

2017. 10

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人

# 高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第九十号

総務課広報係発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づきその論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第64号	坪井 優子	A dual-needle pumping technique for unblocking an obstructed central venous access port  (CVポート閉塞に対する再開通法としての2本穿刺pumping法の検討)	<b>1</b>
乙総医博第41号	本村 健一郎	A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts <i>in vitro</i>  (ROCK阻害薬 (Y-27632) はヒト満期胎盤由来栄養膜細胞の接着、生存、分化を増強する)	<b>6</b>
乙総医博第42号	志賀 建夫	TNF inhibitors directly target Th17 cells via attenuation of autonomous TNF/TNFR2 signalling in psoriasis  (TNF阻害薬は自律的なTNF/TNF受容体2のシグナルを減弱させることで、乾癬においてTh17細胞を直接の標的とする)	<b>12</b>

氏名(本籍)	坪井 優子 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第64号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成29年7月18日
学位論文題目	A dual-needle pumping technique for unblocking an obstructed central venous access port (CVポート閉塞に対する再開通法としての2本穿刺pumping法の検討)
発表誌名	Interventional Radiology 2 (3) 、2017年

<b>審査委員</b>	主査	教授	小林	道也
	副査	教授	北岡	裕章
	副査	教授	花崎	和弘

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 坪井 優子

## 論文題目

A dual-needle pumping technique for unblocking an obstructed central venous access port  
(CVポート閉塞に対する再開通法としての2本穿刺 pumping 法の検討)

### (論文要旨)

中心静脈アクセスポート (CV ポート) システムは現在、化学療法や高カロリー輸液に際して広く使用されているが、CV ポートの閉塞は、システム管理において重要な問題となる合併症の一つである。CV ポート閉塞に対して、従来は通常の使用時と同様にポートにヒューバー針を1本穿刺して、ヘパリンやウロキナーゼ溶液の圧入を行うことが一般的であったが、再開通率は不十分であった。これは、圧入法ではポートの内圧を高めるだけで、ポートとカテーテル接合部の血栓を溶かすことができず、ポートからカテーテル内腔へ注入圧を伝達することが困難であるためと推測された。血栓やフィブリンシース形成による CV ポートの閉塞症例を再開通させるために、我々は新たに“dual-needle pumping technique” (「2本穿刺 pumping 法」) を考案し、本法の有用性について検討した。

「2本穿刺 pumping 法」の手技は以下の通りである。まず蒸留水またはウロキナーゼ溶液 2.5ml を満たした 3ml シリンジをそれぞれに接続した2本のコアレスニードルを用意する。2本のコアレスニードルをできるだけ近接させてポートに対向的に穿刺し、2つのシリンジ間で pumping を行う。Pumping は、ポート内圧を上げないようにシリンジの一方に軽く陰圧をかけながら、もう一方に軽く陽圧をかけるように繰り返す。ポート内薬液室の血栓が溶解され、血球が破壊されると、シリンジ内は次第に淡血性になる。小さな血栓が吸引された場合には、その血栓がポートとカテーテルの接合部にウェッジしないようにするため、その都度溶液中の血栓を廃棄して、手技を続行する。シリンジ内の薬液が少しずつ減少するようなら、ポート内の血栓が溶解し、カテーテル内に薬液が少しずつ注入されはじめた証拠であるため、徐々にシリンジにかける陽圧を強くしながらポート内圧を高めていく。本法の原理は、2本のコアレスニードル間で pumping することでポート内に渦流を発生させ、ポートの薬液室内を洗浄し、血栓を除去あるいは溶解することで、ポートからカテーテル内腔への圧伝達効率を高め、引き続いてカテーテル内腔の血栓や先端のフィブリンシースを押し出すことである。




薬液の選択においては、蒸留水は CV ポート閉塞の原因が血栓による閉塞と推測される症例に対し、血球破砕作用を期待して使用したが、長期不使用やフィブリンシースによる閉塞症例に対し

