

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08147

研究課題名（和文）サルコイドーシスにおける制御性T細胞の機能と治癒機構からみた治療法の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a treatment strategy focused on the function of regulatory T cells to achieve an improvement process of sarcoidosis

研究代表者

安東 優（Ando, Masaru）

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20336267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：サルコイドーシスの改善機序を解明するために、制御性T細胞に關与すると思われるサイトカイン、細胞マーカーの発現を血清及び肺胞洗浄液を用いて検討した。制御性T細胞の細胞表面マーカーのsFOXP-3は改善群と不変・増悪・プレドニン治療群との間ではその発現に有意差はなかった。また、sFoxp3はBALFCCL20、sCCR6と弱い相関がみられた。改善・不変群と増悪・プレドニン治療群との比較では、増悪・プレドニン使用群においてCCL20、ACE、リゾチーム、sIL-2Rは有意に高値であった。CCL20は、ACE、リゾチーム、sIL-2Rと同じように病勢悪化を予測しうる代替マーカーとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコイドーシスは、自然に改善するものから、ステロイドや免疫抑制剤を必要とする難治性のものまで病勢が多彩である。肉芽腫形成を抑制する機序として制御性T細胞の關与があるものと仮説をたてた。本研究では制御性T細胞の細胞マーカーsFOXP-3の発現は改善群とその他の群で有意差がみられなかった。今回の検討では明らかにできなかったが、制御性T細胞及びその細胞が關与する分子が肉芽腫の退縮機序に關与することが明らかになれば、難治性サルコイドーシスの新たな治療法の開発の一助となる。

研究成果の概要（英文）：We examined the mechanisms of the serum and bronchoalveolar lavage fluid levels of cytokines and soluble cell markers to elucidate the mechanisms underlying the improvement in patients with sarcoidosis. The serum levels of Foxp3, which is considered to be a cell marker of regulatory T cells did not differ between the improvement group and the other group (no change/exacerbation/treatment with prednisolone). Weak correlation was observed between the serum levels of Foxp3 and BALF CCL20, and between Foxp3 and serum CCR6. When the improvement/no change and exacerbation/treatment groups were compared, the serum levels of CCL20, ACE, lysozyme and sIL-2R were higher in the exacerbation/treatment group. Thus, CCL20 may be a new surrogate biomarker for predict disease severity in patients with sarcoidosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：サルコイドーシス 制御性T細胞 サルコイドーシス重症度 サルコイドーシス予後

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシス(サ症)における肉芽腫形成過程の解析は多くなされているが、改善過程に焦点をあてた研究はほとんどない。制御性 T 細胞(Treg)の機能が活動期では低下し回復期には改善するとの研究報告があることから、予想される結果は、改善過程時では Treg の復元による IL-10 産生能の増加が予測れ、その復元には TGF- β や IL-35 による Treg の活性化が関与するのではないかと推測される。また、最近の研究では、サ症の肉芽腫形成に活性化した Th17 リンパ球が集簇し、Th17 と抑制的に働く Treg とのバランスで肉芽腫の形成がコントロールされる。Th17 上に発現する CCR6 は、CCL20 に特異的に結合することが知られており、CCL20 は類上皮細胞肉芽腫やマクロファージに発現している。したがって、サ症においては肉芽腫やマクロファージから産生される CCL20 を介して Th17 が集簇する機序が推定され、疾患活動性マーカーとなる可能性があるが、その詳細については明らかではない。

2. 研究の目的

自然に改善するサ症症例と不変・増悪する症例を 2 群間で比較することにより、サ症が自然改善に關与するサイトカインや細胞を同定し、難治性病態の機序を明らかにすることである。Foxp3 陽性制御性 T 細胞は様々なアレルギー疾患においてアレルギー反応を抑制する重要な細胞であることが知られている(Sakaguchi et al. J Exp Med, 72-87, 1985)。活動性 Th17 細胞には CCR6 が高発現し、Th17 細胞のマスター転写因子である ROS β t によって誘導されることが報告されている(Hirota K et al. J Exp Med, 2803-2812, 2007)。本研究では血清、BALF を用いるため、活動性肉芽腫のマーカーとして CCL20、制御性 T 細胞の液性マーカーとして Foxp3、Th17 細胞の活動性マーカーとして CCR6 を指標とした。

3. 研究の方法

サ症の診断については、組織診断群は全身のいずれかの臓器で壊死を伴わない類上皮細胞肉芽腫が陽性であり、かつ、既知の原因の肉芽腫および局所サルコイド反応を除外できるものとした(組織診断群)。診断時に採取した保存用血清及び気管支肺胞洗浄液(BALF)は-80 度のフリーザーに保管した。CCL20 は R&D system 社、CCR6 は AVIVA systems biology 社、Foxp3、IL-17 は abcam 社のエライザーキットを用いた。ACE、lysozyme、sIL-2R は診療録を参照した。統計に関しては、2 群間の比較は Mann-Whitney U 検定、2 群間の相関は、Spearman の相関検定を行った。なお、本研究は大分大学臨床研究倫理委員会にて承認済である。

