

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07463

研究課題名(和文)末梢血濾胞性ヘルパーT細胞を利用した視神経脊髄炎の多面的免疫モニタリング法の開発

研究課題名(英文) Immunological monitoring of neuromyelitis optica activity via peripheral blood circulating follicular helper T cell

研究代表者

越智 博文(Ochi, Hirofumi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20325442

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)：本研究において、視神経脊髄炎(NMO)ではIL21を高発現するCXCR5陽性の末梢血濾胞性ヘルパーT細胞(cTfh細胞)の増加は認められず、疾患活動性や治療反応性を反映するcTfh細胞サブセットを見出すことはできなかった。MGでは、IL21を高発現するCXCR5陽性のcTfh細胞が自己反応性B細胞の分化・成熟や自己抗体産生にかかわる一方で、NMOでは、PD-1を高発現するCXCR5陰性の末梢性ヘルパーT細胞(Tph細胞)が濾胞外経路において自己反応性B細胞の分化・成熟や組織炎症、自己抗体産生細胞の集簇に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MGとNMOはともに、病原性自己抗体によって惹起される神経系の自己免疫疾患である。MGでは、IL21を高発現するCXCR5陽性のcTfh細胞が末梢血中で増加し疾患活動性を反映することから、自己反応性B細胞の分化や成熟、自己抗体産生にはcTfh細胞が深く関与している可能性が考えられた。一方で、NMOではIL21を高発現するcTfh細胞の増加は観察されなかった。このことは、同じ抗体介在性自己免疫疾患であっても、自己反応性B細胞の分化・成熟や自己抗体産生にかかわるT細胞-B細胞相互作用の機序が異なることを示唆しており、両疾患では異なる細胞標的治療戦略が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ICOS<sup>high</sup> CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood (cTfh) increased and produced high amount of IL21 in patients with myasthenia gravis (MG). The frequency of cTfh cells within CD4<sup>+</sup> T cells was associated with clinical disease activity in MG. Whereas, high IL21-producing cTfh cells did not increase in patients with neuromyelitis optica (NMO). Although, both MG and NMO are characterized by autoantibody production, the mechanism of pathogenic T cell-B cell interaction may be different between the two conditions. High IL21-producing ICOS<sup>high</sup> CXCR5<sup>+</sup> cTfh cells may drive pathogenic B cell activation and differentiation in MG, whereas PD-1<sup>high</sup> CXCR5<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Tph) may promote local inflammation and accumulation of autoantibody-producing cells outside of lymphoid follicles in NMO.

研究分野：神経内科学

キーワード：視神経脊髄炎 AQP4抗体 アストロサイト 末梢血濾胞性ヘルパーT細胞 末梢性ヘルパーT細胞 補体 B細胞 IL6

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica : NMO) は、病原性自己抗体であるアクアポリン 4 (aquaporin-4 : AQP4) 抗体が補体介在性にアストロサイト傷害を誘導する結果、神経細胞や軸索の傷害が二次的に惹起される中枢神経の炎症性自己免疫疾患である。臨床的には重度の視神経炎と脊髄炎を繰り返すことを特徴とし、根治療法は未だ開発されていない。そのため、生涯にわたる再発予防治療が必要となる。従来の再発予防は、副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬による非特異的な治療に終始し、再発予防効果が不十分な難治例も少なくなかった。また、再発の有無のみを指標に経験的に用量設定が行われ、必要以上の治療が行われるなどした結果、骨粗鬆症や感染症、悪性腫瘍などの副作用が問題となることも少なくなかった。

一方、補体成分 C5 に対するヒトモノクローナル抗体エクリズマブと、IL-6 受容体に対するヒトモノクローナル抗体サトラリズマブの 2 製剤が 2019 年以降に相次いで承認され、高い再発予防効果が期待できるようになった。さらに、CD19 に対するヒトモノクローナル抗体イネピリズマブも承認申請中であり、治療成績向上が期待できる選択肢も拡大しようとしている。しかし、これらの生物学的製剤は高い再発予防効果が期待できる一方で、高額な治療費が必要なおえ、感染症をはじめとする重篤な副作用の懸念がある。このため、これからの NMO 治療では、免疫学的背景に応じて副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬、生物学的製剤を使い分ける、疾患活動性に応じて副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬の投与量を設定する、このような個別化治療戦略が求められると考えられる。従って、疾患活動性や治療効果を免疫学的に評価、また、治療効果を予測しうる免疫学的指標を確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

