

令和 3 年 6 月 14 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：18K09323

研究課題名(和文)細胞傷害性Tfh細胞を標的としたIgG4関連疾患の新規治療戦略

研究課題名(英文)New therapeutic strategy targeting cytotoxic Tfh cells for IgG4-related disease

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃組織とIgG4-RD患者の顎下腺組織中のCD4+CD8+ Tfh細胞とB細胞サブセットの解析の結果、CD4+CD8+ Tfh細胞はIgG4-RDの顎下腺組織で増加し、その割合とmemory B細胞の割合との間に有意な負の相関を認め、CD4+CD8+ Tfh細胞とmemory B細胞の共培養でIgG産生が抑制された。また、CD4+CD8+ Tfh細胞は多量のgranzymeを産生した。上記の結果からCD4+CD8+ Tfh細胞は慢性炎症環境下でmemory B細胞に対して細胞傷害能を発揮し、memory B細胞からの抗体産生を抑制して免疫反応を制御していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のところIgG4-RDの病因は不明である。今回我々はIgG4-RDの病変部位に存在するTfh細胞を直接解析することにより、細胞傷害性Tfh細胞という新しい細胞群を発見することができた。細胞傷害性Tfh細胞の機能的役割の解明はIgG4-RDにとどまらず、その他の難治性慢性炎症性疾患の病態の新たな理解や治療法の臨床応用に向けて、これまでにならぬ展開がもたらされることが期待される。細胞傷害性Tfh細胞を標的にするIgG4-RDの新規治療法が実用化されれば、従来のグルココルチコイドに代わる副作用の少ない治療が可能となり、多くのIgG4-RDの患者がその恩恵を受けることになると確信している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed CD4+CD8+ Tfh cells and B cell subsets from submandibular glands (SMGs) of patients with IgG4-RD by flow cytometry. The percentage of CD4+CD8+ Tfh cells in IgG4-RD SMGs was increased compared with that in tonsils and was negatively correlated with the percentage of memory B cells in IgG4-RD SMGs. In a coculture experiment with CD4+CD8+ Tfh cells and memory B cells from IgG4-RD SMGs, the amount of IgG produced by memory B cells in the culture supernatant was reduced. In vitro experiments also revealed that CD4+CD8+ Tfh cells have a functional capacity for production of a large amount of granzyme. The results suggest that the number of CD4+CD8+ Tfh cells was increased under the condition of chronic inflammation and that the cells exerted cytotoxicity to memory B cells. Therefore, CD4+CD8+ Tfh cells inhibit the production of IgG from memory B cells and regulate immune responses in lesions of IgG4-RD.

研究分野：免疫・アレルギー

キーワード：IgG4関連疾患 細胞傷害性Tfh細胞 Tfh細胞 IgG4関連涙腺・唾液腺炎 memory B細胞

### 1. 研究開始当初の背景

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease; IgG4-RD) は本邦で提唱された新しい疾患概念で、血液中 IgG4 濃度の著明な上昇と病変部における IgG4 陽性形質細胞の集簇や慢性炎症に伴う高度な線維化を特徴とする慢性炎症性疾患である。IgG4-RD の病変は症例により涙腺、唾液腺、リンパ節、脾臓、胆管、後腹膜など様々な全身臓器に広範囲に波及する。本疾患に対する治療法としてはステロイド剤が第一選択であるが、再燃率が非常に高いこと、ステロイド剤の長期投与に伴う副作用や長期経過による病変臓器の機能低下が問題点として挙げられる。このため IgG4-RD の根本的な治療には病態病理に根ざした新規治療法の開発が急務となっている。IgG4-RD の病態解明に向けた研究が世界中で進められているものの、IgG4-RD の病態背景の全容は未だ明らかではない。IgG4-RD の病変部位には IgG4 陽性形質細胞が多く浸潤しているのに加えて、正常な導管構造の消失と線維化をはじめとする特徴的な病理所見を認めることが知られている。本研究ではこの特徴的な病理所見をもたらす免疫学的変化は何か、具体的にはどのような免疫細胞やサイトカインが中心となって IgG4-RD の病態を形成しているのかを明らかにしていきたい。

