

平成30年5月17日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10787

研究課題名(和文) 2型濾胞ヘルパーT細胞と制御性B細胞を標的とした新しいアレルギー疾患の治療戦略

研究課題名(英文) New treatment strategy for allergic diseases by targeting blood type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells

研究代表者

亀倉 隆太 (Kamekura, Ryuta)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：70404697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シラカバ花粉症患者の末梢血リンパ球の解析を行った。結果、非飛散期の段階で患者群のTfh2細胞の割合が増加していた。また、患者群のICOS陽性Tfh細胞の割合は、飛散期に増加した後、非飛散期には減少し、症状スコア、シラカバ特異的IgE値と有意な正の相関を認めた。さらに、シラカバ抗原(Bet v1)特異的MHCクラス2テトラマー陽性となるICOS陽性Tfh細胞が飛散期の患者末梢血中で有意に増加していることを発見した。これらの結果から、Tfh2細胞はアレルギー素因を規定すること、シラカバ抗原特異的ICOS陽性Tfh細胞はシラカバ花粉症の病態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed lymphocytes in blood from patients with birch pollen allergy. The percentage of circulating Tfh2 cells in blood from patients with birch pollen allergy during the non-pollen season was increased compared with that in blood from healthy volunteers. We also found that the percentage of ICOS+ Tfh cells in blood from patients with birch pollen allergy increased during the pollen season and decreased during the non-pollen season. The percentage of circulating ICOS+ Tfh cells in blood from patients with birch pollen allergy was positively correlated with total symptom scores and level of birch-specific serum IgE. In addition, an increase in Bet v1-specific MHC class 2 tetramer-positive and ICOS+ Tfh cells was seen in patients with birch pollen allergy during the pollen season. The results suggest that elevated circulating Tfh2 cells reflect an allergic predisposition and that birch-specific and ICOS+ Tfh cells play an important role in the pathogenesis of birch pollen allergy.

研究分野：免疫・アレルギー

キーワード：濾胞ヘルパーT細胞 Tfh2細胞 シラカバ花粉症 アレルギー性鼻炎 ICOS

1. 研究開始当初の背景

近年増加の一途をたどるアレルギー疾患を克服するためには、新しい予防法や診断・治療法の開発が急務である。アレルギー性鼻炎や気管支喘息に代表されるアレルギー疾患では 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞が病態形成に關与するとされるが、抗原特異的 IgE の産生機構の本体など未だ不明な点が多く残されている。近年、液性免疫を制御するヘルパー T 細胞サブセットの 1 つである濾胞ヘルパー T (Tfh) 細胞と免疫調節機能をもつ B 細胞サブセットである制御性 B (Breg) 細胞の異常がアレルギー疾患の発症に關与しているという報告が散見され、Tfh 細胞と制御性 B 細胞の不均衡がアレルギー疾患の病態形成の原因となっていることが推察される。我々は以前に Tfh2 細胞と Breg 細胞がアレルギー疾患の病態形成に重要な役割を担っている可能性があると考え、血液検体を解析したところ、アレルギー性鼻炎や気管支喘息では Tfh2 細胞への明らかな分化の偏り (Tfh2 シフト) が生じているのに加えて、気管支喘息を合併したアレルギー性鼻炎では末梢血リンパ球に占める制御性 B 細胞の割合が減少していた (Kamekura R et al. Clinical Immunol. 2015)。これらの結果からアレルギー疾患の病態の背景には Tfh2 シフト (アクセル) の増加と Breg 細胞の数 (ブレーキ) の減少が關与していると考えられ、それらのメカニズムを解明することが、アレルギー疾患の病態解明につながると考える。そこで今回我々は、以下のことを明らかにしたいと考えている。

- (1) Tfh2 細胞と Breg 細胞の表面マーカー等、表現型の解析
- (2) 疾患群の Tfh2 細胞や Breg 細胞の表現型、機能の解析と健常群との比較
- (3) Tfh2 シフトのメカニズムの解明
- (4) Tfh2 細胞や Breg 細胞への分化誘導機構の解明
- (5) Tfh 細胞サブセットと Breg 細胞のクロストーク機構の解明

