

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15723

研究課題名(和文)新規免疫バランスの概念に基づいた液性免疫異常を伴う疾患の解析

研究課題名(英文) Analysis of humoral abnormality caused by functional imbalance of follicular helper T cells.

研究代表者

氷見 徹夫 (Himi, Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫異常に起因する疾患の病態解明を目的としてTfh細胞について検討した。末梢血Tfh細胞サブセットとBregをアレルギー性鼻炎とIgG4関連疾患について検討した。Tfhサブセットの比率は正常と異なりアレルギーではTfh2にシフトしていた。またBregの比率も低下していた。アレルギーではこのTfh2とBregの不均衡が病態の一つと考えられた。一方、IgG4関連疾患では末梢血だけでなく局所のTfhは増加しその比率も変わっていた。さらに局所では、活性化指標であるPD-1やICOSの発現が上昇していた。

研究成果の概要(英文)：To determine the pathophysiologic features of diseases regarding immunological dysregulation, we examined subsets of follicular helper T (Tfh) cells and regulatory B (Breg) cells in peripheral blood and affected lesion from allergic rhinitis (AR) and IgG4-RD patients. The results showed skewed polarization of Tfh cell subsets in both AR and IgG4-RD cases. Interestingly, the %Breg cells in total B cells were decreased in AR cases and, more extensively, in IgG4-RD. Moreover, we found significant correlations of fractional exhaled nitric oxide and blood eosinophil levels with the index %Tfh2 cells per %Breg cells. Our findings indicate that relative decrease in Breg cells under the condition of Tfh2 cell skewing is a putative exaggerating factor of AR to bronchial asthma. Patients with IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis (IgG4-DS) showed increased infiltration of Tfh cells highly expressing PD-1 and ICOS in submandibular glands.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ヘルパーT細胞 脂質メディエーター IgG4関連疾患 抗体産生

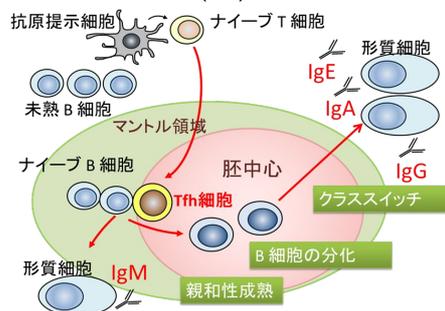
1. 研究開始当初の背景

免疫・アレルギー疾患は近年、増加の一途を辿っており、その予防法や診断・治療法の確立は解決すべき、喫緊の課題である。一般にアレルギー性鼻炎では 2 型ヘルパー T 細胞 (Type 2 T helper; Th2) や肥満細胞、好酸球等がサイトカインや抗原特異的 IgE の産生を介して作用し、鼻炎の諸症状を引き起こすと考えられている。アレルギー性鼻炎をはじめとするアレルギー性疾患の病態形成に関しては、これまでに数多くの研究成果が報告されているが、ヘルパー T 細胞がリンパ組織や炎症の起きている局所でどのように IgE 抗体の産生を制御しているのかについては、まだ不明な点が多く残されている。

また、本邦で概念が確立された IgG4 関連疾患 (IgG4-RD) も病態の不明な疾患群である。近年病態に関する報告も多いが、まだ本質に迫る研究はなされていない。特に申請者の強く関連する IgG4 涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) は局所の免疫学的変化をとらえるうえで重要な疾患の一つであり、この局所での機能解析は病態解明につながる。機能的 T 細胞との関連は免疫異常から容易に推察できるが、新しいサブセットに関する研究も進んできている。本研究課題では、臨床的な解析としてこのアレルギー性鼻炎と IgG4 関連疾患について以下に述べる新しい側面より研究を進めた。

近年、ヘルパー T 細胞サブセットの 1 つで、液性免疫を制御する濾胞ヘルパー T (T follicular helper, Tfh) 細胞と免疫調節機能をもつ B 細胞サブセットである制御性 B (regulatory B; Breg) 細胞の異常が免疫・アレルギー疾患の発症に関与しているという報告が散見され、Tfh 細胞サブセットの不均衡が免疫異常による疾患の病態形成の原因となっていることが推察される。