### 2. 研究の目的

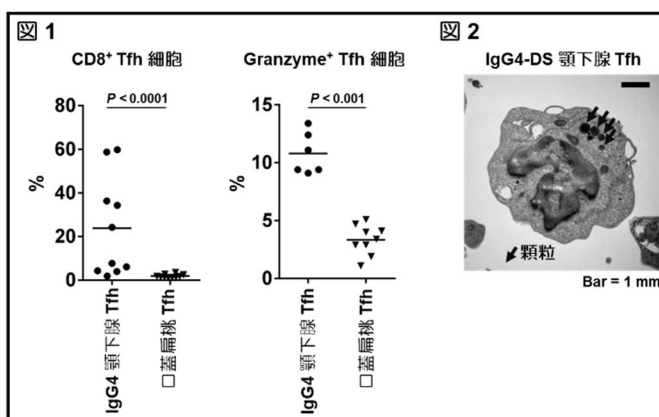
本研究の目的は、IgG4-RD の病態の背景にある免疫細胞やサイトカインなどの免疫学的変化を明らかにし、IgG4-RD の新規治療法を開発することである。我々は以前に IgG4-RD の一つである IgG4 関連涙腺・唾液腺炎 (IgG4-DS) の顎下腺病変部位に多数の濾胞ヘルパー T (Tfh) 細胞が浸潤し、それらが口蓋扁桃由来の Tfh 細胞と比較して、より効率的に B 細胞からの IgG4 抗体の産生を誘導することを発見し、報告した (引用文献)。さらに最近、IgG4-DS の病変部位の Tfh 細胞では、口蓋扁桃由来の Tfh 細胞と比較し、細胞傷害性 T 細胞のマーカーである CD8、granzyme の発現が増加していることを発見した。これらの結果から、IgG4-DS の顎下腺由来の Tfh 細胞は口蓋扁桃由来の Tfh 細胞と比較してより強力な抗体産生誘導能と細胞傷害能を合わせ持つ “Dual functional” な細胞であり、IgG4-RD の病態形成に重要な役割を担っていると考えられた。そこで本研究では、細胞傷害性 Tfh 細胞の IgG4-RD の病態形成における役割を明らかにすることを目的に検討を行った。

### 3. 研究の方法

- (1) 手術で得られた IgG4-DS 患者の顎下腺組織と口蓋扁桃組織からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーにて細胞傷害性 Tfh 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞) と B 細胞サブセット (whole B, naïve B, memory B, germinal center B) の解析を行った。各解析結果をもとに CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞と各 B 細胞サブセット関連について検討した。
- (2) 透過型電子顕微鏡を用いて、IgG4-DS 患者の顎下腺組織由来の Tfh 細胞の形態 (分泌顆粒の有無等) について観察を行った。
- (3) 口蓋扁桃由来の CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞と各種 B 細胞サブセット (whole B, naïve B, memory B) を単離して共培養を行い、培養上清中の抗体量の変化を ELISA 法で検討した。

### 4. 研究成果

- (1) IgG4-DS の病変部位では口蓋扁桃組織と比較し、細胞傷害性 T 細胞のマーカーである CD8、granzyme 陽性 Tfh 細胞の割合が増加していた (図 1)。また、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞と血清 IgG4 値、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞と memory B 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) との間に関連を認められた。
- (2) IgG4-DS 患者の顎下腺組織由来の Tfh 細胞では口蓋扁桃由来の Tfh 細胞と比較して、顆粒様の構造が多く観察された (図 2)。
- (3) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞と memory B 細胞の共培養で naïve B 細胞や whole B 細胞との共培養と比較して B 細胞からの IgG 産生が低く抑えられた。また、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞は CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞と比較して抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体の刺激により多量の granzyme を産生、放出することを発見した。



上記の結果から CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞は慢性炎症環境下で granzyme を産生し、memory B 細胞を標的細胞として細胞傷害能を発揮することが明らかとなった。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tfh 細胞は memory B 細胞からの抗体産生を抑えることで、過剰な免疫反応を抑制していると考えられた。

