

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	野澤 はやぶさ
-------	----	----	---------

学位論文題目

Expression of cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) in tonsillar T-cells and its induction by *in vitro* stimulation with alpha-streptococci in patients with pustulosis palmaris et plantaris (PPP)

(邦題：掌蹠膿疱症扁桃 T リンパ球における皮膚リンパ球抗原 (CLA) の発現と α 溶連菌刺激によるその誘導)

共著者名

高原 幹

岸部 幹

原渕 保明

(未公表)

I. 研究目的

口蓋扁桃に限局した慢性炎症がありそれ自体ほとんど無症状か軽微な症状にとどまるにも関わらず、それが原病巣となり遠隔の諸臓器に反応性の二次疾患をひきおこす病態が扁桃病巣感染症である。掌蹠膿疱症 (pustulosis palmaris et plantaris; PPP) は主として手掌、足底に無菌性膿疱を形成し寛解憎悪を繰り返す慢性皮膚疾患であり、扁桃摘出術が有効な扁桃病巣感染症の最も代表的な疾患として知られている。

本疾患発症の機序として何らかの抗原刺激に対する扁桃での自己感作 T リンパ球の産生や、皮膚と交差反応性を有する自己抗体の産生が示唆されてきたが、その詳細は未だに明らかではない。患者血清中の α 溶連菌に対する特異的抗体価を測定すると、掌蹠膿疱症では慢性扁桃炎や健常成人に比較してその抗体価が高値を示すことや、 α 溶連菌抗原存在下で扁桃単核球を培養すると患者由来扁桃単核球では活性化反応がみられ、各種の炎症性サイトカインの産生が亢進することが報告されており (1)、本疾患の発症機序に口腔内常在細菌である α 溶連菌に対する過剰免疫反応が関与していることが予測される。

一方、リンパ球上の特定の接着分子と組織上の接着分子の結合がリンパ球の特定組織への移行に重要な役割を担っていることが最近判明し、皮膚リンパ球抗原(cutaneous lymphocyte associated antigen; CLA)が皮膚に選択的に浸潤する T リンパ球に発現していることから、皮膚特異的ホーミングレセプターとして注目されている(2)。

本研究の目的は、掌蹠膿疱症の病巣皮膚発症に扁桃 T リンパ球のホーミング現象が関与しているとの仮説に基づき、本疾患における CLA の発現とその役割を明らかにするとともに、口腔内常在細菌である α 溶連菌刺激により CLA の発現がどのように変化するかを検討することで、扁桃病巣感染症としての掌蹠膿疱症の発症機序を明らかにすることである。

II. 材料・方法

1. 検体

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科において扁桃摘出術が施行された 21 名より得られた臨床検体を本研究に用いた。その内訳としては、掌蹠膿疱症が 11 名、対象群として習慣性扁桃炎 8 名と閉塞性睡眠時無呼吸症 2 名である。皮膚 T リンパ球における CLA 発現においては掌蹠膿疱症の比較対照として健常成人より得られた皮膚 5 検体を用いた。

2. 扁桃 T リンパ球における CLA 発現解析

扁桃における CLA 発現は免疫染色とフローサイトメトリーにより解析した。扁桃摘出術により得られた扁桃組織よりパラフィン包埋切片を作成し、抗 CD3 抗体、抗 CLA 抗体を用いた免疫二重染色を行った。CLA の発現は顕微鏡下に CD3 陽性細胞および CLA/CD3 陽性細胞数を計測し、CD3 陽性細胞中の CLA 陽性細胞の割合を算出した。また、扁桃組織の一部は比重遠心法にて単核球を分離し FITC 標識抗 CD3 抗体、PE 標識抗 CLA 抗体にて反応させた後、フローサイトメーターにより CLA の発現を解析した。

