

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08308

研究課題名(和文)ステロイドパルス療法における自然免疫細胞を介した即効性炎症反応抑制機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the immediate suppression mechanism of steroid pulse therapy mediated by innate immune cells

研究代表者

高橋 良 (RYO, TAKAHASHI)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：00317091

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)：自己免疫性皮膚疾患の治療において、即効性が高いステロイドパルス療法が用いられているが、その免疫抑制作用機序は明確ではない。本研究は末梢血中の単球がパルス療法で特徴的である「即効性」の背景にある作用機序にどのように関与するのかを調査した。単球はCD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (pMO)とCD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (cMO)の2つの分画に分けられるが、パルス療法直後では一過性にcMOだけの分画になった。また単球系骨髄由来免疫細胞(m-MDSC)の増加も検出された。一過性に増加したcMOはIL-10産生能が極めて高かったことから、cMOが即効性免疫抑制機序の一つとして作用する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、ステロイドパルス療法における即時性免疫抑制機序の一つとして、一過性に増加する単球の亜集団から大量に産生されるIL-10が抑制作用に寄与する可能性がある事を見出した点である。社会的意義は、本研究で見出した単球の亜集団をモニターすることによって、ステロイドパルス療法の治療効果のバイオマーカーになりうる可能性がある事を見出した点である。

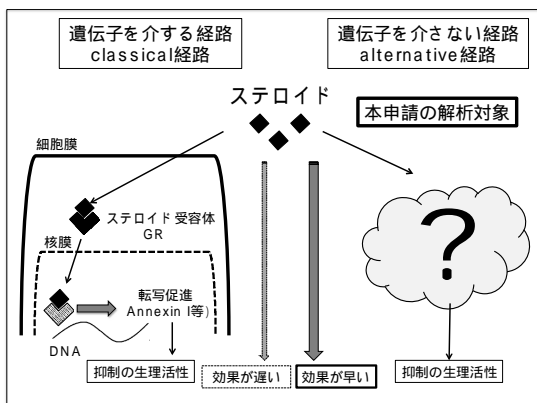
研究成果の概要(英文)：Intravenous corticosteroid pulse therapy (IVPT) has been used for the treatment of several autoimmune skin diseases, however, immunosuppressive mechanisms of IVPT are remains elusive. In this study, we investigated how peripheral blood monocytes (MO) could play a role in an immunosuppressive function in IVPT, using peripheral blood mono nuclear cells obtained from severe alopecia areata (AA) patients. Peripheral blood MOs are composed of at least two different subpopulations, CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocytes (pMOs) and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> classical monocytes (cMOs), selective depletion of pMOs was occurred in all cases after IVPT, resulting in predominance of cMOs. Importantly, significant increase in an IL-10 production from cMOs was observed after IVPT. These results suggest that abundant IL-10 production from expanded cMOs after IVPT may play a role in an immunosuppressive function.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：ステロイドパルス療法 自然免疫細胞 炎症反応抑制 制御性T細胞

### 1. 研究開始当初の背景

膠原病などの自己免疫性皮膚疾患の治療において、ステロイド内服療法と比較して即効性の高いパルス療法が用いられているが、その即効性を説明する作用機序は明確になっていない。ステロイドの主たる作用機序は、**図 1** に示したように遺伝子を介する classical 経路であると考えられている。ステロイドが細胞質に入るとステロイド受容体 (GR ; Glucocorticoid Receptor ) と結合後、遺伝子の転写過程を経てようやく生理活性を示すため、「効果が遅い」とされる。さらに GR のステロイド結合量には限度があり、飽和状態を越えるとそれ以上の効果は上がらない。



**図 1** ステロイドの作用機序。

しかしながらパルス療法では、1) 内服療法と比較して遥かに高用量を投与しても量依存的に効果が見られること、2) さらに遺伝子を介した作用では説明ができない速さで効果が現れることから、遺伝子を介する経路だけでは説明ができず、パルス療法特有の抑制機序が存在することが指摘されているが、それは未だ明らかになっていない (Indian J Pediatr. 2008;10:1057-66)。

