

令和 4 年 4 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22786

研究課題名(和文) 濾胞性T細胞の重症筋無力症における免疫学的指標としての検討

研究課題名(英文) Follicular helper T cells as an immunological marker in Myasthenia gravis

研究代表者

芦田 真士 (Ashida, Shinji)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：60884202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(Myasthenia gravis: MG)は、神経筋接合部に対する抗体により惹起される自己免疫性疾患である。我々は、抗アセチルコリン受容体抗体陽性のMG患者において末梢血中の濾胞性T細胞(Tfh)の頻度、中でもinducible T cell costimulator(ICOS)を高発現したTfhの頻度が上昇しており、重症度と相関することを見出した。さらにTfhのIL-21、IL-17A、IL-4といったサイトカイン産性能はMGにおいて亢進した。ICOS高発現Tfhの頻度は免疫治療により臨床症状の改善とともに低下し、MG活動性の免疫学的指標になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症筋無力症(MG)は自己免疫疾患であり、筋力低下、眼症状、呼吸症状をきたし、患者の生活の質を著しく低下させるのみならず、重症例では至死的である。奔放における患者数は増加しており、高齢者のMGが特に増加していることから、重要な神経免疫疾患である。現在の免疫治療はステロイド、免疫抑制剤が中心であり、生物由来製剤や血液浄化療法を併用しても難治の症例が存在する。疾患活動性を反映する免疫学的な指標、新たな治療標的が望まれている。本研究で着目したT細胞サブセットである濾胞性T細胞(Tfh)は新たな免疫指標、治療標的になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：MG is the autoimmune disease targeting neuro-muscular junction. MG cause fatigue, muscle weakness and respiratory failure. Tfh, chemokine receptor: CXCR5 expressing CD4 T cells, plays crucial role for B-cell maturation and antibody production in secondary lymph nodes. We focused on the CXCR5+ CD4 T cells in peripheral blood (circulating Tfh). This research revealed that the frequency of Tfh, especially ICOS highly expressing Tfh were higher in MG and cytokine productions (IL-4, IL-17A and IL-21) by Tfh were upregulated in MG. Interestingly, the Tfh phenotype showed the correlation with disease severity in MG and Tfh frequency was reduced after immunotherapy. This research indicated the possibility of Tfh in peripheral blood as the immunological marker in MG.

研究分野：神経免疫学

キーワード：重症筋無力症 濾胞性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (Myasthenia gravis: MG) は、神経筋接合部に対する抗体により惹起される自己免疫性疾患であり、近年本邦で増加傾向にある。MG 患者の 80% にアセチルコリン受容体への自己抗体 (抗 acetylcholine receptor: AchR 抗体) を認めるが、Rituximab や Eculizumab といった新規生物学的製剤は抗 AchR 抗体値を低下させることなく臨床症状の改善をきたすとされており¹、疾患活動性や治療評価目的の新たな指標が求められている。またステロイド、免疫抑制剤の効果が不十分な治療抵抗群が一定数存在し、新たな免疫機序を標的とした治療法が望まれている。本研究では MG の臨床的指標になる免疫機構を探索するとともに、治療標的も視野に病態機序を明らかにすることを目的とした。

本研究では、濾胞性 T 細胞 (Follicular helper T cells: Tfh) に着目した。Tfh は近年同定された、ヘルパー T 細胞 (Helper T cells: Th) の中でケモカインレセプターである CXCR5 を発現していることを特徴とし、2 次リンパ節における B 細胞の形質細胞への分化、抗体産生を促進する細胞群である²。また形質細胞は同じく 2 次リンパ節に存在し、抗体産生の中心となる。従って、Tfh は自己反応性の抗体産生を介した自己免疫性疾患の上流に位置する。CXCR5 陽性の Th は末梢血中にも確認でき (circulating Tfh: cTfh)、全身性エリテマトーデスなど抗体介在性の自己免疫性疾患において増加が報告されている³。

2. 研究の目的

本研究では、MG において、詳細な表面抗原も含めた Tfh の解析を行うと共に、臨床における重症度や免疫治療前後での変化を明らかにすることを目的とした。またサイトカイン分泌を中心に cTfh の機能についても解析を行い、MG の免疫病態の解明および治療標的の可能性について検討を行った。神経免疫疾患においては、Tfh の表面抗原や機能については十分に検証されておらず、MG において重症度・治療反応性との関連は検討されていない。本研究により、治療効果を免疫学的に評価しうる指標を確立することを臨床的見地からの目的とした。

3. 研究の方法

重症筋無力症における濾胞性 T 細胞のフェノタイプと表面抗原の解析

Tfh においても、従来 Th で分類されてきた Th1、Th2、Th17 の特徴をもつ、Tfh1、Tfh2、Tfh17 のフェノタイプが存在する。また Tfh の表面分子の代表として、ICOS (Inducible T cell co-stimulator)、PD-1 (programmed death 1)、CD40 ligand 等があり、これらの分子は B 細胞との相互作用において重要である。本研究では、Tfh のフェノタイプと共に、表面分子の発現についても解析を行った。