3. α 溶連菌刺激による扁桃 T リンパ球の CLA 発現解析

a) 菌体抗原の作成

菌体抗原として *Streptococcus (S.) sanguis* (ATCC10556), *S. salivarius* (ATCC7073) および *S. mitis* (NCTC3265) の 3 種の α 溶連菌を用いた。これらの菌を Todd-Hewitt 培地にて 24 時間培養後、60°C 40 分間不活化処理を行い、遠心し回収した。回収した菌体抗原を PBS にて洗浄後、使用時まで凍結乾燥保存した。

b) 扁桃単核球の培養

扁桃組織より得られた単核球は 10% ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培養液に浮遊させた後、上記 3 種の菌体抗原を加えたもの、マイトジェンとしての PHA (phytohaemagglutinin) を加えたもの、および全く抗原を加えないものにおいて 37°C、5% CO₂ 存在下で 3 日間培養した。

c) CLA 発現解析

3日間の培養の後、扁桃単核球は FITC 標識抗 CD3 抗体、PE 標識抗 CLA 抗体にて反応させ、フローサイトメーターにより CLA の発現を解析した。

d) 培養上清におけるサイトカインの解析

培養上清は3日間の培養の後回収し、CLA 発現を亢進させる因子として知られる IL-6、transforming growth factor (TGF)- β の各濃度を ELISA 法により測定した。

4. 末梢血 T リンパ球の CLA 発現解析

掌蹠膿疱症患者より術前、術後3ヶ月、術後6ヶ月の各時期に末梢血を採取した。末梢血より単核球を分離した後、フローサイトメトリーを施行し、末梢血 T リンパ球の CLA 発現を解析した。

5. 掌蹠皮膚における CLA と E-セレクトチンの発現解析

掌蹠膿疱症患者の病巣皮膚および健康成人から得られた皮膚組織からパラフィン包埋切片を作成し、抗 CD3 抗体、抗 CLA 抗体を用いて免疫二重染色を行った。また CLA のリガンドである E-セレクトチンについても抗 E-セレクトチン抗体を用いた免疫染色を行い、その発現を解析した。CLA の発現については顕微鏡下に CD3 陽性かつ CLA 陽性リンパ球数をカウントし単位面積 (1 mm²) あたりの細胞数を算出した。E-セレクトチンの発現については顕微鏡下に E-セレクトチン陽性の微小血管数をカウントし、同様に単位面積 (1 mm²) あたりの E-セレクトチン陽性微小血管数を算出した。

III. 成績

1. 扁桃 T リンパ球における CLA 発現解析

免疫組織学的解析において濾胞間領域の T 細胞と高内皮小静脈が CLA 陽性像を示した。B 細胞領域であるリンパ濾胞には CLA 陽性細胞は認められなかった。免疫染色、フローサイトメトリーのいずれの解析においても掌蹠膿疱症は対照群と比較して有意に CLA 陽性 T 細胞の割合が高かった(いずれも $p < 0.01$)。これらの結果から掌蹠膿疱症では扁桃 T リンパ球における CLA 発現が上昇していることが示された。

2. α 溶連菌刺激による扁桃 T リンパ球の CLA 発現変化

マイトジェンである PHA による刺激では掌蹠膿疱症、対象群ともに CD3 陽性 CLA 陽性細胞の割合が増加していた。一方、*S.mitis* と *S.salivarius* 刺激において、掌蹠膿疱症では CD3 陽性 CLA 陽性細胞の割合が有意に増加していたのに対し(いずれも $P < 0.01$)、対照群ではいずれの α 溶連菌刺激に対しても CD3 陽性 CLA 陽性細胞の割合は変化しなかった。

3. α 溶連菌刺激による扁桃単核球のサイトカイン産生

PHA による刺激では掌蹠膿疱症、対象群ともに培養上清中の IL-6、TGF- β 濃度が増加していた。一方、*S.sanguis* および *S.salivarius* 刺激において、掌蹠膿疱症では培養上清中の TGF- β 濃度が有意に上昇していたのに対し(いずれも $P < 0.01$)、対照群ではいずれの α 溶連菌刺激に対しても培養上清中の TGF- β 濃度に変化を認めなかった。また IL-6 に関しては掌蹠膿疱症、対照群ともに α 溶連菌刺激の有無で培養上清中の濃

度に変化は認められなかった。これらの結果から掌蹠膿疱症では α 溶連菌刺激に対して、扁桃 T リンパ球の CLA 発現が亢進するとともに TGF- β などのサイトカイン環境の変化が存在する可能性が示唆された。

4. 末梢血 T リンパ球における CLA の発現解析

フローサイトメトリーによって掌蹠膿疱症患者の末梢血 T リンパ球の CLA 発現を解析した結果、CD3 陽性 CLA 陽性細胞の割合は、術前と術後 3 ヶ月後では有意な変化を認めなかったが、術後 6 ヶ月目には術前と比較して統計学的に有意にその割合が低下していた ($p < 0.05$)。