### 2. 研究の目的

我々は本研究の申請に向けた予備実験で、1) パルス療法を行った全症例において、治療直後に末梢血の単球が CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> classical monocyte (cMO) だけの分画になった 2) 免疫を抑制する制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の増加がみられた症例があるという 2 つの特徴的な知見を見出した。本研究では、これらの特徴的な臨床所見がパルス療法特有の抑制機序に関与すると推測し、パルス療法で特徴的である「即効性」の背景にある作用機序を解明することを目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) サンプルの採取: ステロイドパルス療法のモデルとして、治療のバックグラウンドが明確であり、ステロイド投与前後で追跡可能な疾患である重症円形脱毛症患者を選択した。杏林大学医学部臨床疫学研究審査委員会で承認を得た研究計画に基づき、医学部皮膚科学教室の大山学教授 (連携研究者) 佐藤洋平医師 (研究協力者) の協力の元、十分なインフォームドコンセントによって協力を得られ、過去にステロイドを投与されていない重症円形脱毛症患者等から採血した。血液の採取は、パルス療法を行う直前・終了日・施行後 1 ヶ月後に行い、採血後迅速に末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mono nuclear cells: PBMC) を分離し、解析時まで -80 で凍結保存し集積した。

(2) 患者より採取した PBMC を蛍光標識抗体で染色し、単球、T 細胞の各分画の変化をフローサイトメトリーで測定した。

(3) 患者より採取した PBMC を各刺激物質 (Toll-like receptor: TLR ligands, Phorbol myristate acetate (PMA), ペプチド抗原) を添加して培養を行い、サイトカイン産生を惹起させた。同時に産生されたサイトカインが細胞内に留まらせる処理 (Brefeldin A, Monensin) を行い、培養終了後、細胞内サイトカインを蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで陽性率を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ステロイドパルス療法による T 細胞分画の変化

PBMC 中の CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T 及び亜分画 (naive central memory: TCM, effector memory: TEM, effector memory RA: TEMRA)、NK 細胞の頻度をフローサイトメトリーで測定した。CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T 細胞はステロイドパルス療法終了後にやや減少傾向が見られたが、特徴的な変化は見られなかった (**図 2**)。

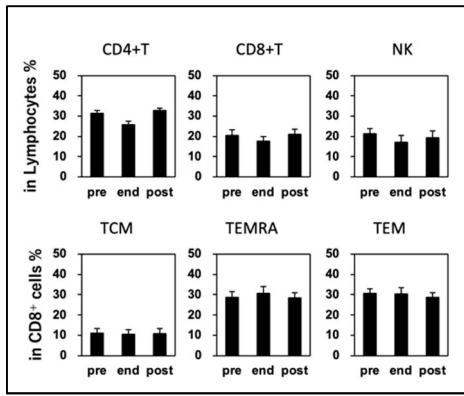
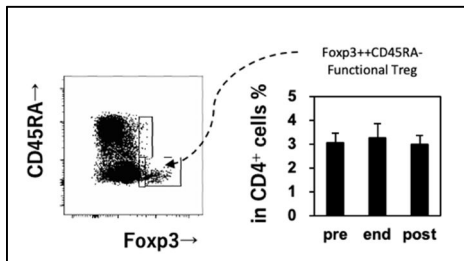


図2 ステロイドパルス療法による CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T 及び亜分画、NK 細胞の頻度の変化 (pre: パルス両方前、end: パルス療法終了時、post: パルス療法終了1ヶ月後)。

(2) CD8<sup>+</sup> T細胞の CD161 の発現の解析  
 単球系の細胞膜に発現している lectin-like transcript-1 (LLT1) が CD8<sup>+</sup> T細胞や NK 細胞膜に発現している CD161 (NKR-P1A) と結合することによって、CD8T/NK 細胞活性が抑制されることから、両者の発現をパルス療法前後で比較した。単球の LLT1 の発現はあまり変化が見られなかったが、CD8<sup>+</sup> T細胞の CD161 の発現が、パルス療法後に増加している所

見が見られた。すなわち、CD8<sup>+</sup> T細胞の CD161 発現が増加することにより、単球系細胞によって CD8<sup>+</sup> T細胞が直接抑制されている可能性が示唆された。

(3) ステロイドパルス療法による Treg 分画の変化。



PBMC 中の FcγR3<sup>+</sup>Treg 細胞は FcγR3 と CD45RA の発現から 3 つの分画に分けることが可能で、その中でも抑制機能を保有する CD4<sup>+</sup>FcγR3<sup>++</sup>CD45RA<sup>-</sup>分画の頻度をフローサイトメトリーで評価した。しかしながら、今回測定したサンプルではパルス療法による特徴的な変化は見られなかった (図3)。