Tfh 細胞はリンパ濾胞の胚中心形成を促し、抗原特異的な抗体産生を制御している。Tfh 細胞には 3 つサブセット (Tfh1, Tfh2, Tfh17 細胞) が存在し、中でも 2 型濾胞ヘルパー T 細胞 (Type 2 T follicular helper; Tfh2) は Th2 細胞と同様の機能を有し、IL-4 を産生して抗原特異的な IgE の産生に関与している (図)。



そこで、このサブセットについて詳細に検討することで前進と局所の免疫病態を明らかにすることができる考えた。

2. 研究の目的

免疫異常を呈する疾患における Tfh 細胞の変化と病態への関わり

**Follicular helper T (Tfh) 細胞**は扁桃で発見されリンパ濾胞に主に存在し、B 細胞分化、形質細胞からの抗体産生を制御している。ヒトの Tfh 細胞サブセットの解析では、Tfh1, Tfh2, Tfh17 が見つかり、それぞれ産生に関与するイムノグロブリン分画もわかってきた。これまでに自己免疫疾患で病態形成と Tfh 細胞との関連などが報告されており、申請者もアレルギー性鼻炎や IgG4 関連疾患における Tfh 細胞の役割について世界で初めて報告した。

この研究を発展させ、さらに詳細な全身と局所両方の変化を明らかにし、さらに、機能的な解析を in vitro で解析することを目的としている。すなわち、各種免疫疾患についての検討を行い、さらに、Tfh 細胞の制御を可能とする因子の探索を行い、特異的マーカーあるいは機能制御につながる生理活性物質を見つけることを目的としている。

3. 研究の方法

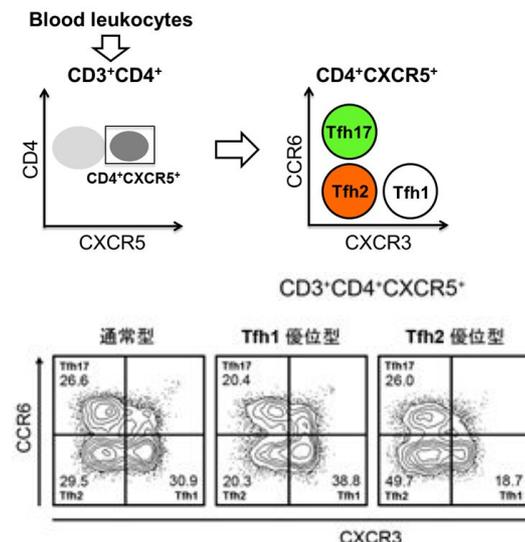
3-1. 組織 Tfh 細胞の機能解析

鼻粘膜や顎下腺組織より Tfh 細胞を単離し、組織学的な検討とともに、後述する共培養系にて IgG4 や IgG2 産生能について検討し、また B 細胞への抗体産生能の影響などを扁桃組織との比較で検討する。

3-2. 血液 Tfh 細胞サブセット、制御性細胞サブセットの解析

各疾患で全 Tfh 細胞に占める Tfh1, Tfh2, Tfh17 比率を FACS にて測定した (下図)。また、CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>に占める Tfr, B 細胞における Breg (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>)、Treg の割合を測定する。これらの結果は年齢をマッチした健常群との比率で表現し、免疫バランスパターン構成を表現する。

