

【28】

氏 名	佐藤 浩子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第753号
学位授与の日付	平成28年2月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Plasmacytoid dendritic cells (PDCs) producing interferon- α (IFN- α) and inducing Mx1 play an important role for CD4+ cells and CD8+ cells in necrotizing lymphadenitis (壊死性リンパ節炎において、形質細胞様樹状細胞はMx1を誘導するインターフェロン α を産生し、CD4およびCD8陽性細胞に重要な役割を果たす)
論文審査委員	(主査) 教授 小 端 哲 二 (副査) 教授 三 谷 絹 子 教授 平 林 秀 樹

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

壊死性リンパ節炎（necrotizing lymphadenitis：NEL）は、不明熱や頸部リンパ節腫脹を主症状とし、口腔外科領域ではときに遭遇する疾患である。本疾患は1970年代始めに日本の研究者らにより初めて報告されて以来、世界中の各地から報告されるようになった。本疾患の主要構成細胞には、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、CD123⁺の形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cells：PDCs）、組織球、マクロファージ（M ϕ ）などがあり、好中球や細菌は出現しないことは従来より示されていたが、PDCsの役割については明らかにされていなかった。

【目 的】

NELにおけるPDCsの意義を解明するために、CD4⁺、CD8⁺、CD123⁺、Mx1⁺細胞および末梢血中の単球などの経時的変化や、PDCsの形態学的変化などにつき検討を行った。

【対象と方法】

本研究は、平成26年12月22日に文部科学省および厚生労働省が公布した「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って行った。

1989年から2014年までに当院でNELと診断された66例（男性23例、女性43例）を対象とした。このうち13例で再発を認め、4例では複数の部位に発症した。

組織学的検討としては、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD123抗体、抗Mx1抗体、抗Ki-67抗体など

を用いた免疫染色や、EBER-ISH (Epstein-Barr virus encoded small RNA - in situ hybridization) などを行った。またヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin) 染色により病巣部および非病巣部を同定し、それぞれの部位において単核球2000個に対するCD4⁺、CD8⁺、CD123⁺およびMx1⁺細胞の経時的变化を計算した。なお、病巣部および非病巣部の各5視野ずつをカウントした。

またPDCsの真円度、長軸 / 短軸比、核 / 細胞質 (nuclear cytoplasm ratio : N / C) 比および円周を測定し、病巣部および非病巣部でのPDCsの形態について比較検討した。

末梢血については、CD4⁺ / CD8⁺細胞比、白血球数や好中球、リンパ球および単球、CRP、LDH、フェリチン、可溶性インターロイキン2受容体 (soluble interleukin-2 receptor) などの生化学データを経時的に検討した。

【結 果】

年齢は3歳から55歳で、30歳以下が72.7%を占めた。腫脹リンパ節の部位は頸部が最も多く、93.9%であった。末梢血白血球数は4000/ μ L以下の症例が47.2%で、単球分画が8%以上の高値を示した症例は67.3%を占めた。

CT画像では、腫脹した頸部リンパ節が数珠状に連なっている様子が観察された。

末梢血のCD4⁺ / CD8⁺比は、発症初期では1.0未満で、時間の経過とともに次第に1.0に近づく傾向があった。

罹患したリンパ節は腫脹し、表面は滑らかで、軟らかく、ときに出血を伴っていた。組織学的には、リンパ球を貪食しているM ϕ 、芽球様細胞およびリンパ球などが多数観察されたが、好中球や細菌は認めなかった。病巣部において、PDCsは血管内皮細胞の周囲および血管内に観察された。Ki-67⁺細胞は病巣部に多く48.8%で認められ、EBER⁺細胞はまれであった。Mx1⁺細胞の分布はPDCsやM ϕ の分布と同じような傾向を示した。即ち、PDCs、M ϕ 、免疫芽球および血管内皮細胞などに陽性で、その数は病巣部でより顕著であったが、小型リンパ球には陰性であった。

PDCsの大きさは12.7 μ m、N / C比は約0.4で、統計学的検討 (Mann-Whitney U-test) により、非病巣部に比べ、病巣部のPDCsはやや大きくまた不整形を示すことが証明された。一方、PDCsを電子顕微鏡学的に観察すると、豊かな胞体内には層状に配列した多くの粗面小胞体が存在し、偏在した核内にはときに核小体が認められた。また、粗面小胞体付近には細管状構造体 (tubuloreticular structure) がみられた。

病巣部組織中のCD4⁺、CD8⁺、CD123⁺、Mx1⁺細胞、および末梢血単球分画について経時的に検討すると、CD8⁺、CD123⁺およびMx1⁺細胞は発症初期から上昇し、単球も同じ傾向を示した。一方、CD4⁺細胞は発症2~4週頃に急激に低下し、その後回復傾向を示した。非病巣部では、CD4⁺細胞は減少傾向を示した。

【考 察】

NELは発熱を伴う感冒様症状や疼痛を伴う頸部リンパ節腫脹および白血球減少を主症状とする良性疾患である。本研究による結果から、以下のように考察した。即ち、病因 (ある種のウイルス) がCD4⁺細胞に直接作用してアポトーシスを起こし、その結果、アポトーシスに陥った細胞はM ϕ に貪

