



## Regulation of peripheral blood mononuclear cell responses to *Dermatophagoides farinae* by substance P in patients with atopic dermatitis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横手, 隆一 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1560">http://hdl.handle.net/10271/1560</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 283号	学位授与年月日	平成10年 9月 4日
氏名	横手 隆一		
論文題目	Regulation of peripheral blood mononuclear cell responses to <i>Dermatophagoides farinae</i> by substance P in patients with atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎患者末梢血単核球のコナヒョウヒダニへの反応のサブスタンスPによる制御)		

博士(医学) 横手 隆一

## 論文題目

Regulation of peripheral blood mononuclear cell responses to *Dermatophagoides farinae* by substance P in patients with atopic dermatitis

(アトピー性皮膚炎患者末梢血単核球のコナヒョウヒダニへの反応のサブスタンスPによる制御)

## 論文内容の要旨

〔はじめに〕

アトピー性皮膚炎(AD)では、ダニ抗原が主要な環境抗原と考えられている。ダニを含むこれら抗原により誘導された皮膚炎症状はストレスにより影響を受けることが知られている。従って、ストレスに関連した神経ペプチドはADの皮疹形成に重要な役割を果たしていると考えられている。代表的な神経ペプチドであるsubstance P (SP)は免疫制御能を有し、サイトカインや免疫グロブリン産生に対し様々な影響を与えることが明らかになっている。

この報告では、AD患者末梢血単核球(PBMC)のダニ抗原に対する反応性を調べ、更にSPの影響を検討することにより、ストレスのAD皮疹形成への関与を検討した。

〔方法と結果〕

1. 対象：AD患者25例(年齢、16-39歳;平均26歳)、非AD湿疹(ED)患者5例(年齢、38-53歳;平均42歳)、健常人13例(年齢、26-39歳;平均30歳)であった。
2. 統計学的処理：Student's *t*-test または Wilcoxon's signed-ranks test により、危険率0.05未満を有意差ありと判定した。
3. 増殖試験：濃度勾配法により分離したPBMCをコナヒョウヒダニ抗原 (*Der f*, 10  $\mu$ g/ml) とともに72時間培養し、細胞増殖をstimulation index (SI) で算出した。AD患者のSI (平均 $\pm$ SD) は、2.6  $\pm$  1.3でED患者や健常人に比べ有意に高かった。増殖反応はCD4<sup>+</sup>細胞依存性で、また、CD80及びCD86によるcostimulationが必要であった。すなわち、*Der f*による増殖反応はB7/CD28を介したCD4<sup>+</sup>細胞の反応であることがわかった。

限界希釈法に基づきPBMC10<sup>6</sup>個中の*Der f*反応細胞数を算出したところ、AD患者の平均 $\pm$ SDは24.32 $\pm$ 27.29 /10<sup>6</sup>個で、健常人(1.74 $\pm$ 2.72/10<sup>6</sup>個)と比べて有意に高かった。

神経ペプチドの影響を調べるために、*Der f*とともにSP (10<sup>-10</sup>~10<sup>-8</sup>M)を加えたところ、増殖反応の増強を認めた。また反応増強はSP C末ペプチド(4-11)で見られたが、SPN末ペプチド(1-7)では見られず、C末端側に活性部位があることがわかった。*Der f*、SP添加系に更にSPのantagonistであるスパンタイトを加えると、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>Mで増殖反応は抑制されたが、10<sup>-10</sup>Mでは抑制されず、SP受容体を介した特異反応であることがわかった。

4. RT-PCRによるサイトカインmRNA発現：Takara RNA PCR kitを用いてPBMCのIL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IFN- $\gamma$ および $\beta$ -actinのmRNA発現を6時間培養したのち解析した。半定量化したバンドの濃度のNIHImageによる測定では、*Der f*刺激ではIL-2発現を増強させ、IL-5、発現を誘導した。SPを加えると、IL-10発現を増強しIL-5発現を抑制した。

## 〔考按〕

患者PBMC中には有意に多くの*Der f* 反応細胞があり、これはCD28/B7を介したCD4<sup>+</sup>細胞の反応であることがわかった。また、*Der f* 刺激ではIL-2とIL-5のmRNA発現を増強したが、IL-4、IL-10やIFN- $\gamma$ に変化を与えなかった。SPは*Der f* 刺激による増殖反応を増強し、IL-10のmRNA発現を増強したがIL-5には抑制的に作用した。*Der f* 刺激ではTh1、Th2両タイプのサイトカイン増強を見たが、これはADにおいては両者の反応が生じている可能性を示唆している。IL-10はT細胞、B細胞や単球など様々な細胞から産生されることが知られており、IL-10産生はSPがこれら非特異的な細胞に働いた結果と考えられた。また、IL-10はCD28/B7を介したT細胞のIL-5産生を抑制することが報告されており、今回の結果も一致する。