では血球破碎作用が期待できないので、最初からウロキナーゼを使用した。

本研究では、2001年から2016年までの間に、血栓閉塞またはフィブリンシースが原因であると考えられたCVポートの閉塞症例25例(システムの破損等は除外)に対して本手技を行った。その結果、22例(88%)で再開通が得られた。そのうち、6例は蒸留水のみで再開通が得られ、2例は蒸留水からウロキナーゼ溶液に変更した後に再開通が得られた。14例は最初からウロキナーゼ溶液を使用して再開通に成功した。不成功の3例では、2本のコアレスニードル間でpumpingは可能であったものの、再開通には至らなかった。本手技を行う際に、肺塞栓や出血、システム破損等の重篤な合併症はみられなかった。

本研究結果から、「2本穿刺pumping法」は高い再開通率が得られ、重篤な合併症もなく、安全で簡便な方法であることが明らかとなった。従来はCVポート閉塞によりシステムを抜去されていた症例でも、本法を行うことで、高率にシステムの再開通が得られた。このため、システム抜去や再挿入による侵襲が軽減されるのみならず、化学療法や高カロリー輸液の中断を回避することが期待できる。本法は血栓やフィブリンシースによるCVポート閉塞の再開通が必要な場面において選択すべき方法と考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名
	坪井 優子
審査委員	主 査 氏 名      小林 道也 
	副 査 氏 名      北岡 裕章 
	副 査 氏 名      花崎 和弘 

題 目      A dual-needle pumping technique for unblocking an obstructed central venous access port  
 (CV ポート閉塞に対する再開通法としての2本穿刺 pumping 法の検討)

著 者      Yuko Tsuboi, Takuji Yamagami, Nobuaki Tsuboi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
 Interventional Radiology (in press)

**要 旨**

**1. 背景と目的**

中心静脈アクセスポート (CV ポート) システムは現在、化学療法や高カロリー輸液に際して広く使用されているが、CV ポートの閉塞は、システム管理において重要な問題となる合併症の一つである。CV ポート閉塞に対して、通常の使用時と同様にポートにヒューバー針を1本穿刺して、ヘパリンやウロキナーゼ溶液の圧入を行うことが一般的であるが、再開通率は不十分であった。これは、圧入法ではポートの内圧を高めるだけで、ポートとカテーテル接合部の血栓を溶かすことができず、ポートからカテーテル内腔へ注入圧を伝達することが困難であるためと推測された。血栓やフィブリンシース形成による CV ポートの閉塞症例を再開通させるために、我々は新たに“dual-needle pumping technique” (「2本穿刺 pumping 法」) を考案し、本法の有用性について検討した。

**2. 方法**

「2本穿刺 pumping 法」の手技は以下の通りである。まず蒸留水またはウロキナーゼ溶液 2.5ml を満たした 3ml シリンジをそれぞれに接続した2本のコアレスニードルを用意する。2本のコアレスニードルをできるだけ近接させてポートに対向的に穿刺し、2つのシリンジ間で pumping を行う。Pumping は、ポート内圧を上げないようにシリンジの一方に軽く陰圧をかけながら、もう一方に軽く陽圧をかけるように繰り返す。ポート内薬液室の血栓が溶解され、血球が破壊されると、シリンジ内は次第に淡血性になる。小さな血栓が吸引された場合には、その血栓がポートとカテーテルの接合部にウェッジしないようにするため、その都度溶液中の血栓を廃棄して、手技を続行する。シリンジ内の薬液が少しずつ減少するようなら、ポート内の血栓が溶解し、カテー

テル内に薬液が少しずつ注入されはじめた証拠であるため、徐々にシリンジにかけける陽圧を強くしながらポート内圧を高めていく。本法の原理は、2本のコアレスニードル間で pumping することでポート内に渦流を発生させ、ポートの薬液室内を洗浄し、血栓を除去あるいは溶解することで、ポートからカテーテル内腔への圧伝達効率を高め、引き続いてカテーテル内腔の血栓や先端のフィブリンシースを押し出すことである。

