



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1002 号
氏名	野村 孝泰
授与年月日	平成 26年 3月 25日
学位論文の題名	Effect of Japanese cedar specific immunotherapy on allergen-specific T _H 2 cells in peripheral blood (スギ特異的免疫療法が末梢血中の抗原特異的ヘルパーT細胞に与える影響) Annals of Allergy, Asthma & Immunology. Vol. 110 : P.380-385, 2013
論文審査担当者	主査： 岡本 尚 副査： 新実 彰男, 齋藤 伸治

論文内容の要旨

【背景】

アレルギー免疫療法はアレルギー疾患の自然歴を変えうる唯一の治療法である。アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の作用機序は十分に解明されていないが、鼻粘膜局所へのエフェクター細胞浸潤抑制、抗原特異的 IgE の減少、抗原特異的 IgG4 の増加、局所でのヘルパーT 細胞 (T_H) サブセットの変化、末梢血中あるいは局所での調節性 T 細胞増加などが報告される。一方、末梢血中の T_H サブセットの関与については議論がある。

抗原特異的 T 細胞は総ヘルパーT 細胞に対して 10^{-4} ~ 10^{-6} と少なく、決定的な解析手法は未確立である。歴史的に、抗原刺激による細胞増殖を利用した解析が行われるが、細胞の性質変化や非特異的増殖などの問題がある。最近、細胞増殖を誘導しない短時間の抗原刺激で T 細胞表面に発現する CD154 が、特異性があり高感度な活性化 T 細胞マーカーとして報告された (Frentsch, 2005)。また、マルチカラーフローサイトメトリーで、多くの蛍光モノクローナル抗体の同時検出が可能となった。

本研究では、活性化マーカー CD154 と 6 種類の細胞質内サイトカインをマルチカラーフローサイトメトリーで検出し、免疫療法が抗原特異的 T 細胞に与える影響を解析した。

【方法】

小児スギ花粉症で皮下免疫療法を受ける患者を対象にした観察研究を行った。免疫療法開始前 (6 月末から 8 月末)、花粉飛散前 (11 月末から 2 月初)、花粉飛散後 (3 月末から 6 月初) に抗原特異的 T 細胞を解析した。分離した末梢血単核球に 6 時間のスギ抗原刺激を加え、蛍光モノクローナル抗体 (抗 CD4、抗 CD154、抗 IL-5、抗 IL-4、抗 IL-10、抗 IL-17A、抗 IFN- γ 、抗 TNF- α) と EMA (死細胞マーカー) で細胞質内サイトカイン染色を行った。マルチカラーフローサイトメトリーでこれらを同時に検出し、総ヘルパーT 細胞に占める CD154 陽性サイトカイン陽性ヘルパーT 細胞数を評価した。

統計解析には、Mann-Whitney U test、Wilcoxon matched-pairs signed-rank test、Friedman test を用いた。 $P < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】

5 歳から 22 歳の 28 例の花粉症患者に対して抗原特異的 T 細胞解析を行った。そのうち、22 例が皮下免疫療法を開始し、6 例は通常の対症療法を行いコントロールとした。治療群とコントロール群で年齢 (10.5 歳 vs. 12.5 歳)、スギ特異的 IgE 値、総 IgE 値に違いはみられなかった。

花粉飛散後に IL-5/IL-4/TNF- α 産生スギ特異的 T 細胞数が治療群で有意に低値であった (治療群 $5.5 / 10^6$ vs. コントロール群 $73.5 / 10^6$, $P < 0.005$; $24.0 / 10^6$ vs. $191.0 / 10^6$, $P < 0.001$; $21.0 / 10^6$ vs. $93.0 / 10^6$, $P < 0.05$)。コントロール群では花粉の自然暴露により IL-5/IL-4 産生スギ特異的 T 細胞が有意に増加した (花粉飛散前 $13.5 / 10^6$ vs. 花粉飛散後 $73.5 / 10^6$, $P < 0.05$; $46.0 / 10^6$ vs. $191.0 / 10^6$, $P < 0.05$)。治療群では IL-5/IL-4 産生スギ特異的 T 細胞の増加はみられなかった。

【考察】

本研究では、スギ花粉症患者で季節性のスギ抗原曝露に伴う IL-5/IL-4 産生スギ特異的 T 細胞

の増加が、皮下免疫療法により抑制されることを示した。末梢血中の T_H サブセットの変化は免疫療法の作用機序として議論があるが、最近の感度がよい解析手法では、その関与が報告される (Campbell, 2010、Wambre, 2012、Bonvalet, 2012)。

本研究の主な制約は、活性化マーカー **CD154** の抗原特異的 T 細胞に対する特異性である。過去の報告から **IL-10** 産生調節性 T 細胞は免疫療法の作用機序として重要な役割を果たしていると思われるが、本研究ではその関与を示すことができなかった。動物実験ではその特異性が示されるが、**IL-10** 産生調節性 T 細胞など数が少ない細胞集団が正確に検出できていない可能性がある。