濾胞性ヘルパー T 細胞 (follicular helper T cell : Tfh 細胞) は、ケモカイン受容体 CXCR5 を発現していることを特徴とする CD4 陽性 T 細胞である(1)。通常は二次リンパ組織の胚中心に存在し、抗原に対して親和性の高い B 細胞の選択に寄与するほか、B 細胞の抗体産生細胞への分化を促進し、高親和性抗体の産生に寄与する(2)。一方、ヒト末梢血中の memory CD4 陽性 T 細胞の一部は CXCR5 を発現 (circulating Tfh 細胞 : cTfh 細胞) し、リンパ組織内の Tfh 細胞と同様に IL-21 の産生を介して B 細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する(3)。この cTfh 細胞は全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) や関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA) などの抗体介在性自己免疫疾患において増加し、疾患活動性を反映することが報告されている(4)。我々は、アセチルコリン受容体抗体によって惹起される自己免疫疾患である重症筋無力症 (myasthenia gravis : MG) においても、cTfh 細胞、とりわけ inducible T-cell co-stimulator (ICOS) を高発現した ICOS<sup>high</sup>cTfh 細胞が増加し、ICOS<sup>high</sup>cTfh 細胞では IL-21 の産生が亢進し、ICOS<sup>high</sup>cTfh 細胞が MG の重症度や疾患活動性の指標となることを新たに見出した(5)。そこで本研究では、NMO の疾患活動性と治療反応性に関連する cTfh 細胞サブセットを同定するとともに、cTfh 細胞を含む多面的な免疫学的指標による末梢血免疫モニタリング法を開発し、免疫学的指標に基づいた薬剤選択と用量設定による NMO の個別化治療戦略を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

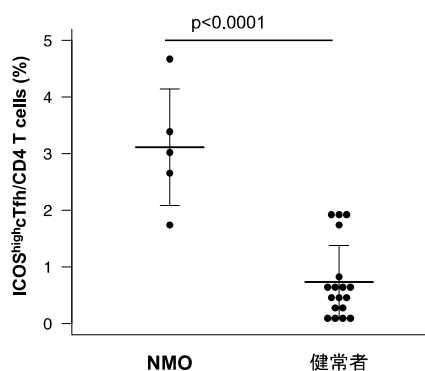
研究代表者と研究分担者が所属する施設において継続的に診療を受けている AQP4 抗体陽性 NMO (NMO spectrum disorders (NMOSD) を含む) を対象に、神経学的評価のほか、再発患者では急性期治療の前後で、慢性安定期の患者では外来受診時の採血検査に応じて末梢血のサンプリングを実施した。また、診断時や再発時には、臨床上の必要性に応じて脳脊髄液検査を実施し、脳脊髄液サンプルも採取した。採取したサンプルをもとに、末梢血中や脳脊髄液中の免疫関連細胞や免疫関連タンパク質の動態を解析し、治療薬、再発や画像所見に基づいた疾患活動性、治療反応性との関連を解析した。

### 4. 研究成果

本研究により以下のことが明らかとなった。

(1) ICOS を高発現する末梢血濾胞性ヘルパー T 細胞 (ICOS<sup>high</sup>cTfh 細胞) の動態 : 先行研究において我々は、NMO/NMOSD 再発期には cTfh 細胞、とりわけ ICOS を高発現した ICOS<sup>high</sup>cTfh 細胞が末梢血中で増加していることを見出した(図 1)。抗体介在性自己免疫疾患である MG においてこの細胞集団は、IL-21 を強く発現し、その頻度は MG の重症度や疾患活動性と関連した(5)。しかし、NMO/NMOSD では、IL-21 を高発現する ICOS<sup>high</sup>cTfh 細胞の増加は認められなかった。このことは、MG と NMO/NMOSD とでは、自己反応性 B 細胞の

