

氏 名 花 田 哲 郎

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士乙第438号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項

学 位 授 与 年 月 日 平成30年 9月12日

学 位 論 文 題 目 Suppressive regulatory T cells and latent transforming growth factor- $\beta$ -expressing macrophages are altered in the peritoneal fluid of patients with endometriosis

(子宮内膜症患者の腹水中では抑制性制御性 T 細胞と潜在型トランスフォーミング成長因子- $\beta$ を発現したマクロファージが変化する)

審 査 委 員 主査 教授 後 藤 敏

副査 教授 杉 原 洋 行

副査 教授 宇田川 潤

## 論 文 内 容 要 旨

<small>※せいいりばんごう</small> <small>※整理番号</small>	<b>442</b>	<small>(ふりがな)</small> 氏 名	<small>はなだ てつろう</small> 花田 哲郎
学位論文題目	Suppressive regulatory T cells and latent transforming growth factor- $\beta$ -expressing macrophages are altered in the peritoneal fluid of patients with endometriosis (子宮内膜症患者の腹水中では抑制性制御性 T 細胞と潜在型トランスフォーミング成長因子- $\beta$ を発現したマクロファージが変化する)		
<p><b>【研究の目的】</b></p> <p>子宮内膜症は子宮内膜以外の場所に子宮内膜組織が異所性に存在する疾患として定義されている。月経困難症や不妊症の原因となり、女性の10人に1人が罹患する頻度の高い疾患でもある。その発症には、月経血が卵管を通じ腹腔内に逆流し、月経血に含まれる子宮内膜組織が異所性に生着することで腹膜病変が生じるとする子宮内膜移植説が最も受け入れられている。しかし月経血の腹腔内への逆流自身はほとんどの女性にみられる現象であるにもかかわらず、子宮内膜症を発症する女性とそうでない女性が存在する。近年、制御性 T 細胞 (Treg) やトランスフォーミング成長因子-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>) に関連する免疫寛容状態が、子宮内膜組織の異所性生着に寄与すると考えられている。そこで申請者らは、Treg については近年報告されている3つの亜集団、TGF-<math>\beta</math> については活性型 TGF-<math>\beta</math> を内包し潜在型として存在させる latency-associated peptide (LAP) に着眼することにより、その機序をさらに明確にできるのではないかと考え研究を開始した。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>本研究は滋賀医科大学倫理審査委員会の承認の下、全ての患者に文書による説明と同意を得て行った。閉経後やホルモン療法などの薬物治療を施行されている患者、子宮内膜症以外の慢性および急性炎症性疾患を持つ患者、悪性腫瘍患者は対象外とし、滋賀医科大学医学部附属病院産婦人科に入院した腹腔鏡手術予定患者のうち、子宮内膜症患者28人および非子宮内膜症患者20人を対象とした。腹腔鏡手術施行時に末梢血および腹水を採取し、採取後直ちに Ficoll を用いて遠心分離し単核球を分離した。分離した単核球をフローサイトメトリーによる解析にて CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg の3つの亜集団 ① CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> resting Tregs (rTregs)、② CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup> effector Tregs (eTregs)、③ cytokine-secreting CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>low</sup> non-Tregs (non-Tregs) に分類し、それぞれの FoxP3 陽性リンパ球中の割合、および LAP 陽性単球 (抹消血液中) およびマクロファージ (腹水中) 割合につき、モノクローナル抗体を用いて分析を行った。同時に腹水中の TGF-<math>\beta</math> についても ELIZA 法によって定量した。解析はMann-Whitney U 検定にて行い、P 値が 0.05 未満を有意差ありと定義した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。  
 2. ※印の欄には記入しないこと。

**【結果】**

CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 細胞中の抑制性 Treg (rTregs および eTreg) は、子宮内膜症患者と非子宮内膜症患者の腹水中 rTregs の中央値がそれぞれ 0.60% と 0.25%、eTreg の中央値がそれぞれ 3.4% と 1.7% であり、子宮内膜症患者の腹水中で有意に割合が高かった (P=0.02 および P<0.01) が、末梢血中では有意差を認めなかった。non-Treg については腹水中でも末梢血中でも両群間に有意差は認めなかった。また腹水中の LAP<sup>+</sup> マクロファージの割合は、子宮内膜症患者の腹水中では有意に減少していた (中央値: 子宮内膜症群 6.2%、非子宮内膜症群 21.2%、P<0.01) が、末梢血中では有意差を認めなかった。TGF-β は子宮内膜症患者腹水中で有意に上昇を認めた (中央値: 子宮内膜症群 1.08 ng/mL、非子宮内膜症群 0.75 ng/mL、P<0.01)。

**【考察】**

本研究では子宮内膜症患者の腹水中で抑制性 Treg が上昇し、末梢血中では変化がないことを示した。これまでも CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 細胞についてはいくつか報告があったものの、結果が一定ではなく議論の余地が残されていたが、我々の得た結果によりやはり Treg に関連した免疫寛容状態が子宮内膜症の病態に寄与していることが明らかとなった。また子宮内膜症患者の腹水中の TGF-β が上昇していることについてはこれまで多くの報告があったが、産生源については不明な点が多かった。本研究では子宮内膜症患者の腹水中マクロファージ表面に発現する LAP が減少し、同時に TGF-β が上昇することを明らかとしたことで、腹水中のマクロファージが TGF-β の産生源の一つであることを示した。TGF-β はそれ自身が組織の繊維化を促すだけでなく Treg の分化も促進する。今回我々が得た結果より子宮内膜症患者の腹水中では、マクロファージ表面の LAP から活性型 TGF-β が放出されることで腹水中の TGF-β 濃度が上昇し、さらに Treg の増加が誘導されている可能性を示した。このカスケードを制御できれば、将来子宮内膜症の病勢をコントロールする治療戦略に繋がる可能性がある。

**【結論】**

子宮内膜症患者では、腹腔内で局所的に抑制性 Treg の上昇および LAP 陽性マクロファージが減少し、TGF-β 濃度が上昇していることが示された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	442	氏名	花田 哲郎
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、子宮内膜症患者の腹水・末梢血中の制御性 T 細胞 (Treg) やマクロファージ、トランスフォーミング成長因子 (TGF)-<math>\beta</math> について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Treg は 3 つの亜集団、resting Treg (rTreg) と effector Treg (eTreg)、non-Treg に分類されるが、子宮内膜症患者群では、腹水中の rTreg、eTreg の割合が有意に高値であった。ただし、末梢血では有意差がなかった。また、腹水、末梢血、いずれにおいても、non-Treg の割合に有意差はなかった。</li><li>2) 腹水中の latency-associated peptide (LAP) 陽性マクロファージの割合は、子宮内膜症患者群で有意に減少していた。一方、末梢血では有意差を認めなかった。</li><li>3) 腹水中の TGF-<math>\beta</math> は子宮内膜症患者群で有意な上昇を認めた。</li><li>4) 以上から、マクロファージ表面に発現する LAP から活性型 TGF-<math>\beta</math> が放出されることで腹水中の TGF-<math>\beta</math> 濃度が上昇し、それにより Treg の増加が誘導されていると考えられた。</li></ol> <p>本論文は、子宮内膜症の発症機構について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 557 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 30 年 8 月 27 日)</p>			