薬液の選択においては、蒸留水は CV ポート閉塞の原因が血栓による閉塞と推測される症例に対し、血球破碎作用を期待して使用したが、長期不使用やフィブリンシースによる閉塞症例に対しては血球破碎作用が期待できないので、最初からウロキナーゼを使用した。

### 3. 結果と考察

2001年から2016年までの間に、血栓閉塞またはフィブリンシースが原因と考えられた CV ポートの閉塞症例 25 例（システムの破損等は除外）に対して本手技を施行した。その結果、22 例（88%）で再開通が得られた。そのうち、6 例は蒸留水のみで再開通が得られ、2 例は蒸留水からウロキナーゼ溶液に変更した後に再開通が得られた。14 例は最初からウロキナーゼ溶液を使用して再開通に成功した。不成功の 3 例では、2 本のコアレスニードル間で pumping は可能であったものの、再開通には至らなかった。本手技を行う際に、肺塞栓や出血、システム破損等の重篤な合併症はみられなかった。

本研究結果から、「2本穿刺 pumping 法」は高い再開通率が得られ、重篤な合併症もなく、安全で簡便な方法であることが明らかとなった。従来は CV ポート閉塞によりシステムを抜去されていた症例でも、本法を行うことで、高率にシステムの再開通が得られた。このため、システム抜去や再挿入による侵襲が軽減されるのみならず、化学療法や高カロリー輸液の中断を回避することが期待できる。本法は血栓やフィブリンシースによる CV ポート閉塞の再開通が必要な場面において選択すべき方法と考えられた。

以上のように本論文は、癌化学療法や高カロリー輸液などで近年増加している CV ポートが閉塞した際に「2本穿刺 pumping 法」という簡便、安価かつ確実な再開通方法を考案し、その有用性を示した点が日常診療に直結する貴重な研究である。よって、審査員一同は、本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値のあるものと判断した。

氏名(本籍)	本村 健一郎 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第41号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成29年9月5日
学位論文題目	A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts <i>in vitro</i> (ROCK阻害薬(Y-27632)はヒト満期胎盤由来栄養膜細胞の接着、生存、分化を增強する)
発表誌名	PLOS ONE 12 (5) e0177994平成29年5月19日

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	村上	一郎
	副査	教授	前田	長正

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨



# 学位論文要旨

氏名 本村 健一郎

## 論文題目

A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts *in vitro*  
(ROCK 阻害薬 (Y-27632) はヒト満期胎盤由来栄養膜細胞の接着、生存、分化を増強する)

(論文要旨)

### 緒言

合胞体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast : STB) は細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast : CTB) が融合することによって形成される胎児由来の細胞で、胎盤固有の機能を司る。STB の機能不全は様々な疾患に関与するため、これらの疾患の解析のためにヒト STB を用いた研究が重要である。

STB の *in vitro* 培養モデルとして、ヒト胎盤由来の初代培養による実験モデルが報告されている。この方法は生理的な条件に近いといえるが安定的な培養が困難であり、有効なツールであるにも関わらずあまり活用されていないのが現状であった。

Rho pathway は様々な細胞動態に関与する。培養困難なヒト由来の細胞 (ES 細胞や角膜内皮細胞) は Rho pathway の下流蛋白である Rho-associated coiled-coil containing kinase (ROCK) の活性化がその原因と言われており、ROCK 阻害薬 (Y-27632) を使用することで培養効率が改善したと報告されている。細胞動態は CTB が STB に分化していく上でも重要な要素であることから、我々は Y-27632 が pCTB の培養効率も改善すると仮説を立て、本研究においてその検証を行った。

### 方法

満期胎盤から CTB を分離し、比重遠心法、anti HLA-ABC 抗体を用いたマグネティックビーズ法で純化した (primary CTB : pCTB、純度約 98%)。pCTB を FCS(10%)、Epidermal Growth Factor (EGF 10 ng/ml) 存在下で培養し、Y-27632 の細胞接着、生存活性、増殖、分化への影響を評価した。

