

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08391

研究課題名(和文)ダニ抗原特異的免疫療法におけるT濾胞ヘルパー細胞と制御性B細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of T follicular helper cells and B regulatory cells in patients with asthma comorbid with rhinitis by HDM-mites SLIT

研究代表者

重原 克則 (Shigehara, Katsunori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70381275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗体産生を司る濾胞ヘルパー及び制御性T細胞(Tfh及びTfr細胞)に着目し、ダニ舌下免疫療法での特異抗体産生とこれら細胞の関与を検討した。18例中、11症例が問診及び治療スコアで有意な改善を認めた(改善群)。治療3カ月目に特異的IgEの一過性上昇を認めたが、以後徐々に低下した。3ヶ月以後はTfh2細胞も徐々に低下し、改善群では12カ月目で有意に低下した。改善群ではTfr及びTreg細胞がTfh2細胞と6ヶ月以降で強い負の相関を認めた。舌下免疫療法は持続的な特異抗原の刺激状態にあり、Tfr及びTreg細胞がTfh2細胞を強く抑制し、IgE産生を含むTh2反応を制御している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダニアレルゲン舌下免疫療法ではアレルギー反応が改善し、薬物治療の中止や減量が多数認められる。アレルギーを誘導したり、改善させる抗体は以前より知られている。最近、濾胞ヘルパーT細胞が多くの疾患で抗体産生を制御が明らかとなってきた。この濾胞ヘルパーT細胞が抗体産性を通してアレルギー疾患に関わる仕組みは、まだ十分に解明されていない。解明されれば今後のアレルギー疾患の治療に大いに貢献することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined T follicular helper(Tfh) cells and B regulatory(Breg) cells in patients with atopic asthma comorbid with allergic rhinitis treated with house dust mite(HDM)-sublingual immunotherapy(SLIT). Eleven patients of 18 patients showed good response. Tfh2 cells gradually decreased after 3 month therapy, conversely, Tfh1 cells gradually increased. HDM-specific IgE was transiently elevated at 3 month therapy, however, after 3 month therapy gradually decreased, HDM-specific IgG4 gradually increased for 12 months. Tfh2 cells showed significantly negative correlation with T follicular regulatory(Tfr) cells and T regulatory (Treg) cells after 6 month therapy in responder patients. Inhibition against Tfh2 cell by Tfr and Treg cells lead to reduced production of HDM-specific IgE, and consequently improve Th2 reaction in responder patients.

研究分野：アレルギー学 免疫学 呼吸器病学

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 濾胞制御性T細胞 制御性T細胞 制御性B細胞 ダニ特異的免疫グロブリン ダニ抗原舌下免疫療法 アレルギー性鼻炎合併気管支喘息

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鼻腔を含む広義のアレルギー性気道系疾患(アレルギー性鼻炎、気管支喘息)は患者数が多く、治療上重要な疾患の一つである。アレルギー性気道系疾患は2型ヘルパーT(helper T₂; Th₂)細胞が病態形成に深く関与するとされ、抗原特異的IgE産生に関わっていると考えられたが、IgEの産生機構はヒトにおいて不明な点が多い。近年、液性免疫を制御するヘルパーT細胞亜集団のT濾胞ヘルパー(follicular helper T; T_{fh})細胞がヒトの各疾患に深く関わっていることを示す報告がされている。T_{fh}細胞はリンパ濾胞の胚中心(germinal center:GC)形成を促し、B細胞と強く相互作用し、抗原特異的な抗体産生を制御している。抗原感作マウス喘息モデルでは特異的IgE産生は従来のTh₂細胞ではなく、T_{fh}細胞が担っている事が明らかとなっている(Ballesteros-Tato A et al. Immunity 2016)。さらに、ヒトの末梢血T_{fh}細胞は3つのサブセット(T_{fh}1、T_{fh}2、T_{fh}17細胞)が存在し、この中で2型T_{fh}(T_{fh}2)細胞はIL-4を産生してIgG、Eの産生する事が可能である(Morita R et al. Immunity 2011)。我々はアレルギー性気道疾患(アトピー型喘息及びアレルギー性鼻炎)の末梢血T_{fh}2細胞が増加していることを報告している(Kamekura R et al. Clin Immunol 2015)。