5. 皮膚における CLA と E-セレクトインの発現解析

掌蹠膿疱症皮膚では主に表皮と真皮乳頭内に多数の CD3 陽性 CLA 陽性細胞を認めた。さらにこれらの細胞は形成された膿疱周囲に多数集積する像が観察された。単位面積 (1 mm^2) あたりの CD3/CLA 陽性細胞数は掌蹠膿疱症では健常皮膚に比べ有意に高い結果であった ($p < 0.01$)。さらに E-セレクトインの免疫染色では、真皮内に E-セレクトイン陽性の微小血管の存在を認めた。単位面積 (1 mm^2) あたりの E-セレクトイン陽性微小血管数を算出したところ、掌蹠膿疱症皮膚では健常皮膚に比べて有意に E-セレクトイン陽性微小血管数が多い結果であった ($p < 0.01$)。

IV. 考察

本研究では掌蹠膿疱症扁桃 T リンパ球における皮膚ホーミングレセプターCLA の発現、掌蹠皮膚における CLA 陽性 T リンパ球の浸潤とリガンドである E-セレクトイン陽性微小血管の存在を明らかにした。これらの結果は扁桃病巣感染症である本疾患の病巣皮膚発症に、皮膚特異的ホーミングレセプターを介した扁桃 T リンパ球の皮膚への移行が重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。

CLA は主に T リンパ球上に発現する糖タンパクであり、皮膚特異的ホーミングレセプターとして知られる (2)。これまでの研究において乾癬、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患においても病巣皮膚に浸潤した T リンパ球の CLA 発現は報告されているが、その発現機序や由来は未だ明らかにされていない。本研究においては皮膚に浸潤した CLA 陽性 T リンパ球が扁桃から移行したものであることを直接的に証明するものではないが、扁桃摘出術の術後 6 ヶ月目に末梢血 T リンパ球の CLA 発現が有意に低下したことを考慮すると、扁桃 T リンパ球の循環経路として末梢循環系が関与している可能性が高いものと考えられた。

一方で本疾患の発症機序に関しては口腔内常在菌である α 溶連菌に対する免疫応答の異常が示唆されてきた (1)。本研究において、 α 溶連菌刺激存在下に扁桃単核球を培養することで、T リンパ球の CLA 発現が亢進し、さらに CLA の発現を増強させる因子である TGF- β の産生が亢進することが明らかになった。これらの実験結果は、掌蹠膿疱症では扁桃において口腔内常在細菌である α 溶連菌に対する過剰免疫反応が存在するという従来の説を支持するとともに、その免疫反応が皮膚ホーミングレセプターCLA の発現誘導に関与していることを示すものである。

以上の結果から、掌蹠膿疱症の病巣皮膚発症の機序として、扁桃における α 溶連菌に対する過剰免疫反

応の存在と、皮膚ホーミングレセプターCLA を介した皮膚への扁桃 T リンパ球のホーミングが重要な役割を担っているものと考えられた。

V. 結論

1. 掌蹠膿疱症扁桃 T リンパ球では対照群と比べて CLA の発現が高かった。
3. α 溶連菌刺激により掌蹠膿疱症扁桃 T リンパ球の CLA 発現が亢進した。
4. α 溶連菌存在下に掌蹠膿疱症扁桃単核球を培養したところ TGF- β の産生が亢進した。
5. 掌蹠膿疱症末梢血 T リンパ球の CLA 発現は扁桃摘出術後に減少した。
6. 掌蹠膿疱症皮膚では CLA 陽性 T リンパ球の浸潤と E-セレクトリン陽性の微小血管の発現亢進を認めた。

以上の結果より掌蹠膿疱症の病巣皮膚発症に扁桃における α 溶連菌に対する過剰免疫反応の存在と、皮膚ホーミングレセプターCLA を介した皮膚への扁桃 T リンパ球のホーミングが重要な役割を担っている可能性が示唆された。



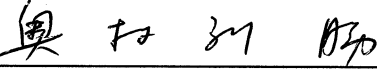



VI. 引用文献

1. Murakata, H., Y. Harabuchi, and A. Kataura. 1999. Increased interleukin-6, interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha production by tonsillar mononuclear cells stimulated with alpha-streptococci in patients with pustulosis palmaris et plantaris. *Acta Otolaryngol* 119:384.
2. Picker, L. J., S. A. Michie, L. S. Rott, and E. C. Butcher. 1990. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol* 136:1053.

