

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18776

研究課題名(和文) CD8陽性Tfh細胞が関わる慢性炎症性疾患の病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathophysiological mechanism of chronic inflammatory diseases involving CD8-positive T follicular helper cells

研究代表者

村山 公介 (Murayama, Kosuke)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20825418

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)：IgG4関連疾患の病態解明をすすめるため、IgG4関連涙腺・唾液腺炎(IgG4-DS)の顎下腺病変部に高率に存在しているCD8陽性濾胞ヘルパーT(Tfh)細胞の解析を行い、IgG4-DSにおけるCD8陽性Tfh細胞の役割を明らかにした。CD8陽性Tfh細胞は自身のメモリーB細胞に対する細胞傷害能を有する新規のTfh細胞サブセットであり、慢性炎症環境においてCD8陰性Tfh細胞より分化誘導されることを示した。上記の結果から、CD8陽性Tfh細胞はIgG4-RDにおいてIgG4を異常産生するメモリーB細胞を傷害することで病勢の収束に寄与していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の検討において全Tfh細胞に占めるCD8陽性Tfh細胞の割合が末梢血中IgG4値や罹患臓器数と逆相関することが示されたため、顎下腺病変の解析からIgG4関連疾患の全身的な重症度予測が可能となる可能性がある。また、CD8陽性Tfh細胞は健常小児扁桃にも比較的多く存在していることが我々の解析で確認されたため、健常者におけるCD8陽性Tfh細胞はメモリーB細胞の傷害を介して抗体産生制御の恒常性維持に寄与していることが推察される。

疾患特異的なCD8陽性Tfh細胞が存在すると仮定した場合、これを制御することで自己抗体産生メモリーB細胞を制御し新たな治療に結びつけることが出来る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathophysiology of IgG4-related disease, we analyzed CD8-positive T follicular helper (Tfh) cells present in the submandibular glands of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis (IgG4-DS) patients, and clarified the role of CD8-positive Tfh cells in IgG4-DS.

We confirmed that CD8-positive Tfh cells are a novel Tfh cell subset having cytotoxic potential for their own memory B cells and are induced to differentiate from CD8-negative Tfh cells in a chronic inflammatory environment.

In conclusion, it was speculated that CD8-positive Tfh cells damaged memory B cells that abnormally produce IgG4 in IgG4-RD and contributed to the convergence of the disease.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：慢性炎症性疾患 IgG4関連疾患 IgG4関連涙腺・唾液腺炎 Tfh細胞 CD8陽性Tfh細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は、自己免疫疾患やアレルギー疾患にとどまらず、最近では生活習慣病や癌の病態の背景にあることが知られ、大変注目されている概念である。慢性炎症を伴うそれらの疾患の多くは難治性であるうえに、近年患者数が増加しているため、慢性炎症性疾患の病態の解明と新規治療法の開発は喫緊の課題である。しかしながら、慢性炎症性疾患の背景には複雑な免疫機構の変化が存在しており、その詳細は未だに不明な点が多い。

我々は、慢性炎症性疾患の1つであるIgG4関連涙腺・唾液腺炎(IgG4-DS)の顎下腺病変組織の解析を行い、病変部位に多数の濾胞ヘルパーT(Tfh)細胞が浸潤していることを新たに発見した(J Immunol 2017)。興味深いことに、その後の追加解析でそれらのTfh細胞は高率にCD8が陽性であることを発見した。我々の独自の研究から発見されたこのCD8陽性Tfh細胞の病理学的役割については、これまでに報告がない。慢性炎症性疾患の病理組織所見に鑑みてCD8陽性Tfh細胞がその病態形成に関与している可能性が高いと考えられたため、CD8陽性Tfh細胞の機能解析を行い、IgG4-DSの病態解明をすすめるために本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が新たに発見したCD8陽性Tfh細胞の解析を行い、IgG4-DSの病態解明をすすめることである。さらに、CD8陽性Tfh細胞を標的とした慢性炎症性疾患の新たな治療法の開発につなげることを目指している。

