

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 芦田 真士

### 論文題目

Circulating follicular helper T cells: immunological marker of disease severity in myasthenia gravis.

### 論文の要旨

背景:重症筋無力症 (Myasthenia gravis: MG) は神経筋接合部の障害により、筋力低下、嚥下機能低下、眼球運動障害をきたし、患者の生活の低下につながる疾患であり、時に呼吸機能障害から生命を脅かす。患者の 80%に神経筋接合部に存在するアセチルコリンレセプターへの自己抗体 (抗 AchR 抗体) を認め、抗体介在性の疾患と考えられている。胸腺腫との関連が深く、胸腺腫での自己抗体産生の病態機序が推察される一方で、胸腺摘除後に MG を発症する症例や、抗体低下後も臨床的改善がえられない症例も存在する。加えて、抗 AchR 抗体以外の抗体も含めて自己抗体が検出されない症例も MG の 10%以上に認めるなど病態は不明な点も多い。このように臨床診断や治療効果判定が時として困難なことから、免疫的指標が望まれる。またステロイドや免疫抑制剤といった治療が行われているが、治療抵抗性の患者も少なくない。高齢者 MG におけるステロイドの副作用など、長期のコントロールにおける課題も多く、新規免疫機序を標的とする薬剤が求められる。

従来、抗体介在性の自己免疫疾患において、B 細胞の中でも形質細胞、また B 細胞から形質細胞への分化を促進する CD4 陽性細胞であるヘルパー T 細胞 (Th) が重要とされてきた。近年、Th の中でも濾胞性 T 細胞 (follicular helper T cells: Tfh) が 2 次リンパ節において、B 細胞の成熟、抗体産生を促進する報告がなされ、着目されている。Tfh の特徴として、C-X-C motif receptor (CXCR) 5 を発現しており、また Th の中でも Inducible T cell co-stimulator (ICOS) を高度に発現している。末梢血中にも CXCR5 陽性の Th は存在しており (circulating Tfh :cTfh)、自己免疫性疾患での上昇が報告されている。我々は、Tfh、形質細胞のカウンターパートである、cTfh、形質芽細胞を MG 患者において解析した。また ICOS 発現と cTfh のインターロイキン(IL)-21 を始めとするサイトカイン産生機能の関連を評価するために、ICOS 高発現 (ICOS<sup>high</sup>) cTfh と低発現 (ICOS<sup>low</sup>) cTfh を分離し、T 細胞刺激を行った後に上清中のサイトカインを定量した。

方法:MG 患者末梢血中からリンパ球を分離、主にフローサイトメトリーを使用して解析を行った。京都府立医科大学、京都大学、関西医科大学医療センターに入院した、免疫療法導入前で胸腺摘除術を受けていない 24 名の抗 AchR 抗体陽性 MG 患者を対象とし、18 名の正常対照群と比較した。24 名のうち、追跡調査を行えた 6 名について、免疫療法導入後の cTfh phenotype の解析を行なった。MG 患者においては、重症度との比較を行った。また cTfh および、ICOS<sup>high</sup>、ICOS<sup>low</sup> cTfh のサイトカイン産生能について評価を行った。MG 患者および健常者 5 名の末梢血リンパ球を抗体染色後に目的細胞をソーティング、*in vitro* で 48 時間 T 細胞刺激を行い、上清中のサイトカインとして IL-21, IL-4, IL-17A, IFN- $\gamma$  を multiplex

array を用いて定量した。

結果と考察:免疫治療前の MG 患者において cTfh, ICOS<sup>high</sup> cTfh の頻度ともに健常群と比較して上昇していた (9.0% in MG vs 5.8% in HS,  $p = 0.0015$  and 4.0% in MG vs 0.9% in HS,  $p < 0.0001$ , respectively)。cTfh の phenotype を表面の chemokine 発現を元にタイピングしたところ、Th2, Th17 の性質をもつとされる Tfh2, Tfh17 の頻度が MG 患者で上昇していることを確認した (5.7% in MG vs 4.2% in HS,  $p = 0.023$ , and 0.73% in MG vs 0.21% in HS,  $p < 0.001$ , respectively)。胸腺腫の有無と cTfh の頻度、フェノタイプに関連は認められなかった。

MG 患者から単離した cTfh において、IL-21 の産生量は有意に上昇していた。また IL-4, IL-17A の産性能も更新しており、IFN- $\gamma$  の産性能は低下していることから、表面抗原で認めた phenotype の偏倚を機能的にも確認できた。MG 患者では ICOS<sup>high</sup> cTfh は ICOS<sup>low</sup> cTfh と比較して多くの IL-21 を産生しており、IL-17A の産生と関連を認めた。興味深いことに HS ではこの現象は認めず、ICOS<sup>high</sup> cTfh の頻度のみならず、機能的な違いも MG 患者に起きていると推察された。

cTfh と臨床情報との解析を行った。cTfh, ICOS<sup>high</sup> cTfh の頻度は MG 重症度と正の相関を示した ( $R^2 = 0.35$ ,  $p = 0.005$  and  $R^2 = 0.31$ ,  $p = 0.0038$ )。形質芽細胞は MG にて増加傾向にあったが、形質芽細胞の頻度と重症度との相関は認めなかった。また従来言われている通り、抗 AchR 抗体と重症度に相関は認めなかった。抗 AchR 抗体陽性の MG にて、ICOS<sup>high</sup> cTfh は臨床重症度や治療反応性の指標として有用であることを見出した。

免疫治療の cTfh 頻度、phenotype への影響について免疫治療前後で評価を行った。重症度の改善と並行して、cTfh, ICOS<sup>high</sup> cTfh 頻度の減少を認めた。Th1, 2, 17 の phenotype においては、Tfh2 と Tfh17、とくに Tfh17 の頻度低下を認めた。

Tfh は B 細胞の分化に重要であり、IL-21 は中心的な役割を示すとされている。抗体介在性疾患である MG においても、cTfh を解析することで病態において重症な役割を示している可能性が示唆された。また IL-17 も同様に MG 免疫病態において重要であると推測された。cTfh が MG における重症度の免疫学的指標になるかは、より多数症での検討が必要と考えられるが、抗 AchR 抗体より免疫学的に疾患重症度を反映できると考えた。