoral immune responses are established by the active interactions of B and Tfh cells (follicular helper T cells) in GCs. Therefore, we focused on the potential of these cells to induce lymphoid hyperplasia promoted in OSAS pathogenesis. The results revealed that the tonsils of OSAS were considerably different from those of RT tonsils in terms of Tfh cells. Moreover, lipoxin A4 and leukotriene B4 have the capacity to differentiate naive CD4+ T cells into Tfh cells. The results suggest that such lipid mediators have a potential role in the development of lymphoid follicles through the regulation of Tfh cell differentiation and regulation of these mediators should be considered as a candidate of conservative treatment.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：扁桃肥大 エンター 睡眠時無呼吸症候群 アデノイド肥大 機能性リンパ球 濾胞ヘルパーT細胞 脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児 OSAS の診断と治療効果判定のための客観的手法の開発

小児の閉塞性睡眠時無呼吸症候群(OSAS)は、睡眠障害国際分類第2版(ICSD II)1で初めて独立して分類され、診断基準が明記された。その基準には睡眠ポリグラフ検査(PSG)による無呼吸低呼吸指数 AHI 1回/時という項目が含まれる。OSAS 診断のゴールドスタンダードは PSG であるが、小児において多数の電極を装着する困難さ、電極を外す・絡まるなどのトラブルや、保護者同伴入院の必要性、施設側の設備不足や人件費の問題などがあり、施行できる施設は限られているのが現状である。これらに対する解決策としていくつか提唱されているがまだ現状に則したものでなく新たな客観的診断・経過観察のための手法の確立が急がれている。

(2) 小児期の扁桃肥大のメカニズムの解析と保存的治療に向けての基礎研究

扁桃の基本的免疫機能は、抗原を認識する場所、免疫記憶を作るための場所、免疫機能のなかで実効性のあるものに変換する場所、の3点に集約することができる(図1)

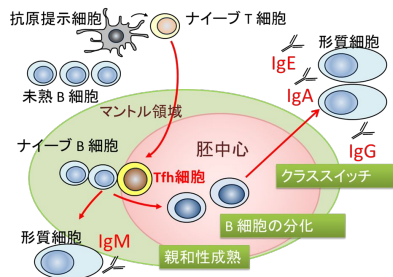


図1. 扁桃の基本的免疫機能(文献2より)

この免疫機能を維持するため小児扁桃では活発な免疫担当細胞の働きが行われている。そのため、リンパ組織の過形成がおこり前述のような扁桃肥大による上気道の閉塞が起きOSASが発症することとなる。

抗原情報は、上皮下のリンパ球に伝えられ、濾胞や胚中心での免疫反応を経て自然免疫から獲得免疫に続く。この扁桃の濾胞内の機能について新たな機能性T細胞の関与が示され、扁桃での免疫形成の基本的概念も変化してきている。特に、新しい機能性T細胞である濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)は液性免疫を誘導するために重要であることが解明され、胚中心の形成、すなわち扁桃が肥大するときのキーとなる細胞である可能性が示唆されてきた。

2. 研究の目的

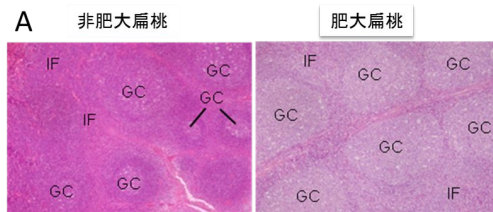
(1) 小児OSASの診断と治療効果判定のための客観的手法の開発

脳波記録睡眠簡易検査装置Sleep Profiler™を用いた統合型睡眠検査装置Integrated PSG Systemが小児OSASの診断および治療効果判定において有用かどうか検討することを目的とする。

