

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	上田征吾
-------	-----	-----	------

学 位 論 文 題 目

Up-regulation of $\beta 1$ integrin 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 $\beta 1$ インテグリンの
発現増加と α 溶連菌刺激によるその誘導)

共著者名

高原 幹、東谷 敏孝、吉崎 智貴、岸部 幹、原渕 保明

掲載雑誌

Journal of Clinical Immunology 30:861-871 (2010)

I. 研究目的

掌蹠膿疱症 (pustulosis palmaris et plantaris) は主として手掌および足底に無菌性膿疱を形成し、寛解増悪を繰り返す慢性の難治性皮膚疾患であり、口蓋扁桃摘出により皮疹の改善や消失が多く認められることから、代表的な扁桃病巣疾患とされている。

これまで我々は、掌蹠膿疱症患者の扁桃 T 細胞において、習慣性扁桃炎での扁桃 T 細胞と比較して CD25 などの活性化マーカーを発現している細胞が多いことを見いだした (1)。また、皮膚への細胞遊走に関与するとされる皮膚リンパ球関連抗原 (CLA: cutaneous lymphocyte-associated antigen) (2) と CC ケモカインレセプター (CCR: CC chemokine receptor) 6 (3) の扁桃 T 細胞における発現亢進を認め、これらの発現は α 溶血性レンサ球菌 (α 溶連菌) 刺激にて亢進することを見いだした。これらの結果は本疾患の発症に、口腔内常在菌である α 溶連菌により活性化された扁桃 T 細胞が上記皮膚指向性マーカーを発現し、皮膚へホーミングしていることを示唆するものである。しかしながらこれらの詳細な機序については依然不明

な点が多い。

$\beta 1$ インテグリンは、そのリガンドである血管細胞接着分子 (VCAM-1: vascular cell adhesion molecules-1) とともに細胞接着因子として同定され、細胞遊走に関与するとされている。乾癬においては $\beta 1$ インテグリン陽性 T 細胞の浸潤と血管内皮における VCAM-1 の発現が病変皮膚で亢進していることが報告されている。また $\beta 1$ インテグリンは共刺激因子として T 細胞の活性化にも関与するとされ、近年種々の自己免疫疾患においてその関与が指摘されている。しかし、本疾患における扁桃リンパ球での $\beta 1$ インテグリンの検討は行われていない。

本研究では掌蹠膿疱症の扁桃および術前、術後の末梢血リンパ球における $\beta 1$ インテグリンの発現について検討し、さらに生体外 α 溶連菌刺激による掌蹠膿疱症の扁桃 T 細胞における $\beta 1$ インテグリン発現の変化、扁桃 T 細胞の VCAM-1 に対する遊走性、掌蹠膿疱症病変部皮膚における $\beta 1$ インテグリン、VCAM-1 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 33 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 15 名、反復性扁桃炎患者が 18 名である。また皮膚における $\beta 1$ インテグリンの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. 扁桃および末梢血 CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現

a) 扁桃 CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現

掌蹠膿疱症および反復性扁桃炎患者からの扁桃組織より比重遠心法にて単核球を分離し、PE 標識抗 CD4 抗体および FITC 標識抗 $\beta 1$ インテグリン抗体で二重染色後、two-color flow cytometry を施行した。また扁桃単核球から磁気ビーズ法によって CD4 陽性 T 細胞を分離し、PE 標識抗 CLA 抗体および FITC 標識抗 $\beta 1$ インテグリン抗体で二重染色後、two-color flow cytometry を施行した。

b) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現

掌蹠膿疱症および反復性扁桃炎患者から、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 CD4 および $\beta 1$ インテグリンの two-color flow cytometry を施行した。