AD皮膚部ではSPやSP含有神経終末の増加が見られることと併せると、SPはダニ抗原刺激によるサイトカイン産生に影響を及ぼし、皮膚の臨床症状を修飾していることが推察される。

## 論文審査の結果の要旨

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis : AD) は主要な惹起抗原の1つであるダニ抗原によって誘発される皮膚炎症である。申請者は、その症状の程度や経過が精神的ならびに身体的ストレスによって影響されることに着目し、代表的なストレス関連神経ペプチドの1つである substance P (SP) がAD患者の末梢血リンパ球の抗原特異的反応に対してどのような影響を与えるかを検索することにより、ADの皮膚形成に対するSPの影響の有無を解明しようとした。

審査委員会において審査された結果、次の点が評価された。

## 1. 本研究で用いられた材料および方法について

研究対象として正常人13名、AD患者25例、および非AD患者5例を用い、それぞれの末梢血から単核細胞分画 (PBMC) を濃度勾配法により分離し、コナヒョウヒダニ抗原 (*Der f*, 10  $\mu$ g/ml) を添加し37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培養条件下で72時間培養し、stimulation index (SI) を算出し細胞増殖反応活性を測定した。それに対する神経ペプチドSPの効果は、C末端ペプチド (4~11) 或いはN末端ペプチド (1~7) をそれぞれ添加し、SIを算出して検索した。SP特異性はSP拮抗性であるスパンタイトの添加効果により証明した。また、*Der f* 反応細胞数は限界希釈法で算出した。PBMCのサイトカインmRNA発現はTakara RNA-RT-PCRキットにより解析し、その濃度はNIH Image法により半定量的に測定した。

以上の方法は精度及び再現性において問題はなく、本研究目的を解明する上で適切であると評価された。

2. AD患者のPBMCの*Der f* 抗原反応活性、および反応細胞数は非AD患者の値と比べ有意に高値を示した。なお、この反応はCD4<sup>+</sup>細胞に依存性であり、CD80、CD86のcostimulationを必要とした。

以上の所見から申請者は、*Der f* に対する増殖反応はB7/CD28を介したCD4<sup>+</sup>細胞の反応によるものであると主張した。この見解は、AD患者PBMC中に*Der f* 反応CD4<sup>+</sup>T細胞が存在し、B7/CD28介在性に反応することを明らかにしたのものとして高く評価された。

3. 次に、AD患者のPBMCの増殖反応はSPのC末端ペプチドの添加により増強されたことから、C末端側に活性部位が存在することを明らかにした。また、*Der f* 刺激によりIL-2とIL-5のmRNAの発現が誘導され、一方SP添加によりIL-5発現は反対に抑制されることを見いだした。

これらの所見から申請者は、AD患者においては、*Der f* 刺激によりT細胞のTh 1とTh 2がともに反応し両タイプのサイトカイン産生が増強され、その際、SPは抗原非特異細胞にも作用してIL-10産生を促しT細胞のIL-5産生を抑制することによりAD皮膚の症状を修飾するものと推論している。

審査委員会においては、本研究はストレスに関する代表的な神経ペプチドであるSPが局所の免疫系細胞に作用し、各種の免疫系サイトカイン産生に影響を与えることによりADの臨床症状を修飾することを明らかにしたものであるとして、高く評価された。

審査の過程において、申請者に対し次のような質問がなされた。

- 1) ダニ抗原として*Der f* を用いた理由
- 2) *in vitro*細胞増殖反応において、ヒトAB型血清ではなく自家血清を用いた理由
- 3) 末梢血単核細胞分画の細胞組成、とくに単球やNK細胞などの混在率について
- 4) B7-1 (抗CD80)、B7-2 (抗CD86) 抗体の免疫グロブリンクラスは何か、また抗原提示細胞がADCCの機構で傷害される可能性はないか
- 5) *Der f* 抗原による初回感作と遷延感作において、ともにB7-1、B7-2によるcostimulationが必要か
- 6) 添加したSP ( $10^{-10}$ ~ $10^{-8}$ M) の濃度はどのようにして決定したか
- 7) SPのIL-10mRNA増強作用とIL-5 mRNA抑制作用がADの症状をどのように修飾するのか
- 8) SPが主に作用するT細胞亜群は何か、また、局所の好酸球に作用する可能性はないか
- 9) AD患者皮膚におけるSP値を測定したか
- 10) スパンタイトの構造と作用機序、および治療剤となる可能性について

以上の質問に対する申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭  
副査 教授 小出 幸夫 副査 助教授 峯田 周幸