### 結果・考察

はじめに Y-27632 の pCTB の細胞培養プレートへの接着と細胞活性への影響を評価した。Y-27632 は培養後 24 時間で pCTB の細胞培養プレートへの接着を高めた。ま

た、96時間でミトコンドリア活性（生存率）を上昇させた。接着細胞数とミトコンドリア活性の評価系は細胞増殖によって影響を受けるためY-27632がpCTBの細胞増殖に影響を与えているかを評価したところ、影響を与えておらずpCTBの増殖能は低かった。このことから、Y-27632は細胞増殖を介さずpCTBの細胞培養プレートへの接着とミトコンドリア活性を増強することが明らかとなった。




次に、Y-27632がpCTBのSTBへの分化にあたえる影響を、細胞融合とホルモン産生（ヒト絨毛ゴナドトロピン $\beta$  subunit:hCG- $\beta$ 産生）で評価した。Y-27632はpCTBの細胞融合率を高め細胞融合に関与する遺伝子群（GCM-1、Syncytin1、Syncytin2）の発現を増強すること、またhCG- $\beta$ 産生を増強することが明らかとなった。これはY-27632がpCTBの分化を促進していることを示している。

最後に、Y-27632がどのような経路によってpCTBの分化を促進しているかを明らかにするため、Rho pathwayの下流蛋白の一つであるRac1の阻害薬であるNSC-23766と、CTBの分化に重要であることが報告されているProtein Kinase A(PKA)の阻害薬であるH-89を用いた検討を行った。NSC-23766はY-27632で増強された細胞融合、融合に関与する蛋白の遺伝子発現とhCG- $\beta$ 産生を抑制し、H-89はY-27632で増強された細胞融合と融合に関与する蛋白の遺伝子発現を抑制した。以上から、Y-27632はPKAとRac1を介した経路により、分化を誘導している可能性が示唆された。

#### 結論

Y-27632によって、pCTBの接着、細胞活性、分化が増強され、安定的な培養が可能となった。また、Rho pathwayがCTBからSTBへの分化に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	本村 健一郎
審査委員	主査氏名	宇高 恵子 
	副査氏名	村上 一郎 
	副査氏名	前田 長正 

**題 目** A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts in vitro  
(ROCK阻害薬 (Y-27632) はヒト満期胎盤由来栄養膜細胞の接着、生存、分化を増強する)

**著 者** Kenichiro Motomura, Naoko Okada, Hideaki Morita, Mariko Hara, Masato Tamari, Keisuke Orimo, Go Matsuda, Ken-Ichi Imadome, Akio Matsuda, Takeshi Nagamatsu, Mikiya Fujieda, Haruhiko Sago, Hirohisa Saito, Kenji Matsumoto

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月**  
PLOS ONE 12(5) e0177994  
平成29年5月19日

**要 旨**

本村健一郎さんの学位審査は、平成29年8月7日18時より、約1時間にわたり行った。まず、公開で研究内容の発表を行った。

**【背景と目的】**

胎盤の trophoblast の研究は、細胞株が乏しく、これまで syncytiotrophoblast (STB) の研究に使われてきた BeWo は、胎盤の trophoblast のように合胞体を形成せず、遺伝子発現も cytotrophoblast (CTB) とは異なる。また、胎盤機能不全症等、個人の STB を解析する必要がある研究は困難である。そこで、胎盤から CTB を初代培養し、それらが自然に STB へと分化し、合胞体を形成して human chorionic gonadotropin-β (hCG-β) など、STB に特徴的なタンパク質を発現するのを利用する研究方法が考えられたが、実際には、CTB は培養をしてもプレートに接着しがたく、細胞死に陥り、増殖能が乏しい。

