



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1571号
学位記番号	第1126号
氏名	久保 良二
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>Bath-PUVA therapy improves impaired resting regulatory T cells and increases activated regulatory T cells in psoriasis (PUVA バス療法は乾癬患者において低下した resting の制御性 T 細胞 (rTreg) を改善し、そして活性化制御性 T 細胞 (aTreg) を増加させる)</p> <p>J Dermatol Sci, 86: 46-53, 2017</p>
論文審査担当者	主査： 山崎 小百合 副査： 岡本 尚, 森田 明理

論文内容の要旨

【目的】制御性 T 細胞 (regulatory T cell 以下 Treg) は、1995 年に初めて報告された時点では細胞表面マーカーである CD4 と CD25 の 2 つが、その後 2003 年に核内転写因子である Foxp3 を発現することが発見されている。乾癬患者において、紫外線療法の一つである PUVA バス療法を行うことにより、皮疹の改善とともに末梢血中の Treg が治療前後で有意に上昇することが報告されている。その後、末梢血の Treg の免疫抑制機能が、乾癬患者では健常者と比べて優位に低下していること、PUVA バス療法によりそれが正常レベルまで改善することが報告されている。Treg のマーカーについて、2009 年に別の細胞表面マーカーである CD45RA を用いることによって、これまでの Treg を機能別に 3 つに分けられるようになった。最も抑制能が強い分画は activated Treg (以下 aTreg)、その次に抑制能がある分画は resting Treg (以下 rTreg)、そして抑制能がない分画は non-suppressive T cell (non-Treg) と呼ばれる。我々は乾癬患者の PUVA バス療法前中後の各段階で末梢血中の Treg の 3 つ各分画がどのように推移し臨床と関連しているかどうかを調べた。

【方法】

PUVA バス療法のプロトコールは、濃度 0.0001% に希釈した 37°C の 8-methoxypsoralen 浴を 15 分行った後、UVA を全身に 0.5J/cm² より開始し 0.5J/cm² ずつ増量、途中でびらんや強い疼痛などの副作用がなければ最大 4.0J/cm² まで増量した。PUVA バス療法を受ける尋常性乾癬患者 15 名について治療前中後で末梢血を採取し、末梢血単核球を分離した。マウス抗ヒト CD4/PE、CD25/FITC、CD45RA/Pacific Blue 抗体で細胞表面を染色後、Fixation Permeabilization を行い細胞表面に穴をあけ、次にマウス抗ヒト Foxp3/APC 抗体にて核内を染色。染色した PBMC を Flowcytometry し、リンパ球分画、次いで CD4 陽性細胞で gating し、Foxp3-CD45RA で展開して 3 つの Treg 分画の比率を測定した (aTreg は CD4+CD25+CD45RA-Foxp3^{high}、rTreg は CD4+CD25+CD45RA-Foxp3^{low}、non-Treg は CD4+CD25+CD45RA-Foxp3^{low})。また健常対照者 11 名も同様に末梢血単核球の染色を行い、乾癬患者と比較した。

【結果および考察】

乾癬患者の PUVA バス療法前中後の 3 点での解析では、rTreg 値は治療経過中、治療後で有意に上昇するが、aTreg と aTreg+rTreg では治療経過中のみ有意に上昇していた。PUVA バス療法 5 回毎の解析では、治療前と比較して rTreg では PUVA バス 15 回治療後と 20 回治療後で有意に上昇し、aTreg+rTreg では 15 回治療後で有意に上昇していた。aTreg のみでも 15 回治療後あたりでやや上昇傾向であるも有意差はなかった。non-Treg についてはすべてで有意差を認めなかった。健常対照者との比較では、治療前の乾癬患者では rTreg が有意に低下、治療途中の乾癬患者では aTreg が有意に上昇、そして治療後では再び rTreg が有意に低下していた。乾癬皮疹の程度を示す PASI (Psoriasis Area and Severity Index) スコアと各 Treg サブセットの比較では、治療前の乾癬患者では aTreg と PASI score に正の相関を認めた (相関係数 $r=0.357$)。乾癬患者群を光線療法歴のある群とない群とに分けて比較すると、PUVA バス治療 10 回の時点で後者の方が aTreg、rTreg、aTreg+rTreg のいずれも有意に上昇を認めており、光線療法歴のない患者群の方がある群と比べて PUVA バス療法の感受性が良いという臨床を裏付ける結果であった。

aTreg は主に rTreg から転換されそして早期に消失することが分かっており、このことと本研究の結果から、乾癬患者では病態を悪化させる免疫反応を抑制するために rTreg から aTreg へ積極的に転換されそのために rTreg が枯渇すること、PUVA バス療法が一過性に末梢血中の aTreg を増加させることで皮疹を改善させている可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

