

授与番号	甲第 1656 号
------	-----------

論文内容の要旨

Regulatory T cells in human cord blood of preterm and term infants

(早産児と正期産児の臍帯血中の制御性T細胞の測定)

(林 祐子, 朝倉賀子, 松下翔子, 遠藤幹也, 千田勝一)

(Experimental Hematology, 投稿審査中)

I. 研究目的

CD4⁺CD25⁺制御性T細胞 (regulatory T cell : Treg) は過剰免疫反応を抑制し, 免疫寛容を維持する役割を担っている. このTregは転写因子, forkhead box P3 (FoxP3) によって分化と機能が制御されるため, FoxP3はTregの特異的マーカーとして利用されている. 一方, FoxP3は細胞内抗原であり, 生細胞の機能研究には適していないことから, FoxP3と逆相関するCD127がTregの新規特異的マーカーとして注目されている. しかし, 早産児と正期産児の臍帯血でFoxP3とCD127の両者を測定した報告はない.

本研究では, 早産児と正期産児を対象にして臍帯血のTregにおけるFoxP3とCD127の発現を測定し, これらのマーカーの発現に影響を与える因子について検討した.

II. 研究対象及び方法

本研究は岩手医科大学の倫理委員会の承認を得て行なった.

1. 対象

当院と関連病院で出生した早産児 26 人 (在胎 24~36 週) と正期産児 66 人 (在胎 37~41 週) の計 92 人から臍帯血を採取した. 早産児の 19 人の母親には, 肺成熟促進のため副腎皮質ステロイド薬の筋注が行われた.

2. 臍帯血の処理と測定

臍帯血採取後, Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) を用いて単核球を分離し, これにリンパ球系細胞凍結保存液 (コスモバイオ社, 東京) を加えて凍結保存した. 37°Cで解凍後, 単核球をCD4-FITC, CD25-PE-Cy5, FoxP3-PE, CD127-PE抗体と Human FoxP3 Buffer Setで染色した (以上, Becton Dickinson (BD) 社, San Jose, CA). 次にFACSCaliburフローサイトメーターとCellQuestPro software (BD) を使用し, CD4⁺T細胞中のCD25⁺FoxP3⁺とCD25⁺CD127⁻との細胞割合を測定した. また, 両者の細胞数を算出した.

3. 検討項目

FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの細胞割合と細胞数について在胎期間別に比較し, また, FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの細胞割合について正期産児における分娩様式別 (帝王切開・経膣分娩) と母親のアレルギー疾患既往の有無別に, また, 一部の臍帯血で採血部位別 (臍

帯静脈・臍帯動脈)と凍結保存の期間別(0, 7, 14, 21, 28日)に比較した。

4. 統計解析

2群間の比較はMann-Whitney検定で、多群間の比較はKruskal-Wallis検定(Steel法)で行った。相関分析はPearsonの積率相関分析で行った。

III. 研究結果

1. FoxP3⁺Tregの割合は、在胎40-41週(n=19)よりも24-27週(n=4, p<0.01)と28-31週(n=11, p<0.01), 32-35週(n=5, p<0.05)で有意に高く、CD127⁺Tregの割合は、在胎40-41週よりも24-27週(p<0.01)と28-31週(p<0.01), 32-35週(p<0.05), 36-37週(n=23, p<0.05)で有意に高かった。
2. FoxP3⁺Tregの細胞数は、在胎40-41週よりも24-27週(p<0.05)と36-37週(p<0.05)で有意に多く、CD127⁺Tregの細胞数は、在胎40-41週よりも24-27週(p<0.05)と36-37週(p<0.05), 38-39週(n=30, p<0.05)で有意に多かった。
3. FoxP3⁺TregとCD127⁺Tregの割合には強い相関がみられた(r=0.95)。
4. FoxP3⁺TregとCD127⁺Tregの割合は、帝王切開(n=42)と経膣(n=24)分娩、アレルギー疾患既往あり(n=17)となし(n=49), 臍帯静脈(n=10)と臍帯動脈(n=10)の間で有意差を認めず、凍結保存後28日(各n=12)まで有意な変化がなかった。