濾胞性 T 細胞の *in vitro* functional assay

Tfh は直接的な T-B 細胞相互作用以外に、サイトカインを介して B 細胞の分化、抗体産生へ寄与している可能性がある。Tfh の産生する代表的サイトカインであるインターロイキン (IL)-21 は B 細胞の抗体産生を促進することが知られている⁴。申請者らは、Th 表面の CXCR5 を染色しセルソーターを使用することで、Tfh を生細胞のまま分離、*in vitro*での刺激実験において、cTfh による IL-21 の産生が MG において亢進していることを確認していた。本研究では、Tfh を分離、代表的なサイトカイン産生について解析を行った。さらに Tfh の代表的サイトカインである IL-21 の B 細胞への影響について、*in vitro*で評価した。

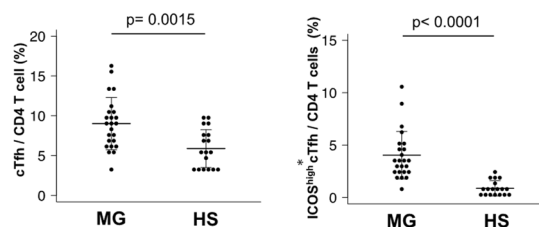
重症筋無力症の重症度、治療反応性と濾胞性 T 細胞の関連性の解析

申請者らは、未治療の MG において重症度と cTfh の頻度が相関することを明らかにした。治療後の疾患活動性の指標になるかを明らかにするために、免疫治療後の Tfh フェノタイプの解析を臨床情報もあわせて行った。

4. 研究成果

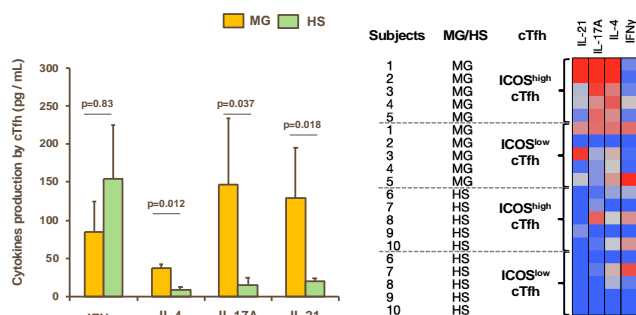
MG における末梢血 Tfh のフェノタイプの偏倚

免疫治療前の MG 群 24 名と健常群 18 名の末梢血リンパ球を、フローサイトメトリーを用いて解析、Tfh 頻度と phenotype を評価した。MG 群では、健常群と比較して、cTfh 頻度の上昇を認め、ICOS の発現が上昇していた。また cTfh 表面のケモカインを解析し、MG 患者では Th2/Th17 の特性をもつとされる cTfh2/cTfh17 が増加していることを見出した。Tfh2/Tfh17 は Tfh と比較して、B 細胞の成熟と抗体産生により重要とされており、抗体介在性疾患である MG において、Tfh の増加と偏倚が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

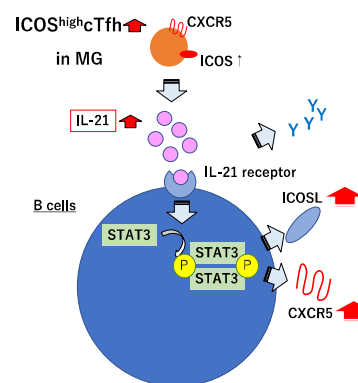


cTfhの機能解析

末梢血リンパ球から、cTfh をセルソーターにより単離、培地で 48 時間の T 細胞刺激を行い、上清中のサイトカインを cytometric bead array (CBA) 法を用いて定量した。サイトカインは Th1、Th2、Th17 の代表的サイトカインである、IFN- γ 、IL-4、IL-17A に加えて、Tfh の代表的サイトカインで B 細胞分化に重要な、IL-21 を評価した。MG 群由来の cTfh は健常群と比較して、IL-21、IL-17A、IL-4 を有意に産生した。この現象は MG 群由来の ICOS 高発現 cTfh でより顕著であった。このことは、で見出した Tfh フェノタイプの偏倚を機能的に裏付けるものと考えた。また、Tfh 頻度のみならず機能的にも MG で変化をみとめた点が興味深いと考えた。

