

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	木村 成宏
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第761号
学位授与の日付	平成29年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Possible involvement of chemokine C-C receptor 7 <sup>+</sup> programmed cell death-1 <sup>+</sup> follicular helper T-cell subset in the pathogenesis of autoimmune hepatitis. (自己免疫性肝疾患の免疫病態における CCR7 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> 濾胞性ヘルパーT細胞の関与)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 教授 若井 俊文 副査 教授 寺井 崇二

### 博士論文の要旨

#### 【目的】

濾胞性ヘルパーT (follicular helper T, Tfh) 細胞はCD4陽性T細胞分画の1つであり、B細胞の分化誘導に重要な役割を果たしている。Tfh細胞の異常が高 $\gamma$ -グロブリン血症と自己抗体の出現を助起することで各種の自己免疫疾患において主たる病態を担っている可能性とともに、間葉系幹細胞移入による免疫抑制にはTfh細胞の抑制が重要であることが示されている。近年、Tfh細胞は機能的に異なる各種の亜分画に更に分類可能であることが明らかにされており、本研究は代表的な自己免疫性肝疾患である自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) の免疫病態におけるTfh細胞分画の関与について検討することを目的とした。

#### 【方法】

新潟大学医歯学総合病院にて診断・治療されたAIH 35例を対象とし、倫理委員会承認済み (第1906号) の研究計画に基づき提供に同意いただいた診断時の肝生検組織と末梢血を使用した。AIH症例は新規に診断された新規AIH群と既治療のAIH治療群とに分けて検討し、原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) 28例、慢性B型肝炎患者 (chronic hepatitis B, CHB) 22例と健常ボランティア (healthy control, HC) 44例を対照群とした。新規AIH群は12例で平均年齢66 (52-76) 歳 (男性1例、女性11例)、AIH治療群は23例で平均年齢64 (31-87) 歳 (男性1例、女性22例)、プレドニゾロン (PSL) は13例 (56.5%) で使用されていた。PBC群は平均年齢69 (45-90) 歳 (男性5例、女性23例)、CHB群は平均年齢58 (32-81) 歳 (男性13例、女性9例)、HC群は平均年齢31 (23-83) 歳 (男性19例、女性25例) であった。肝生検組織と末梢血から比重遠心法にてリンパ球を分離後、CXCR5, CD69, PD-1, ICOS, CXCR3, CCR6, CCR7などの発現をフローサイトメトリー (FACS) により解析した。また、肝生検組織を用いて免疫組織染色法によりTfh細胞の肝組織内分布を検討し、更に末梢血リンパ球を *in vitro* で刺激後にTfh細胞の活性化と各種サイトカイン産生をFACSにより解析した。

#### 【成績】

Tfh 細胞は既報の通り CD3 陽性細胞中の CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>分画もしくは CD4 陽性細胞中の PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>分画と定義した。末梢血の解析では、CD3 陽性細胞中の CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>細胞頻度は新規 AIH 群と PBC 群において他の群より有意に上昇していた ( $P < 0.05$ )。また、CD4 陽性細胞中の PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>細胞頻度も同様に新規 AIH 群と PBC 群において有意な上昇が認められた ( $P < 0.05$ )。Tfh 細胞の活性化マーカーである CXCR3 および PD-1 発現は、AIH 治療群では他の群よりも有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。Tfh 細胞は CXCR3 と CCR6 発現により、CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>分画はヘルパーT (Th) 1 細胞様、CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>分画は Th2 細胞様、CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>は Th17 細胞様の機能を持つことがと報告されており、新規 AIH 群では他の群との有意差は認めなかったものの、PBC 群において Th2 細胞様の CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>分画が AIH 治療群、HC 群よりも有意に減少していた (それぞれ  $P = 0.005$ ,  $P = 0.048$ )。一方、B 細胞の分化誘導を促進する IL-21 を多く産生し、自己免疫疾患において重要な役割を持つことが示されている CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>の Tfh 細胞分画の頻度は、新規 AIH 群において他の群よりも有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。AIH 症例における CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>分画の頻度は、血清 IgG 値と有意な正の相関を示し ( $r = 0.672$ ,  $P < 0.01$ )、肝予備能の指標であるプロトロンビン時間 (PT) や血清アルブミン値とは有意な負の相関を示した (それぞれ  $r = -0.517$ ,  $P = 0.028$ ,  $r = -0.390$ ,  $P = 0.025$ )。また、新規 AIH 群のうち PSL により治療された 6 例では、CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>分画の頻度が血清 AST 値と ALT 値が正常化した治療後には治療前と比較して有意に減少した ( $P = 0.040$ )。更に、AIH 症例の Tfh 細胞を PMA と Ionomycin で *in vitro* で刺激すると、IL-21、IFN- $\gamma$ 、IL-17 が HC 群と比較して有意に高産生された (それぞれ  $P = 0.044$ ,  $P < 0.01$ ,  $P = 0.019$ )。

