

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461167

研究課題名(和文)喘息における新規バイオマーカーとしてのCD27陰性CD4陽性T細胞の役割

研究課題名(英文)Circulating CD27-CD4+T cells in patients with asthma

研究代表者

原田 紀宏 (Harada, Norihiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10465065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：喘息症例のバイオマーカーとしての補助シグナル分子CD27陰性CD4陽性T細胞の可能性を明らかにすることを目的とした。結果、CD27陰性CD4陽性T細胞分画は、重症度などとの相関を認めなかったが、末梢血液中の1型自然リンパ球(ILC1)と3型自然リンパ球(ILC3)分画と負の相関を認めた。一方、末梢血中の各自然リンパ球(ILC1、2型自然リンパ球、ILC3、MAIT細胞)について解析した結果、CD69陽性活性化自然リンパ球分画はそれぞれに正の相関を認め、気流制限との相関も示唆された。これらからは、喘息には、Th2細胞のみならず、様々な活性化自然リンパ球が複雑に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported an important role for CD27 in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of allergic lung inflammation. Moreover, not only Th2 cells but also a variety of innate subsets of lymphoid cells such as innate lymphoid cells (ILCs), and mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are involved in asthma and may have important effector functions in asthmatics. In the present study, we investigated whether the CD27-CD4+T cells ILCs and MAIT cells in the peripheral blood of patients with asthma would be associated with clinical asthma parameters. There were no significant differences in the frequencies of CD27-CD4+T cells, ILCs and MAIT cells between the asthma severity groups. The percentage of activated NK cells, group 1 ILCs, group 2 ILCs, group 3 ILCs and MAIT cells in the peripheral blood of asthmatics were positively correlated with each other, and may orchestrate immune responses, but not behave as an individual population, in asthmatic airway inflammation.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

治療薬の進歩と普及に伴い喘息管理は改善傾向にあるが、世界中で喘息の有病率は上昇傾向にある。その10%は、現行の治療戦略での限界が指摘される重症難治性喘息であり、新たな治療戦略の開発が望まれている。喘息は、好酸球を主体とした炎症細胞浸潤と気道上皮剥離を伴う慢性気道炎症を呈する。このアレルギー性炎症の主体はTh (T helper) 2細胞とIL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカインによるTh2型免疫反応と考えられている。Th2細胞に分化するCD4 T細胞の活性化には、T細胞抗原レセプター (TCR) を介した抗原の認識が必要である。この際、T細胞は抗原を直接認識するのではなく、抗原提示細胞上の主要組織適合抗原遺伝子複合体(MHC) クラス分子に結合した抗原ペプチドを認識する。しかし、完全にCD4 T細胞を活性化するにはTCRを介した抗原認識シグナルだけでは不十分であり、補助シグナル分子と呼ばれる細胞表面機能分子が必須である。この両方のシグナルがCD4 T細胞に伝達されたときに、はじめてCD4 T細胞は抗原に反応して活性化されることとなるが、実際の生体内におけるTh2細胞の実体は明らかではなく、Th2への分化誘導のメカニズムは定かではなかった。近年、補助シグナル分子として同定されるタンパク質は飛躍的に増加し、補助シグナル分子は、単に活性化のシグナルを伝達するだけでなく、抑制性のシグナルを伝達する分子も数多く発見されてきた。これら多種の補助シグナル分子の介在の有無によりT細胞の活性化、不活性化が決定され、Th1やTh2、Th17細胞等への分化の方向を決定するなど、T細胞が持つ多様な機能が制御されると考えられ、T細胞制御は複雑さを増している。我々は、マウスの研究から、補助シグナル分子CD27陰性CD4陽性T細胞がアレルギー性

炎症の新規バイオマーカーと成り得る可能性を見出し、さらには、CD27のリガンドであるCD70に対する抗体がTh2細胞への分化を直接標的とする治療に成り得る可能性を見出している。

一方、獲得免疫によるTh2型免疫反応に加えて、TCR非拘束の自然免疫も喘息におけるアレルギー性炎症に関わることが明らかになり、この自然免疫に関わる自然リンパ球が注目されている。自然リンパ球は、TCRを持たないグループとTCRを有するも単一性で多様性のないTCRしか持たないグループに大別される。前者は、innate lymphoid cells (ILCs)いわゆる自然リンパ球として知られる。後者に属するMucosal-associated invariant T (MAIT)細胞は、T細胞受容体にインバリアント α 鎖(ヒトVa7.2Ja33)を発現するT細胞であり、MR1分子に抗原提示される細菌由来のビタミンB2合成中間産物をリガンドとして認識する。このMR1依存性にMAIT細胞は、複数種の細菌や真菌成分により活性化されることが示されている。