3. 研究の方法

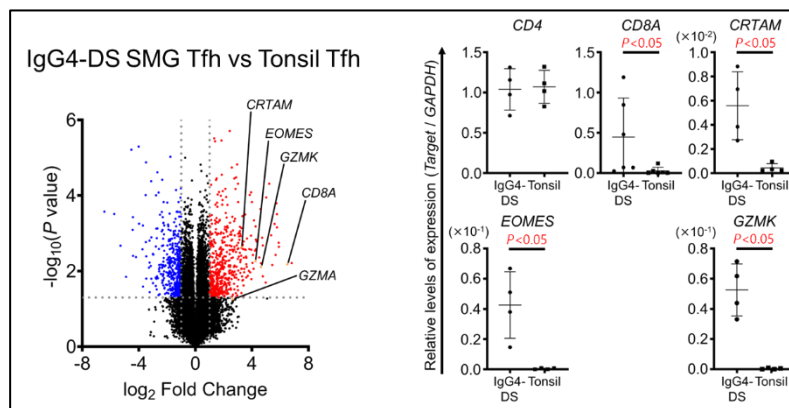
本研究には、IgG4-DS患者の顎下腺組織および末梢血に加え、成人および小児の口蓋扁桃組織を使用した。顎下腺組織および口蓋扁桃組織は手術検体を使用した。それぞれの検体からリンパ球を分離したのち、フローサイトメトリーを用いて目的の細胞を単離し、DNAマイクロアレイ・PCR・共培養などに使用した。手術検体および末梢血の使用に関しては、すべて書面による説明と同意を得た。

また、IgG4-DS患者のカルテ情報より各種臨床パラメータ情報を収集し、同一患者の顎下腺組織および末梢血の解析データと照らし合わせ、相関関係の有無につき検討を行った。臨床情報の使用に関しても、すべて書面による説明と同意を得た。

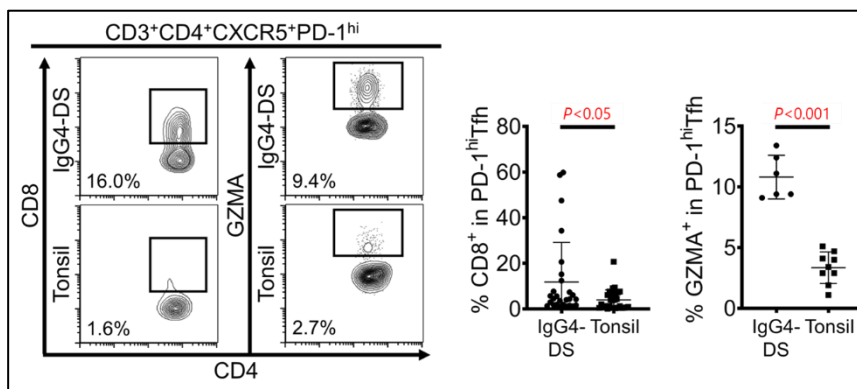
4. 研究成果

(1) CD8陽性Tfh細胞の存在の確認

IgG4-DSの顎下腺病変部に存在するTfh細胞の特殊性を網羅的に検索する目的で、IgG4-DS病変部のTfh細胞と口蓋扁桃のTfh細胞をそれぞれ単離し、マイクロアレイ・PCRを用いて比較検討を行った。右図の結果から、IgG4-DS病変部のTfh細胞は扁桃のTfhと比較して細胞傷害性T細胞(CTL)関連分子を高発現していることが確認された。