図3 ステロイドパルス療法による CD4<sup>+</sup>FcγR3<sup>++</sup>CD45RA<sup>-</sup>分画の頻度の変化。

(4) T細胞からのサイトカイン産生の変化

ステロイドパルス療法によって末梢血 T細胞の細胞障害機能がどの程度抑制されているかを確認するために、ステロイドパルス療法を行った円形脱毛症患者の末梢血 T細胞からのサイトカイン産生を評価した。なお、本症例末梢血には毛包の Trichohyalin (TCHH) に対する抗原特異的に反応する T細胞の存在が報告されているので、本研究では TCHH1~4 のカスタムペプチドを合成後、これらのペプチドで T細胞を刺激し、抗原に反応して産生されるサイトカイン (インターフェロン、グランザイム B 及びパーフォリン) をフローサイトメトリーで測定した。なお、T細胞の抗原特異的の比較対象として、汎 T細胞活性化物質のフィトヘマグルチニン-P (Phytohemagglutinin-P: PHA-P) を使用した。TCHH1~4 ペプチド抗原に特異的に反応した T細胞からのインターフェロン産生をステロイドパルス療法前後で比較すると、治療後に CD8<sup>+</sup> T細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞及びナチュラルキラー T細胞において減少傾向が見られた。一方、CD8<sup>+</sup> T細胞及び CD4<sup>+</sup> T細胞のグランザイム B 及びパーフォリンの産生は、TCHH1~4 ペプチド抗原刺激、PHA-P 刺激の両者で低下した。なお、CD8<sup>+</sup> T細胞からのサイトカイン産生は、当初着目した CD161<sup>+</sup>分画からは殆ど見られ無かったことから、単球系細胞の LLT1 とのコンタクトによってサイトカイン産生が抑制されている可能性がある (図4)。以上の結果からステロイドパルス療法によって TCHH 特異的細胞傷害性 T細胞の頻度が低下し、更に T細胞全体におけるグランザイム B 及びパーフォリン依存性の細胞障害活性が抑制されていることが示唆された。

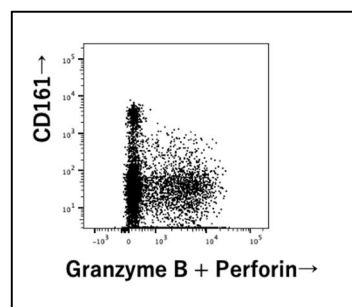


図4 CD8<sup>+</sup> T細胞における CD161 発現とグランザイム B 及びパーフォリン産生分画。

(5) PBMC 中の単球系細胞及び亜分画の変化。

集積された症例を用いて、末梢血液中の単球系細胞における CD14 及び CD16 の発現をフローサイトメトリーで解析した。パルス療法終了時には、予備実験でも確認された CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte (pMφ) が消失し、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> cMφ の単一の細胞集団になることを改めて確認した。この現象は、全てのステロイドパルス療法を受けた患者末梢血で確認されたことから、ステロイド投与によって発生する共通かつ特異的な現象だと考えられる。

(6) m-MDSC 細胞の増加

近年 cMφ と一部同様の表面マーカーを示す monocytic myeloid derived suppressor cells (m-MDSC): 単球系骨髄由来免疫細胞が着目されている。この細胞は単球よりも未熟な細胞で、強力な免疫抑制作用を持つことが報告されており、本研究で見いだされている特徴的な細胞

胞集団と関係している可能性がある。そこでパルス療法患者より分離された PBMC 中の cMO の詳細な表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。m-MDSC の表面マーカーは、HLA-DR<sup>-dim</sup>、Lineage<sup>-</sup>、CD33<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD15<sup>-</sup>をターゲットにした(図5)。

