



〔最終講義〕 小児科医40年の臨床と研究を振り返って： 次世代に伝えたいこと



下条直樹

(2020年10月31日受付, 2020年12月10日公表)

はじめに

本来は2020年3月10日に最終講義をさせていただく予定でしたが、コロナウイルスの影響で9月8日に大学内小児科医局員を前に附属病院3階のガーネットホールで十分なソーシャルディスタンスを取る形で最終講義を行いました。この講義は、YouTubeにアップされていてどなたでも見ることができます (https://youtu.be/_veHPJSfn1U)。本稿では、その抜粋をご紹介します。当日においでいただいた先生方に加えて、小児科入局後現在まで大変多くの先生方にお世話になりました。本紙面をお借りして、厚く御礼を申し上げます。

さて、自分自身が最終講義なるものを行う機会をいただいたことに少し驚きとためらいを感じるというのが正直なところでした。最終講義はその研究者の集大成を話すことでもあるのですが、自分自身の研究に集大成などというものがそもそもないのではないかと感じる場所が大きかったからです。一方、今までの最終講義は本来学生向けのものであるにもかかわらず、実習などとも重なり、聴講する学生が決して多くはありませんでした。せっかく教授が歩んできた臨床や研究の足跡を知ることができるのにとてももったいないと感じていました。そこで、私の最終講義は、千葉大学医学部の学生が卒業後に研究にも興味を持ってもらえるように、自分なりにど

のように考えて進んできたのかがわかるような内容にしようと考えました。最後に学生と若い医師に伝えたいことを挙げました。

小児科そして専門領域の選択

当時はストレート入局でした。私は卒後、小児科を選びました。その理由は、まず、小児科が総合的な診療科であることだったと思います。現在でも、大学の小児科には7つのグループがありますけれども、相互に連携しあって決して臓器だけを診るようなことはなく全体を診ることを忘れないようにしています。2番目は、子どものダイナミズム・生き生きさ (vividness, liveliness) です。成長・発達にともない、いくつもの遺伝子がオンあるいはオフになり、どんどん変わっていく、そのレギュレーションというのがものすごく面白いと思います。また、子どもは、普通、悪いところが1つあって病気になります。ですからそれをうまく治してあげるとそのまま元気になって帰ってくれます。医師としては、大変やりがいがあるわけです。その当時は、小児科に入った年末には7つある研究班のどれかに入って専門性を進めていくという仕組みになっていました。研究班を決めるにあたって、私自身が何を考えたかということですが、疾病における個体差、生体恒常性 (ホメオスタシス)、生体防御系などに興味があったことから、アレルギー班にいられていただきました。

千葉大学大学院医学研究院小児病態学

Naoki Shimojo. Looking back on 40 years of clinical practice and research by a pediatrician: a message to the next generation.

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Phone: 043-226-2144. Fax: 043-226-2145. E-mail: shimojo@faculty.chiba-u.jp

Received October 31, 2020, Published December 10, 2020.

小児科に入って3年経った時の1982年に、河野陽一先生がアメリカでの3年間の留学を終えて帰国されました。河野先生は、ある抗原に対してマウスやヒトが免疫反応をするかしないかに関わる遺伝子（免疫応答遺伝子：現在では一般的には主要組織適合抗原、ヒトではHLA）をテーマとして研究をしてこられていました。そして帰局後は、中島教授のもと教室の内分泌班が精力的に診療していた自己免疫性内分泌疾患である橋本病の自己抗原認識機構の解明を研究のテーマのひとつにされました。私自身に与えられたテーマは、橋本病の自己抗原であるチログロブリンに反応するT細胞の認識する抗原決定基（エピトープ）を、異なる動物種由来のチログロブリンへの応答性から解析する、というものでした。この過程で、細胞培養、タンパク精製、マウスの扱いかた、など細胞生物学の基本的な手技を習得することができました。この当時は大学院がなかったのですが、臨床の合間を縫いつつ毎日深夜まで実験を行っていました。河野先生には、今の大学院生以上に大学院生らしい研究指導をいただきました。1987年に中島教授から学位（乙：論文博士）をいただきました。研究テーマの根っこは若い時の影響が大きいですと言われます。私の場合には、大きくは生体のホメオスタシスのメカニズム、免疫に絞れば外界からの刺激に対する反応の違いと疾病の関連、に対する興味は今まで続く研究のテーマになっていると思います。