IV. 結語

Tregが早産児で高値を示したのは、免疫寛容の維持に重要な役割をもっているか、母体へのステロイド投与による影響と考えられた。Tregの特異的マーカーとして、FoxP3と同様にCD127も有用であった。正期産児のTregの割合は、分娩様式の違いや母体のアレルギー疾患既往の有無、臍帯の採血血管、凍結保存期間による影響を認めなかった。

V. 学位申請後経過

※1 最終審査後、Journal of Iwate Medical Association 67巻3号に2015年8月掲載予定。

※2 在胎週数別の比較をするに当たり、各在胎週数群、特に早産児の対象数で少ないところがあり、早産児の対象数を増やした。

II. 研究対象及び方法

1. 対象

当院と関連病院で出生した早産児26人(在胎24~36週)と正期産児66人(在胎37~41週)の計92人から臍帯血を採取した。早産児の19人の母親には、肺成熟促進のため副腎皮質ステロイド薬の筋注が行われた。

当院と関連病院で出生した早産児36人(在胎24~36週)と正期産児67人(在胎37~41週)の計103人から臍帯血を採取した。

※3 母体因子の関与についての検討を追加した。

II. 研究対象及び方法

3. 検討項目

~~—FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの細胞割合と細胞数について在胎期間別に比較し、また、FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの細胞割合について正期産児における分娩様式別（帝王切開・経膈分娩）と母親のアレルギー疾患既往の有無別に、また、一部の臍帯血で採血部位別（臍帯静脈・臍帯動脈）と凍結保存の期間別（0, 7, 14, 21, 28日）に比較した。~~

FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの細胞割合と細胞数について在胎期間別に比較した。また、FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの細胞割合について、正期産児における分娩様式別（帝王切開分娩・経膈分娩）と母親のアレルギー疾患既往の有無別に、早産児における母体の絨毛膜羊膜炎と妊娠高血圧症の有無別、および母体へのステロイド、塩酸リトドリン、硫酸マグネシウム投与の有無別に比較した。さらに、一部の臍帯血で採血部位別（臍帯静脈・臍帯動脈）と凍結保存の期間別（0, 7, 14, 21, 28日）に比較した。

※4 対象数が増加し、在胎週数区分を一定にしたことで統計結果が一部変更になった。

III. 研究結果

~~1. FoxP3⁺Tregの割合は、在胎 40-41 週 (n=19) よりも 24-27 週 (n=4, p<0.01) と 28-31 週 (n=11, p<0.01), 32-35 週 (n=5, p<0.05) で有意に高く、CD127⁻Tregの割合は、在胎 40-41 週よりも 24-27 週 (p<0.01) と 28-31 週 (p<0.01), 32-35 週 (p<0.05), 36-37 週 (n=23, p<0.05) で有意に高かった。~~

1. FoxP3⁺Tregの割合は、在胎 39-41 週 (n=28) よりも 24-26 週 (n=7) と 27-29 週 (n=13), 30-32 週 (n=7) で有意に高く（すべてp<0.01）、在胎 37-38 週 (n=39) よりも 24-26 週 (p<0.01) と 27-29 週 (p<0.01), 30-32 週 (p<0.05) で有意に高かった。CD127⁻Tregの割合に関しても、同様の結果が得られた。

~~2. FoxP3⁺Tregの細胞数は、在胎 40-41 週よりも 24-27 週 (p<0.05) と 36-37 週 (p<0.05) で有意に多く、CD127⁻Tregの細胞数は、在胎 40-41 週よりも 24-27 週 (p<0.05) と 36-37 週 (p<0.05), 38-39 週 (n=30, p<0.05) で有意に多かった。~~

2. FoxP3⁺Treg, CD127⁻Tregの細胞数は、在胎週数別に差はみられなかった。

~~3. FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの割合には強い相関がみられた (r=0.95)。~~

3. FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの割合には強い相関がみられた (r=0.96)。

※5 対象数の増加に伴い、各群別の対象数に変更になった。

~~4. FoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの割合は、帝王切開分娩 (n=42) と経膈分娩 (n=24), アレルギー疾患既往あり (n=17) となし (n=49), 臍帯静脈 (n=10) と臍帯動脈 (n=10) の間で有意差を認めず、凍結保存後 28 日 (各n=12) まで有意な変化がなかった。~~