そこで申請者らは、ヒトの胚性幹細胞(hESC)や角膜の血管内皮細胞(hCEC)の培養におい

て、Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK)の inhibitor である Y-27632 を添加すると、細胞の接着性を高めて細胞死を低下させるという報告にヒントを得て、CTB の初代培養系においても同様の効果があるか、調べた。

#### 【方法と結果・考察】

帝王切開の満期正常胎盤を細分し、タンパク分解酵素処理と Percoll 密度勾配法により CTB 細胞を単離した。そして、epidermal growth factor (EGF)を添加した 10%FCS IMDM 中で培養し、Y-27632 等を添加して細胞の生育を比較した。SBT への分化は、形態学的観察の他、RT-PCR 法により、hCG- $\beta$ をはじめとする SBT に特徴的な 4 つのタンパク質の mRNA の発現が増加していることと、extravillous CTB に分化した細胞に特徴的な HLA-G の mRNA の発現がないことを指標にして評価した。

その結果、Y-27632 を添加することにより、CTB のプレートへの接着性が増し、細胞死を免れて生育する細胞数が著明に増加した。これら生細胞の数と代謝活性を反映するミトコンドリアの活性を、WST-8 アッセイにより測定すると、有意差をもって Y-27632 の濃度依存性に活性が上昇した。この細胞数の増加は、CTB の増殖能が高まったからではなく、自発的な細胞死が抑えられた結果であった。

また、CTB の培養を EGF 存在下で続けると、自発的に STB 様の合胞体を形成した。個々の細胞間の接着面を示す抗 phalloidin 蛍光抗体で染色し、細胞の外周を可視化すると、ひと続きの細胞膜により閉じられた細胞内に数十の核を含む合胞体が形成されていた。これら合胞体の形成も、Y-27632 の添加により促進された。ROCK inhibitor を加えて培養した細胞では、GCM1, Syncytin 1, 2, および hCG- $\beta$ の転写が数倍高まっており、STB への分化が示唆された。同様の観察は、異なるヒトから得られた胎盤組織の初代培養においても再現性があり、今後、遺伝背景の異なる個人間の比較研究に使える培養法であることが明らかとなった。

次に、ROCK inhibitor が CTB から STB への分化を促進するメカニズムとして、ROCK と相互に抑制関係にある Rac1 が活性化されて PKA と会合し、Erk1/2 をリン酸化することが考えられたため、Rac1 inhibitor である NSC-23766 を加えて、Y-27632 に誘導される CTB から STB への分化誘導に対する効果を調べた。その結果、NSC-23766 単独でも、いくらか CTB から STB への分化誘導を抑える効果が観察され、Y-27632 を添加することにより、大幅に促進された STB への分化も、著明に抑制した。従って、ROCK inhibitor による CTB から STB への分化誘導の大半は、Rac1 を介した Erk1/2 の活性化によるものであることが明らかとなった。一方、PKA の inhibitor である H-89 は、単独で CTB の生育をやや促進するが、合胞体形成は有意に抑え、Y-27632 に誘導される合胞体形成にも抑制的に働いた。CTB から STB への分化に伴う遺伝子の発現誘導においても、H-89 は GCM1 と Syncytin1 の発現誘導を有意に抑制した。最後に、HLA-G の発現誘導に伴う CTB から extravillous CTB への分化に対する影響を NSC-23766 あるいは H-89 を加えて調べたところ

ろ、変化はなく、RAC1 および PKA の関与はないことが示唆された。

以上のことから、CTB の接着性と生育、および CTB から STB への分化が ROCK inhibitor により促進されること、それが、主に Rac1 および PKA を介したものであることが明らかとなった。

#### 【審査報告】

審査員からは、一般に細胞の増殖と分化は、同期はしないが連動して起こり、ES においても凝集体として培養すると増殖し、細胞をばらばらにほぐすと分化が誘導される例があり、今回 ROCK inhibitor で増殖に影響がみられなかったのは意外であった、また、将来疾患との関連を考えると、満期胎盤より、早期胎盤の機能解析に向けた取り組みの方が、意義が大きいのではないか、と議論があった。