研究におけるつながり・縁

学位取得後、河野先生のご紹介で、米国NIHで学ぶ機会をいただきました。ボスは、William E Biddison博士です。Billは、インフルエンザウイルス感染細胞に対するCD8陽性キラーT細胞の分子認識機構を研究しており、私もそのプロジェクトに入りました。Billと同じNIH内で彼の共同研究者であるJohn E Coligan博士にも様々な指導をいただきました。またこの時、NIHには千葉大学免疫学教室から篠原信賢先生、齊藤隆先生らの先生が留学中で、大変お世話になりました。また、同級生の田原和夫先生もバセドウ病研究で有名なLeonard D Kohn先生のラボに留学中でした。これらのご縁が帰国後の自分自身の研究に大きく関連することになります。帰局後は、1994年からの4年間の下志津病院小児科勤務を挟んで定年まで大学小児科にて臨床と研究に従事しました（図1）。研究は、大きく、実験バセドウ病の病態解析、RSウイルス感染症・小児アレルギー疾患におけるCD4+T細胞の抗原認識機構・機能解析、そしてコホートを対象とするアレルギー発症因子の解析、の3つにわけられます。実験バセドウ病の確立には田原先生、Len、齊藤隆先生から、アレルギー特異的T細胞の研究にはBill、Johnらのサポートを受けました。厚生労働省アトピー性皮膚炎研究班に属したことから、アトピー性皮膚炎から始まるアレルギーマーチの解明のためにコホート調査を立ち上げる必要を感じました。厚生労働省研

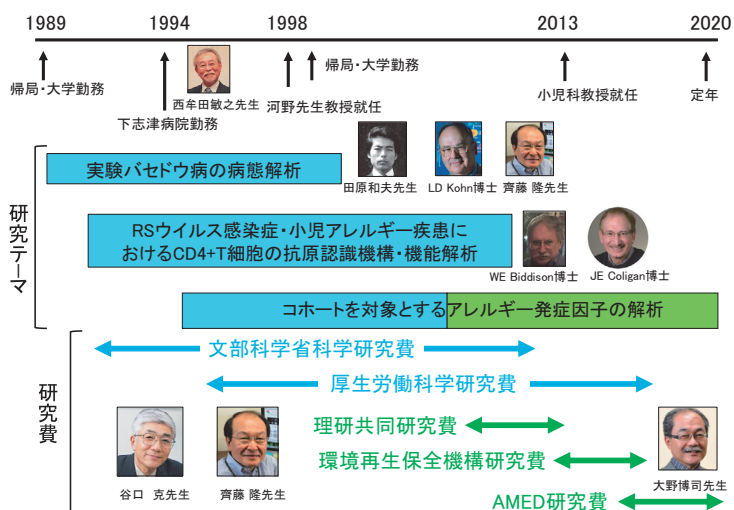


図1 留学から帰国後の臨床・研究のテーマ

究班の研究費を基にいくつかの出生コホートを立ち上げて乳児期のアトピー性皮膚炎の発症因子のいくつかを同定することができましたが、長期間のフォローができるコホートの設定は難しく、また血清などの生体試料を採取することはできていませんでした。そんな時に、谷口克先生、齋藤隆先生のおられる理化学研究所との共同研究費、その後はAMED研究費（理研大野先生との共同研究）などの取得ができ、出生コホート研究を定年の年度まで続けることができました。本当に周りに恵まれたと感じています。

研究のあゆみと内容の紹介

1) 臓器特異的自己免疫疾患の発症機構の解明

どんな疾患もそうですが、動物モデルの存在は病態の解明に非常に重要です。しかし、橋本病と異なり、バセドウ病の動物モデルは何十年もできていませんでした。甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) の遺伝子がクローニングされた後も、内分泌の研究者がTSHRの細胞外ドメインやペプチドを免疫しても全く甲状腺機能亢進症を誘導することができていませんでした。私自身はバセドウ病の免疫応答においてはTSHRの高次構造の認識が重要ではないかと考えました。そこで、TSHRを発現する細胞そのものを免疫するという方法を考えました。この方法では高次構造を保った自己抗原を免疫系に提示できます。抗原提示という点で、TSHR発現細胞が主要組織適合抗原（マウスではH-2）を有することが重要と考え

てTSHRとI-A^K分子の2つを発現する細胞を作成しました。するとTSHRとI-A^K分子の両方を発現する線維芽細胞の免疫でのみTSHRに対する抗体が産生され、およそ30%のマウスに甲状腺ホルモンの高値とともに著明な甲状腺腫大が誘導されました（図2）。組織学的にもバセドウ病に類似の形態が認められました。TSHRとI-A^K分子の両方を発現する線維芽細胞を免疫したマウスの脾細胞（T細胞）の線維芽細胞に対する増殖をみると、TSHRあるいはI-A^K分子のどちらかだけを発現する細胞には反応せず、両者を発現する細胞のみに増殖したことから（図3左）、この系ではおそらくTSHR由来のペプチドとI-A^K分子の複合体を認識するT細胞が誘導されていることが示唆されました。以上の結果から、我々は、図3の右に示すように、TSHRを発現する甲状腺濾胞細胞がウイルス感染などによりクラスII分子を発現して、自己反応性T細胞およびB細胞に抗原提示を行ってバセドウ病発症に至るという仮説を提示しました。

