

論文の内容の要旨

論文題目「局所粘膜内免疫環境と免疫チェックポイントの免疫組織学的解析によるステロイド治療を要する潰瘍性大腸炎の予測可能性について」

学位申請者 津田 真吾

キーワード：潰瘍性大腸炎，免疫組織化学，免疫チェックポイント，CD163，GSEA

総括

潰瘍性大腸炎(UC)は大腸において免疫系を制御する機構に異常を来し、過度の免疫活性化によって粘膜層の破壊をきたす疾患である。本研究では、下記の免疫組織化学マーカーを使用して結腸粘膜に存在する細胞タイプと免疫経路を特定した:Tリンパ球(CD3)、ヘルパーT細胞(CD4)、細胞障害性Tリンパ球(CD8)、NK細胞(CD56)、制御性T細胞(FOXP3)、PD-1とBTLA受容体およびそのリガンドであるTNFRSF14、総マクロファージ(CD68)、炎症誘発性のM1様マクロファージ(CD16)、炎症制御性のM2様マクロファージ(CD163とPTX3)、炎症制御性の樹状細胞(CD11c)。UCの大腸粘膜においてこれまでPD-1、PTX3、BTLA、TNFRSF14との関連は調べられておらず、今回これらを含めた免疫組織化学の手法を用いて免疫学的分析を行った。本研究よりUCの大腸粘膜における免疫恒常性メカニズムの変化が、臨床的にステロイド治療を必要とする中等症以上となった病勢との関連があることが明らかとなった。

背景

UCの病態の主体は免疫制御機構の異常による免疫の過剰反応によるものと考えられている。UCの基本治療は5-ASA製剤であり、これのみでコントロールできず中等症～重症となった場合はステロイド剤の全身投与を中心とした追加治療を行う。現在UCの診断には主に大腸内視鏡検査と腸粘膜での生検を用いており、内視鏡的評価と病理組織学評価を組み合わせることで確定診断と重症度評価を行う。しかし、診断当初には中長期の予後予測は困難である。UCの診断時点における予後予測を可能とする指標があれば、治療初期の段階での治療法の選択に役立つであろう。

方法

対象は2005年から2013年にかけて東海大学医学部付属病院において実施された大腸内視鏡検査において採取された生検検体を有する72症例。56例がUC、11症例が感染性腸炎、5例が正常粘膜であった。検体はUC初発の診断時に採取されたものであり、未治療のものである。UC症例中、5-ASA製剤の内服のみで2年間の全身ステロイド治療を必要としなかった43例をnon-SRとし、診断初期もしくは経過観察中に中等症となり全身ステロイド投与を必要とした13例をSRに群別した。

内視鏡的評価方法としてはBaronスコアを、H-E染色の組織学的評価にはGeboesスコアを使用した。各マーカーの免疫組織化学では粘膜固有層に浸潤している細胞の中で陽性細胞が存在する割合を記録し0～+3のスコアをつけた。

遺伝子解析：GSEAを用いて活動性のUCと正常粘膜の比較を行い、今回用いた免疫マーカーの増減が、対応する遺伝子の濃縮に一致するかを検証した。GSE38713を用い、STRINGによってタンパク質間相互作用のネットワーク図を作成した。

結果

内視鏡的評価と組織的評価の比較：SRではBaronスコアもGeboesスコアも有意に高値を示し、オッズ比はBaronスコアの方が高かった。

正常粘膜・感染性腸炎・UCの免疫マーカーによる比較：正常腸管の粘膜ではほぼ全ての免疫マーカーの低発現

で、炎症抑制に関与するBTLAとTNFRSF14が高発現であった。それに対して、感染性腸炎の粘膜ではCD3、CD8、FOXP3、PD-1、CD68、CD163、PTX3で高発現がみられた。UCでも同様に、CD3、CD8、FOXP3、PD-1、CD68、CD16、CD163、PTX3、CD11Cが高発現であったが、BTLAは低発現であった。感染性腸炎と比較すると、UCではCD8、PTX3、CD11Cにおいてより高発現であった。

UCの予後と免疫マーカーの比較：SRとnon-SRの比較。SRではFOXP3陽性制御性T細胞の数が少なく、共抑制経路を示すPD-1は低発現であり総マクロファージを示すCD68は高発現で、活性化M2様マクロファージ比率を示すCD163/68比が低発現であった。

免疫マーカーの多変量解析：免疫マーカーの発現状況を用い、教師なし階層クラスター分析を行った。non-SRとSRはクラスターが近似し、正常粘膜と感染性腸炎とは明確に離れていた。

UCと正常粘膜における遺伝子発現解析：GSEAを用いて活動性UCの遺伝子発現状態を検証した結果、免疫組織化学と同様の傾向を示すことがわかった。

考察

本研究において、我々は免疫組織化学を用いて腸管粘膜における微小免疫環境と免疫チェックポイントを分析することで、UCの病態を解明しその臨床的な予後(特にステロイド加療を要するかについて)を予測できる可能性を示した。

UCをはじめとする炎症性腸疾患の原因として生来の免疫異常と獲得免疫の障害が挙げられる。前者では炎症誘発性M1様マクロファージの増加や、炎症反応を抑える役割を持つ樹状細胞の減少がある。後者においては1型と2型ヘルパーT細胞のバランスやTh17陽性細胞の増加、制御性T細胞の減少が関係しているとされる。本研究の結果、正常粘膜と比較しUCはCD3、CD8、FOXP3、PD-1、CD68、CD16、CD163、PTX3、CD11Cの増加がみられた。この結果は既存の文献で述べられた結果に一致しており、現在のUCに対する病因の理解に合致する。UCでは、共抑制性シグナル伝達のマーカーであるBTLAが低発現であった。

SRと関連する因子について検索したところ、SR群はFOXP3陽性の制御性T細胞とPD-1が低発現であり、CD68陽性の総マクロファージは高発現だが、CD163/CD68比で表わされるM2様マクロファージの活性は低い事が判明した。FOXP3陽性制御性T細胞やPD-1に代表される抑制性経路は腸管内の炎症を防ぐため重要であるという先行研究があり、今回の結果はそれを支持するものと考えられた。

結論

UCの免疫組織化学において、我々の知る限り未だ記述のされていない数種類の免疫関連マーカーについて検討を行った。正常な腸粘膜では、免疫微小環境で炎症を引き起こす種々のマーカーは低発現であるが、炎症を抑制するBTLAおよびTNFRSF14の発現は高いという特徴があった。UCの特徴はCD3、CD8、FOXP3、PD-1、CD68、CD16、CD163、PTX3、CD11Cなどの様々な免疫関連マーカーの増加とBTLAの低発現であった。SR群では免疫抑制に関連するFOXP3、PD-1およびCD163/CD68比は低下し、CD68陽性の総マクロファージの増加していた。したがって、UCの増悪は免疫抑制機構の機能低下が関連している可能性があり、これらのマーカーはUCの予後予測に有用である可能性がある。