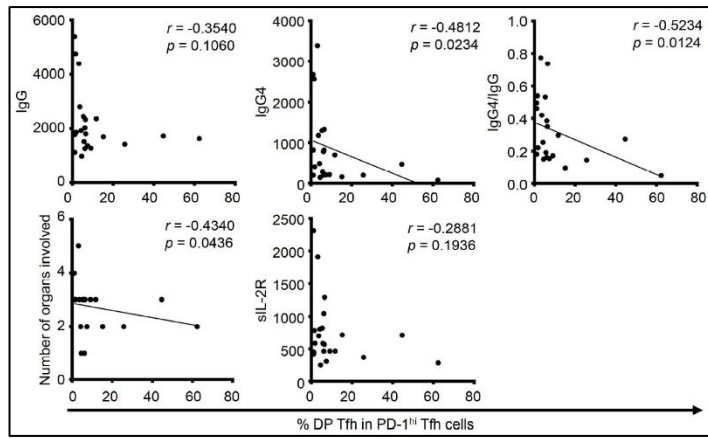


上記結果をもとにIgG4-DS病変部のTfh細胞をフローサイトメトリーで解析した。右図の結果から、IgG4-DS病変部のTfh細胞にはCD8およびグランザイムを発現するものが高率に存在していることが確認された。



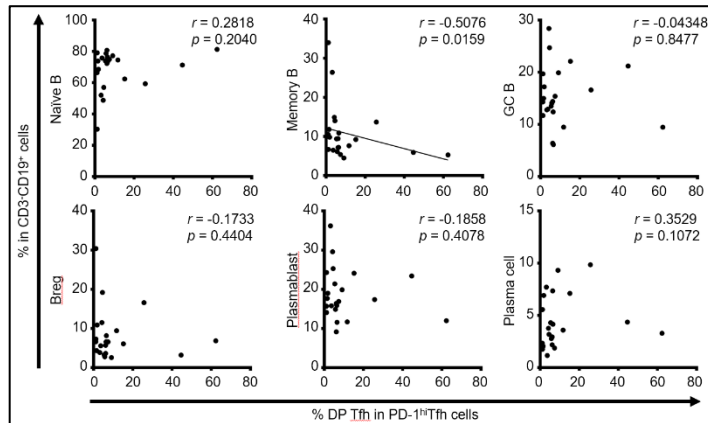
(2) CD8 陽性 Tfh 細胞と臨床パラメータおよび B 細胞サブセットとの相関

IgG4-DS 病変部の CD8 陽性 Tfh 細胞の割合と臨床パラメータの相関を調べた。右図の結果から、CD8 陽性 Tfh 細胞の割合は、血中 IgG4 値、血中 IgG4/IgG 比、IgG4 関連疾患の罹患臓器数とそれぞれ有意な負の相関があることが示された。この結果から、一つの罹患臓器の解析から病勢や重症度を推定できる可能性が示された。



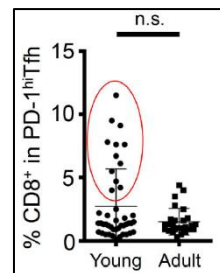
(DP Tfh : double positive Tfh、CD8 陽性 Tfh 細胞と同義)

同様に IgG4-DS 病変部の CD8 陽性 Tfh 細胞の割合と B 細胞サブセットの相関を調べた。右図の結果から、CD8 陽性 Tfh 細胞の割合は、メモリー B 細胞の割合と有意な負の相関があることが示された。この結果から、CD8 陽性 Tfh 細胞とメモリー B 細胞の間に何かしらの細胞間相互作用が存在することが推察された。