一方、肝生検組織の解析では、免疫組織染色法により Tfh 細胞を示唆する CXCR5 陽性細胞を検討すると、CXCR5 陽性細胞は肝組織中においても AIH 群および PBC 群において CHB 群よりも有意に増加していた (それぞれ  $P < 0.05$ )。FACS による解析では、AIH 症例の Tfh 細胞における活性化マーカー PD-1 と ICOS の発現は、同一症例の末梢血中よりも肝組織中で有意に上昇しており (それぞれ  $P = 0.041$ ,  $P < 0.01$ )、PD-1 陽性の Tfh 細胞は末梢血中と肝組織中とで有意に正の相関を示した ( $r = 0.785$ ,  $P = 0.003$ )。更に、AIH 症例の肝組織中の PD-1 陽性の Tfh 細胞頻度は血清抗核抗体価と有意な正の相関を示した ( $r = 0.693$ ,  $P = 0.016$ )。

#### 【考案と結論】

AIH 症例では、発症時に末梢血中と肝組織中で活性化した Tfh 細胞が増加しており、特に IL-21 を産生し B 細胞の分化誘導に重要である CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>の Tfh 細胞分画の頻度は、血清 IgG 値と有意な正の相関を示すとともに肝予備能の指標である PT 値やアルブミン値とは有意な負の相関が認められるなど、AIH の免疫病態や病勢に関与している可能性が示唆された。申請者らは、AIH においては CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>の Tfh 細胞分画の増加が IL-21 などの高産生により B 細胞の過剰な分化誘導を生じ、IgG 値の高産生や更には自己抗体の出現の一因となっていると推論した。更に、PSL 治療により血清 AST 値と ALT 値の正常化が得られた症例では、発症時に増加していた CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>の Tfh 細胞分画の頻度は治療後に有意に低下しており、PSL 治療が CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>の Tfh 細胞分画の減少を来すことが、病勢の改善の一因である可能性を推察している。以上のように、本研究では Tfh 細胞の CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>分画が AIH の病態に関与している可能性が明らかとなった。

#### 審査結果の要旨

本研究課題では、自己免疫性肝炎 (AIH) の免疫病態における濾胞性ヘルパーT 細胞 (Tfh) 細胞分画の関与について検討した。新規 AIH 群と既治療の AIH 治療群とに分けて検討し、原発性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis、PBC)、慢性 B 型肝炎患者 (chronic hepatitis B、CHB) と健常ボランティア (healthy

control、HC) を対照群とした。肝生検組織と末梢血から比重遠心法にてリンパ球を分離後、表面マーカーの発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、肝生検組織を用いて免疫組織染色法により Tfh 細胞の肝組織内分布を検討し、さらに末梢血リンパ球を *in vitro* で刺激後に Tfh 細胞の活性化と各種サイトカイン産生を解析した。

その結果、1) Tfh 細胞数は新規 AIH 群と PBC 群において有意に上昇すること、2) 新規 AIH 群において CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> の Tfh 細胞分画の頻度が有意に増加すること、3) AIH 症例における CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> 分画の頻度は、血清 IgG 値と有意な正の相関を、肝機能とは有意な負の相関を示すこと、4) AIH 症例の Tfh 細胞を PMA と Ionomycin で *in vitro* で刺激すると、IL-21、IFN- $\gamma$ 、IL-17 が HC 群と比較して有意に高産生されること、5) 肝生検組織の解析では、Tfh 細胞を示唆する CXCR5 陽性細胞が AIH 群および PBC 群の肝組織中に有意に増加することが判明した。

これらの結果は、AIH における CCR7<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> の Tfh 細胞分画増加が IL-21 などの高産生により肝臓内において B 細胞の過剰な分化を誘導し、それが IgG 値の高産生、自己抗体出現の一因になっていることを強く示唆する。新規性の高い内容であり、学位論文としての価値を有すると判断した。