#### 引用文献

- (1) Kamekura R (1 番目), 他 14 名. A Critical Role of Lesional T Follicular Helper Cells in the Pathogenesis of IgG4-Related Disease. *J Immunol.* 2017;199:2624-2629.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yabe H, Kamekura R, Yamamoto M, Murayama K, Kamiya S, Ikegami I, Shigehara K, Takaki H, Chiba H, Takahashi H, Takano K, Takahashi H, Ichimiya S.	4. 巻 31
2. 論文標題 Cytotoxic Tph-like cells are involved in persistent tissue damage in IgG4-related disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 249-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2020.1719576.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asai Y, Chiba H, Nishikiori H, Kamekura R, Yabe H, Kondo S, Miyajima S, Shigehara K, Ichimiya S, Takahashi H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Aberrant populations of circulating T follicular helper cells and regulatory B cells underlying idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Res.	6. 最初と最後の頁 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-019-1216-6.	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 Miyajima S, Shigehara K, Kamekura R, Takaki H, Yabe H, Ikegami I, Asai Y, Nishikiori H, Chiba H, Uno E, Takahashi H, Ichimiya S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Activated circulating T follicular helper cells and skewing of T follicular helper 2 cells are down-regulated by treatment including an inhaled corticosteroid in patients with allergic asthma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 66-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.08.008.	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 Ikegami I, Takaki H, Kamiya S, Kamekura R, Ichimiya S.	4. 巻 514
2. 論文標題 Bob1 enhances ROR t-mediated IL-17A expression in Th17 cells through interaction with ROR t.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1167-1171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.05.057.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamekura R, Takahashi H, Ichimiya S.	4. 巻 31
2. 論文標題 New insights into IgG4-related disease - emerging new CD4+ T cell subsets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Opin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 9-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BOR.0000000000000558.	査読の有無 無
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 山本哲夫, 朝倉光司, 白崎英明, 亀倉隆太, 氷見徹夫.	4. 巻 122
2. 論文標題 シラカバ花粉IgE陽性の口腔咽頭過敏症における各種花粉とプロフィリン (Bet v 2) 感作との関係.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日耳鼻	6. 最初と最後の頁 209-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamekura R, Yamamoto M, Takano K, Yabe H, Ito F, Ikegami I, Takaki H, Shigehara K, Suzuki C, Himi T, Takahashi H, Ichimiya S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Circulating PD-1+CXCR5-CD4+ T cells underlying the immunological mechanisms of IgG4-related disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatol Adv Pract.	6. 最初と最後の頁 rky043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rap/rky043.	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 Yamamoto M, Takano K, Kamekura R, Suzuki C, Tabeya T, Murakami R, Honda S, Mukai M, Nojima M, Ichimiya S, Himi T, Nakase H, Takahashi H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Predicting therapeutic response in IgG4-related disease based on cluster analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunological Medicine.	6. 最初と最後の頁 30-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09114300.2018.1451613.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto M, Takano KI, Kamekura R, Aochi S, Suzuki C, Ichimiya S, Nakase H, Himi T, Takahashi H.	4. 巻 Oct 25
2. 論文標題 Interleukin 5-producing ST2+ memory Th2 cells in IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1526357.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto M, Takano K, Kamekura R, Suzuki C, Ichimiya S, Himi T, Nakase H, Takahashi H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Stage classification of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis by the serum cytokine environment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1004-1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1436029.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito F, Kamekura R, Yamamoto M, Takano K, Takaki H, Yabe, H, Ikegami I, Shigehara K, Himi T, Takahashi H, Ichimiya S.	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-10+ T follicular regulatory cells are associated with the pathogenesis of IgG4-related disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunol Lett.	6. 最初と最後の頁 56-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2019.01.008.	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 Yamamoto M, Takano KI, Kamekura R Aochi S, Suzuki C, Ichimiya S, Takahashi H.	4. 巻 Jan 24
2. 論文標題 Analysis of allergic reaction in IgG4-related disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1572488.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano K, Okuni T, Yamamoto K, Kamekura R, Yajima R, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Potential utility of core needle biopsy in the diagnosis of IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 393-396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1465665.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano K, Yajima R, Kamekura R, Yamamoto M, Takahashi H, Yama N, Hatakenaka M, Himi T.	4. 巻 128
2. 論文標題 Clinical utility of 18 F-fluorodeoxyglucose/positron emission tomography in diagnosis of immunoglobulin G4-related sclerosing sialadenitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laryngoscope.	6. 最初と最後の頁 1120-1125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.26945.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 亀倉隆太, 矢部勇人, 山本元久, 高橋裕樹, 高野賢一, 一宮慎吾.
2. 発表標題 オリゴクローナルな血液Tph細胞の増加がIgG4関連疾患の病態形成に関与する.
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀倉隆太, 矢部勇人, 山本元久, 高橋裕樹, 高野賢一, 一宮慎吾.
2. 発表標題 IgG4関連疾患の病態形成にオリゴクローナルな血液Tph細胞の増加が関与する.
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀倉隆太, 矢部勇人, 重原克則, 高野賢一, 一宮慎吾.
2. 発表標題 シンポジウム13 生体バリア機構とアレルギー疾患. アレルギー性鼻炎に関連するエプイムノームの新機能.
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamekura R, Yabe H, Takano K, Yamamoto M, Ikegami I, Ito F, Takahashi H, Himi T, Ichimiya S.
2. 発表標題 Unique profiles of lesional T follicular helper cells in the pathogenesis of IgG4-related disease.
3. 学会等名 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI) Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀倉隆太, 山本元久, 高橋裕樹, 一宮慎吾.
2. 発表標題 濾胞ヘルパー T 細胞と IgG4 関連疾患
3. 学会等名 ベーシックシンポジウム 2 「新規 T 細胞サブセットと疾患」: 第46回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kamekura R, Yamamoto M, Yabe H, Takaki H, Takano K, Takahashi H, Takahashi H, Himi T, Ichimiya S.
2. 発表標題 A unique subset of PD-1+CXCR5-CD4+ T cells is involved in immunological mechanisms of IgG4-related disease.
3. 学会等名 American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Ryuta Kamekura, Hayato Yabe, Motohisa Yamamoto, Hiroki Takahashi, Kenichi Takano, Shingo Ichimiya.
2. 発表標題 Cytotoxic peripheral T helper cells are involved in the pathogenesis of IgG4-related disease.
3. 学会等名 The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Digital Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀倉隆太, 山本元久, 高橋裕樹, 一宮慎吾.
2. 発表標題 IgG4関連疾患におけるPD-1+CXCR5-CD4+ T細胞の機能的役割.
3. 学会等名 第12回IgG4研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

札幌医科大学医学部フロンティア医学研究所〔免疫制御医学部門〕ホームページ <a href="https://web.sapmed.ac.jp/immunology/">https://web.sapmed.ac.jp/immunology/</a>
---

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