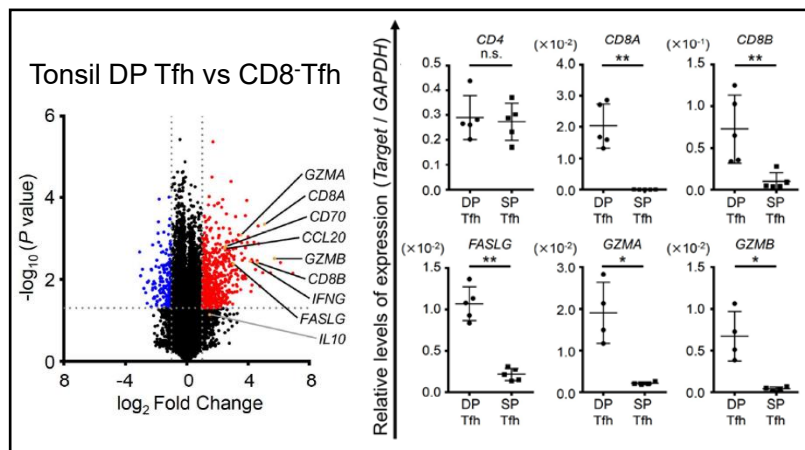
(3) CD8 陽性 Tfh 細胞と CD8 陰性 Tfh 細胞の比較検討

CD8 陽性 Tfh 細胞の機能解析をすすめるにあたり、IgG4-DS 病変部の CD8 陽性 Tfh 細胞のみでは検体量に限界があったため、口蓋扁桃組織を網羅的に解析し CD8 陽性 Tfh 細胞の検索を行った。その結果、小児扁桃の一部に CD8 陽性 Tfh 細胞が比較的高率に存在することが明らかとなった(右図)。そこで、小児扁桃から CD8 陽性 Tfh 細胞と CD8 陰性 Tfh 細胞をそれぞれ単離し、比較検討することで CD8 陽性 Tfh 細胞の機能解析をすすめた。



(n.s : not significant)

小児扁桃の CD8 陽性 Tfh 細胞と CD8 陰性 Tfh 細胞をマイクロアレイ・PCR を用いて比較検討を行った。右図の結果から、扁桃の CD8 陽性 Tfh 細胞においても IgG4-DS 病変部の CD8 陽性 Tfh 細胞と同様に CTL 関連分子が高発現していることが確認された。

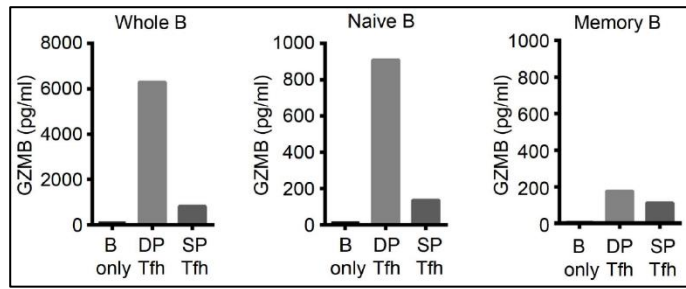


(* : P<0.05, ** : P<0.01)

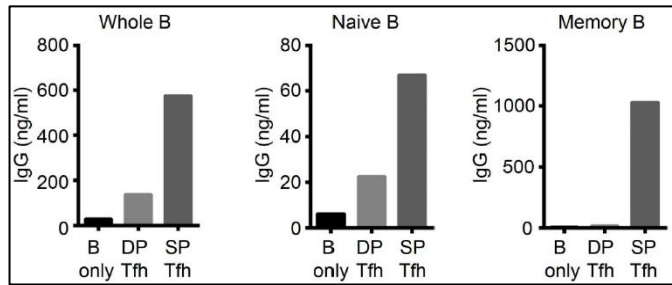
(SP Tfh : single positive Tfh、CD8 陰性 Tfh 細胞と同義)

(4) CD8 陽性 Tfh 細胞と B 細胞の共培養実験

小児扁桃の CD8 陽性 Tfh 細胞・CD8 陰性 Tfh 細胞・B 細胞をそれぞれ単離し、細胞数を揃えて培地に撒き、7 日間の共培養を行ったのちに培養上清を回収し、培養上清中の IgG を ELISA 法で定量した。右図の結果から CD8 陽性 Tfh 細胞は従来の Tfh 細胞と比較して B 細胞の抗体産生誘導能が低いことが明らかとなった。さらに、B 細胞をナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞に変更して同様の共培養実験を行ったところ、メモリー B 細胞における抗体産生誘導能が著しく低いことが明らかとなった。

