

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	吉崎智貴
-------	-----	-----	------

学 位 論 文 題 目

Up-regulation of CC chemokine receptor 6 on tonsillar T cells and its induction
by in vitro stimulation with α -streptococci in patients
with pustulosis palmaris et plantaris

(邦題：掌蹠膿疱症患者の扁桃 T 細胞における CCR 6 の
発現増加と α 溶連菌刺激によるその誘導)

共著者名

坂東 伸幸、上田 征吾、野澤 はやぶさ、後藤 孝、
岸部 幹、高原 幹、原渕 保明

掲載雑誌

Clinical and Experimental Immunology 157:71-82 (2009)

I. 研究目的

掌蹠膿疱症 (pustulosis palmaris et plantaris) は主に手掌および足蹠に無菌性膿疱を生じる難治な原因不明の慢性皮膚疾患である。その治療として扁桃摘出術が極めて有用であり、代表的な扁桃病巣疾患として認識されているが、掌蹠膿疱症における扁桃の免疫学的、病理学的関与については不明な点が多い。

我々はこれまで掌蹠膿疱症患者の扁桃 T 細胞において病巣皮膚への特異的遊走因子である皮膚リンパ球関連抗原 (CLA) の発現が亢進しており、これは α 溶連菌の生体外刺激により誘導されること、また、掌蹠膿疱症病変部皮膚に多数の CLA 陽性 T 細胞が浸潤していることを見いだした (1)。これらの結果は掌蹠膿疱症の扁桃 T 細胞が病変部に浸潤する際に CLA が深く関与している可能性を示唆するものである。

近年多くのケモカインおよびケモカインレセプターが同定されており、乾癬においては CC ケモカインレセプター (CCR) 4、CCR6、CX ケモカインレセプター (CXCR) 3 およびそのリガンドが病態に関与している可

能性が報告されているが、これらのケモカインレセプターは掌蹠膿疱症における皮膚ホーミングレセプターである CLA 陽性 T 細胞で多く共発現している(2)。そのため、これらは掌蹠膿疱症においてもその病態に関与している可能性があるが、そのメカニズムは不明である。

本研究では掌蹠膿疱症の扁桃および末梢血リンパ球におけるケモカインレセプターの発現について検討し、さらに α 溶連菌の生体外刺激による掌蹠膿疱症の扁桃 T 細胞におけるケモカインレセプター発現の変化、扁桃 T 細胞のケモカインに対する遊走性、掌蹠膿疱症病変部皮膚におけるケモカインの発現について検討した。

II. 材料と方法

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 26 名より得られた臨床検体が本研究に用いられた。その内訳は、掌蹠膿疱症患者が 14 名習慣性扁桃炎患者が 12 名である。末梢血リンパ球におけるケモカインレセプター発現については掌蹠膿疱症の比較対照として健常成人 12 名より得られた検体を用いた。

2. 扁桃および末梢血リンパ球におけるケモカインレセプターの発現解析

a) 扁桃リンパ球におけるケモカインレセプターの発現解析

掌蹠膿疱症および習慣性扁桃炎患者に対する扁桃摘出術によって得られた扁桃組織より比重遠心法にて単核球を分離し、PE 標識抗 CD3 抗体および FITC 標識抗 CCR4、CCR6、CXCR3 抗体で二重染色後、two-color flow cytometry にて解析した。

b) 末梢血リンパ球におけるケモカインレセプターの発現解析

掌蹠膿疱症患者では術前、および術後 3 ヶ月の時点で末梢血を採取し、単核球を分離後 CD3/CCR4、CCR6、CXCR3 の two-color flow cytometry を施行した。対照群では健常成人より得られた末梢血で同様の手法によりケモカインレセプターの発現を解析した。

3. α 溶連菌刺激による扁桃リンパ球のケモカインレセプター発現解析

扁桃組織より得られた単核球を 10%FBS 添加 RPMI1640 中に浮遊させた後、*Streptococcus (S.) sanguis* (ATCC10556), *S. salivarius* (ATCC7073) および *S. mitis* (NCTC3265) の 3 種の菌体抗原を加えたもの、マイトジェンとしての PHA を加えたもの、および全く抗原を加えないものにわけて 37°C、5%CO₂ 下で 3 日間培養し、CD3/CCR4、CCR6、CXCR3 の two-color flow cytometry を行った。

