

学 位 論 文 題 名

汎発性膿疱性乾癬発症における免疫学的メカニズムの解析

学位論文内容の要旨

汎発性膿疱性乾癬は、発熱、関節痛などの強い全身症状を伴い、全身に無菌性膿疱を多発し、時に致死的となる原因不明の難治性皮膚疾患であり、その発症メカニズムの解析及び有効な治療法の確立が望まれている。発症に先行して、上気道感染症が認められる症例が多いことなどから、発症のメカニズムとして以下のような仮説を立てた。すなわち、遺伝的素因を持つ個体に感染などの刺激が加わり、炎症反応が引き起こされる過程において、リンパ球の活性化、サイトカインの産生、細胞接着分子の発現誘導などが起こり、その結果汎発性膿疱性乾癬に特徴的な臨床症状が発現すると考えた。この仮説を検証するために、以下の実験を行なった。

1) 患者血清サイトカイン濃度の測定

汎発性膿疱性乾癬患者血清中の、各種のサイトカイン濃度をELISA法によって測定した。患者は、active phaseとstable phaseとに分けて解析を行なった。尋常性乾癬患者、アトピー性皮膚炎患者、および健常人血清を対照として用いた。IFN- γ 、IL-1 β は大部分のactive phaseの血清において高値を示したが、stable phaseの患者血清、疾患対照血清においては、健常人血清より高値を示すものは認められなかった。TNF- α の血清濃度もactive phaseにおいて高濃度を示す傾向があったが、コントロールと同様のレベルを示すサンプルも多く認められた。また、IL-6、IL-8はactive phaseの約半数のサンプルにおいて、コントロールサンプルと比較して、著明に高い値を示した。

2) リンパ球増殖反応

汎発性膿疱性乾癬患者および対照健常人から密度勾配遠心法によって単核球

分画 (PBMC) を分離した後、ブドウ球菌由来のスーパー抗原であるSEA, SEB刺激に対する増殖反応を³H-thymidineの取り込みによって検討した。

患者由来PBMCのSEAの刺激によるS.I.は 42.6 ± 20.8 であり、正常人コントロールの 17.8 ± 8.4 と比較すると統計学的に有意な差を持って高い増殖反応性を示した。同様に、SEBに対する増殖反応も、患者由来単核球では 47.4 ± 28.2 であり、正常人コントロールの 15.4 ± 8.1 と比べるとやはり有意に高い値であった。

3) 末梢血単核球, 単核球のサイトカイン産生能

汎発性膿疱性乾癬患者および対照健常人から末梢血単核球を分離後、各種スーパー抗原, LPSの存在下で48時間培養した後、培養上清中のサイトカイン濃度をELISA法によって測定した。

IL-1 β , TNF- α は、患者群でスーパー抗原刺激によって軽度の産生が認められたが、コントロール群と比べて有意な差はなかった。一方IL-8は、いずれの刺激に対しても、コントロール群と比較して、患者群で統計学的に有意に高い産生が認められた。さらに単核球分画を分離し同様の検討を行なった結果では、active phaseの患者の単核球分画で、stable phase, 健常人に比べて有意に高いIL-1 β 産生が認められた。

4) 病変部皮膚組織における細胞接着分子発現の解析

汎発性膿疱性乾癬患者病変部, 対照として尋常性乾癬病変部, および健常人皮膚のICAM-1, ELAM-1の発現を免疫組織化学的に解析した。

ELAM-1は、尋常性乾癬, 汎発性膿疱性乾癬ともに、病変部真皮網状層の血管内皮細胞において強い発現を示し、それらの発現パターンに差はみられなかった。ICAM-1は、尋常性乾癬では、真皮乳頭層毛細血管内皮細胞に発現が認められたのに対して、汎発性膿疱性乾癬病変部においては、真皮中層の深さにまで及ぶ血管の内皮細胞に発現を認め、尋常性乾癬とは明らかに異なる分布を示した。

5) ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子発現調節のCellular ELISA (CELISA)法によるin vitroでの解析

ヒト培養血管内皮細胞（HMVEC細胞）を種々のサイトカインで刺激した後、ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1 の発現を培養プレート上で、CELISA法により測定した。

ELAM-1はIL-1 β , TNF- α によって濃度依存性に発現増強が認められたが、他のサイトカイン刺激では変化は認められなかった。ICAM-1は、IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 刺激によって、それぞれ濃度依存性に発現が増強し、TNF- α が最も強いICAM-1の発現誘導作用を示した。その他のサイトカインでは発現に影響は認められなかった。VCAM-1の発現は、TNF- α によってのみ増強が観察された。

以上の結果から、1) 汎発性膿疱性乾癬患者血清中では、炎症性サイトカインの著しい増加がみられること、2) 患者末梢血単核球は、細菌由来のスーパー抗原に対して高い増殖反応性を示し、3) さらにサイトカイン産生も上昇すること、そして、4) これらの炎症性サイトカインによって皮膚血管内皮細胞の接着分子発現が亢進することが示された。