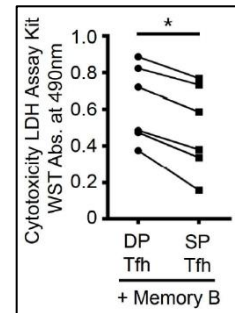


同様に、培養上清中の GZMB を ELISA 法で定量した。右図の結果から CD8 陽性 Tfh 細胞の培養上清中には GZMB が多量に存在することが明らかとなったが、メモリー B 細胞と共培養を行った上清では GZMB が著明に減少していることが明らかとなった。以上の結果から、CD8 陽性 Tfh 細胞が自身のメモリー B 細胞を障害している可能性が示唆された。



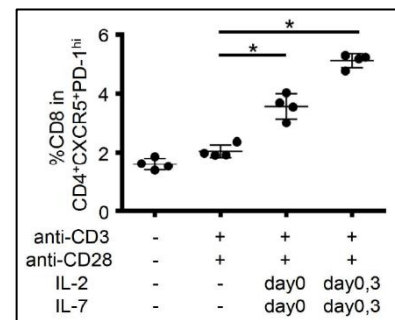
(5) CD8 陽性 Tfh 細胞のメモリー B 細胞に対する細胞傷害能の確認

CD8 陽性 Tfh 細胞および CD8 陰性 Tfh 細胞とメモリー B 細胞の共培養を行い、LDH アッセイを用いて細胞傷害能の確認を行った。右図の結果から CD8 陽性 Tfh 細胞との共培養で有意に LDH の上昇が確認されたため、細胞障害が生じていることが示された。



(6) CD8 陽性 Tfh 細胞は CD8 陰性 Tfh 細胞から分化する

これまでの研究データから、CD8 陽性 Tfh 細胞が CD8 陰性 Tfh 細胞から分化すると予想し、様々なサイトカインで刺激を行い分化誘導がみられるか解析を行った。その結果、右図に示したように CD8 陰性 Tfh 細胞に IL-2 と IL-7 を添加して刺激培養を行うことで、CD8 陽性 Tfh 細胞に一部分化することが確認された。加えて、刺激回数を 2 回にすることでさらに分化誘導が生じることが確認された。



(1) から (6) の結果から、CD8 陽性 Tfh 細胞は慢性炎症環境において CD8 陰性 Tfh 細胞から分化してくる新規の Tfh 細胞サブセットであり、自身のメモリー B 細胞を障害することで抗体産生量の調整を行う機能を有していることが明らかとなった。IgG4-DS においては IgG4 産生メモリー B 細胞を障害することで病態の収束に寄与していると考えられた。また、CD8 陽性 Tfh 細胞は IgG4-DS のみではなく、他の慢性炎症性疾患においても病変部にみられる可能性があり、病態解明の新たな糸口となる可能性を秘めているものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村山公介、亀倉隆太、一宮慎吾、高野賢一
2. 発表標題 IgG4関連涙腺・唾液腺炎におけるCD8陽性濾胞ヘルパーT細胞の機能解析
3. 学会等名 第34回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山公介、亀倉隆太、一宮慎吾、高野賢一
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるCD8陽性濾胞ヘルパーT細胞の機能解析
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山公介、亀倉隆太、一宮慎吾、高野賢一
2. 発表標題 IgG4関連涙腺・唾液腺炎の病変組織におけるB細胞サブセットの解析
3. 学会等名 第32回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Murayama, Ryuta Kamekura, Shingo Ichimiya, Kenichi Takano
2. 発表標題 Unique profiles of lesional B cell subsets underlie the pathogenesis of IgG4 related disease
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery (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
---------	---------