

論文の内容の要旨

論文題目 Th1, Th2 サイトカイン産生とケモカインレセプター発現からみたアトピー性皮膚炎の病態について

指導教官 玉置邦彦教授

氏名 湧川基史

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD)は主に小児期に発症し、痒みの強い皮疹を慢性的に繰り返す疾患である。この疾患は病態として免疫学的な側面と非免疫学的な側面を併せ持つが、免疫学的病態のなかで Th1/Th2 バランスの不均衡が重要な要素の1つに挙げられている。AD 患者の末梢血, 病変部ともに Th2 が優位であり, これが末梢好酸球増多や IgE 高値に関連していると考えられている一方, Th1 サイトカインが病変の形成に関わっているとの報告もみられる。

ところで, 近年, 炎症の場における選択的または特異的な細胞浸潤に, ケモカインの関与が注目されている。炎症の場における Th1 優位, あるいは Th2 優位の炎症細胞浸潤にケモカインが関与していることが考えられるようになった。Naive T 細胞や resting-memory T 細胞上にはケモカインレセプター CXCR4 が発現し, Th2 細胞には CCR4 が, Th1 には CXCR3 と CCR5 が比較的特異的に発現していることが報告されている。したがって, 末梢血 helper T 細胞上のこれらのレセプターの発現は, Th1, Th2 バランスを反映するだけでなく, 病勢とも関連する可能性が示唆される。

以上のことを踏まえ, 本研究では, AD における Th1, Th2 サイトカイン分泌パターンをより明らかにするために AD 患者 PBMC を分離して AD の主要アレルゲンであるダニ抗原抽出物 (dust mite extract; DME)とともに培養し, 上清中の IFN- γ (Th1 サイトカイン)値と, IL-4, IL-5, IL-13 (Th2 サイトカイン) 値について, 特に IgE との相関について検討を行った。また, 近年 AD に有効であるとされる免疫抑制剤である tacrolimus (FK-506) による Th2 サイトカイン産生制御についても検討を加えた。

さらに, ケモカインレセプターの発現は CCR4, CXCR3 について CD4⁺ T 細胞, CD8⁺ T 細胞において検討し, AD の病態, 重症度や検査値異常を反映しうるか否か, あるいは皮膚におけるリンパ球のホーミングに関連する分子であり皮膚炎症におけるリンパ球遊走の key molecule とされている cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) 発現やリンパ球の

活性化マーカーの1つである CD25 発現と関連するか否かを検討した。さらに、CCR4⁺CD4⁺ T 細胞あるいは CXCR3⁺CD4⁺ T 細胞内における IL-4, IFN- γ の産生, 病変部 CD4⁺ T 細胞における CCR4 発現についても検討を加えた。末梢血 CCR4, CXCR3 についての検討は, Th1 優位と考えられている尋常性乾癬 (Ps) 患者においても施行し, AD における結果と比較した。

実験 1. アトピー性皮膚炎 (AD) 患者の末梢血単核球における Th1, Th2 産生パターンと臨床的相関についての検討

まず, 各サイトカインの経時的産生パターンの相違をみるために, AD 患者と健常人の DME 添加 PBMC を 12 時間, 24 時間, 3 日, 7 日培養し, 上清中の IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ 値を測定したところ, IL-4 は, 培養時間 12, 24 時間でピークとなり, 3 日後, 7 日後で検出量が減少したが, IL-5, IL-13 は 7 日後まで培養時間依存性に増加した。IFN- γ は, 検体によって多少のばらつきがみられたが, 概ね経時的に産生が亢進した。

培養時間を 7 日とし, AD 患者, 健常人の PBMC における IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ 産生量を検討したところ, IL-5, IL-13 は AD 群で DME 無添加群に比べて有意に産生が亢進した。AD 群の IFN- γ 値は症例によるばらつきが大きく, DME 添加では DME 無添加に比べて増加したものと抑制されたものがみられた。IL-4 は添加, 無添加ともに全例で検出されなかった。

AD 群の DME 添加における培養 7 日後の各サイトカイン産生量について相関を検討したところ, IL-5 と IL-13 値との間には正の相関がみられ, IFN- γ と IL-5, IL-13 の産生量との間には負の相関が認められた。

AD 群を Dermatophagoides pteronyssinus 特異 IgE 値 (Dp-IgE 値) が 10 U/ml 未満 (low 群), 10 以上 100 U/ml 未満 (moderate 群), 100 U/ml 以上 (high 群) の 3 群に分け, 培養 7 日後の各群の各サイトカイン値を比較した。IL-5 の検出値は high 群では low 群に比べ約 18 倍, IL-13 値も high 群では low 群に比べ約 15 倍となり, それぞれ両群間に有意差を認めた。IFN- γ は low 群で産生量が多い傾向を示したが, high 群との統計学的有意差は認められなかった。

AD 患者 5 例の DME 添加 PBMC における IL-13, IL-5, IFN- γ 産生に対する dexamethasone, tacrolimus の抑制効果について検討した。Dexamethasone 10^{-8} M, Tacrolimus 10^{-8} M は DME 添加 PBMC の IL-13, IL-5 の産生を有意に抑制した。IFN- γ も dexamethasone 10^{-8} M, tacrolimus 10^{-8} M によって DME 無添加時のレベルまで低下したが, もともと産生量が少ないため,

両薬剤による抑制効果は有意ではなかった。

実験 2. アトピー性皮膚炎 (AD) 患者の末梢血, 組織中 CD4⁺ T 細胞におけるケモカインレセプターの発現

AD 患者, Ps 患者, 健常人において, CD4⁺ あるいは CD8⁺ T 細胞上の CCR4, CXCR3 の発現について比較検討した. AD 患者 CD4⁺ T 細胞における CCR4 発現は, 健常人や Ps 患者に比べ, 有意に高値を示した. CD4⁺ T 細胞における CXCR3 は AD 患者と健常人との間で有意差を認めなかったが, Ps 患者においては健常人に比べて有意に高値を示した. CD8⁺ T 細胞では, AD 患者において健常人や Ps 患者よりも CCR4 陽性率が有意に高く, Ps における CXCR3 陽性率は健常人よりも有意に高かった.