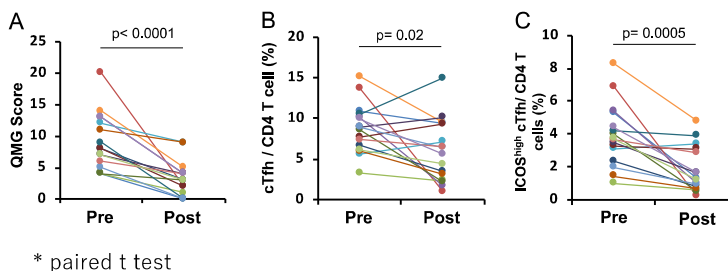
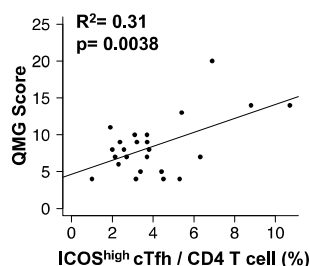


次に、磁気ビーズで末梢血中から B 細胞を単離、IL-21 を含む培地で刺激し上清中の IgG 産生について、CBA 法を用いて定量した。IL-21 刺激下で B 細胞の生存率、IgG 産生量は上昇し、IgG 産生は IL-21 の濃度依存性に増加を認めた。これにより、MG-Tfh の IL-21 の産生能亢進が病態に強く関与することが示唆された。また IL-21 刺激で B 細胞上の CXCR5 と ICOS ligand の発現が亢進することを見出した。さらに IL-21 受容体の下流シグナルである、STAT3 の重合を阻害することで、前述の IL-21 による B 細胞表面抗原の発現促進を認めなくなった。IL-21 は STAT3 のリン酸化を介して B 細胞表面の CXCR5 発現や ICOS ligand 発現を誘導することを明らかにした。これらの分子の発現促進は、B 細胞の 2 次リンパ節胚中心への遊走、T-B 相互作用において重要であり、胚中心における Tfh との相互作用を促進し、B 細胞の成熟と抗体産生に関わる可能性が推察された。



重症筋無力症の重症度、治療反応性と濾胞性 T 細胞の関連性の解析

未治療 MG 患者の重症度指標である QMG スコアと cTfh フェノタイプの比較を行った。cTfh、特に ICOS 高発現 cTfh の頻度は、QMG スコアと有意な正の相関を示した。また免疫治療により、重症度スコアが改善すると並行して、cTfh 頻度、ICOS 発現は低下を示した。免疫治療後は、特に cTfh17 の減少を認めた。Th17 と Tfh の分化やサイトカイン産生には共通する部分があり、Tfh/Tfh17 偏倚がより MG 病態機序と関連していることが推察され、特に cTfh17 に着目することで MG 病態の活動性をモニタリングできる可能性が示唆された。



<引用文献>

1. J F Howard Jr et al. Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *The Lancet Neurology* 2017;16(12):976-986.
2. R Morita et al. Human blood CXCR5(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011;34(1):108-121.
3. H Ueno et al. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nature Immunology* 2015;16(2):142-152.
4. R Ettinger et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* 2005;175:7867-7879.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ashida Shinji, Ochi Hirofumi, Hamatani Mio, Fujii Chihiro, Kimura Kimitoshi, Okada Yoichiro, Hashi Yuichiro, Kawamura Kazuyuki, Ueno Hideki, Takahashi Ryosuke, Mizuno Toshiki, Kondo Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Immune Skew of Circulating Follicular Helper T Cells Associates With Myasthenia Gravis Severity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e945 ~ e945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤誉之, 芦田真士
2. 発表標題 重症筋無力症における濾胞性T細胞の偏移: 新規疾患活動性バイオマーカーになりうるか.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会. シンポジウム34 神経免疫疾患の個別化医療: 現在と未来. (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ashida Shinji, Fujii Chihiro, Hamatani Mio, Nishigori Ryusei, Takata Masaki, Kimura Kimitoshi, Kawamura Kazuyuki, Ochi Hirofumi, Takahashi Ryosuke, Mizuno Toshiki, Kondo Takayuki
2. 発表標題 Phenotypic skew of circulating follicular helper T cells in Double Seronegative Myasthenia gravis
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦田真士, 藤井ちひろ, 濱谷美緒, 錦織隆成, 高田真基, 木村公俊, 川村和之, 上野英樹, 越智博文, 高橋良輔, 水野敏樹, 近藤誉之
2. 発表標題 Double Seronegative MG における濾胞性T細胞の解析.
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ahisda Shinji、Ochi Hirofumi、Fujii Chihiro、Hamatani Mio、Mizuno Toshiki、Kondo Tanayuki
2. 発表標題 Association of micro RNA expression with circulating follicular helper T cells in Myasthenia gravis.
3. 学会等名 15th International Congress of Neuroimmunology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 芦田 真土、近藤 誉之	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 201
3. 書名 【神経免疫 メカニズムと疾患 神経系と免疫系を結ぶ分子機構の解明からバイオマーカー・治療標的の探索まで】(第2章)神経免疫と疾患 神経免疫疾患:近年の動向 抗アセチルコリン受容体抗体陽性重症筋無力症の免疫病態 濾胞性T細胞を含めたTh偏倚	

〔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
---------	---------