3. α 溶連菌刺激による扁桃 CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現

扁桃組織より得られた単核球を 10%FBS、100U/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン添加 RPMI1640 に浮遊させた後、*Streptococcus (S.) sanguinis* (ATCC10556), *S. salivarius* (ATCC7073) および *S. mitis* (NCTC3265) の 3 種の不活化菌体抗原を加えたもの、および抗原を加えないものにおいて 37°C、5%CO₂ 下で 3 日間培養し、CD4 および $\beta 1$ インテグリンの two-color flow cytometry を行った。

4. 扁桃 CD4 陽性 T 細胞の細胞遊走能

扁桃組織より得られた単核球より磁気ビーズ法にて CD4 陽性 T 細胞を分離し、フィルターのパオサイズ 5 μ m のケモタキシンチャンバーの上段に入れ、下段に β 1 インテグリンのリガンドである VCAM-1 を 0, 0.01, 0.1, 1 μ g/ml の 4 段階の濃度を設定し入れた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で 1 時間後にフィルターを染色し細胞数をカウントした。

5. 皮膚における β 1 インテグリンと VCAM-1 の発現

掌蹠膿疱症患者の病巣部および健常成人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 CD4、 β 1 インテグリン抗体を用いた免疫染色を行い、顕微鏡下に β 1 インテグリン陽性細胞数をカウントした。また抗 VCAM-1 抗体を用いた免疫染色も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。また 2 因子の相関は Spearman の順位相関係数を用いた。いずれも $P < 0.05$ を有意とした。

III. 成績

1. 扁桃および末梢血 CD4 陽性 T 細胞における β 1 インテグリンの発現

掌蹠膿疱症群では反復性扁桃炎群と比較して扁桃および末梢血 CD4 陽性 T 細胞における β 1 インテグリンの発現が有意に高かった(中央値:25-75 パーセントイル 扁桃 25.9%: 23.5%-35.9% vs. 21.6%: 17.8%-22.4%; $P < 0.001$ 、末梢血 54.3%: 43.5%-65.1% vs. 45.8%: 37.7%-49.2%; $P < 0.05$)。また扁桃 CD4 陽性 T 細胞における β 1 インテグリンと CLA の発現は掌蹠膿疱症群が反復性扁桃炎群に比較して有意に高かった (32.4%: 31.3%-39.4% vs. 19.7%: 9.2%-29.9%; $P < 0.05$)。

2. α 溶連菌刺激による扁桃 CD4 陽性 T 細胞における β 1 インテグリンの発現

掌蹠膿疱症群では *S. sanguinis*、*S. salivarius* 刺激により β 1 integrin 陽性 CD4 陽性 T 細胞の有意な増加を認めた (*S. sanguinis* : 1.21: 1.17-1.32 vs. 0.98: 0.79-1.17; $P < 0.01$, *S. salivarius* : 1.14: 0.99-1.26 vs. 1.01: 0.88-1.09; $P < 0.05$) が、反復性扁桃炎群ではいずれの α 溶連菌刺激に対しても有意な変化を認めなかった。

3. 扁桃 CD4 陽性 T 細胞の細胞遊走能

掌蹠膿疱症群、反復性扁桃炎群ともに VCAM-1 の濃度依存性に遊走能の亢進を認めたが、VCAM-1 の濃度が 1 μ g/ml において掌蹠膿疱症群が反復性扁桃群に比較し有意に高い遊走能を認めた (1.91:1.54-2.13 vs. 1.31: 1.23-1.46; $P < 0.05$)。

4. 扁桃摘出術前後での末梢血 CD4 陽性 T 細胞における β 1 インテグリンの発現変化

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 CD4 陽性 T 細胞における β 1 インテグリンの発現が有意に低下していた ($P < 0.01$) が、反復性扁桃炎群では有意な低下は認めなかった。また、 β 1 インテグリンの発現減少率は術後の皮疹スコアと有意な相関を認めた ($P < 0.05$, $r = -0.72$)。