図1 NMOとICOS<sup>high</sup>cTfh

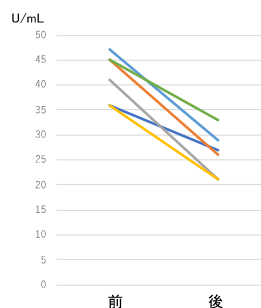


分化・成熟や自己抗体産生にかかわる cTfh 細胞の役割が異なる可能性を示唆していると考えられる。

RA の関節内において、programmed death-1 (PD-1) を高発現する CD4 陽性 T 細胞が同定され、末梢性ヘルパー T 細胞 (peripheral helper T cell : Tph 細胞) と命名されている(6)。この PD-1<sup>high</sup>Tph 細胞は、cTfh 細胞と同様に IL-21 の産生を介して自己反応性 B 細胞の分化・成熟や自己抗体産生を促進するが、CXCR5 や Bcl-6 を発現せず、炎症部位への移動を誘導する CCR2、CX3CR1、CCR5 などのケモカイン受容体を発現している点で cTfh 細胞と異なるとされる。さらに、PD-1<sup>high</sup> Tph 細胞は、ケモカイン CXCL13 を産生しリンパ球を炎症部位に集簇させる作用を有している。この Tph 細胞は、RA のみならず SLE や 1 型糖尿病などの自己免疫患者の末梢血中で増加していることが報告されている(7, 8)。また、最近になって、Tph 細胞は NMO/NMOSD の末梢血中においても増加し、CD27 陽性 IgD 陰性 switched memory B 細胞に対して B 細胞補助活性を示し、抗体産生を促進させることが報告された(9)。さらに、NMO/NMOSD の末梢血中では、CD11c を高発現し抗原提示能や抗体産生細胞へ分化する能力が高い CD11c<sup>high</sup>B 細胞が増加し、その頻度は IFN- $\gamma$  を高産生する CXCR3 陽性 CCR6 陰性の Tph1 細胞の頻度と正の相関関係にあることが報告された(10)。本研究結果とこれらの既報告とを合わせて考えると、MG のようなリンパ濾胞が形成される疾患では、Tfh/cTfh 細胞がリンパ濾胞内外において自己反応性 B 細胞の分化・成熟や自己抗体産生の促進にかかわる一方で、リンパ濾胞が形成されず組織炎症が主病態である NMO/NMOSD では、Tph 細胞が炎症部位に遊走しリンパ濾胞外において自己反応性 B 細胞の分化・成熟や自己抗体産生の促進、さらには慢性の組織炎症にかかわる可能性が考えられた。Tph 細胞は炎症組織に異所性リンパ濾胞様構造を形成しようと考えられるが、NMO/NMOSD 病巣に異所性リンパ濾胞様構造が観察されたとの報告はない。

(2) 治療介入後の血清補体価 CH50 の低下：NMO/NMOSD では AQP4 抗体がアストロサイトに結合し、補体の活性化を介してアストロサイト傷害を惹起する。補体成分 C5 に対するヒト化モノクローナル抗体エクリズマブとラブリズマブでは、治療開始後速やかに血清補体価 CH50 がほぼ検出感度以下にまで低下する。同様に、IL-6 シグナルを阻害するヒト化 IL-6 受容体モノクローナル抗体サトラリズマブでも、治療後は血清補体価 CH50 が全例で低下した(図 2)。しかし、サトラリズマブ治療中の再発は研究期間中に確認されなかったため、血清補体価 CH50 の低下と治療効果との関連は解析できなかった。

図2 治療開始前後の血清補体価CH50



(3) 急性期脳脊髄液免疫プロファイルの解析：急性期 NMO/NMOSD を対象に、脳脊髄液中のサイトカイン・ケモカインの発現パターンを解析した(11)。その結果、NMO/NMOSD は多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) と比較して IL-12、APRIL、BAFF、CCL2 の濃度が有意に高く、CCL3 や CCL5 の濃度が有意に低かった。また、MS に典型的な 3 つの脳 MRI 画像所見 (ovoid lesion、3 個以上の脳室周囲病変、結節ないしはリング状造影効果) を全て有する MS を典型的 MS、それ以外を非典型的 MS と分類すると、典型的 MS と異なり NMO/NMOSD では、サイトカイン・ケモカインのクラスター発現が認められた(図 3)。さらに、NMO/NMOSD は、典型的 MS のみならず非典型的 MS と明確に異なるサイトカイン・ケモカインの発現パターンを示した(図 4)。このことは、AQP4 抗体陽性 NMO/NMOSD は、典型的 MS のみならず非典型的 MS と免疫学的病態が異なることを示している。このように、診断時に何らかの MS の典型的脳 MRI 所見が欠如する非典型例は、他疾患が十分に除外され臨床的に MS と確定診断された例の約 3 割を占めていた。今後は、NMO/NMOSD と MS とを鑑別する免疫学的な診断補助的指標、さらには、MS の正確な診断のための免疫学的診断特異的指標、あるいは MS の多様な免疫病態に応じた診断亜分類を可能とする免疫学的な診断補助的指標を確立することが重要であると考えられた。