本研究は 2 つの点で優れている。まず、小児の免疫療法において、末梢血中の抗原特異的 T 細胞の関与を示した初めての報告である。免疫療法の臨床的有用性はおもに小児で報告され、小児を対象にした免疫機序の解明は重要である。次に、本解析手法は比較的簡易に、細胞増殖を用いず、多くの T_H サブセットを同時解析できることである。免疫療法の解明には多くの症例、多くの T_H サブセットの解析が必要で、本解析手法は有力な手法である。

我々は、末梢血中の抗原特異的 T 細胞の有力な解析手法を報告した。免疫療法のモニタリングに本手法を用いることで、複雑なアレルギー免疫機序の中心的役割を解明し、より洗練された免疫療法の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

アレルギー免疫療法はアレルギー疾患の自然歴を変えうる治療法のひとつである。アレルギー性鼻炎に対する免疫療法の作用機序は十分に解明されていないが、鼻粘膜局所へのエフェクター細胞浸潤抑制、抗原特異的 IgE の減少、抗原特異的 IgG4 の増加、局所でのヘルパー T 細胞 (T_H) サブセットの変化、末梢血中あるいは局所での調節性 T 細胞増加などの報告がある。一方、末梢血中の T_H サブセットの関与については議論がある。抗原特異的 T 細胞は総ヘルパー T 細胞に対して 10^{-4} ~ 10^{-6} と少なく、決定的な解析手法は未確立である。歴史的に、抗原刺激による細胞増殖を利用した解析が行われるが、細胞の性質変化や非特異的増殖などの問題がある。最近、細胞増殖を誘導しない短時間の抗原刺激で T 細胞表面に発現する CD154 が、特異性があり高感度な活性化 T 細胞マーカーとして報告された。また、マルチカラーフローサイトメトリーで、多くの蛍光モノクローナル抗体の同時検出が可能となった。そこで本研究では、活性化マーカー CD154 と 6 種類の細胞質内サイトカインをマルチカラーフローサイトメトリーで検出し、免疫療法が抗原特異的 T 細胞に与える影響を解析した。以下に結果の要点を示す。

小児スギ花粉症で皮下免疫療法を受ける患者を対象にした観察研究を行った。免疫療法開始前 (6 月末から 8 月末)、花粉飛散前 (11 月末から 2 月初)、花粉飛散後 (3 月末から 6 月初) に抗原特異的 T 細胞を解析した。分離した末梢血単核球に 6 時間のスギ抗原刺激を加え、蛍光モノクローナル抗体 (抗 CD4、抗 CD154、抗 IL-5、抗 IL-4、抗 IL-10、抗 IL-17A、抗 IFN- γ 、抗 TNF- α) と EMA (死細胞マーカー) で細胞質内サイトカイン染色を行った。マルチカラーフローサイトメトリーでこれらを同時に検出し、総ヘルパー T 細胞に占める CD154 陽性サイトカイン陽性ヘルパー T 細胞数を評価した。①5 歳から 22 歳の 28 例の花粉症患者に対して抗原特異的 T 細胞解析を行った。そのうち、22 例が皮下免疫療法を開始し、6 例は通常の特症療法を行いコントロールとした。治療群とコントロール群で年齢 (10.5 歳 vs. 12.5 歳)、スギ特異的 IgE 値、総 IgE 値に違いはみられなかった。②花粉飛散後に IL-5/IL-4/TNF- α 産生スギ特異的 T 細胞数が治療群で有意に低値であった。③コントロール群では花粉の自然暴露により IL-5/IL-4 産生スギ特異的 T 細胞が有意に増加したが、治療群では IL-5/IL-4 産生スギ特異的 T 細胞の増加はみられなかった。

以上より、スギ花粉症患者で季節性のスギ抗原曝露に伴う IL-5/IL-4 産生スギ特異的 T 細胞の増加が、皮下免疫療法により抑制されることを示した。免疫療法のモニタリングに本手法を用いることで、複雑なアレルギー免疫機序の解明が進み、より洗練された免疫療法の開発が期待される。本研究では、活性化マーカー CD154 とマルチカラーフローサイトメトリーによる新しい抗原特異的 T 細胞解析手法を用いて、小児スギ花粉症の免疫療法で、末梢血中の T_H サブセットの変化が関与しているという新たな知見を得たことが評価された。

審査委員会では、第 1 副査 (新実彰男教授) から「対象患者の割り付けはどのようにしたのか」など論文に関する 10 項目の質問、次に、主査 (岡本尚教授) から「アレルギー免疫療法の副作用とその対処法について」など 13 項目の質問があった。また、指導教授である第 2 副査 (齋藤伸治教授) から「アレルギー疾患における免疫療法の位置づけは」など主科目を中心に 3 項目の質問を行った。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野 (小児医学) に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚 副査 新実 彰男、齋藤 伸治