一方、我が国では、アレルギー性気道系疾患の治療は主に薬物療法が中心であるが、中止により多くは再発し継続的治療が必要な患者さんが大多数を占める。アレルギー性気道系疾患における特異アレルゲン免疫療法(allergen immunotherapy; AIT)は、食物アレルギーと同様にアレルゲンの持続投与によりアレルゲン特異的Th₂免疫応答の抑制を誘導し、アレルギー疾患の自然歴を改善(免疫寛容)できる唯一の根本的治療法である。欧米では以前より着実な研究と治療によってアレルギー疾患の改善、寛解に寄与してきたが、最近、日本でも家塵ダニおよびスギ花粉を対象にアレルギー性鼻炎および花粉症に対して治療が始まった。

2. 研究の目的

現在までの知見によりAITによる免疫寛容の誘導機序は、マスト細胞、好塩基球の脱感作に続き、制御性T(T_{reg})細胞、制御性B(B_{reg})細胞の誘導と抗原特異的IgG₄を中心とする抗原特異的IgEに対する遮断抗体の産生であることが明らかになっている。このようにAITは、患者の免疫系に大きな変動をもたらす。しかしながら、抗体産生の中心を担うT_{fh}細胞のAITにおける抗原特異的IgG₄をはじめとするIgEを含めた各Igサブセット産生との関係はほとんど包括的に検討されていない。これまでに、AITの抗原特異的IgG₄の産生はIL-10産生B_{reg}細胞が担い(van de Veen W et al. JACI 2013)、また、ヒトにおいてB_{reg}細胞がT_{fh}細胞の分化と同細胞によるIg産生を抑制し、T濾胞制御性(T_{fr})細胞を誘導するとの報告がある(Achour A et al. JACI 2017)。末梢血T_{fh}細胞はメモリー型の細胞であるが、PD-1⁺やICOS⁺細胞は病変局所の状態を反映すると考えられる(He Jet al, Immunity 2015)。これらの報告も考慮し、ダニ抗原特異的免疫療法の経過におけるT_{fh}細胞、B_{reg}細胞、T_{fr}細胞およびT_{reg}細胞と抗原特異的Igサブセットの変動を包括的に末梢血及びex vivoレベルで解析し、未解明な部分に対する同治療の免疫的機序を解明したい。また、本研究でAITの免疫病態が明らかとなり、同治療におけるレスポナーと非レスポナーの差異が今まで以上に明らかとなり、治療上の対応策や長期間観察によりアレルゲンに不応答の状態がどのくらいの期間継続するかも明らかとなる可能性があり、アレルギー性疾患の多い我が国でのAITのさらなる普及に資するものと考えられる。

3. 研究の方法

研究同意の得られたダニ特異IgE陽性のアレルギー性鼻炎および(アレルギー性)鼻炎合併喘

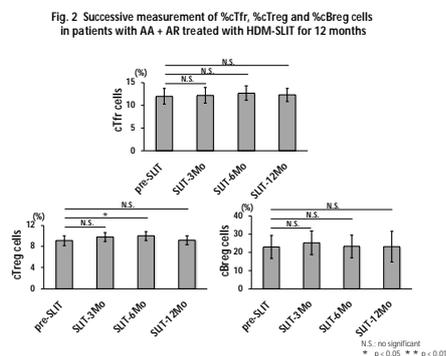
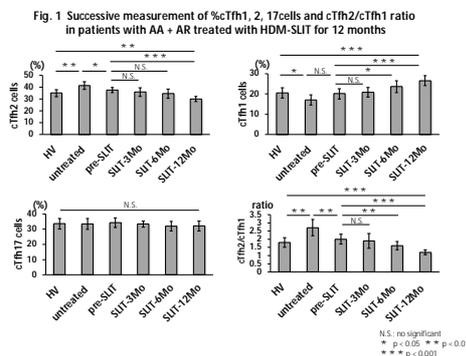
息患者に標準化ダニ抗原を舌下で毎日服用する舌下免疫療法(Sublingual immune therapy; SLIT)実施している患者を対象とする。