今回の研究で得られた結果から、汎発性膿疱性乾癬患者における発熱などの全身症状が、上昇した種々の炎症性サイトカインに起因することが推測された。ICAM-1の発現が膿疱性乾癬において、真皮中層の血管内皮細胞にまで強く発現すること、in vitroでのサイトカインによる細胞接着分子発現調節の検討結果から、急性期の患者の生体内においても、サイトカインによって血管内皮細胞の細胞接着分子発現が亢進し、皮膚病変部への好中球浸潤が生じるものと考えられた。これらのサイトカイン上昇をもたらす機序について、患者末梢血単核球が細菌由来スーパー抗原に対して反応性が亢進し、患者PBMCにおけるIL-8産生亢進と、末梢血単核球でのIL-1 β 産生亢進が一連のサイトカインの上昇を惹起し、汎発性膿疱性の病態形成に関与する可能性が示唆された。

以上、冒頭で述べた汎発性膿疱性乾癬の発症に関する仮説、すなわち、上気道感染などにより、Tリンパ球、単球を中心とする細胞性免疫反応が誘発され、その結果産生、放出されるサイトカインの作用により、汎発性膿疱性乾癬に特徴的な全身症状および皮膚症状が形成されるという考えを支持する結果と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大河原 章

副 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

汎発性膿疱性乾癬発症における免疫学的メカニズムの解析

汎発性膿疱性乾癬は、発熱、関節痛などの強い全身症状を伴い、全身に無菌性膿疱を多発する原因不明の皮膚疾患である。発症に先行して、上気道感染症が認められる症例が多いことなどから、発症のメカニズムとして以下のような仮説を立てた。すなわち、遺伝的素因を持つ個体に感染などの刺激が加わり、炎症反応が引き起こされる過程において、リンパ球の活性化、サイトカインの産生、細胞接着分子の発現誘導などが起こり、その結果汎発性膿疱性乾癬に特徴的な臨床症状が発現すると考えた。この仮説を検証するために、以下の実験を行なった。

始めに、汎発性膿疱性乾癬患者血清中の、各種のサイトカイン濃度をELISA法によって測定した。IFN- γ 、IL-1 β は大部分のactive phase（急性期）の血清において高値を示した。TNF- α の血清濃度もactive phaseにおいて高濃度を示す傾向があった。また、IL-6、IL-8はactive phaseの約半数において、健常人と比較して、著明に高い値を示した。

次に、汎発性膿疱性乾癬患者および対照健常人から単核球分画を分離した後、SEA、SEB刺激に対する増殖反応を³H-thymidineの取り込みによって検討した。患者由来末梢血単核球は、SEAの刺激によって、健常人に比べ有意に高い増殖反応性を示した。同様に、SEBに対する増殖反応も、患者由来単核球は有意に高い値を示した。

さらに、患者末梢血単核球、単核球のサイトカイン産生能を検討した。汎発性膿疱性乾癬患者および対照健常人の末梢血単核球を各種スーパー抗原、LPSの存在下で培養後、上清中のサイトカイン濃度をELISA法によって測定した。

IL-8は、対照群と比較して、患者群で統計学的に有意に高い産生が認められた。さらにactive phaseの患者の単球分画で、stable phase（寛解期）、健常人に比べて有意に高いIL-1 β の産生が認められた。

次に、病変部における好中球浸潤の機序を明らかにするため、汎発性膿疱性乾癬患者病変部のICAM-1、ELAM-1の発現を尋常性乾癬病変部を対照として、免疫組織化学的に解析した。ELAM-1は、尋常性乾癬、汎発性膿疱性乾癬とも発現パターンに差はみられなかった。ICAM-1は、尋常性乾癬では、真皮乳頭層毛細血管内皮細胞に発現が認められたのに対して、汎発性膿疱性乾癬病変部においては、真皮中層の深さにまで及ぶ血管の内皮細胞に発現が認められた。

最後に、ヒト培養血管内皮細胞を用いて、接着分子発現のサイトカインによる調節機序をCELISA法によって解析した。ELAM-1はIL-1 β 、TNF- α によって濃度依存性に発現増強が認められ、ICAM-1は、IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 刺激によって、それぞれ濃度依存性に発現誘導作用を示した。VCAM-1の発現は、TNF- α によってのみ増強が観察された。

以上の結果から、急性期のGPP患者では、血清中には高濃度の炎症性サイトカインが存在し、末梢血単核球は、細菌由来のスーパー抗原に対して高い増殖性と、サイトカイン産生能を示し、その炎症性サイトカインによって、病変部皮膚血管内皮細胞の接着分子の発現が亢進していることが示された。これらの一連の免疫学的反応が、汎発性膿疱性乾癬の全身症状および皮膚症状の形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

公開発表に際し、副査の細川教授より、スーパー抗原の病態形成への関与、HLAとの相関、リンパ球と血管の相互作用、鍵となるサイトカイン、治療法について、副査の小野江教授より、特定のV β レセプターを持つTリンパ球の関与、スーパー抗原以外のmitogenの関与の可能性、サイトカインアンタゴニストの関与、HLA近傍の遺伝子の関与について、また免疫科学研究所小笠原助教授より、患者血管内皮細胞の接着分子発現について、最後に主査の大河原教授から、妊娠との関連、レチノイドの単球への作用、炎症の終息のメカニズムについて質問があった。申請者は最新の情報を混え、大概適切な解答をなし得た。

審査員一同は、これら汎発性膿疱性乾癬の免疫学的発症メカニズムに関する先端的研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。