2. 研究の目的

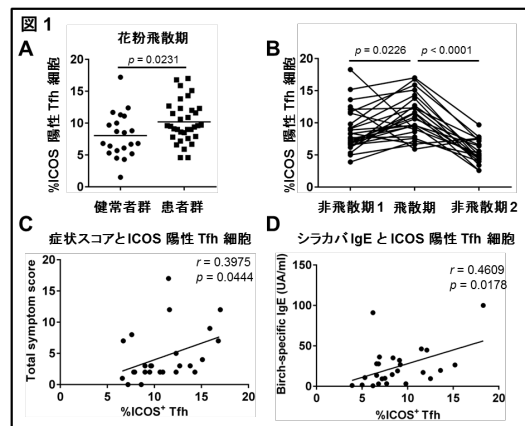
アレルギー疾患における Tfh 細胞と Breg 細胞の役割をより深く検討するために、北海道を中心に多くみられるシラカバ花粉症を研究対象とした。シラカバ花粉症は高頻度で合併する口腔アレルギー症候群との関連で近年大変注目されている疾患である。その治療法は現在、抗ヒスタミン薬等による対症療法に限られており、新規治療法の開発が求められている。これまでにシラカバ花粉症をはじめとする季節性アレルギー性鼻炎における Tfh 細胞や Breg 細胞の機能的な役割について検討された報告はない。そこで今回我々は、本疾患においてこれら細胞群が病態形成に關与しているという仮説を立て、検討を行った。

3. 研究の方法

シラカバ花粉非飛散期 1、飛散期、非飛散期 2 の 3 期における健常者 (n = 21) とシラカバ花粉症患者 (n = 26) の末梢血リンパ球中の total Tfh 細胞、Tfh2 細胞、PD-1、ICOS 陽性活性化 Tfh 細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。解析結果と臨床パラメータとの関連について検討した。さらに、シラカバ抗原である Bet v1 と結合した PE 標識シラカバ抗原特異的 MHC クラス 2 テトラマー (HLA-DRB1:1501) を用いて陽性細胞の同定を試みた。

4. 研究成果

シラカバ花粉非飛散期、飛散期共に、シラカバ花粉症患者群で健常者群と比較して total Tfh 細胞 (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺) に占める Tfh2 細胞 (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺CCR6⁺CXCR3⁻) の割合が増加していた。しかし、患者群の total Tfh 細胞、Tfh2 細胞の割合は、花粉非飛散期 1、飛散期、非飛散期 2 の 3 期で有意な変化を認めなかった。そこで我々は、シラカバ花粉症の病態では、Tfh 細胞の割合や数の変化ではなく、活性化の程度が変化しているという仮説を立て、活性化 T 細胞のマーカーとして知られる PD-1 と ICOS に着目し、血液 Tfh 細胞において解析を行った。その結果、花粉飛散期には患者群で健常者群と比較して ICOS 陽性 Tfh 細胞 (CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺) の割合が増加しており、ICOS 陽性 Tfh 細胞の割合は飛散期で増加し、非飛散期には減少していた (図 1A と 1B)。さらには、ICOS 陽性 Tfh 細胞の割合は患者群において、症状スコア (total symptom score) (図 1C)、シラカバ特異的 IgE 値と正の相関を認めた (図 1D)。一方 PD-1



陽性 Tfh 細胞はそのような傾向を認めなかった。シラカバ抗原特異的 MHC クラス 2 テトラマー (HLA-DRB1:1501) を用いた解析では、陽性細胞を同定することに成功し、シラカバ花粉飛散期における ICOS 陽性 Tfh 細胞の T 細胞抗原受容体と Bet v1 抗原との結合を確認できた。症例数を増やして同様の検討を行ったところ、シラカバ花粉飛散期に Bet v1 抗原と結合する T 細胞抗原受容体を持つ ICOS 陽性 Tfh 細胞が患者末梢血