2. 研究の目的

本研究においては、喘息における補助シグナル分子CD27陰性CD4 T細胞、自然リンパ球と重症度や呼吸機能検査などの各種パラメーターとの比較を行い、新たな喘息のバイオマーカーとしてのCD27陰性CD4 T細胞の可能性を明らかにすることを目的とした。さらに、バイオマーカー探索として、末梢血液中の自然リンパ球やサイトカイン、ケモカイン、線維化マーカーなども解析した。

気道リモデリングの特徴である基底膜下の肥厚、線維化は、細胞外マトリックスであるコラーゲンやテネイシンが沈着したものであり、アレルギー性気道炎症が細胞外マトリックス産生を誘導している可能

性が報告されている。また、線維化マーカーであるペリオスチンが抗 IL-13 抗体製剤のコンパニオン診断薬として期待されている状況がある。本研究では、線維化マーカーであるテネイシンファミリーに属するマトリックスタンパク質であり、間質から気道に炎症細胞の遊走をサポートするとされるテネイシン C とペリオスチンに注目した。

3 . 研究の方法

喘息症例から採血を行い、以下の測定項目との比較を実施した。

- ・ 患者背景
- ・ 呼吸機能検査
- ・ 呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO)
- ・ Forced oscillation technique (FOT)
- ・ Asthma Control Test (ACT) スコア
- ・ 不定期受診、不定期治療、入院の回数
- ・ 血液検査; 末血好酸球数、血清総 IgE 値、抗原特異的 IgE 値
- ・ 血液検査(フローサイトメトリー); CD4 T 細胞に占める CD27 陰性細胞と陽性細胞分画、自然リンパ球分画
- ・ 血液検査 (ELISA); 1,25-(OH)₂ ビタミン D、25-OH ビタミン D、オステオポンチン、ペリオスチン、テネイシン C、Eotaxin、FGF-2、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α 、VEGF

検体採取は、EDTA またはヘパリン採血と全血採取を行った。リンパ球分離液を用いて、比重遠心法による単核細胞の分離回収を行い、フローサイトメトリーで解析した。フローサイトメトリーでの解析には、CD4 T 細胞に占める CD27 陰性細胞と陽性細胞の解析、リンパ球分画に占める各 ILC 細胞分

画の解析、および、各自然リンパ球に占める各 CD69 陽性活性化自然リンパ球の解析を行った。Lineage マーカー陰性は、CD1a 陰性、CD3 陰性、CD11c 陰性、CD14 陰性、CD19 陰性、CD34 陰性、TCR $\gamma\delta$ 陰性、CD123 陰性、BDCA2 陰性、FC ϵ R1 陰性と定義した。また、NK 細胞は CD3 陰性 CD56 陽性細胞、ILC1 は Lineage 陰性 CD127 陽性 CD161 陽性 CD117 陰性 CRTH2 陰性細胞、ILC2 は Lineage 陰性 CD127 陽性 CD161 陽性 CRTH2 陽性細胞、ILC3 は Lineage 陰性 CD127 陽性 CD161 陽性 CD117 陽性 CRTH2 陰性細胞、MAIT 細胞は CD3 陽性 V α 7.2 TCR 陽性 CD161^{high} 細胞と定義した。血清中の 25(OH) ビタミン D、[1,25(OH)₂D₃]、オステオポンチン、ペリオスチン、テネイシン C 等は ELISA で測定した。

4 . 研究成果

CD27 陰性 CD4 陽性 T 細胞

末梢血液中 CD27 陰性 CD4 陽性 T 細胞分画は、重症度、治療ステップ、ACT スコア、FeNO、呼吸機能検査との相関を認めず、喘息のバイオマーカーとしての役割は明らかではなかったが、末梢血液中の 1 型自然リンパ球(ILC1)、3 型自然リンパ球(ILC3)、CD69 陽性活性化 ILC1、および、CD69 陽性活性化 ILC3 の分画と負の相関を認めた。また、血清中線維化マーカーである血清テネイシン C 高値、且つ、血清ペリオスチン低値の群では、CD27 陰性 CD4 陽性 T 細胞と ILC1、ILC3、CD69 陽性活性化 ILC1、および、CD69 陽性活性化 ILC3 分画と強い負の相関を認めた。

