

氏名（本籍）	藤 澤 智 美（岐阜県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	乙第 1463 号
学位授与日付	平成 25 年 2 月 20 日
学位授与要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Adsorptive Depletion of CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> Proinflammatory Monocyte Phenotype in Patients with Generalized Pustular Psoriasis: Clinical Efficacy and Effects on Cytokines
審 査 委 員	（主査）教授 近 藤 直 実 （副査）教授 前 川 洋 一      教授 竹 内 保

### 論文内容の要旨

膿疱性乾癬(GPP)は好中球性皮膚症の一つで、急激な発熱・全身倦怠感・関節痛とともに全身皮膚が紅潮し無菌性小膿疱が多発、融合する。その免疫病態には主に Th1 や Th17 が関与しており、骨髄由来の白血球から炎症性サイトカイン、ケモカインが産生され、好中球・単球の遊走、表皮細胞の増殖、持続的な炎症などを誘導する。さらに好中球、単球/マクロファージ、樹状細胞、NK 細胞、 $\gamma$   $\delta$  T 細胞を含む免疫細胞が Th 細胞の分化を誘導すると考えられているが、GPP の免疫病理の全体像は判明していない。単球には CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>DR<sup>+</sup> classical phenotype と約 8%を占める CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> proinflammatory phenotype があり、 後者は刺激によって TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカインを大量に放出することが知られている。顆粒球吸着療法 (GMA) は GPP など好中球性皮膚症に効果を示す治療法であるが、除去される単球の性状などについては不明である。今回、GPP において①CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte/CD14<sup>+</sup> monocyte 比(proinflammatory monocyte 比)が増加しているか、②GMA を施行後の proinflammatory monocyte 比の変化、③GMA の臨床効果、④GPP 患者末梢血中の monocyte のサイトカイン産生能の評価、⑤GMA が monocyte のサイトカイン産生能に与える影響について検討した。

**【対象と方法】** 本学医学系研究科医学研究等倫理審査委員会において承認を得、研究を開始した。健常人 16 名、GPP 患者 11 名を対象として採血した。活動期 GPP (aGPP) 患者に GMA を施行し、治療前後で血液を得た。GMA 前後の臨床評価には日本皮膚科学会の膿疱性乾癬重症度分類を使用した。

末梢血中の proinflammatory monocyte 比を解析するため、 anti-human CD14 と anti-human CD16 monoclonal antibody を使用し、フローサイトメトリーを用いて測定した。健常人および GPP 患者末梢血より末梢血単核細胞 (PBMC) を遠心分離し、さらに MACS を使用して CD14<sup>+</sup>monocyte を得た。CD14<sup>+</sup>monocyte 培養液に LPS (1 $\mu$ g/mL) を加え 37 $^{\circ}$ C, 18 時間培養した後、培養上清中のサイトカイン・ケモカイン濃度を cytometric bead array を使用して測定した。測定項目は TNF- $\alpha$ , CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES)とし、paired *t*-test にて有意差検定を行った。

**【結果】** ①aGPP 群では非活動期 GPP 群及び健常人群に比べて proinflammatory monocyte 比が著しく増加していた。また GMA を 1 回施行後の末梢血中では著しく低下した。②GMA 5 回 (週 1 回計 5

回) 1 クールを施行後、臨床症状は重症度分類で3点以上軽快し、proinflammatory monocyte 比は5名中4名で低下した。③血清中のサイトカイン測定では、aGPP 群は健常人群に比べ CXCL8, CCL3, CCL4 は有意に増加していたが、CCL5 は逆に有意に低下していた。CCL2, TNF- $\alpha$  に有意な差は見られなかった。④LPS を添加後の CD14<sup>+</sup> monocyte 培養上清では、aGPP 群は健常人群に比べ CCL5 は有意に低下した。CXCL8, CCL3, CCL4, TNF- $\alpha$  は不変であり、CCL2 は増加傾向にあった。⑤1 クール施行前後の CD14<sup>+</sup> monocyte を LPS で刺激した後の培養上清中の CCL3, CCL4 は有意に低下した。CXCL8 は全例で低下したが有意差はなく、CCL2, CCL5, TNF- $\alpha$  は変化がなかった。

**【考察】** aGPP の末梢血中では健常人や非活動期 GPP と比べ proinflammatory monocyte 比が増加していた。GMA 施行により臨床症状の改善と共にこの分画が減少したことから、好中球だけでなく CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte も GPP の活動性における免疫病態の一端を担っており、末梢血からこの分画を吸着除去することが GMA 治療の治療効果を示す一因と考えられる。CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte は TNF- $\alpha$  の主要産生細胞であり乾癬の皮疹局所でも増加しているとされている。しかし血清中・培養液中の TNF- $\alpha$  は aGPP と健常人で差がなかったため、LPS 刺激からの炎症誘発には関与しない、もしくは病勢極期には変化がみられないという可能性が考えられた。

CXCL8, CCL3, CCL4 は aGPP 血清中で有意に高く、重症度スコアと相関することから、病勢に相関するマーカーとして期待できる。しかし培養上清では健常人と差が見られなかったため、LPS 刺激に反応を示さない、あるいは増悪極期にはすでにこれらサイトカインを放出した後の状態と考えられる。GMA を施行した後は CD14<sup>+</sup> monocyte の CCL3, CCL4 の産生能が低下しているが CXCL8 は不変である。CXCL8 産生の主体は CD14<sup>+</sup> monocyte ではなく活性化好中球であり、また CD14<sup>+</sup> monocyte の CCL3, CCL4 産生能は aGPP 初期にピークとなり、その後は低下した状態が維持されると考えられる。CCL2 は幼若な単球に作用し、分化した単球・マクロファージには CCL3, CCL4 が作用するとされているが、aGPP の CD14<sup>+</sup> monocyte は LPS 刺激により CCL2 の産生が増加する。一方、CCL5 は幅広く白血球を遊走・活性化させるサイトカインで乾癬の皮疹局所では増加しているとされているが、その亜型である aGPP では血清でも培養上清でも低下しており GMA でも変化はなかった。

**【結論】** GPP の末梢血では proinflammatory monocyte 比が高値であるが、GMA により proinflammatory monocyte 比が低下し、CD14<sup>+</sup> monocyte からの CCL3, CCL4 産生が減少することによって臨床症状が改善する。GMA は CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte を吸着・除去することができるため、GPP 患者にとって有効な非薬物的治療となり得ると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 藤澤智美は、活動期の膿疱性乾癬では CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> proinflammatory monocyte/CD14<sup>+</sup> monocyte 比が非活動期や健常人に比べて有意に増加し、血中 CXCL8, CCL3, CCL4 濃度も有意に上昇していることを示した。また顆粒球吸着療法はこの proinflammatory monocyte 比を減少させ、サイトカイン産生を制御する可能性を示した。本研究の成果は、膿疱性乾癬の病態解明と、本症における顆粒球吸着療法の奏効機序の解明に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Tomomi Fujisawa, Kana Murase, Hiroyuki Kanoh, Masao Takemura, Hidenori Ohnishi, Mariko Seishima: Adsorptive Depletion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Proinflammatory Monocyte Phenotype in Patients with Generalized Pustular Psoriasis: Clinical Efficacy and Effects on Cytokines Therapeutic Apheresis and Dialysis 16, 436-444 (2012)