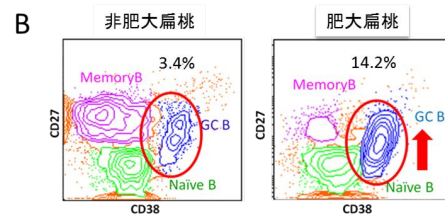
(2) 小児期の扁桃肥大のメカニズムの解析と保存的治療に向けての基礎研究

幼小児期に扁桃・アデノイドは肥大し成長とともに退縮する。各扁桃での年齢変化としてアデノイド(咽頭扁桃)は4-5歳ごろ、口蓋扁桃は少し遅れて肥大のピークを認める。幼小児期の免疫成熟過程で扁桃は機能亢進し結果として肥大する。では肥大扁桃ではどのような免疫学的変化が起こっているのであろうか。

小児の肥大扁桃ではB細胞は活性化し、特にリンパ濾胞の胚中心B細胞数が増加する。また、組織学的には胚中心過形成と濾胞間領域の拡大を認め、リンパ組織の反応性過形成の状態が出来上がり扁桃の容積が増大する。このような変化はよく知られているが、胚中心過形成・退縮を起こすさらに詳細な免疫学的機序はいまだ不明である(図2)。



肥大扁桃で胚中心(GC)の過形成と濾胞間領域(IF)の拡大



肥大扁桃で胚中心(GC)B細胞の増加

図2. 小児の扁桃肥大のメカニズム(文献2より) 小児ではリンパ組織の反応性過形成の状態が起こり扁桃の容積の肥大をもたらす。組織学的には胚中心過形成と濾胞間領域の拡大が起こる(A)。この時、リンパ球の中で特に増加が顕著な細胞分画は胚中心B細胞(GC B)である(B)。

この図で示した胚中心B細胞の分化を助けるのが濾胞ヘルパーT細胞と考えられている。そこで、小児の扁桃肥大を示すOSAS症例では、このTfh細胞がどのような変化を起こしているかを知ることが、扁桃の加齢による肥大と退縮のメカニズムを知ることができるかもしれない。本研究ではこのTfh細胞に着目し臨床症例での変化を探るとともに、この細胞の機能調節をさらに検討することで、小児OSAS症例の手術以外の保存的治療の道筋を探るのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 小児OSASの診断と治療効果判定のための客観的手法の開発

対象は2014年6月から2015年8月まで札幌医科大学耳鼻咽喉科にてIntegrated PSG systemによりPSG解析を行った26例。簡易睡眠検査はSmartWatch™ PMP 300EX(パシフィックメディコ株式会社)を使用し、PSGは脳波記録簡易睡眠

検査装置 Sleep Profiler™ (Advanced Brain Monitoring, INC.) と簡易睡眠検査装置 SmartWatch™ PMP 300EX を組み合わせて Integrated PSG system にて解析を行った。

(2) 小児期の扁桃肥大のメカニズムの解析と保存的治療に向けての基礎研究

手術にて得られた扁桃を用いて検索した。組織学的検討としては Tfh 細胞のマーカーとして Bcl6 陽性細胞を指標とし、リンパ球中の比率は扁桃よりリンパ球を分離し Tfh 細胞のマーカーを用いて FACS にて解析した。

われわれの先行研究でアラキドン酸カスケードが Tfh 細胞分化に関連していると推察されたため、主に脂質メディエーターを中心にナイーブ T 細胞から Tfh 細胞へ分化促進する因子について検討した。扁桃よりナイーブ T 細胞と B 細胞を分離し共培養を行う。IL-6, 12, 21 添加で Tfh 細胞への分化が促進されるため、分化誘導の就職因子の検討をこの in vitro の系で行った。

4. 研究成果

(1) 小児 OSAS の診断と治療効果判定のための客観的手法の開発

脳波記録睡眠簡易検査装置 Sleep Profiler を用いた統合型睡眠検査装置 Integrated PSG System を小児 OSAS の診断に有効かどうか検討した。リアルタイムで装着状況が確認できないため、脳波やフロー記録で装着不良が生じた。覚醒反応は中等度～重症例で多い傾向があったが、睡眠ステージは重症度により変化がなかった。簡易検査では重症度を正確に判定できなかった。ダウン症合併例に Integrated PSG System を用いることで CPAP を導入し得た。全ての小児 OSAS 症例に PSG が必要かどうかは議論を要するが、PSG 設備のない施設において Integrated PSG System は一つの手段として有用と思われる(文献1)。