食される。また、この病因により、活性化されたPDCsがインターフェロン α (interferon- α : IFN- α) を産生し、IFN- α はCD8⁺細胞を芽球化させる。芽球化したCD8⁺細胞は細胞傷害性因子を産生してCD4⁺細胞をアポトーシスに陥らせる。IFN- α は更に単球にも作用する。単球はIFN- α によりM ϕ へと分化して、アポトーシスに陥ったCD4⁺細胞の貪食を盛んに行うことになる。なお、これらIFN- α の存在は、IFN- α が誘導するMx1の免疫染色によりリンパ節内に確認することができた。

【結 論】

NELでは、病因 (ある種のウイルス) によりPDCsが動員され、その結果、IFN- α が産生されることにより、リンパ球やM ϕ などの免疫細胞に重要な免疫応答が惹起されることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

壊死性リンパ節炎 (necrotizing lymphadenitis : NEL) は、発熱を伴う感冒様症状や疼痛を伴う頸部リンパ節腫脹および白血球減少を主症状とする良性疾患である。病因は未だ不明ながら、本疾患の病巣部には細菌や好中球は認められず、主要構成細胞として、Tリンパ球、マクロファージや形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells : PDCs) などがみられる。申請論文では、NELの病像形成におけるPDCsの役割を解明することを目的に、NELと診断された66症例の臨床像、病理組織像および末梢血中のCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、単球などの経時的变化、そしてPDCsの形態学的変化を詳細に検討している。検討の結果、① 患者男女比は23対43、年齢分布は3歳から55歳で、30歳以下が72.7%を占めた。腫脹リンパ節の部位は頸部が最も多く、93.9%であった。うち13例で再発を認め、4例では複数の部位に発症した。② 末梢血白血球数は4,000/ μ L以下の症例が47.2%で、単球分画が8%以上の高値を示した症例は67.3%を占めた。末梢血CD4/CD8比は、発症初期では1.0未満で、時間経過とともに1.0に近づく傾向があった。③ 病巣部の組織像は、リンパ球を貪食しているマクロファージ、芽球様細胞およびリンパ球などが多数観察され、PDCsは血管内皮細胞の周囲および血管内に観察された。Ki-67⁺増殖細胞は病巣部に多く存在した。インターフェロン α (IFN α) に誘導されるMx1分子は、PDCs、マクロファージ、免疫芽球および血管内皮細胞に陽性であり、病巣部に多く観察され、小型リンパ球では陰性であった。④ 病巣部のCD8⁺ T細胞、PDCs、Mx1⁺細胞および末梢血単球はNEL発症初期より増加した。病巣部CD4⁺ T細胞は発症後数週間で急激に減少し、その後回復傾向を示した。非病巣部ではCD4⁺ T細胞が減少傾向を示した。⑤ 病巣部のPDCsは非病巣部に比べ、やや大きく不整形を示した。PDCsの電子顕微鏡観察では、豊かな胞体内に粗面小胞体が層状配列し核を圧排しており、粗面小胞体付近には細管状構造体が認められた。これらの結果より、NELでは何らかの病因 (ある種のウイルス感染) によりPDCsが活性化され、直接的にあるいはIFN α 産生によるCD8⁺ T細胞の活性化を介してCD4⁺ T細胞の細胞死を誘導し、それをマクロファージが処理すると申請論文では結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、文部科学省・厚生労働省の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従い、

1989年から2014年までに同一施設内で集められたNEL66症例を対象に診療録情報と標準的な実験手法である免疫組織染色法、in situ hybridization法および電子顕微鏡観察を用いて詳細に比較検討している。よって、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

未だ不明なNELの病因を明らかにすべく、申請論文ではNELの主要構成細胞の一つであるPDCsに着目し、その挙動や形態学的変化を十分な症例数を用いて詳細に比較検討している。その結果、活性化されたPDCsがIFN α を産生し、直接的あるいは間接的にCD4⁺ T細胞の細胞死を誘導する可能性を初めて明らかにしている。この点において、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、十分なNEL症例数を対象に、確立された標準的な実験手法を用いて、PDCsの挙動を詳細に比較検討している。そこから得られたデータに基づき論理的に考察を展開し結論を導き出している。その結論は、病理学や免疫学などの関連領域における知見を踏まえても矛盾するものではなく妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、NEL形成過程においてPDCsの活性化とIFN α の産生が重要な役割を果たす可能性を初めて明らかにした。PDCsの活性化とIFN α の産生はウイルス感染によるものが大部分を占め、続くCD8⁺ T細胞の活性化とCD4⁺ T細胞の細胞死の誘導そしてマクロファージによる処理は免疫応答の結果を示唆している。これはNELの病因および病態を考察する上で大変貴重な新知見であり、当該分野への貢献度も極めて高いと評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、自らの口腔外科診療で遭遇するNELを研究テーマとして選択し、病理学および免疫学の理論と実践を学んだ上で作業仮説を立て、本研究を立案、的確に遂行している。得られた新知見は大変貴重であり、その研究成果は当該領域の専門誌への掲載が承認されている。よって、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野への貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Journal of Clinical and Experimental Hematopathology

55 : 127-135, 2015