臨床的な指標との比較のためには、活性化 Tfh の比率が重要と考えられる。そこで、活性化の指標として PD-1 陽性細胞、ICOS 陽性細胞の比率を検討した。



### 3-3. Tfh 特異的分子 (Bob1) の解析

患者からの同意を得てえられた口蓋扁桃組織、胸腺組織、末梢血を用いた。セルソーターを用いて扁桃 Tfh 細胞と胸腺 CD4(+)T 細胞を単離し、マイクロアレイ法によりトランスクリプトームを比較検討した。得られた遺伝子より、Tfh 細胞に特異的に発現する遺伝子を抽出し、対象とした遺伝子について組織免疫染色、RT-PCR 法、ウエスタンブロッティング法により、Tfh 細胞における特異的発現を検証した。新規制御遺伝子を挿入したウイルスベクターを作成し、ヒトナイーブ CD4(+)T 細胞への遺伝子導入実験により機能的役割を検討した。遺伝子欠損マウスを用いた解析による検討を重ね、当該遺伝子の機能的役割を解析した。

### 3-4. ヒト扁桃由来リンパ球を用いた Tfh 細胞分化共培養モデル

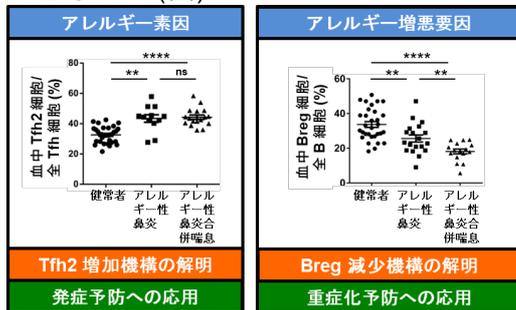
手術検体の扁桃組織や顎下腺組織、末梢血液から、セルソーターを用いてリンパ球、CD4 陽性ナイーブ T 細胞、Tfh 細胞、非 Tfh 細胞、B 細胞を単離し、Real time PCR 法により脂質メディエーター関連遺伝子の発現について解析した。単離した CD4 陽性ナイーブ T 細胞をサイトカイン、抗体、脂質メディエーターの存在下で培養し FACS による解析を実施した。単離した Tfh 細胞、ナイーブ B 細胞を抗体、脂質メディエーター存在下に共培養し FACS による解析を実施した。単離した Tfh 細胞を脂質メディエーター存在下で培養し annexin V-FITC と 7-AAD を用いて細胞生存率を測定した。

## 4. 研究成果

### アレルギー疾患での Tfh 細胞の変化

Tfh2 細胞と Breg 細胞がアレルギー性鼻炎の病態形成、さらにはその重症化に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

アレルギー疾患の病態の背景には Tfh2 シフトの増加と Breg 細胞の数の減少、つまり、Tfh2/Breg バランスの破綻が関与していると考えられ、それらのメカニズムを解明することが、アレルギー疾患の病態解明につながると思われる (図)。



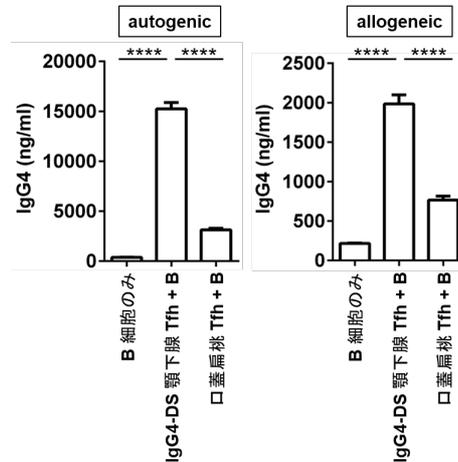
我々の解析からアトピー疾患患者の末梢血においても Tfh2 細胞が増加することを踏まえ、Tfh2 細胞の増加はアレルギー素因を規定し、Breg 細胞の減少はアレルギーの増悪因子と考えられる。そのため、Tfh2 細胞への分化偏倚を是正し、Breg 細胞の数と機能を維持することができれば、アレルギー性鼻炎の発症と重症化を防ぐことができ、好酸球の増加機構の解明と合せて、新規治療法の開発につながると考えられる。