VII. 参考文献

1. 高原 幹, 岸部 幹, 野澤はやぶさ, 石田芳也, 柳内 充, 片山昭公, 今田正信, 林 達哉, 原淵保明: 掌蹠膿疱症でのホーミングケモカインの検討. *口咽科* 2002; 14: 299-304.
2. 高原 幹, 野澤はやぶさ, 岸部 幹, 原淵保明: 掌蹠膿疱症の発症病態と扁桃摘出術の有効性. *口咽科* 2003; 15: 277-283.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	野澤 はやぶさ
<p>審査委員長  </p> <p>審査委員  </p> <p>審査委員  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Expression of cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) in tonsillar T-cells and its induction by in vitro stimulation with alpha-streptococci in patients with pustulosis palmaris et plantaris (PPP)</p> <p>(邦題：掌蹠膿疱症扁桃 T リンパ球における皮膚リンパ球抗原(CLA)の発現と α溶連菌刺激によるその誘導)</p>			
<p>掌蹠膿疱症(pustulosis palmaris et plantaris; PPP)は主として手掌、足底に無菌性膿疱を形成し寛解憎悪を繰り返す慢性皮膚疾患であり、扁桃病巣感染症の最も代表的な疾患として知られている。その治療には、扁桃摘出術が有効であることが数多く報告されているが、扁桃が関わった発症機序については未だ不明の点が多い。本論文は、掌蹠膿疱症患者由来の扁桃、末梢血および病巣皮膚における T リンパ球の皮膚特異的ホーミングレセプター CLA (cutaneous lymphocyte associated antigen)の発現を解析するとともに、α溶連菌刺激に扁桃 T リンパ球の CLA 発現変化を検討することで、扁桃病巣感染症としての掌蹠膿疱症の発症機序を考察したものである。</p> <p>はじめに扁桃 T リンパ球における CLA の発現を二重免疫染色および two-</p>			

color flow cytometry により解析した。その結果、いずれの解析においても掌蹠膿疱症患者では陽性 CLA 陽性 CD3 細胞の割合は対照疾患群と比較して統計学的に有意に高いことが明らかとなった($P < 0.01$)。

次に、扁桃リンパ球を試験管内にて α 溶連菌菌体抗原存在下で3日間培養し、CLA 発現の変化を解析した。また CLA の発現を促すサイトカインである IL-6 と TGF- β の産生を ELISA 法により解析した。その結果、CLA 陽性 CD3 細胞の割合は掌蹠膿疱症では *S.mitis* と *S.salivarius* 刺激にて有意に増加したのに対し(いずれも $P < 0.01$)、対照群ではいずれの α 溶連菌刺激においても変化しなかった。さらに TGF- β の産生は掌蹠膿疱症では *S.sanguis* および *S.salivarius* 刺激によって有意に亢進したのに対し(いずれも $P < 0.01$)、対照群では変化しなかった。

末梢血 T リンパ球における CLA 発現について扁桃摘出術前、術後3ヶ月、術後6ヶ月に末梢血を採取し解析したところ、掌蹠膿疱症では CD3 陽性 CLA 陽性細胞の割合は術後6ヶ月目には術前と比較して統計学的に有意に低下していた($p < 0.05$)。

最後に、病巣皮膚における CLA とそのリガンドである E-セレクトインについて免疫染色にてその発現を検討した。その結果、掌蹠膿疱症皮膚では主に表皮と真皮乳頭内に多数の CLA 陽性 CD3 細胞を認め、その数は健常皮膚に比べ有意に高いことが判明した($p < 0.01$)。また、E-セレクトインは真皮内の微小血管に発現され、その数は掌蹠膿疱症皮膚では健常皮膚に比べて有意に高かった($p < 0.01$)。

本研究は、掌蹠膿疱症の扁桃 T リンパ球では α 溶連菌に対する過剰免疫反応によって CLA 発現が亢進し、その結果、CLA 陽性扁桃 T リンパ球が体循環を介して病巣皮膚へホーミングする可能性を示唆したものである。得られた知見は今後、掌蹠膿疱症の診断、治療法の開発に役立つ可能性があり、臨床的にも意義深いものと考えられた。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。