4. 研究成果

組織学的に診断されたサ症患者 72 例に対して血清 CCL20、CCR6、Foxp3、IL-17 を測定した。血清 CCL20 (sCCL20) median 18.0 pg/mL (range 4.5-1789) , 血清 CCR6 (sCCR6) median 5.9 pg/mL (range 1.4-101.3) , 血清 Foxp3 (sFoxp3) 0.0 ng/mL (range 0-13.2) , 血清 IL-17 (sIL-17) median 0 pg/mL (range 0-17.5) , ACE median 23.8 IU/L (range 7.0-69.1) lysozyme median 11.8 μ g/mL (range 3.1-66.0) , sIL-2R median 887.0 U/mL (range 269-8479)であった。また肺胞洗浄液 CCL20 (BALF CCL2)、CCR6 (BALF CCR6)を測定したところ、BALF CCL20 median 4.3 pg/mL (range 0-259.3) , BALF CCR6 median 3.0 pg/mL (range 0-20.1)であった。

制御性 T 細胞の cell marker と考えられる Foxp3 は、BALF CCL20 ($r=0.389$, $p=0.001$)、sCCR6 ($r=0.356$, $p=0.002$)と弱い相関がみられた。一方、sCCL20、BALF CCR6、sIL-17、ACE、lysozyme、sIL-2R との間では相関はみられなかった。

sCCL20 は、BALF CCL20 ($r=0.279$, $p=0.018$), sIL-2R ($r=0.342$, $p=0.003$)と弱い相関がみられ、ACE ($r=0.208$, $p=0.080$)、lysozyme ($r=0.218$, $p=0.066$)で統計学的有意差はないが弱く相関する傾向がみられた。一方、BALF CCL20 は、sCCL20、sFoxp3、ACE ($r=0.315$, $p=0.007$)、lysozyme ($r=0.313$, $p=0.007$)、sIL-2R ($r=0.456$, $p<0.001$)と弱い相関がみられた。BALF CCR6 及び sIL-17 に関しては、相関を認めるマーカーはなかった。

診断後 6 か月時点で疾患活動性マーカー (ACE, lysozyme, sIL-2R) が低下し、画像で明らかなるリンパ節の縮小が観察されたものを改善群 ($n=17$)、その他を不変・増悪・プレドニン治療群 ($n=55$) とし 2 群間比較を行った。sFoxp3 は改善群と不変・増悪・プレドニンの群で有意差はみられなかった。また、そのほかのマーカーについてもいずれも有意差がみられなかった。改善群 ($n=17$) と不変群を除いた増悪・プレドニン治療群 ($n=15$) の比較では、sCCL20 (median 18.9 pg/mL vs median 25.4 pg/mL, $p=0.053$) ACE (median 23.2 IU/L vs median 33.8 IU/L, $p=0.008$) リゾチーム (median 12.8 μ g/mL vs median 21.8 μ g/mL, $p=0.037$) sIL-2R (median 1003.0 U/mL vs median 3041.0 U/mL, $p=0.007$) であった。sCCL20 に関しては、改善群は増悪・プレドニン治療群よりも低値である傾向があった ($p=0.053$)。改善・不変群 ($n=57$) と増悪・プレドニン治療群 ($n=15$) の比較では、sCCL20 (median 15.6 pg/mL vs median 25.4 pg/mL, $p=0.013$) BALF CCL20 (median 3.6 pg/mL vs median 10.9 pg/mL, $p=0.006$)、ACE (median 21.8 IU/L vs median 33.8 IU/L, $p=0.001$) lysozyme (median 11.4 μ g/mL vs median 21.8 μ g/mL, $p<0.001$) sIL-2R (median 843.0 U/mL vs median 2611 U/mL, $p<0.001$) であった。

制御性 T 細胞の機能がサ症活動期では低下し回復期には改善するとの研究報告がある。制御性 T 細胞の還元による IL-10 産生増加がサ症の病勢低下に寄与するものと予測された。本研究では、制御性 T 細胞の細胞表面マーカーである Foxp3 の血中濃度は改善群と悪化・プレドニン治療群との間では有意差はなかった。

一方、改善群と増悪・プレドニン使用群の比較で有意差があったのは ACE、lysozyme、sIL-2R であった。これらのマーカーは通常診療で測定可能なマーカーであり、低値であれば無治療経過観察で自然改善、寛解に向かう可能性が示唆された。CCL20 はマクロファージや肉芽腫内の多核巨細胞や上皮細胞に発現していることが知られており、我々は以前、サルコイドーシス患者血清中の CCL20 濃度は正常ボランティアよりも高値であり、ACE、lysozyme、sIL-2R と弱い正の相関があることを報告した (第 59 回日本呼吸器学会学術講演、東京、ATS 2019 International Conference 2019 in Dallas, USA)。本研究では、改善・不変群と比較して増悪・プレドニン使用群において sCCL20、BALF CCL20 はいずれも高値であり、ACE、lysozyme、sIL-2R と同様の結果であった。CCL20 は病勢悪化の予後を予測しうる新たなバイオマーカーになる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西山祐加、安東 優 他
2. 発表標題 サルコイドーシス患者における血清CCL-20濃度と疾患活動性との関連
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会, 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Ando et al.
2. 発表標題 CCL20 and its association with disease activity and severity in sarcoidosis.
3. 学会等名 American Thoracic Society 2019 International Conference in Dallas, USA. (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------