今回の検討で IgG4-DS の顎下腺組織に多く存在する Tfh 細胞は口蓋扁桃由来の Tfh 細胞と比較して BCL6 を高発現していた。BCL6 は Tfh 細胞の分化レベルを反映することが知られており、IgG4-DS の病変部位では抗原提示細胞から反復する抗原刺激を受けることで BCL6 の発現が増強するという特殊な環境を反映しているものと考えられる。IgG4-DS の顎下腺組織に存在する Tfh 細胞の起源や IgG4 のクラススイッチの機構に関しては依然として不明のままであり、今後の検討課題である。

### IgG4 関連疾患での Tfh 細胞の変化

IgG4-RD の病変部位に存在する Tfh 細胞が B 細胞・形質細胞からの IgG4 産生を強力に誘導することを証明した。

今回の検討で IgG4-DS の顎下腺組織に多く存在する Tfh 細胞は口蓋扁桃由来の Tfh 細胞と比較して BCL6 を高発現していた。BCL6 は Tfh 細胞の分化レベルを反映することが知られており、IgG4-DS の病変部位では抗原提示細胞から反復する抗原刺激を受けることで BCL6 の発現が増強するという特殊な環境を反映しているものと考えられる。IgG4-DS の顎下腺組織に存在する Tfh 細胞の起源や IgG4 のクラススイッチの機構に関しては依然として不明のままであり、今後の検討課題である。



今回の検討で得られた結果から、IgG4-DS の顎下腺組織に多く存在する Tfh 細胞は IL-10 や CXCL13 の産生を介して、B 細胞に対して強力に IgG4 抗体の産生を誘導する機能を持つことが明らかとなった。また血液中の PD-1 強陽性 Tfh 細胞の割合は、IgG4-RD のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。つまり、IgG4-RD の病理組織の特徴である、IgG4 陽性形質細胞の増加にこの組織由来の Tfh 細胞が関与している可能性があり、IgG4-RD の新規治療法を開発する上で、有望な治療ターゲットになり得ると考えられた。

### 濾胞ヘルパー T 細胞における Bob1 の機能

濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) は、抗原特異的免疫反応において重要な機能を有している。本研究では、Tfh 細胞が転写因子 Bob1 (B cell specific octamer binding protein 1) を特異的に発現していることを認めた。Tfh 細胞での Bob1 発現は Bcl6 の発現や B 細胞を補助する機能と関連しなかった。外来抗原の

初期免疫刺激に対して, Bob1 欠損マウスでの Tfh 細胞の割合は, 野生型マウスより高値であった. Bob1 欠損マウス由来 Tfh 細胞は, CD3/CD28 モノクローナル抗体による刺激に対して, 強い増殖活性を示し, CD3 誘導細胞死への耐性を示した. これらのことより, Tfh 細胞には TCR を介した数的規模を調節する Bob1 関連の機構が存在すると考えられた.