また、胎盤という虚血環境にある細胞の増殖・分化の制御は興味深い課題であり、低酸素状態で TB の子宮筋への浸潤能が上がるという報告もある。Trophoblasts の培養系が樹立されれば、将来、虚血に対する耐性や酸素濃度の変化に対する応答機序を明らかにでき、有意義であると、コメントがあった。

聴衆からも、将来、疾患との関連で胎盤細胞の機能解析が可能になれば画期的であり、ROCK inhibitor は眼科領域で治療薬として使われていることから、産科領域でも有益な使い方が示唆されれば、実用化への道は拓けやすいと、コメントがあった。

臨床医である申請者が、細胞培養法の開拓から取り組む本研究は、研究への真摯な姿勢を表すものであり、今回打開できた培養法を用いて、今後、胎盤の免疫機能を中心に、さらなる研究を進める予定である。

以上の審査をふまえ、審査員一同、申請者の研究は、高知大学博士 (医学) の学位を授与するにふさわしい内容であると判断した。

氏名(本籍)	志賀 建夫 (山口県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第42号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成29年9月5日
学位論文題目	TNF inhibitors directly target Th17 cells via attenuation of autonomous TNF/TNFR2 signalling in psoriasis (TNF阻害薬は自律的なTNF/TNF受容体2のシグナルを減弱させることで、乾癬においてTh17細胞を直接の標的とする)
発表誌名	Journal of Dermatological Science, 77(1)、79~812014年11月26日

審査委員	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	福島	敦樹
	副査	教授	寺田	典生

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 志賀建夫

## 論文題目

TNF inhibitors directly target Th17 cells via attenuation of autonomous TNF/TNFR2 signalling in psoriasis

(TNF 阻害薬は自律的な TNF/TNF 受容体 2 のシグナルを減弱させることで、乾癬において Th17 細胞を直接の標的とする)

### (論文要旨)

乾癬は慢性の炎症性疾患であり、表皮細胞の分化異常と過剰増殖、真皮への炎症細胞浸潤を特徴とする。近年、乾癬の病態において IL-23/Th17 軸が中心的な役割を果たしていることが報告されている。IL-23 は Th17 細胞の分化と増殖に寄与しており、抗 IL-23 抗体、抗 IL-17 抗体、抗 IL-17 受容体抗体のいずれもが乾癬に奏効する。またそれらのシグナルの上流には TNF- $\alpha$  が存在しており、TNF 阻害薬は Th17 が関連する炎症性疾患（関節リウマチ、炎症性腸疾患など）に幅広く利用されている。

これまで乾癬において TNF 阻害薬は主に樹状細胞に作用することが示されてきた。それは TNF- $\alpha$  と誘導型一酸化窒素合成酵素を産生する樹状細胞（TNF- $\alpha$ 、inducible NOS 産生樹状細胞；Tip-DC）で、自身の TNF 産生により IL-23 の産生を促進する。この細胞に TNF 阻害薬が働くことで IL-23 の産生が抑制され、Th17 細胞の働きも抑えられると考えられている。しかしながら TNF 阻害薬が乾癬の病変部に多数浸潤している T 細胞にも作用しうるかは、はっきりしていなかった。

本研究では健常人および乾癬患者から末梢血を採取し、T 細胞（CD3 陽性細胞）のみを分離し用いた。分離した T 細胞に Th17 誘導サイトカイン（IL-1 $\beta$ 、IL-23 および CD3/CD28 刺激）を添加し 3 日間培養すると、IL-17A のみならず TNF- $\alpha$  も同時に産生する細胞が増殖した。また ELISA 法により培養上清中の IL-17A、TNF- $\alpha$  を検出した。

次に T 細胞が産生する TNF- $\alpha$  が T 細胞自身に作用しうるかを確認するため、TNF 受容体（TNFR）の発現についてフローサイトメトリー法で検討を行った。結果、Th17 誘導条件下で誘導される IL-17A 産生細胞の多くが TNFR2 を発現していることを確認した。