(2) 小児期の扁桃肥大のメカニズムの解析と保存的治療に向けての基礎研究

扁桃からの分離細胞の検討で、小児の肥大扁桃では Tfh 細胞が高頻度に認められることが分かった。すなわち、小児の扁桃肥大症例では胚中心形成を促進する Tfh 細胞の数的増加が認められることが分かった。さらに、Th 細胞全体の中での比率も肥大扁桃では高いことが小児肥大扁桃では認められた(図3)。

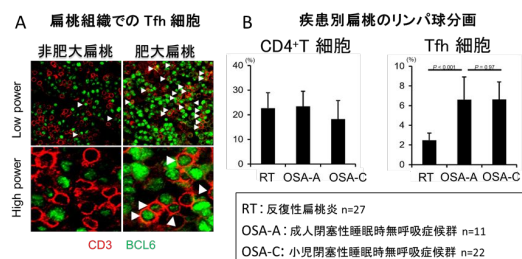


図 3. 扁桃におけるリンパ球分画, 特に濾胞へ

ヘルパー T 細胞 (Tfh) の分布 (文献 2 より)

扁桃肥大症例では CD3 陽性 BCL6 陽性の Tfh 細胞が多数認められる (矢頭) (A). リンパ球分画の解析では非肥大扁桃である反復性扁桃症例と比較して小児例・成人扁桃肥大 OSA 症例ともに Tfh が増加している (B). 単に絶対数が増加しているだけではなく、ヘルパー T 細胞 (CD4) 中の Tfh 比率も高くなっている。

これは、小児だけでなく相対的に肥大を認めた成人の症例でも同様の傾向であることから、加齢性変化のみならず、免疫学的バランスの変化により成人でも扁桃肥大に Tfh 細胞の変化が関与している可能性が示唆できた。

このことから Th 細胞機能のバランスの変化が扁桃肥大の要因の一つと考えられ、その概念を図に示した (図 4)。

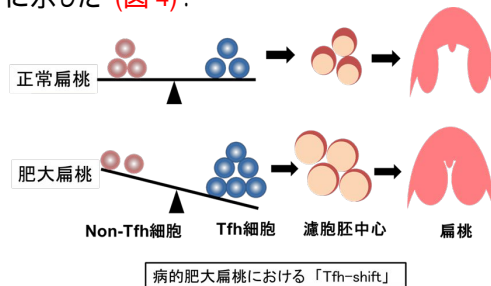


図 4. 扁桃肥大はヘルパー T 細胞機能のバランス変化による (文献 2 より)。

濾胞胚中心の過形成には Tfh 細胞の機能亢進と免疫バランスの変化が関与

共培養系を用いた検討では、脂質メディエーターであるリポキシン A 4 やロイコトリエン B 4 はナイーブ T 細胞から Tfh 細胞への分化へ関与していることが分かった。臨床的に扁桃肥大に対してステロイドの点鼻やロイコトリエン拮抗薬は効果があるとの報告がある。著効を示すことは少ないものとして後者に関しては同様の脂質メディエーターに属するため、今回の検討はさらに活性物質の絞り込みに寄与する可能性が高い。その意味でもこれらのメディエーターの調節は OSAS の保存的治療の候補となるかもしれない。

引用文献

1. 坪松ちえ子, 新谷朋子, 氷見徹夫: 小児 OSAS における Integrated PSG system の検口咽科 29: 213-218, 2016
2. 氷見徹夫, 高野賢一, 亀倉隆太, 山下恵司, 小笠原徳子, 坪松ちえ子: 扁桃・アデノイドの基礎知識と手術治療に関連する問題点 日耳鼻 119: 701-712, 2016