AD 患者末梢血 CD4⁺ あるいは CD8⁺ T 細胞における CCR4, CXCR3 陽性率と AD の重症度の相関について検討した. AD 患者 CD4⁺ T 細胞上の CCR4 陽性率は AD の重症度と正の相関を示した. また, CD8⁺ T 細胞上の CCR4 陽性率も重症度と正の相関を示した. それに対して, CD4⁺ あるいは CD8⁺ T 細胞における CXCR3 陽性率は AD の重症度と相関を認めなかった.

4 人の重症 AD 患者末梢血 CD4⁺ T 細胞上の CCR4, CXCR3 陽性率の治療による時間的変化について検討した. 全症例とも 3 週間の入院にて, ステロイド外用剤を主体とした治療を行い, 著明に症状が改善した症例である. CD4⁺ T 細胞上の CCR4 陽性率は症状の改善とともに全例低下傾向を示した. 4 症例とも治療 3 週間後の CCR4 陽性率は治療前に比べて有意に低かったが, CXCR3 陽性率は治療前後において有意な差はみられなかった.

AD 患者と健常人の CCR4⁺CD4⁺, CXCR3⁺CD4⁺ T 細胞における IL-4, IFN- γ 産生について検討した. 健常人においては, CCR4⁺CD4⁺ T 細胞は IL-4 を産生するが IFN- γ をほとんど産生せず, CXCR3⁺CD4⁺ T 細胞は IL-4 を産生せずに IFN- γ を産生した. このことは, CCR4 が Th2 細胞に比較的選択的に発現し, CXCR3 が Th1 細胞に選択的に発現していることを示している. AD 患者においては, CCR4⁺CD4⁺ T 細胞のほとんどが IL-4 を産生していたが, 一部は IL-4 と IFN- γ の両方を産生していた. このことは, これらの細胞が Th2 または Th0 細胞であることを示唆している. 一方, CXCR3⁺CD4⁺ T 細胞のほとんどが IFN- γ のみを産生していたことから, これらの細胞はほとんどが Th1 細胞であると考えられた. 無刺激の条件下では IL-4 や IFN- γ は検出されなかった.

AD 患者末梢血 CCR4⁺CD4⁺ あるいは CXCR3⁺CD4⁺ T 細胞上の CD25 発現について検討した. CCR4⁺CD4⁺ T 細胞上の CD25 陽性率は CCR4⁺CD4⁺ T 細胞に比べ有意に高かった.

CXCR3⁺CD4⁺ と CXCR3⁻CD4⁺ T 細胞における CD25 陽性率は非常に低く、両者の間には有意差を認めなかった。さらに、AD 患者末梢血 CCR4⁺CD4⁺ あるいは CXCR3⁺CD4⁺ T 細胞上の CLA について発現を検討した。CCR4⁺CD4⁺ T 細胞上の CLA 陽性率は CCR4⁻CD4⁺ T 細胞に比べ有意に高かった。CXCR3⁺CD4⁺ と CXCR3⁻CD4⁺ T 細胞における CLA 陽性率は非常に低く、両者の間には有意差を認めなかった。

AD の急性の紅斑性病変部と慢性苔癬化病変部において CCR4, CXCR3 の発現について免疫組織化学的に検討した。AD の急性病変、慢性病変部とも CCR4 は表皮や真皮血管周囲に浸潤している単核球の大部分に陽性となったが、CXCR3 の陽性率は非常に低かった。同じ病変において他の切片で CD4⁺ 陽性細胞上の CCR4 の陽性率について蛍光免疫染色にて検討した。急性、慢性病変とも 70%以上の CD4⁺ T 細胞において CCR4 が発現していたが、Ps 病変部においては、約 10%の陽性率にとどまった。

まとめ

この2つの実験では、ADの T 細胞におけるサイトカイン産生とケモカインレセプター発現を検討し、ADの病態へのアプローチを試みた。これらの結果からADの病態についてまとめると、抗原刺激によって helper T 細胞が Th2 へとシフトし、IL-4, IL-5, IL-13 といったサイトカインを産生分泌し、IgE 高値や好酸球増多を引き起こしていることが考えられる。末梢血中の Th2 細胞は CCR4 を発現し、さらに活性化のマーカーである CD25 や皮膚のホーミングレセプターである CLA を比較的高率に発現している。AD 病変部では、CLA のリガンドである E-selectin が真皮血管内皮に発現し、CCR4 のリガンドである thymus and activation-regulated chemokine (TARC), macrophage-derived chemokine (MDC) がそれぞれ表皮ケラチノサイトや真皮樹状細胞で産生され、CCR4⁺CD4⁺ T 細胞を皮膚に浸潤させ、皮膚病変の形成に関与していることが示唆される。こうしたことから、Th2 への分化を抑制することは将来的な AD の治療に考慮すべきことと考えられ、さらに CCR4 や CLA などの分子も将来的に AD の治療ターゲットとなる可能性もあると考えている。