4. 扁桃リンパ球の細胞遊走性解析

扁桃組織より得られた単核球より磁気ビーズ法にてT細胞を分離し、ボアサイズ3 μm のトランスウェルの上段に入れ、下段にCCR6のリガンドであるCCL20を0, 100, 500, 1000ng/mlの4段階の濃度を設定し入れた。3時間後に下段に溜まった細胞をカウントした。

5. 皮膚におけるCCR6とCCL20の発現解析

掌蹠膿疱症患者の病巣部および健常部皮膚から得られた皮膚組織よりパラフィン包埋連続切片を作成し、抗CD3、CCR6抗体を用いた免疫染色を行い、顕微鏡下にCCR6陽性細胞数をカウントした。またCCL20についても抗CCL20抗体を用いた免疫染色を行いその発現を解析した。

6. 統計学的解析

2因子間の検討にはMann-Whitney U検定、Wilcoxon検定を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

III. 結果

1. 扁桃および末梢血T細胞におけるケモカインレセプターの発現解析

掌蹠膿疱症群では習慣性扁桃炎群と比較して扁桃および末梢血T細胞におけるCCR6の発現が有意に高かった。CCR4およびCXCR3については、両群間に有意差は認められなかった。

2. α 溶連菌刺激による扁桃リンパ球のケモカインレセプター発現解析

掌蹠膿疱症では*S. mitis*存在下での培養においてCCR6陽性T細胞の割合が上昇していたのに対し、習慣性扁桃炎群ではいずれの α 溶連菌刺激に対してもCCR6陽性T細胞の割合は変化しなかった。また、T細胞のCCR6発現上昇率については*S. mitis*と*S. salivarius*存在下での培養において掌蹠膿疱症群の方が習慣性扁桃炎群に比較して優位に高い結果であった。

3. 扁桃リンパ球の細胞遊走性解析

習慣性扁桃炎群の扁桃T細胞はCCL20に対し濃度依存性の遊走性を呈したのに対し、掌蹠膿疱症群のT細胞はより低濃度のCCL20に対し高い遊走能を呈した。両群間の比較では、CCL20濃度が100ng/mlの時に掌蹠膿疱症群の方が習慣性扁桃炎群に比べて有意に高い遊走性を呈した。

4. 扁桃摘出術前後での末梢血T細胞におけるCCR6発現の変化

掌蹠膿疱症群では、術前と比較して術後3ヶ月の時点での末梢血T細胞におけるCCR6の発現が有意に低下していた。CCR6の発現減少率は術後の皮膚症状スコアと有意に相関していた。

5. 皮膚におけるCCR6陽性細胞の浸潤とCCL20の発現解析

掌蹠膿疱症の病巣皮膚では多くの CD3 陽性細胞の浸潤が確認され、その同一視野で CCR6 陽性細胞が確認されたのに対し、非病巣皮膚では CD3 陽性細胞および CCR6 陽性細胞いずれもほとんど確認されなかった。同様に病巣皮膚では CCL20 陽性細胞が多く確認されたが、非病巣皮膚では CCL20 陽性細胞はほとんど確認されなかった。

IV. 考察

本研究では、掌蹠膿疱症の扁桃および末梢血 T 細胞における CCR6 の発現、掌蹠皮膚における CCR6 陽性 T 細胞の存在および CCR6 のリガンドである CCL20 の発現を明らかにした。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、扁桃で活性化した T 細胞上の CCR6 および病巣部位における CCL20 が重要な役割を担っていることを示唆するものである。本実験系においては皮膚に見いだされた CCR6 陽性 T 細胞は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、扁桃摘出術により扁桃を除去することで末梢血 T 細胞における CCR6 発現が減少したことを考慮すると、CCR6 を発現した扁桃 T 細胞が末梢循環系を経由して CCL20 の発現した皮膚へ浸潤しているものと考えられた。また、扁桃 T 細胞の CCL20 に対する遊走性の検討では、習慣性扁桃炎群の扁桃 T 細胞の遊走性が濃度依存性であったのに対し、掌蹠膿疱症群の扁桃 T 細胞はより低濃度の CCL20 に対し高い遊走性を呈し、掌蹠膿疱症の扁桃 T 細胞では CCR6 の発現が亢進しているだけでなく、CCL20 に対する高い反応性を有している可能性が示唆された。また、 α 溶連菌存在下に掌蹠膿疱症扁桃 T 細胞を培養することで T 細胞上の CCR6 の発現亢進が認められた。我々はこれまで掌蹠膿疱症扁桃 T 細胞を α 溶連菌存在下に培養することで TGF- β の産生が亢進することを報告しているが(1)、TGF- β は CCR6 の発現を上昇させる因子でもあり(3)、掌蹠膿疱症 T 細胞における CCR6 の発現亢進に扁桃における α 溶連菌に対する過剰免疫反応が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、掌蹠膿疱症の扁桃 T 細胞では α 溶連菌に対する過剰免疫応答の結果 CCR6 発現が亢進しており、CCR6 を介した T 細胞の病巣皮膚への浸潤が掌蹠膿疱症の発症機序において重要な役割を担っていることが示唆された。これにより、CCR6 が病勢を把握するマーカーとして、あるいは治療の標的因子として将来的な開発に応用できるものと考えられた。