### 脂質メディエーターは濾胞ヘルパーT細胞の分化を促進する

ロイコトリエンやリポキシンといった脂質メディエーターは広く自然免疫や獲得免疫を調節しており, これらの機能障害は様々な免疫介在性疾患の原因となり得る. 我々は以前に脂質メディエーターの産生を担う 5-リポキシゲナーゼ (Alox5) の生体内での高親和性抗体の調節における顕著な特徴を報告した. 本研究では, 胚中心における B 細胞の活性化に重要な役割を果たす濾胞ヘルパーT細胞 (Tfh 細胞) の解析を通して, 抗原特異的液性免疫の成立過程における Alox5 関連脂質メディエーターの機能的な重要性を明らかにすることを目的とした. リポキシン A4 (LXA4) とやや程度は落ちるがロイコトリエン B4 (LTB4) が, ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞の Tfh 細胞への分化を促進することが示された. この結果は LXA4 特異的な細胞表面受容体である FPR2 のアゴニスト BML-111 およびアンタゴニスト BOC-2 を用いた実験においても確認された. Tfh 細胞への分化促進環境下でナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を培養することでナイーブ T 細胞から Tfh 細胞への分化における脂質メディエーターの新しい役割が明らかとなった.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Kumagai A, Kubo T, Kawata K, Kamekura R, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Sumikawa Y, Himi T, Yamashita T, Ichimiya S. Keratinocytes in atopic dermatitis express abundant ΔNp73 regulating thymic stromal lymphopoietin production via NF-κB. *J Dermatol Sci*. 2017 Nov;88(2):175-183. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.06.017. (査読有)
2. Matsumiya H, Kawata K, Kamekura R, Tsubomatsu C, Jitsukawa S, Asai T, Akasaka S, Kamei M, Yamashita K, Ito F, Kubo T, Sato N, Takano KI, Himi T, Ichimiya S. High frequency of Bob1<sup>lo</sup> T follicular helper cells in florid reactive follicular hyperplasia. *Immunol Lett*. 2017 Nov;191:23-30. doi: 10.1016/j.imlet.2017.07.012 (査読有)
3. Nagaya T, Kawata K, Kamekura R, Jitsukawa S, Kubo T, Kamei M, Ogasawara N, Takano K, Himi T, Ichimiya S. Lipid mediators foster the differentiation of T follicular helper cells. *Immunol Lett*. 2017 Jan;181:51-57. doi: 10.1016/j.imlet.2016.11.006. (査読有)
4. Ogasawara N, Poposki JA, Klingler AI, Tan BK, Weibman AR, Hulse KE, Stevens WW, Peters AT, Grammer LC, Schleimer RP, Welch KC, Smith SS, Conley DB, Raviv JR, Soroosh P, Akbari O, Himi T, Kern RC, Kato A. IL-10, TGF-β and glucocorticoid prevent the production of type 2 cytokines in human group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. Oct 23, 2017. (査読有)
5. Kamekura R, Takano K, Yamamoto M, Kawata K, Shigehara K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Sato A, Ogasawara N, Tsubomatsu C, Takahashi H, Nakase H, Himi T, Ichimiya S. Cutting Edge: A Critical Role of Lesional T Follicular Helper Cells in the Pathogenesis of IgG4-Related Disease. *J Immunol*. 2017 Oct 15;199(8):2624-2629. doi: 10.4049/jimmunol.1601507. (査読有)
6. Takano K, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Recent advances in knowledge regarding the head and neck manifestations of IgG4-related disease. *Auris Nasus Larynx* 44: 7-17, 2017. (査読有)
7. Takano K, Yajima R, Kamekura R, Yamamoto M, Takahashi H, Yama N, Hatakenaka M, Himi T. Clinical utility of 18F-fluorodeoxyglucose/positron emission tomography in diagnosis of immunoglobulin G4-related sclerosing sialadenitis. *Laryngoscope* in press, 2017. (査読有)
8. Ichimiya S, Kamekura R, Kawata K, Kamei M, Himi T. Functional RNAs control T follicular helper cells. *J Hum Genet*. 2017 Jan;62(1):81-86. doi: 10.1038/jhg.2016.88. (査読有)
9. Abe A, Takano K, Kojima T, Nomura K, Kakuki T, Kaneko Y, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Interferon-gamma increased epithelial barrier function via upregulating claudin-7 expression in human submandibular gland duct epithelium. *J Mol Histol*. 2016 Jun;47(3):353-63. doi: 10.1007/s10735-016-9667-2. (査読有)
10. Sato A, Kamekura R, Kawata K, Kawada M, Jitsukawa S, Yamashita K, Sato N, Himi T, Ichimiya S. Novel Mechanisms of Compromised Lymphatic Endothelial Cell Homeostasis in Obesity: The Role of Leptin in Lymphatic Endothelial Cell Tube Formation and Proliferation. *PLoS One*. 2016 Jul 1;11(7):e0158408. doi: 10.1371/journal.pone.0158408. (査読有)
11. Takano K, Nomura K, Abe A, Kamekura R, Yamamoto M, Ichimiya S, Takahashi H, Himi T. Clinicopathological analysis of salivary gland tissue from patients with IgG4-related disease. *Acta Otolaryngol* 136 (7): 717-721, 2016. (査読有)
12. Kamekura R, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Ichimiya S, Himi T. Role of