中で有意に増加していることを発見した。

これらの結果から、花粉非飛散期の段階で患者群の Tfh2 細胞の割合が健常者群に比べて増加していることから、Tfh2 細胞はアレルギー素因を規定していると考えられた。また、患者群の ICOS 陽性 Tfh 細胞の割合は、飛散期に増加し、非飛散期には減少すること、さらには、症状スコア (total symptom score)、シラカバ特異的 IgE 値と正の相関を認めることから、ICOS が飛散期における活性化 Tfh 細胞の指標となり得ること、ICOS 陽性シラカバ抗原特異的 Tfh 細胞がシラカバ花粉症の病態形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、気管支喘息モデルマウスを用いた予備実験にて、吸入による抗原刺激後に末梢血中の ICOS 陽性 Tfh 細胞が増加することを確認した。この結果は花粉暴露によるシラカバ花粉症患者での検討と同様の結果であり、今後はこの実験系を用いて、抗原刺激に伴う ICOS 陽性 Tfh 細胞の増加を抑える薬物の探索、薬物投与実験を行っていく予定である。将来的にはこの ICOS 陽性 Tfh 細胞を標的とした治療薬の開発を目指して研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Kamekura R, Takano K, Yamamoto M, Kawata K, Shigehara K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Sato A, Ogasawara N, Tsubomatsu C, Takahashi H, Nakase H, Himi T, Ichimiya S. Cutting Edge: A Critical Role of Lesional T Follicular Helper Cells in the Pathogenesis of IgG4-Related Disease. *J Immunol* 2017;199:2624-2629. doi: 10.4049/jimmunol.1601507. (査読有)

亀倉隆太, 一宮慎吾, 氷見徹夫: アレルギー性鼻炎の新たな治療標的としての“エピムノーム”の重要性. *アレルギー* 66:91-96, 2017. doi: 10.15036/arerugi.66.91. (査読無)

Nagaya T, Kawata K, Kamekura R, Jitsukawa S, Kubo T, Kamei M, Ogasawara N, Takano K, Himi T, Ichimiya S. Lipid mediators foster the differentiation of T follicular helper cells. *Immunol Lett* 2017;181:51-57. doi: 10.1016/j.imlet.2016.11.006. (査読有)

山本哲夫, 朝倉光司, 白崎英明, 亀倉隆太, 氷見徹夫. 各種吸入性抗原の感作と口腔咽頭過敏症を起こす原因食物. *日耳鼻* 2017;120:1147-1154. (査読有)

Kumagai A, Kubo T, Kawata K, Kamekura

R, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Sumikawa Y, Himi T, Yamashita T, Ichimiya S. Keratinocytes in atopic dermatitis express abundant Δ Np73 regulating thymic stromal lymphopoietin production via NF- κ B. *J Dermatol Sci* 2017;88:175-183. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.06.017. (査読有)

Matsumiya H, Kawata K, Kamekura R, Tsubomatsu C, Jitsukawa S, Asai T, Akasaka S, Kamei M, Yamashita K, Ito F, Kubo T, Sato N, Takano KI, Himi T, Ichimiya S. High frequency of Bob1^{lo} T follicular helper cells in florid reactive follicular hyperplasia. *Immunol Lett* 2017; 191:23-30. doi: 10.1016/j.imlet.2017.07.012. (査読有)

Ichimiya S, Kamekura R, Kawata K, Kamei M, Himi T. Functional RNAs control T follicular helper cells. *J Hum Genet*. 2016; 62:81-86. doi: 10.1038/jhg.2016.88. (査読有)

Kamekura R, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Ichimiya S, Himi T. Role of Crosstalk between Epithelial and Immune Cells, the Epimicrobiome, in Allergic Rhinitis Pathogenesis. *Adv Otorhinolaryngol*. 77:75-82, 2016. doi: 10.1159/000441878. (査読無)

Yamashita K, Ichimiya S, Kamekura R, Nagaya T, Jitsukawa S, Matsumiya H, Takano K, Himi T. Studies of Tonsils in Basic and Clinical Perspectives: From the Past to the Future. *Adv Otorhinolaryngol*. 77:119-24, 2016. doi: 10.1159/000441902. (査読無)