乾癬患者において、紫外線療法の一つである PUVA バス療法を行うことにより、皮疹の改善とともに末梢血中の制御性 T 細胞 (regulatory T cell 以下 Treg) が治療前後で有意に上昇することが報告されている。末梢血の Treg の免疫抑制機能が、乾癬患者では健常者と比べて優位に低下していること、PUVA バス療法によりそれが正常レベルまで改善することが報告されている。2009 年に別の細胞表面マーカーである CD45RA を用いることによって、これまでの Treg を機能別に 3 つに分けられるようになった。最も抑制能が強い分画は activated Treg (以下 aTreg)、その次に抑制能がある分画は resting Treg (以下 rTreg)、そして抑制能がない分画は non-suppressive T cell (non-Treg) と呼ばれる。我々は乾癬患者の PUVA バス療法前中後の各段階で末梢血中の Treg の 3 つ各分画について解析した。

【方法】PUVA バス療法を受ける尋常性乾癬患者 15 名について治療前中後で末梢血を採取し、末梢血単核球を分離した。染色した PBMC を Flowcytometry し、リンパ球分画、次いで CD4 陽性細胞で gating し、Foxp3-CD45RA で展開して 3 つの Treg 分画の比率を測定した (aTreg は CD4+CD25+CD45RA-Foxp3^{high}、rTreg は CD4+CD25+CD45RA+Foxp3^{low}、non-Treg は CD4+CD25+CD45RA-Foxp3^{low})。また健常対照者 11 名も同様に末梢血単核球の染色を行い、乾癬患者と比較した。

【結果および考察】rTreg 値は治療経過中、治療後で有意に上昇するが、aTreg と aTreg+rTreg では治療経過中のみ有意に上昇していた。PUVA バス療法 5 回毎の解析では、治療前と比較して rTreg では PUVA バス 15 回治療後と 20 回治療後で有意に上昇し、aTreg+rTreg では 15 回治療後で有意に上昇していた。aTreg のみでも 15 回治療後あたりでやや上昇傾向であるも有意差はなかった。乾癬皮疹の程度を示す PASI (Psoriasis Area and Severity Index) スコアと各 Treg サブセットの比較では、治療前の乾癬患者では aTreg と PASI score に正の相関を認めた (相関係数 $r=0.357$)。乾癬患者群を光線療法歴のある群とない群とに分けて比較すると、PUVA バス治療 10 回の時点で後者の方が aTreg、rTreg、aTreg+rTreg のいずれも有意に上昇を認めており、光線療法歴のない患者群の方がある群と比べて PUVA バス療法の感受性が良いという臨床を裏付ける結果であった。Treg は主に rTreg から転換されそして早期に消失することが分かっており、乾癬患者では病態を悪化させる免疫反応を抑制するために rTreg から aTreg へ積極的に転換されそのために rTreg が枯渇すること、PUVA バス療法が一過性に末梢血中の aTreg を増加させることで皮疹を改善させている可能性が示唆された。

【審査の内容】十数人の聴衆の前で約 20 分間の論文内容のプレゼンテーション後、主査の山崎教授からは、光線における Treg 誘導のメカニズム、Treg の機能を決定する重要な因子として Foxp3 以外の関連因子や、関節症性乾癬、尋常性乾癬など病型による差など、9 項目、第 1 副査の岡本教授からは、乾癬に紫外線療法が行われる歴史や光線療法の対応疾患など、8 項目の質問がなされた。森田教授からは、IL-22 の作用や乾癬性関節炎の病態など 3 項目の質問がなされた。おおむね満足できる回答があり、学位論文の主旨を十分に理解していると考えられた。本研究は、紫外線療法の一つである PUVA バス療法を行うことで、最も抑制能が強い分画は activated Treg (以下 aTreg) が誘導され、その誘導される時期を明らかにしたものであり、今後の臨床での光線療法の発展に有意義な知見であると考えられた。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 山崎小百合 副査 岡本 尚 森田 明理