5. 皮膚における $\beta 1$ インテグリン陽性 CD4 陽性 T 細胞の浸潤と VCAM-1 の発現

掌蹠膿疱症の病巣皮膚では CD4 陽性 T 細胞の浸潤が多数認められ、その同一視野で $\beta 1$ インテグリン陽性細胞が認められたが、健常皮膚では CD4 陽性 T 細胞および $\beta 1$ インテグリン陽性細胞いずれもほとんど認められなかった。同様に病巣皮膚では VCAM-1 陽性の血管内皮が多数認められたが、健常皮膚ではほとんど認められなかった。

IV. 考案

本研究では、掌蹠膿疱症の扁桃および末梢血 CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現、皮膚局所における $\beta 1$ インテグリン陽性 CD4 陽性 T 細胞の浸潤および血管内皮における VCAM-1 の発現増強を明らかにした。これらの結果は扁桃病巣疾患である本疾患の発症に、CD4 陽性扁桃 T 細胞上の $\beta 1$ インテグリンおよび病巣部位の血管内皮における VCAM-1 が重要な役割を担っていることを示唆するものである。また扁桃摘出術によって末梢血 CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリン発現が減少したことを考慮すると、 $\beta 1$ インテグリンを発現した扁桃 CD4 陽性 T 細胞が体循環を經由して VCAM-1 の発現した皮膚へ浸潤しているものと考えられた。また、 α 溶連菌刺激にて掌蹠膿疱症扁桃の CD4 陽性 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現亢進が認められたことから、掌蹠膿疱症扁桃リンパ球の常在細菌に対する過剰反応が $\beta 1$ インテグリンの発現亢進の根幹にある可能性が示唆された。さらに、扁桃 CD4 陽性 T 細胞の VCAM-1 に対する遊走能の検討では、掌蹠膿疱症群において VCAM-1 に対する高い遊走能が認められ、掌蹠膿疱症の扁桃 CD4 陽性 T 細胞では $\beta 1$ インテグリンの発現が亢進しているだけではなく、VCAM-1 に対する高い反応性を有している可能性も示唆された。皮膚局所への遊走について、過去に我々は、CLA、CCR6 の関与を明らかにしたが(2、3)、CLA、CCR6 はそれぞれ血管内皮におけるローリングと遊出に関わっており、それに $\beta 1$ インテグリンの接着作用が加わることで、本疾患の扁桃 CD4 陽性 T 細胞が皮膚へ浸潤する詳細なメカニズムが明らかとなった。さらに、我々は掌蹠膿疱症扁桃 T 細胞が活性化状態にあることを報告したが(1)、 $\beta 1$ インテグリンの共刺激因子としての作用がこの T 細胞の過剰活性化に関わっている可能性が示唆された。

以上の結果から、掌蹠膿疱症の発症機序として掌蹠膿疱症の扁桃 CD4 陽性 T 細胞では α 溶連菌に対する過剰免疫応答の結果 $\beta 1$ インテグリンの発現が亢進し、それを共刺激因子として更なる活性化をきたし、体循環へ放出され、VCAM-1 を発現した病巣皮膚血管に付着し、病巣内へ浸潤する可能性が示唆された。これにより、 $\beta 1$ インテグリン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であると考えられた。

V. 結論

1. 掌蹠膿疱症群において扁桃および末梢血の $\beta 1$ インテグリン陽性 CD4 陽性 T 細胞は有意に増加していた。
2. 掌蹠膿疱症扁桃単核球への *S. sanguinis*、*S. salivarius* 刺激により、 $\beta 1$ インテグリン陽性 CD4 陽性 T 細胞

の増加を認めた。

3. VCAM-1 への扁桃 CD4 陽性 T 細胞の遊走能は掌蹠膿疱症群において有意に亢進していた。
4. 掌蹠膿疱症患者の末梢血におけるβ1 インテグリン陽性 CD4 陽性 T 細胞は扁桃摘出術後有意に減少した。
5. 掌蹠膿疱症足底皮膚において、β1 インテグリン陽性 CD4 陽性 T 細胞の浸潤と VCAM-1 の発現を認めた。
6. 以上の結果から、掌蹠膿疱症の発症において、β1 インテグリンは扁桃局所での T 細胞の活性化および皮膚局所への浸潤に関与していることが示唆された。