Kamekura R, Imai R, Takano K, Yamashita K, Jitsukawa S, Nagaya T, Ito F, Hirao M, Tsubota H, Himi T. Expression and Localization of Human Defensins in Palatine Tonsils. *Adv Otorhinolaryngol*. 77:112-8, 2016. doi: 10.1159/000441888. (査読無)

Yamashita K, Kawata K, Matsumiya H, Kamekura R, Jitsukawa S, Nagaya T, Ogasawara N, Takano K, Kubo T, Kimura S, Shigehara K, Himi T, Ichimiya S. Bob1 limits cellular frequency of T-follicular helper cells. *Eur J Immunol*. 46:1361-70, 2016. doi: 10.1002/eji.201545499(査読有)

亀倉隆太: ヒト臨床検体を用いた研究がもたらすアレルギー性鼻炎の新規治療戦略. *日鼻誌* 55:66-9, 2016. (査読無)

〔学会発表〕(計 6 件)

米国アレルギー・喘息・免疫学会 (AAAAI 2017), March 3-6, 2017, Atlanta, GA, USA. Ryuta Kamekura, Kenichi Takano, Motohisa Yamamoto, Koji Kawata, Sumito Jitsukawa, Tomonori Nagaya, Fumie Ito, Chieko Tsubomatsu, Hiroki Takahashi, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya. Role of lesional BCL6^{hi}PD-1^{hi} T follicular helper cells as a cardinal B-cell helper to produce IgG4 in IgG4-related disease

米国アレルギー・喘息・免疫学会議 (AAAAI 2016), March 4-7, 2016, Los Angeles, CA, USA. Ryuta Kamekura, Koji Kawata, Sumito Jitsukawa, Tomonori Nagaya, Keiji Yamashita, Fumie Ito, Kenichi Takano, Katsunori Shigehara, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya. Role of circulating ICOS⁺ follicular helper T cells in the pathogenesis of birch pollen allergy

第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5 日 ~ 7 日 沖縄県宜野湾市 Ryuta Kamekura, Koji Kawata, Sumito Jitsukawa, Fumie Ito, Katsunori Shigehara, Tetsuo Himi, Shingo Ichimiya. Role of activated T follicular helper cells in the pathogenesis of IgG4-related disease

第 55 回日本鼻科学会総会・学術講演会 2016 年 10 月 13 日 ~ 15 日 宇都宮市 亀倉隆太、實川純人、長屋朋典、伊藤史恵、坪松ちえ子、一宮慎吾、氷見徹夫。活性化濾胞ヘルパー T 細胞によるシラカバ花粉症の病態形成のメカニズムの解明

第 65 回日本アレルギー学会学術大会 2016 年 6 月 17 日 ~ 19 日 東京都 亀倉隆太、高野賢一、實川純人、伊藤史恵、小笠原徳子、一宮慎吾、氷見徹夫。シンポジウム 2 アレルギー性鼻炎：ここまで解った病態—治療への展望—アレルギー性鼻炎の新たな治療標的としての“エピムノーム”の重要性

第 34 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2016 年 2 月 4 日 ~ 6 日 鳥羽市 亀倉隆太、實川純人、長屋朋典、川田耕司、重原克則、一宮慎吾、氷見徹夫。シラカバ花粉症の病態形成における血液濾胞ヘルパー T 細胞の役割

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所・免疫制御医学部門
<http://web.sapmed.ac.jp/immunology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀倉 隆太 (KAMEKURA, Ryuta)
札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所・免疫制御医学部門・講師
研究者番号：70404697

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

一宮 慎吾 (ICHIMIYA, Shingo)
札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所・免疫制御医学部門・教授
研究者番号：30305221

氷見 徹夫 (HIMI, Tetsuo)
札幌医科大学・耳鼻咽喉科・教授
研究者番号：90181114

(4) 研究協力者

()