これらの結果をもとに Th17 誘導条件下の T 細胞に TNF 阻害薬が作用しうるか検討した。Th17 誘導条件下で培養した T 細胞では IL-17A の遺伝子発現が増強するが、そこに TNF 阻害薬であるエタネルセプトを添加すると IL-17A の遺伝子発現が低下した。一方、Th1 に関連する IFN- $\gamma$  の遺伝子発現については Th17 誘導条件および TNF 阻害薬添加条件のいずれにおいても有意な変動はみられなかった。フローサイトメトリー法による検討でもエタネルセプトが T 細胞からの IL-17A 産生を阻害することが示された。ELISA 法による培養上清中サイトカイン濃度の検討でも同様の結果が得られた。




次に乾癬患者の末梢血 T 細胞でも TNF のシグナルを阻害することで IL-17A の産生が抑制されるか、TNF 阻害薬（エタネルセプト、アダリムマブ）および抗 TNFR2 抗体を用いて検討した。その結果、3 剤とも IL-17A の産生を阻害することが確認できた。特に抗 TNFR2 抗体が IL-17A の産生を抑制したこ

とは、T細胞が自身で産生した TNF により自律的に IL-17A の産生を促進していることを示唆するものと考えられる。また健常人末梢血からナイーブ CD4 陽性 T 細胞を分離して Th17 誘導した条件では抗 TNFR2 抗体は IL-17A 産生を抑制し得なかった。はっきりしたメカニズムは不明だが、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞から分化誘導された Th17 細胞とメモリー CD4 陽性 T 細胞から分化誘導された Th17 細胞において、IL-17 産生における TNF シグナルの必要性に差異があった可能性がある。

以上、今回われわれが T 細胞のみを分離して行った研究の結果から、TNF 阻害薬は T 細胞にも直接作用し、自律的な TNF- $\alpha$ /TNFR シグナルを抑制することで IL-17A シグナルを阻害するものと考えられた。



論文審査の結果の要旨

		氏名	志賀 建夫
審査委員	主査氏名	宇高 恵子	
	副査氏名	福島 敦樹	
	副査氏名	寺田 典生	

題目 TNF inhibitors directly target Th17 cells via attenuation of autonomous TNF/TNFR2 signalling in psoriasis

(TNF阻害薬は自律的なTNF/TNF受容体2のシグナルを減弱させることで、乾癬においてTh17細胞を直接の標的とする)

著者

Takeo Shiga, Kenji Sato, Sayo Kataoka, Shigetoshi Sano

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
 Journal of Dermatological Science, 77(1)、79~81  
 2014年11月26日

要旨

志賀建夫さんの学位審査は、平成29年8月2日18時30分より約1時間にわたり行った。まず、公開で研究内容の発表を行った。

【背景と目的】

乾癬は、関節リウマチ (RA) と共に、IL-23/IL-17 基軸に傾いた過剰な免疫反応が病態形成に関わる。現在、TNF- $\alpha$ 阻害薬が乾癬の治療に使われているが、その作用機序として、炎症性の myeloid dendritic cells (DCs) において、TNFR を介したシグナル受容に続いて起こる、IL-23 の産生を抑制するのが、主たる作用であると考えられている。しかし、TNFR の中でも、TNFR2 は T 細胞を含むリンパ系の細胞に特化して発現され、NF- $\kappa$ B を介した生存シグナルの伝達に働くなど、DC をはじめとする様々な細胞種に発現される TNFR1 とは違いが示唆されたおり、TNF- $\alpha$ 阻害薬が直接 T 細胞に作用する可能性が示唆される。さらに、RA において、抗 TNF- $\alpha$ 療法が奏効した例においては、循環血液中の Th17 細胞の減少

や血清中の IL-17 量の低下がみられることから、抗 TNF- $\alpha$ 阻害薬が、直接 T 細胞、特に、乾癬病変局所に浸潤した T 細胞に作用する可能性も考えられ、T 細胞に対する直接効果のあるなしを調べることは、治療を考える上でも有意義である。