VI. 引用文献

1. Takahara M, Kishibe K, Nozawa H, Harabuchi Y. Increase of activated T cells and up-regulation of Smad7 without elevation of TGF-beta expression in tonsils from patients with pustulosis palmaris et plantaris. Clin Immunol 115:192-9, 2005
2. 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
3. Yoshizaki T, Bandoh N, Ueda S, Nozawa H, Goto T, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y. Up-regulation of CC chemokine receptor 6 on tonsillar T cells and its induction by *in vitro* stimulation with *a-streptococci* in patients with pustulosis palmaris et plantaris. Clin Exp Immunol 157: 71-82, 2009.

VII. 参考文献

1. Yoshizaki T, Bandoh N, Ueda S, Nozawa H, Goto T, Kishibe K, et al. Up-regulation of CC chemokine receptor 6 on tonsillar T cells and its induction by *in vitro* stimulation with *alpha-streptococci* in patients with pustulosis palmaris et plantaris. Clin Exp Immunol 157:71-82, 2009
2. Goto T, Bandoh 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

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	上田 征吾
<p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 三代川 齊之 </p> <p>審査委員 鳥本 悦宏 </p>			
学位論文題目			
Up-regulation of $\beta 1$ integrin on tonsillar T cells and its induction by in vitro stimulation with α -streptococci in patients with pustulosis palmaris et plantaris (掌蹠膿疱症患者の扁桃 T 細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現増加と α 溶連菌刺激によるその誘導)			
<p>掌蹠膿疱症 (以下 PPP) は手掌や足底に限局して膿疱を形成する疾患である。本疾患は、しばしば上気道感染 (特に急性扁桃炎) に伴い悪化し、扁桃的摘出により症状が改善することから、扁桃病変との関連が注目されている。著者らのグループは、PPP 患者の扁桃ではヘルパー T 細胞の活性化が起こっており、その刺激として α 溶連菌感染が重要であることを報告してきた。しかし、PPP における扁桃 T 細胞活性化の詳細なメカニズムについては不明であった。</p> <p>申請者らは、T 細胞活性化における costimulator であり、炎症部位における T 細胞の接着、遊走に関わる $\beta 1$ インテグリンに注目し、PPP 患者と健常者の扁桃から採取したヘルパー T 細胞を検討した。その結果、①患者の扁桃では $\beta 1$ インテグリンを発現する T 細胞が増加すること、②in vitro で α 溶連菌抗原刺激を与えると PPP 患者でのみ $\beta 1$ インテグリン陽性 T 細胞が増加すること、③扁桃摘出後、末梢血中の $\beta 1$ インテグリン陽性 T リンパ球が減少すること、④PPP 患者 T 細胞は $\beta 1$ インテグリンのリガンドの 1 つである VCAM-1 への高い遊走能を示すこと、⑤実際の PPP 患者の足底皮膚において、</p>			

増生した VCAM 陽性血管とともにβ1 インテグリン陽性リンパ球が浸潤していることを明らかにした。

本研究は、PPP における扁桃ヘルパーT 細胞活性化の機序の一部を解明しており、皮膚病変との関連を理解する上で重要な知見を提供している。本研究では新鮮扁桃摘出検体を用いて T 細胞のβ1 インテグリン発現を検討し、扁桃摘出後の臨床経過との相関を明らかにするなど、臨床講座独自の症例を基本とした検討のみならず、*in vitro* での基礎的な解析も加え、より詳細な機序の解析を目指している点が特に評価される。

申請者は研究成果について、最新の関連情報を踏まえ、背景、目的から討論に至る過程を適切に発表していた。その後、申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。また、本研究における課題についても理解し、今後の研究の方向性について考慮した対応ができていた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者が積み重ねた努力の結果であり、当該分野において学術的にも十分に貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。