末梢血自然リンパ球

末梢血液中の各自然リンパ球分画と喘息の重症度との間に相関関係は認められなかった。

NK 細胞は、実測努力性肺活量/予測努力

性肺活量(%FVC)と実測一秒量/予測一秒量(%FEV₁)に負の相関を認めた。CD56^{bright} NK細胞は、%PEF、low-frequency reactance area (AX)、と resonant frequency (Fres)に負の相関、respiratory reactance at 5 Hz (X5) と MAIT 細胞の分画とに正の相関を認めた。CD56^{dim} NK細胞は、%FVC、%FEV₁と負の相関、NK細胞分画と正の相関を認めた。ILC1は、2型自然リンパ球(ILC2)と ILC3 とに負の相関を認めた。ILC3は、BMIと負の相関、ACTスコアと%FVCに負の相関を認めた。内服ステロイド薬の容量は、ILC1と正の相関、ILC2と ILC3とは負の相関を認めた。MAIT細胞は、年齢、喘息罹患歴、BMI、血清ペリオスチンと気流制限とに負の相関を認めた。MAIT細胞分画は年齢依存が報告されているが、年齢調整した MAIT細胞は、BMIとのみ相関を認めた。

末梢血 CD69 陽性活性化自然リンパ球

末梢血液中の各 CD69 陽性活性化自然リンパ球分画と喘息の重症度との間に相関関係は認められなかった。

CD69 陽性活性化 NK細胞は、FVCと正の相関を認め、FEV₁%と実測ピークフロー/予測ピークフロー(%PEF)とに負の相関を認めた。CD69 陽性活性化 ILC1は、FEV₁%、%FEV₁、%PEFと負の相関を認めた。CD69 陽性活性化 ILC2は、FEV₁%と%FEV₁に負の相関を認めた。CD69 陽性活性化 ILC3は BMIと正の相関を認め、CD69 陽性活性化 MAIT細胞は FEV₁%と負の相関を認めた。年齢調整した CD69 陽性活性化 MAIT細胞は、%PEFと血清ペリオスチン値と相関を認めた。CD69 陽性活性化 CD56^{bright} NK細胞は、FEV₁%、%FEV₁、%PEFと負の相関を認めた。CD69 陽性活性化 CD56^{dim} NK細胞は、FVC、血清 IgE 値と正の相関、%PEFと負の相関を認めた。CD69 陽性活性化 ILC2と

MAIT細胞との相関を除く、CD69 陽性活性化 NK細胞、ILC1、ILC2、ILC3、と MAIT細胞分画は、お互いに正の相関を認めた(図1)。年齢調整した CD69 陽性活性化 MAIT細胞は、これらすべての細胞と相関を認めた。

テネイシン C

治療ステップ4,5の喘息患者は、ステップ1,2,3の喘息患者と比較し、血清テネイシンC値は有意差をもって高値であった。血清テネイシンC値が高値の群であり、且つ、血清ペリオスチン低値の群において、血清テネイシンC値は、FEV₁、FEV₁%、X5と負の相関を認め、R5、R20、Fres、AXと正の相関を認めた。

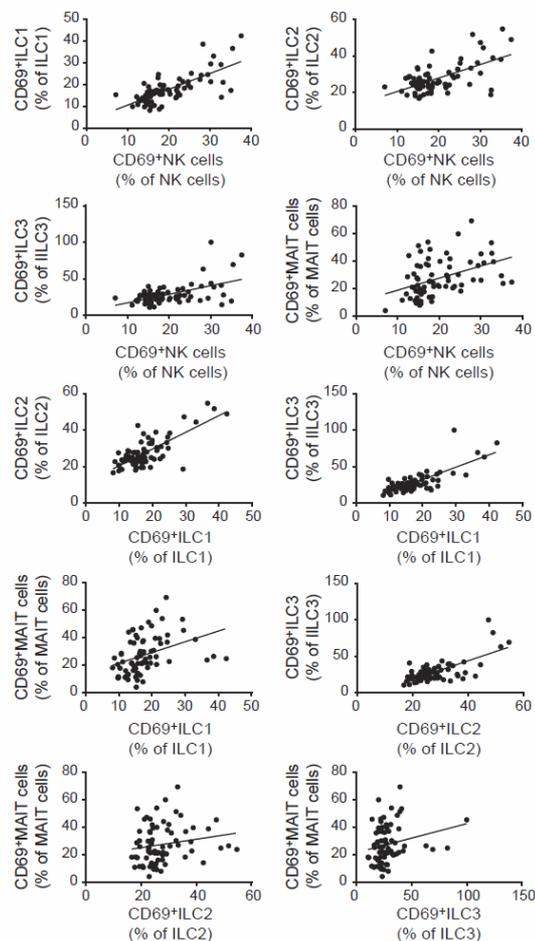


図1

CD27 陰性 CD4 陽性 T細胞は、Th2型炎症と相関することが期待されたが、FeNO

や好酸球、IgE、ペリオスチン、ILC2 などの相関を認めなかった。しかし、ILC1 と ILC3 とは負の相関を認め、ペリオスチン低値でテネイシン C 高値の症例では、さらに強い負の相関を認めたことから、末梢血液中の CD27 陰性 CD4 陽性 T 細胞が非 Th2 型炎症に関連がある可能性が考えられた。また、末梢血液中の自然リンパ球の結果では、CD69 陽性活性化自然リンパ球分画はそれぞれに正の相関を認め、気流制限との相関も示唆された。これらからは、喘息には、Th2 細胞のみならず、様々な活性化自然リンパ球が複雑に関与する可能性が示唆された。