そこで、申請者らは、健常人および乾癬患者の末梢血 CD4 T 細胞を単離し、Th17 誘導性サイトカイン環境にさらして *in vitro* で機能分化を促す実験系に、TNF- $\alpha$ 阻害薬を添加して、影響を調べた。

#### 【方法と結果・考察】

磁気ビーズを用いて健常人または乾癬の患者の末梢血 CD4 T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を吸着させたビーズを加えて抗原刺激を行い、IL-1 $\beta$ と IL-23 を添加した培養液中で3日間、Th17 への分化誘導を行った。その結果、培養翌日にピークを示す TNF- $\alpha$ の産生と、翌日から3日目にかけて漸増する IL-17A の産生がみられた。フローサイトメーターを用いた解析においても、TNF- $\alpha$ と IL-17A の両方を産生する T 細胞の増加が、健常人においても乾癬患者においても観察された。この *in vitro* 誘導培養系に TNF- $\alpha$ 阻害薬として etanercept (ETN)、adalimumab (ADA)、あるいは抗 TNFR2 抗体を加えて Th17 への分化誘導に対する影響を調べた。

その結果、乾癬患者の CD4 T 細胞における IL-17A 産生誘導が、ETN により有意に抑えられた。健常人の CD4 T 細胞の Th17 誘導系においては、ETN の抑制があまり明らかでなかったが、その理由については、それ以上追及しなかった。モノクローナル抗体製剤である ADA、および実験用の抗 TNFR2 抗体も、乾癬患者の CD4 T 細胞が Th17 へ分化誘導されるのを抑制した。

これらの結果から、乾癬に対する TNF- $\alpha$ 阻害薬の作用機序として従来考えられていた、樹状細胞等による抗原提示および T 細胞の機能分化の誘導に対する効果のみならず、CD4 T 細胞に直接作用して、Th17 への機能分化を抑制することが明らかとなった。そして、この効果は、リンパ系の細胞が発現する TNFR2 を介した反応であることが示唆された。

#### 【審査報告】

審査員からは、今回調べた TNF- $\alpha$ 阻害薬のうち、adalimumab はすでに乾癬の治療薬として臨床で使われており、治療をする上で、この研究がどういうインパクトを有するのか、また、ETN は日本では乾癬に対して適応がないが、調べた理由は何か、という質問があった。さらに、乾癬の異なる病型に対する TNF- $\alpha$ 阻害薬の効果について、樹状細胞への作用と T 細胞への作用を分けて考えることに意義がある可能性はないか、などの質疑があった。これらに対し、申請者の志賀さんは、乾癬治療の現場での実状を踏まえて議論をした。

さらに、TNF- $\alpha$ 阻害薬の副作用として問題になる易感染性について、阻害薬間での違いはないか、また、IL-17 を直接標的とする抗体製剤が最近認可されたが、IL-17 は好中球も発現するため、好中球減少も問題となる、という議論が持ちかけられた。申請者は、確かに減

少がみられるものの、個々の患者でも反応が異なり、一定の対策は難しいと説明した。

審査員からは、免疫組織染色における樹状細胞の染色パターン等に関する質問や、Th17誘導に使ったサイトカインを加えていない、抗原刺激のみのT細胞の反応(TNFR2の発現誘導など)について質問があった。これらの質問に対しても、志賀さんは、実験時の状況を説明して議論することができた。また、TNF- $\alpha$ 阻害薬によって、可溶性TNF- $\alpha$ に対する作用と、膜会合性TNF- $\alpha$ に対する作用の違いがあるが、健常人と乾癬患者における反応性の違いなど、今回の結果の考察に、それらを考慮する必要はないか、という議論も出た。これについても、申請者は、適切に応答することができた。

以上をふまえ、審査員一同、申請者の研究は、高知大学博士(医学)の学位を授与するにふさわしい内容であると判断した。