4. 正期産児におけるFoxP3⁺TregとCD127⁻Tregの割合は、帝王切開分娩 (n=43) と経膈分娩 (n=24), アレルギー疾患既往あり (n=17) となし (n=50), 臍帯静脈 (n=10) と臍

帯動脈 (n=10) の間で有意差を認めず、凍結保存後 28 日 (各n=12) まで有意な変化がなかった。

※6 母体因子の関与についての検討を追加し、新たな結果が得られた。

III. 研究結果

5. 早産児におけるFoxP3⁺TregとCD127⁺Tregの割合は、母体に絨毛膜羊膜炎あり (n=10) となし (n=26), 妊娠高血圧症あり (n=4) となし (n=32) の間で有意差は認めず、母体ステロイド投与例 (n=29) では非投与例 (n=7) よりも (p<0.01), 塩酸リトドリン投与例 (n=27) では非投与例 (n=9) よりも (p<0.01), 硫酸マグネシウム投与例 (n=15) では非投与例 (n=21) よりも (p<0.05) 有意に高かった。

※7 新たな結果が得られたことから、結語の一部を変更した。

IV. 結語

~~Tregが早産児で高値を示したのは、免疫寛容の維持に重要な役割をもっているか、母体へのステロイド投与による影響と考えられた。Tregの特異的マーカーとして、FoxP3と同様にCD127も有用であった。正期産児のTregの割合は、分娩様式の違いや母体のアレルギー疾患既往の有無、臍帯の採血血管、凍結保存期間による影響を認めなかった。~~

Treg 割合は正期産児よりも早産児で高値を示し、免疫寛容の維持に重要な役割をもっている可能性が考えられた。また、早産児の Treg 割合は母体へのステロイド、塩酸リトドリン、硫酸マグネシウムの投与例が非投与例よりも高値を示した。これらの薬剤投与は在胎期間の短い例に多いため、Treg 割合の高値は在胎期間による影響の可能性もある。Treg の特異的マーカーとして、FoxP3 と同様に CD127 も有用であった。正期産児の Treg の割合は、分娩様式の違いや母体のアレルギー疾患既往の有無、臍帯の採血血管、凍結保存期間による影響を認めなかった。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 小山 耕太郎 (小児科学講座)
副査 准教授 遠藤 幹也 (小児科学講座)
副査 講師 村井 一範 (内科学講座: 血液・腫瘍内科分野)

免疫寛容の維持に関与している制御性 T 細胞 (Treg) は、自己免疫や炎症、腫瘍免疫、感染免疫などについて研究されてきたが、早産児と正常産児の臍帯血で詳細に検討した報告はない。本研究では、Treg の特異的マーカーである FoxP3 と CD127 について早産児と正常産児の臍帯血を用いて測定し、また、それらの発現に影響を与える因子について検討した。この結果、臍帯血中の Treg は正常産児よりも早産児が多かった。このことは Treg が早産児の免疫寛容の維持に重要な役割を担っているか、母体への副腎皮質ステロイド薬投与による影響を示唆している。また、正常産児の Treg は分娩様式の違いや母体のアレルギー疾患既往の有無、臍帯の採血血管、検体の凍結保存の有無により有意差がないことを示した。

本論文は、早産児と正常産児の臍帯血中 Treg に関して新たな知見を示したものであり、学位に値する。

試験・試問の結果の要旨

免疫系の発達と分化、制御性 T 細胞の役割と病態、制御性 T 細胞の分子マーカーなどについて試問し、適切な解答を得た。学位に値する学識があることを認めた。

参考論文

- 1) 東日本大震災が気仙医療圏の小児医療に与えた影響とこれからの課題
(林 祐子, 他 7 名と共著)
岩手県立病院医学会雑誌, 51 巻, 2 号 (2011) : p87-92.
- 2) 小児の感染症と川崎病における好中球 CD64 発現量の検討
(朝倉賀子, 他 4 名と共著)
岩手医学雑誌, 65 巻, 4 号 (2013) : p285-292.