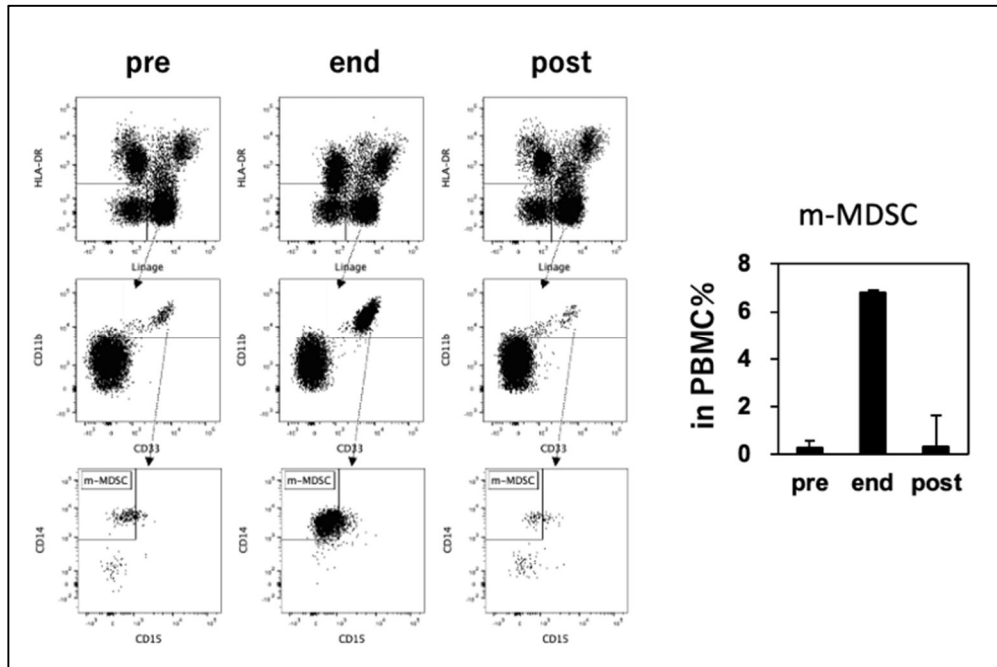


図5 フローサイトメトリーを用いた m-MDSC 様細胞のゲーティングストラテジーとステロイドパルス療法による PBMC 中における m-MDSC 様細胞の割合の変化。

パルス療法前の PBMC 中には、m-MDSC 様細胞(ここでは便宜上、「m-MDSC 様細胞」とする)は殆ど存在しなかったが、パルス療法直後では m-MDSC 様細胞が増加していることを新たに見出した。パルス療法終了後 1 ヶ月後の PBMC では治療開始前と同等レベルまでに戻った。さらに m-MDSC 様細胞の CD16 発現を調査すると陰性であったことから、特殊な cMO 細胞集団の一部は、m-MDSC 様細胞であることが示唆された。

#### (7) 単球分画からの抑制性サイトカイン産生の増加

パルス療法で激的に変化した単球分画において、抑制性サイトカインの一つである IL-10 の産生頻度に変化が生じるのか調査した。PBMC を TLR-2 及び TLR-4 リガンドの Pam3CSK4 及び Lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、細胞内 IL-10 を蛍光抗体で染色後、フローサイトメトリーで陽性率を測定した。IL-10 は、TLR-2、-4 リガンドの両者の刺激によって pMO 分画からは殆ど産生されず cMO 分画から高頻度で産生された。さらに、cMO プレドミナントになったパルス療法終了直後では、IL-10 産生が優位に増加していることが明らかになった。なお、TLR-2 リガンド刺激ではパルス療法終了後 1 ヶ月後でも治療開始前よりも IL-10 産生が高い傾向を示した(図6)。

以上の結果から、ステロイドパルス療法によって一過性に増加した m-MDSC 様細胞を含む cMO からの IL-10 が、即効性のある免疫抑制作用機序に関与している可能性があることが示唆された。

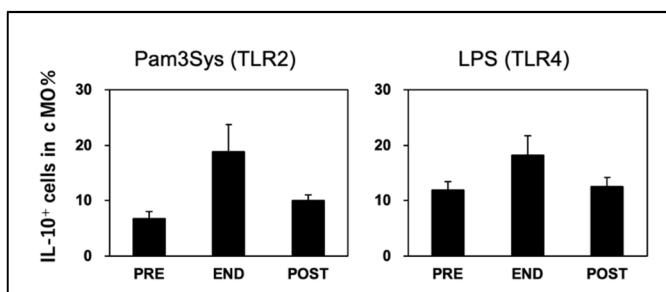


図6 TLR-2, -4 刺激によって cMO から産生された IL-10 のステロイドパルス療法による変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sato Y, Takahashi R, Kimishima M, Yamazaki Y, Ohyama M
2. 発表標題 Developmetn of a scoring system for the prediction of the outcome of intravenous corticosteroid pulse therapy in rapidly-progressive alopecia areata.
3. 学会等名 Internatioanl Investigative Dermatology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
連携研究者	大山 学  (Ohyama Manabu)  (10255424)	杏林大学・医学部・教授    (32610)	

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