図3 サイトカイン・ケモカイン発現の相関関係

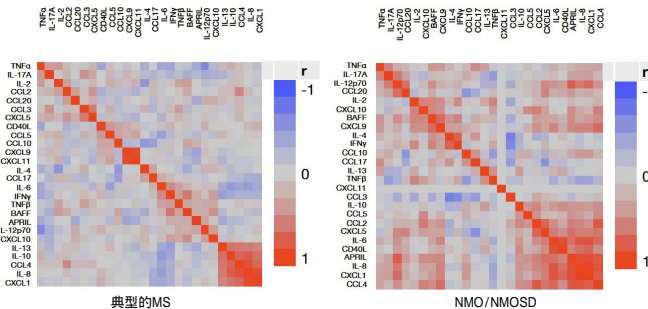
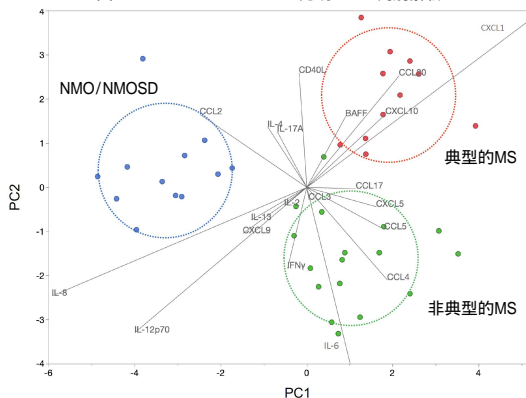


図4 サイトカイン・ケモカイン発現による判別解析



<引用文献>

1. Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7041):452-8.
2. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014;345(6200):1058-62.
3. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, 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):108-21.
4. Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol*. 2015;16(2):142-52.
5. Ashida S, Ochi H, Hamatani M, Fujii C, Kimura K, Okada Y, et al. Immune Skew of Circulating Follicular Helper T Cells Associates With Myasthenia Gravis Severity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(2).
6. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature*. 2017;542(7639):110-4.
7. Caielli S, Veiga DT, Balasubramanian P, Athale S, Domic B, Murat E, et al. A CD4(+) T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat Med*. 2019;25(1):75-81.
8. Ekman I, Ihantola EL, Viisanen T, Rao DA, Nanto-Salonen K, Knip M, et al. Circulating CXCR5(-)PD-1(hi) peripheral T helper cells are associated with progression to type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(9):1681-8.
9. Hoshino Y, Noto D, Sano S, Tomizawa Y, Yokoyama K, Hattori N, et al. Dysregulated B cell differentiation towards antibody-secreting cells in neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):6.
10. Amano E, Sato W, Kimura Y, Kimura A, Lin Y, Okamoto T, et al. CD11c(high) B Cell Expansion Is Associated With Severity and Brain Atrophy in Neuromyelitis Optica. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2024;11(2):e200206.
11. Ashida S, Kondo T, Fujii C, Hamatani M, Mizuno T, Ochi H. Association of cerebrospinal inflammatory profile with radiological features in newly diagnosed treatment-naive patients with multiple sclerosis. *Front Neurol*. 2022;13:1012857.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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, Kondo Takayuki, Fujii Chihiro, Hamatani Mio, Mizuno Toshiki, Ochi Hirofumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Association of cerebrospinal inflammatory profile with radiological features in newly diagnosed treatment-naive patients with multiple sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1012857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2022.1012857.	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 -

1. 著者名 Ashida Shinji, Ochi Hirofumi, Hamatani Mio, Fujii Chihiro, Nishigori Ryusei, Kawamura Kazuyuki, Matsumoto Sadayuki, Nakagawa Masanori, Takahashi Ryosuke, Mizuno Toshiki, Kondo Takayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Radiological and Laboratory Features of Multiple Sclerosis Patients With Immunosuppressive Therapy: A Multicenter Retrospective Study in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 749406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2021.749406	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0件

〔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
研究分担者	濱谷 美緒 (Hamatani Mio)  (20890809)	京都大学・高等研究院・特定助教  (14301)	
研究分担者	芦田 真士 (Ashida Shinji)  (60884202)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	藤井 ちひろ  (Fujii Chihiro)  (00516065)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師    (24303)	

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