- (1) 同患者より末梢血を採血し、FACSによりTfh細胞(CD3+CD4+CXCR5+)とそのサブセット(Tfh1細胞(CD3+CD4+CXCR5+CXCR3+CCR6-), Tfh2細胞(CD3+CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6-), Tfh17細胞(CD3+CD4+CXCR5+CXCR3-CCR6+))と活性化マーカー(PD-1, ICOS)、PD-1⁺Tfr細胞(CD3+CD4+CXCR5+PD-1+Foxp3+)、Treg細胞(CD3+CD4+CD25+FOXP3+)およびBreg細胞(CD19+CD24+CD27+)を測定する。また、同時に他のB細胞(naïve B細胞(CD19+IgD+CD27-), memory B細胞(CD19+IgD-CD27+), transition cell細胞(CD19+CD24+CD38+)細胞、plasmablast(CD19+CD24^{low}CD38+), plasma cell(CD19+CD138+)も測定する。血漿又は血清は凍結保存し各種ダニ特異的Igサブセットを測定する。採血は治療前、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、以後6ヶ月、計3年間とする。今後のさらなる解析のため血清および血漿を凍結保存する。
- (2) 今回の検討ではアレルギー性鼻炎合併喘息患者が主な対象である。欧米では、AITは喘息において重要な治療手段となっているが、本邦では未承認の段階である。上記の患者さんにおいてAIT中、継続的に状態を理学所見、問診票(Asthma Control Questionnaire; ACQ)、肺機能検査、呼気一酸化窒素検査および気道過敏性検査などを施行し、アトピー型喘息におけるAITの有効性についても検証する。アレルギー性鼻炎の効果判定は欧州アレルギー学臨床免疫学会(European academy of allergy and clinical immunology; EACCI)の指針も基づき症状スコアは(Total nasal symptom score(TNSS))と治療スコア(Medication score. MS)の合計であるcombined symptom and medication score(CSMS)で判定する

4. 研究成果

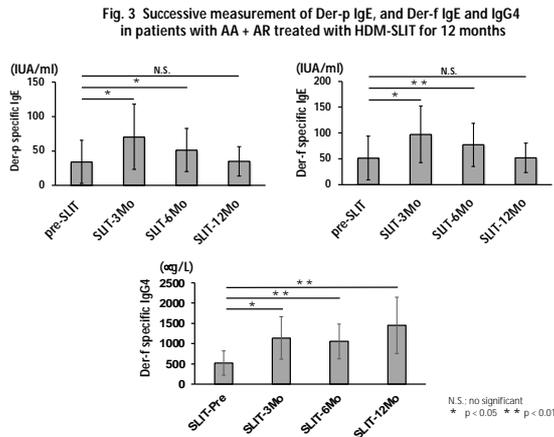
家塵ダニにIgE陽性を示すアレルギー性鼻炎合併喘息患者をSLITにて23症例登録し、治療前、治療後3, 6, 12ヶ月で、問診、呼吸生理学的検査および採血で検討した。5例が途中脱落した。採血は通常の項目に加え、抗体産生に関与する濾胞ヘルパーT(Tfh)細胞および濾胞制御性T(Tfr)細胞、制御性T(Treg)細胞および制御性B(Breg)細胞、さらにダニ特異的IgE, IgG4, IgG, IgAを測定し、これらの細胞とダニ特異的Igの関係を検討した。また、アレルギー性鼻炎は前述のEACCIのCSMS、喘息はACQ症状スコア、治療スコアは使用している吸入ステロイド量が分かりやすいようにglobal initiative for asthma(GINA)の治療stageを用いた。

結果であるが、Tfh細胞サブセットではIgE産生に関わるTfh2細胞の徐々の低下とIFN- γ 産性能を有するTfh1細胞の段階的上昇を認めた。この結果は12ヶ月後結果を健常者(Healthy volunteer; HV)と比較しても有意な結果であった。Tfh17細胞はほとんど変動がなかった。



一方、Treg細胞の緩やかな上昇を認めた(実数、未提示)。Tfr細胞及びBreg細胞に関しては経過中有意な変動はなかった(Fig. 1,2)。

一方、ダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*; *Der-p*, *Dermatophagoides farinae*; *Der-f*) 抗原特異的IgEは3カ月目で一過性の上昇後、以後持続的に低下を認めた。IgG4は一部の症例を除き、3ヶ月目からは有意に上昇し、経過中の増加を認めた(Fig. 3)。



*Der-p*と*Der-f*特異的IgGは徐々に増加、12ヶ月後では有意に開始前より増加した(データ未提示)。

今回の検討では、治療3ヶ月以後の特異的IgEとTfh2細胞は徐々に低下した。Tfh2細胞がB細胞に対しIgE産生能を有することを考えると、Tfh2細胞の減少が特異IgEの低下をもたらしたと考えられる。また、特異的IgG4とTfh1細胞は伴に増加するが、特定のBreg細胞がIL-10存在下でclass switchしてIgG4を産生するとの報告があり、また、Tfh1細胞はIFN-g産生能を有し、感染症やワクチン接種で増加することが知られる。AITにおける特異的IgG4とTfh1細胞の関係はex vivoでの検討を要する。PD-1⁺Tfr細胞は治療経過中の特異Igに伴う変動はなかった。