喘息における、Th2 型炎症と非 Th2 型炎症、そこに関わる CD4 陽性 T 細胞のそれぞれの分画、および、新たに見出された自然リンパ球のそれぞれの分画との関連については、さらなる解析が必要である。

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7件)

1. Harada, S., N. Harada, Y. Itoigawa, Y. Katsura, F. Kasuga, A. Ishimori, F. Makino, J. Ito, R. Atsuta, and K. Takahashi. 2016. Evaluation of switching low-dose inhaled corticosteroid to pranlukast for step-down therapy in well-controlled patients with mild persistent asthma. *J Asthma* 53: 207-212. 査読有 doi: 10.3109/02770903.2015.1087556.
2. Katsura, Y., N. Harada, S. Harada, A. Ishimori, F. Makino, J. Ito, F. Kamachi, K. Okumura, H. Akiba, R. Atsuta, and K. Takahashi. 2015. Characteristics of alveolar macrophages from murine

models of OVA-induced allergic airway inflammation and LPS-induced acute airway inflammation. *Exp Lung Res* 41: 370-382. 査読有 doi: 10.3109/01902148.2015.1044137.

3. Itoigawa, Y., N. Harada, S. Harada, Y. Katsura, F. Makino, J. Ito, F. Nurwidya, M. Kato, F. Takahashi, R. Atsuta, and K. Takahashi. 2015. TWEAK enhances TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 16: 48. 査読有 doi: 10.1186/s12931-015-0207-5.
4. Kamachi, F., T. Isshiki, N. Harada, H. Akiba, and S. Miyake. 2015. ICOS promotes group 2 innate lymphoid cell activation in lungs. *Biochem Biophys Res Commun* 463: 739-745. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.005.
5. Kamachi, F., N. Harada, Y. Usui, T. Sakanishi, N. Ishii, K. Okumura, S. Miyake, and H. Akiba. 2014. OX40 ligand regulates splenic CD8(-) dendritic cell-induced Th2 responses in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 444: 235-240. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.060.

[学会発表](計29件)

1. K. Matsuno, N. Harada, A. Ishimori, S. Harada, T. Takeshige, J. Ito, R. Atsuta, K. Takahashi. TWEAK induced chemokine, MCP-1, RANTES and IL-8 production in human bronchial epithelial cells, American Thoracic Society International Conference 2016. San Francisco
2. 石森絢子, 原田紀宏, 原田園子, 松野圭, 竹重智仁, 中村愛, 牧野文彦, 伊藤潤, 熱田了, 千葉麻子, 出原賢治,

三宅幸子, 高橋和久, 気管支喘息症例における末梢血中自然リンパ球 MAIT細胞の解析, 日本呼吸器学会誌 5 巻: 増刊号, 157. 2016 年 4 月 9 日, 国立京都国際会館(京都), 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016 年 4 月 8 日 ~ 4 月 10 日

3. 浅地美奈, 原田紀宏, 原田園子, 石森絢子, 松野圭, 田辺悠記, 笹野仁史, 桂蓉子, 牧野文彦, 伊藤潤, 飛野和則, 熱田了, 出原賢治, 高橋和久, 気管支喘息症例における血清テネイシンC値, 日本呼吸器学会誌5巻: 増刊号, 157. 2016年4月9日, 国立京都国際会館(京都), 第55回日本呼吸器学会学術講演会, 2016年4月8日~4月10日
4. 原田紀宏, 原田園子, 石森絢子, 松野圭, 竹重智仁, 田辺悠記, 笹野仁史, 桂蓉子, 糸魚川幸成, 牧野文彦, 伊藤潤, 熱田了, 出原賢治, 高橋和久, 気管支喘息における血清テネイシンCの解析, 2015年9月3日, ホテルニューグランド(横浜), 第25回国際喘息学会日本・北アジア部会, 2015年9月3日~9月4日
5. 原田園子, 原田紀宏, 石森絢子, 桂蓉子, 松野圭, 竹重智仁, 糸魚川幸成, 牧野文彦, 伊藤潤, 熱田了, 千葉麻子, 出原賢治, 三宅幸子, 高橋和久, 気管支喘息における末梢血中 mucosal-associated invariant T細胞の解析, 2015年9月3日, ホテルニューグランド(横浜), 第25回国際喘息学会日本・北アジア部会, 2015年9月3日~9月4日

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 紀宏 (HARADA, Norihiro)
順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 10465065

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし