

氏名	坂元 直哉		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8349 号		
学位授与年月	平成 29年 8月 31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	The accumulation of regulatory T cells in the hepatic hilar lymph nodes in biliary atresia（胆道閉鎖症における肝門部リンパ節への制御性 T 細胞の集簇）		
主査	筑波大学教授	医学博士	兵頭 一之介
副査	筑波大学講師	博士（医学）	大城 幸雄
副査	筑波大学講師	博士（医学）	河合 弘二
副査	筑波大学助教	博士（医学）	川崎 綾

論文の内容の要旨

坂元直哉氏の博士学位論文は、胆道閉鎖症における肝門部リンパ節の制御性 T 細胞比率について検討したものである。その要旨は、以下の通りである。

（目的）

胆道閉鎖症の病因は未だ不明である。小児外科医の間では胆道閉鎖症の初回手術（肝門部空腸吻合術）時に肝門部リンパ節が腫大していることはよく経験されることであるが、その機序や病因論的意義も未だ不明である。しかし、このことから病因として何らかの免疫学的機構が働いていることが示唆されていた。近年、本症において免疫の活性化を抑える働きのある制御性 T 細胞（Treg 細胞）が末梢血において減少しているとの報告があり、免疫活動が活性化することにより胆管を攻撃するというシナリオが提唱されている。

今回、著者は腫大肝門部リンパ節が胆道閉鎖症における病態を解明していく上で重要な手がかりになると推定し、実際に手術で得られた肝門部のリンパ節を使用して Treg 細胞に焦点を当て研究を行った。

（対象と方法）

2012年～2016年にかけて胆道閉鎖症と診断された患者9例、コントロールとして胆道拡張症の患者5

例を対象としている。著者はコントロール症例において、努力はしたものの **age matched control** が得られなかったとしている。したがって年齢は胆道閉鎖症 20-104 日に対してコントロール症例 1-14 歳と差が生じている。

検体は肝門部リンパ節と末梢血を採取した。肝門部リンパ節は胆道閉鎖症の初回手術で通常採取されるものであり、この研究により新たに侵襲が加わるものではなかったとしている。末梢血は全身麻酔下、手術侵襲が加わる前に採取している。もちろん施設の倫理審査委員会から研究実施承認を受け、さらに保護者からの文書による同意を得て研究が実施されている。

著者は得られたサンプルから、フローサイトメトリーを用いて **CD4 陽性リンパ球**に占める **Treg 細胞** 分画を解析した。Treg 細胞分画は **total Treg 細胞(CD4+/CD25+/FoxP3+)**、活性作用をもつ **active Treg 細胞(CD4+/CD25+/FoxP3+/CD45-)**の二つに分けて分析を行った。前述のようにコントロール群と疾患群においては年齢差があり、リンパ球の分画は同一の分布ではない。そこで肝門部リンパ節と末梢血の **Treg 細胞**の比率を算出し、その比率をコントロール群と胆道閉鎖症群で比較検討している。統計は **SPSS** を使用し、**Mann-Whitney test** を用いて **P<0.05** を有意差ありとした。

(結果)

胆道閉鎖症群では **CD4+**細胞に占める **total Treg 細胞**、**active Treg 細胞**の割合は末梢血よりも肝門部リンパ節で高かった (それぞれ **P<0.001**, **P=0.001**)。一方、同様にコントロール群でも末梢血より肝門部リンパ節への **total Treg 細胞**、**active Treg 細胞**の集簇傾向がみられるが、肝門部/末梢血の **active/total Treg 細胞**の割合比率は、胆道閉鎖症群 (3.1) がコントロール群 (1.6) の約 2 倍 (**P=0.03**) の値を示した。つまり胆道閉鎖症では **active Treg 細胞**の割合が増加していることが明らかになった。

(考察)

著者は、第一に本研究の新たな知見としては、これまで末梢血の **total Treg 細胞**しか検討されていなかった胆道閉鎖症の **Treg 細胞**を **active Treg 細胞**にまで踏み込んで解析したこと、さらにその割合が胆道閉鎖のリンパ節において異なっていることを証明したことであると述べている。本研究結果は、胆道閉鎖症における肝門部リンパ節への **Treg 細胞**の集簇を証明したものである。これはこれまで検討されていた末梢血のみの検討では不十分であり、胆管の局所的な免疫機構にも着目する必要があること、さらには **Treg 細胞**が減少するというこれまでの仮説とは異なる病因論を示唆するものである。これまでの説では **Treg 細胞**を減少させる原因として **Cytomegalo virus** 感染などのウイルス感染が提唱されていたが、著者は全ての症例で **Cytomegalo virus** の感染は指摘できなかったと報告している。

今回観察された **Treg 細胞**のリンパ節への集簇は 1)活性化した免疫機能を抑制するために二次的に増加、2)何らかの原因で **Treg 細胞**が **primary** に増加という 2つの機序が考えられる。妊娠では子宮周囲のリンパ節に **Treg 細胞**が集簇し、本来ならば母体異物であるはずの胎児を排除せずに妊娠を成立させている事実が証明されている。著者は **Treg 細胞**が **primary** に増加していた場合、例えば胆道閉鎖症において **Host** である児を攻撃する因子は証明されていないが、胆道閉鎖症の児には母体からの細胞が移行するという説 (**Maternal Micro Chimerism**) があり、胆道閉鎖症の病因の一つとして大変興味深いものであると指摘している。しかし本研究では **Treg 細胞**のみしか検討しておらず、今後の研究課題と考えられる。

研究の限界として、今回の著者の研究ではリンパ節と末梢血における **Treg 細胞**の割合を検討している

ことから、胆道閉鎖症の末梢血の Treg 細胞の実数が低下している可能性は否定できていない。今後症例数を増やし、この問題を含め、様々なマーカーやリンパ球の機能解析などを駆使して免疫機構を解析することで、胆道閉鎖症の病因解明に新たな道を切り開くことが期待される。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、本研究において胆道閉鎖症の肝門部リンパ節に活性化 Treg 細胞の集簇がみられることを明らかにした。これは胆道閉鎖症の局所において何らかの免疫反応が生じていることを示唆するものである。これまで世界的にも末梢血の Treg 細胞の報告しかなされていないことから、この希少疾患である先天異常の研究は困難を極めたものと容易に推測される。これに果敢に挑み異常部位のリンパ節における Treg 細胞を解析したことは、これからの本疾患の病因解明への礎になるものと高く評価できる。

平成 29 年 6 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。