今回、各症例を症状及び治療内容で評価し、AITで有意な改善を認めた、改善群(Responder)とほとんど改善を認めなかった非改善群(Non-responder)にグループ化した。両群の比較では、アレルギー性鼻炎のCSMS(EACCI)の基準では、改善群は治療6ヶ月以降で治療前のスコアより有意に減少を認めた。また、喘息の症状を評価するACQでも治療前との比較で6ヶ月目、12ヶ月目で有意にスコアの低下が認められた。喘息におけるGINAの治療ステージでは改善群では有意な差は認めなかったが、低下傾向は認められ更なる治療の継続で有意に低下する可能性は十分にある。非改善群では治療前に比べ治療後で有意な差は認められなかった(Fig. 4)。改善群と非改善群の治療前の臨床所見や研究の項目を比較すると、改善群では治療前の好酸球(パーセンテージと実数)および総IgEの高値を認めた。さらに今回の研究項目のダニ特異的IgG4の高率な誘導、また、Tfh2細胞は治療前に非改善群より有意に高値で、12カ月後は非治療群と比べ、大幅な低下をしていた等の特徴を認めた。

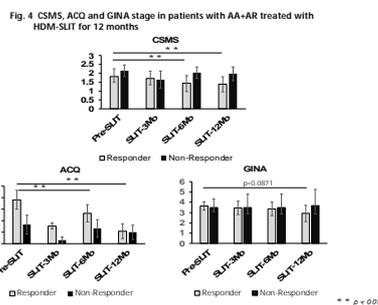
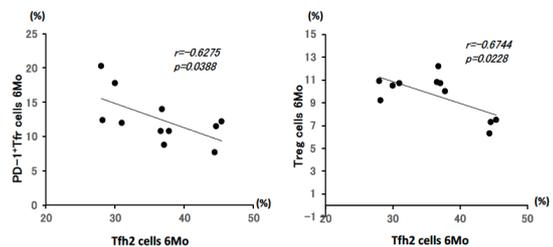


Fig. 5 Correlation between %Tfh2 cells and %PD-1⁺Tfr, or Treg cells in responder patients by SLIT



さらに、改善群の各測定細胞の相関を見ると、PD-1⁺Tfrs細胞およびTreg細胞でTfh2細胞と6ヶ月以降で強い負の相関を認めた(Fig. 5)。舌下免疫療法は持続的な特異抗原の刺激状態にあるが、PD-1⁺TfrおよびTreg細胞がTfh2細胞を強く抑制し、IgE産生を含むTh2反応を制御してい

ると考えられる。また、SLIT治療による効果は当然のことながら症例による違いがあり、治療改善群と非改善群のフェノタイプが存在する。我々のデータでは約2/3がSLIT治療で1年間に改善を認めた。

特異的IgG4に関しては経時的増加は認めしたが、今回測定した細胞群の中で一時的にTfh1およびPD-1⁺Tfr細胞と正の相関を認めることがあったが、1年間の経過観察であり、これらの所見が今後も継続するかは検討課題である。IgG4の誘導にTfh細胞が関わるかは本研究の重要事項の1つであり、IgG4と測定細胞群は多変量的、経時的なより詳細な検討が必要である。測定B細胞群とTfh細胞の関係も今後の課題である。また、アレルギー性鼻炎に関しては症状・薬物スコア(CSMS)にて1年間で効果が確認出来たが、喘息に関しては吸入ステロイド剤の減量できるかが治療効果の重要な指標であり、この点に関しても今後GINA治療ステージのステップダウンできるか経時的観察が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 重原 克則
2. 発表標題 鼻炎合併アトピー型喘息患者のダニ抗原舌下免疫療法における 濾胞ヘルパーT細胞と濾胞制御性T細胞の検討検討
3. 学会等名 日本呼吸器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重原 克則
2. 発表標題 ダニ舌下免疫療法中のアレルギー性鼻炎合併喘息患者における濾胞ヘルパーT細胞を中心とした検討
3. 学会等名 日本アレルギー学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀倉隆太
2. 発表標題 ダニ舌下免疫療法における血液機能性リンパ球サブセットの経時的変化
3. 学会等名 第67回 日本アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重原克則
2. 発表標題 ダニ舌下免疫療法中の喘息合併アレルギー性鼻炎患者における濾胞ヘルパーT細胞を中心とした検討
3. 学会等名 第68回 日本アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsunori Shigehara
2. 発表標題 The analysis of Tfh/Tfr cells and HDM-specific immunoglobulins in patients with atopic asthma comorbid with allergic rhinitis receiving HDM-sublingual immunotherapy
3. 学会等名 jJSA/WAO joint Congress 2020, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	亀倉 隆太 (KAMEKURA Ryuta) (70404697)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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
---------	---------