V. 結論

1. 掌蹠膿疱症では対照群に比べて扁桃および末梢血 T 細胞における CCR6 の発現が亢進していた。
2. α 溶連菌刺激による培養で掌蹠膿疱症扁桃 T 細胞上の CCR6 発現が亢進した。
3. 掌蹠膿疱症の扁桃 T 細胞は CCL20 に対して高い反応性を有していた。
4. 掌蹠膿疱症末梢血 T 細胞の CCR6 発現は扁桃摘出術後に減少し、その減少率と皮膚症状の改善度は相関した。

5. 掌蹠膿疱症の皮膚において CCR6 陽性 T 細胞の浸潤と CCL20 の発現が亢進していた。
6. 以上の結果から、CCR6 を介した扁桃 T 細胞の皮膚への浸潤が掌蹠膿疱症の発症機序において重要な役割を担っていることが示唆された。




VI. 引用文献

1. Nozawa H, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y. 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). Clin Immunol 116:42-53, 2005
2. Liao F, Rabin RL, Smith CS, et al. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. J Immunol 162:186-194, 1999
3. Vanbervliet B, Homey B, Durand I, et al. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. Eur J Immunol 32:231-242, 2002

VII. 参考文献

1. Goto T, Bando N, Yoshizaki T, Nozawa H, Takahara M, Ueda S, Hayashi T, Harabuchi Y. Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN- γ productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy. Clin Immunol 126:260-269, 2008
2. 吉崎智貴, 高原 幹, 坂東伸幸, 原潤保明: 掌蹠膿疱症における扁桃摘出術の適応をどう考えるか? - 耳鼻咽喉科の立場から- JOHNS 24(10):1557-1561, 2008

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	吉崎 智貴
<p>審査委員長 <u>立野 正敏</u> </p> <p>審査委員 <u>原 琢 保 明</u> </p> <p>審査委員 <u>岡 村 一</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Up-regulation of CC chemokine receptor 6 on tonsillar T cells and its induction by in vitro stimulation with α-streptococci in patients with pustulosis palmaris et plantaris.</p> <p>(邦題：掌蹠嚢胞症患者の扁桃 T 細胞における CCR6 の発現増加と α 溶連菌刺激によるその誘導)</p>			
<p>掌蹠嚢胞症は扁桃の病巣感染が発症に関与することが知られており、扁桃摘除術を施行することで病変の改善がみられる事が知られている。論文提出者らは、この扁桃摘除が掌蹠嚢胞症の病態に関与する機序を解明する目的で、末梢血および摘出された扁桃リンパ球の T 細胞分画について検討したところ以下の結果が得られた。①CCR6 陽性細胞が比較対照群に比べて著しく増加している。② α 溶連菌でリンパ球を刺激することで CCR6 陽性細胞が比較対照群に比べて増加すること。③ CCR6 のリガンドである CCL20 存在下で患者由来リンパ球の遊走能が比較対照群に比べて増加していた。④扁桃摘除で症状改善をみとめた三ヶ月後の末梢血で CCR6 細胞数が正常化していた。⑤掌蹠嚢胞症病変の免疫組織学的検索で病変局所に CCR6 陽性細胞の浸潤が比較対照群に比べて高度であり、CCR6 のリガンドである CCL20 陽性細胞も局所で増加していた。</p> <p>これらの結果から掌蹠嚢胞症では扁桃局所で α 溶連菌の刺激で誘導された CCR6 陽性細胞が活性化され、病変局所で発現亢進している CCL20 により、局所に遊走し掌蹠嚢胞症の病変を形成する可能性が示唆された。扁桃摘除術は CCR6 陽性細胞の発生源を除去することで、掌蹠嚢胞症の発症を抑えるという機序が示された。</p>			

論文の構成・手法も適切であり、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。尚、本論文は既に2009年のClinical and Experimental Immunology誌(2009; 157: 71-82)に掲載済みである。