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 新谷朋子, 坪松ちえ子: 睡眠時無呼吸症候群手術療法, アデノイド扁桃摘出術 (査読なし) 最新医学別冊 119: 181-187 2017
2. 坪松ちえ子, 新谷朋子, 氷見徹夫: 小児

OSAS における Integrated PSG system の検討
口咽科 29:213-218, 2016(査読あり)

3. 氷見徹夫, 高野賢一, 亀倉隆太, 山下恵司, 小笠原徳子, 坪松ちえ子: 扁桃・アデノイドの基礎知識と手術治療に関連する問題点 (査読なし) 日耳鼻 119: 701 712, 2016

4. Tsubomatsu C, Shintani T, Abe A, Yajima R, Takahashi N, Ito F, Takano K, Himi T. Diagnosis and Treatment of Obstructive Sleep Apnea Syndrome in Children. (査読なし) Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:105-11.

doi: 10.1159/000441886.

5. Jitsukawa S, Takano K, Ito F, Tsubomatsu C, Himi T. Influence of Age on Caloric Response. (査読なし) Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:17-22.

doi: 10.1159/000441864

6. Saikawa E, Takano K, Ogasawara N, Tsubomatsu C, Takahashi N, Shirasaki H, Himi T. Cochlear Implantation in Children with Cochlear Malformation. (査読なし) Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:7-11.

doi: 10.1159/000441859.

〔学会発表〕(計6件)

1. 坪松ちえ子, 新谷朋子, 氷見徹夫: 小児 OSAS における Integrated PSG system の検討 第 41 回日本睡眠学会学術集会 2016 年 7 月 7 日 8 日 京王プラザ(東京都新宿区)

2. 亀倉隆太, 高野賢一, 長屋朋典, 實川純人, 伊藤文恵, 坪松ちえ子, 一宮慎吾, 氷見徹夫: I g G 4 関連疾患における活性化濾胞ヘルパー T 細胞の I g G 4 産生への関与 第 29 回日本口腔咽頭科学会 2016 年 9 月 8 日 9 日 松山テルサ 島根県松江市

3. 高野賢一, 矢島諒人, 亀倉隆太, 坪松ちえ子, 氷見徹夫: I g G 4 関連疾患における線維化因子の検討 第 29 回日本口腔咽頭科学会 2016 年 9 月 8 日 9 日 松山テルサ 島根県松江市

4. 坪松ちえ子, 新谷朋子, 高野賢一, 氷見徹夫: 小児閉塞性睡眠時無呼吸におけるアデノイド・口蓋扁桃の所見と重症度の検討 第 29 回日本口腔咽頭科学会 2016 年 9 月 8 日 9 日 松山テルサ 島根県松江市

5. 坪松ちえ子, 新谷朋子, 氷見徹夫: ダウン症と高度肥満を伴った重症睡眠時無呼吸症例の治療経験 第 11 回日本小児耳鼻咽喉科学会 2016 年 6 月 30 日 7 月 1 日 ホテルクレメント徳島(徳島県徳島市)

6. 坪松ちえ子, 新谷朋子, 氷見徹夫: 小児 OSAS における Integrated PSG system の検討 第 28 回日本口腔咽頭科学会 2015 年 9 月 10 日 11 日 ホテル阪神(大阪府大阪市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪松ちえ子 (TSUBOMATSU, Chieko)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40468096

(2) 連携研究者

氷見徹夫 (HIMI, Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90181114

一宮慎吾 (ICHIMIYA, Shingo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30305221

亀倉隆太 (KAMEKURA, Ryuta)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70404697

長屋朋典 (NAGAYA, Tomonori)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60517902

山下恵司 (YAMASHITA, Keiji)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 50583580

新谷朋子 (SHINTANI, Tomoko)

とち耳鼻咽喉科・院長

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 10244352

(3) 研究協力者

伊藤 史恵 (Ito, Fumie)