Crosstalk between Epithelial and Immune Cells, the Epimicrobiome, in Allergic Rhinitis Pathogenesis. Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:75-82. doi: 10.1159/000441878. (査読有)

13. Yamashita K, Kawata K, Matsumiya H, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, Ogasawara N, Takano K, Kubo T, Kimura S, Shigehara K, Himi T, Ichimiya S. Bob1 limits cellular frequency of T-follicular helper cells. Eur J Immunol. 2016 Jun;46(6):1361-70. doi: 10.1002/eji.201545499. (査読有)

[学会発表](計9件)

1. Ryuta Kamekura, Kenichi Takano, Motohisa Yamamoto, Koji Kawata, Sumito Jitsukawa, Tomonori Nagaya, Fumie Ito, Chieko Tsubomatsu, Hiroki Takahashi, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya. Role of lesional BCL6hiPD-1hi T follicular helper cells as a cardinal B-cell helper to produce IgG4 in IgG4-related disease. 2017 AAAAI Annual meeting. 平成29年3月3-6日, アトランタ(米国)
2. 亀倉隆太, 高野賢一, 山本元久, 伊藤史恵, 矢部勇人, 川田耕司, 高橋裕樹, 氷見徹夫, 一宮慎吾: 研究奨励賞セッション IgG4 関連涙腺・唾液腺炎の病態形成における濾胞ヘルパーT細胞の機能的役割. 第45回日本臨床免疫学会総会(平成29年9月28~30日, 東京)
3. 伊藤史恵, 亀倉隆太, 高野賢一, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 加齢に伴う濾胞ヘルパーT細胞と濾胞制御性T細胞の機能変容. 第30回日本口腔・咽頭科学学会総会ならびに学術講演会(平成29年9月7~8日, 金沢)
4. 亀倉隆太, 高野賢一, 山本元久, 伊藤史恵, 川田耕司, 重原克則, 高橋裕樹, 氷見徹夫, 一宮慎吾: IgG4 関連涙腺唾液腺炎の病変部位とリンパ組織に存在する濾胞ヘルパーT細胞の機能的差異. 第66回日本アレルギー学会学術大会(平成29年6月16~18日, 東京)
5. 伊藤史恵, 亀倉隆太, 川田耕司, 高野賢一, 氷見徹夫, 一宮慎吾: Regulatory mechanism of IgG4 production in lesions of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis. 第106回日本病理学会総会(平成29年4月27~29日, 東京)
6. 亀倉隆太, 高野賢一, 伊藤史恵, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 奨励賞応募演題 IgG4 関連涙腺・唾液腺炎の病変部位における濾胞ヘルパーT細胞の機能的役割. 第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(平成29年4月13~15日, 旭川)
7. Ryuta Kamekura, Koji Kawata, Sumito Jitsukawa, Fumie Ito, Katsunori

Shigehara, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya: Role of activated T follicular helper cells in the pathogenesis of IgG4-related disease. 第45回日本免疫学会学術集会(平成28年12月5~7日, 宜野湾)

8. 亀倉隆太, 實川純人, 長屋朋典, 伊藤史恵, 坪松ちえ子, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 活性化濾胞ヘルパーT細胞によるシラカバ花粉症の病態形成のメカニズムの解明. 第55回日本鼻科学会総会・学術講演会(平成28年10月13~15日, 宇都宮)
9. 長屋朋典, 亀倉隆太, 山下恵司, 實川純人, 川田耕司, 一宮慎吾, 氷見徹夫: 濾胞ヘルパーT細胞の分化と機能における脂質メディエーターの役割. 第117回日本耳鼻咽喉科学学会総会・学術講演会(平成28年5月19~21日, 名古屋)

[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

氷見 徹夫(Himi Tetsuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90181114

(2)研究分担者

高野 賢一(Takano Kenichi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70404689

一宮 慎吾(Ichimiya Shingo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90181114

(3)連携研究者

(4)研究協力者