2) アレルギーの病態解明

免疫アレルギー班の臨床では、まだまだ病態も不明で患者数が増えている食物アレルギーの免疫学的機序についての研究がテーマでした。我々は食物アレルゲン反応性T細胞の抗原認識と機能解析を目的として、患者さんから食物アレルゲンを特異的に認識し反応するCD4陽性T細胞株の樹立を試みました。図4には、我々がおそらく世界で初めて報告した、鶏卵アレルギーのお子さん

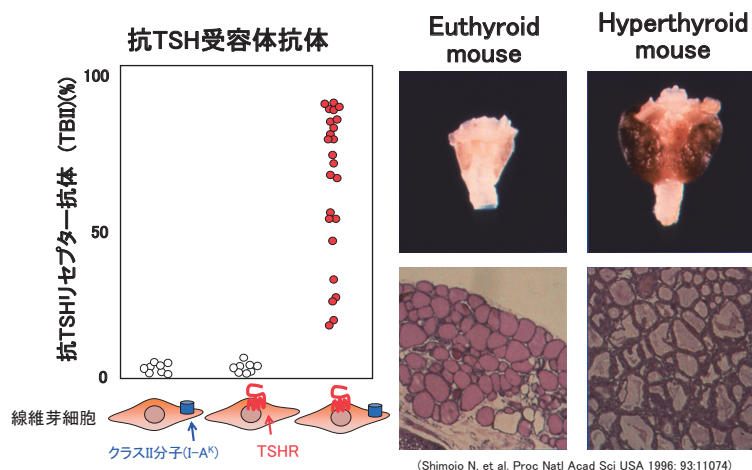


図2 TSH受容体・クラスII分子発現線維芽細胞免疫による甲状腺機能亢進症マウスモデル

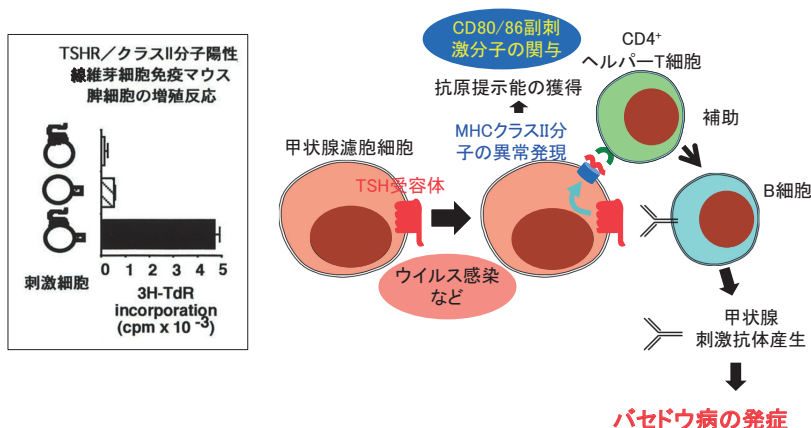
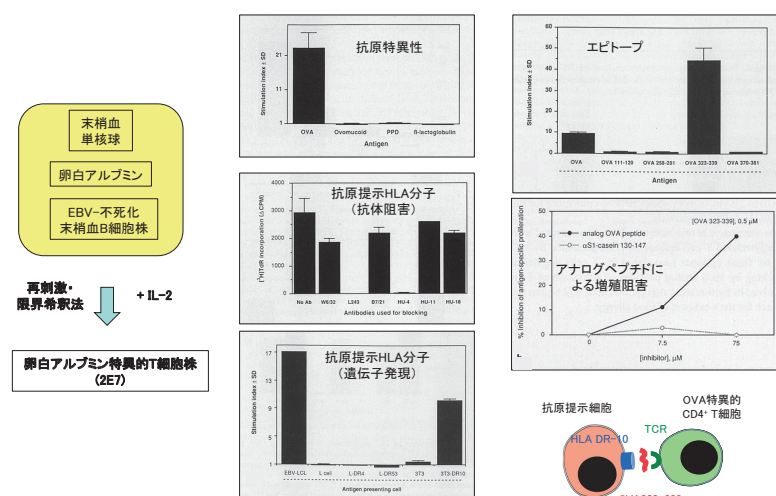


図3 バセドウ病の発症メカニズム (仮説)



(Shimojo N. et al. Int Arch Allergy Immunol 1994;105:155)

図4 鶏卵アレルギー患者末梢血単核球からの卵白アルブミン特異的CD4+T細胞株の樹立と認識機構の解析

の末梢血単核球から樹立した卵白アルブミン特異的T細胞株2E7の抗原認識機構を示しています。小児から大量の血液をいただくことはできませんので、我々はまず末梢血単核球にEBウイルスを感染させて、不活化B細胞株を樹立しました(図4左)。B細胞はクラスII分子を発現しており、抗原提示細胞として働くことができます。不活化B細胞株をマイトマイシンC処理して増殖能を止めて抗原提示細胞として使用します。患者さんから2度目の採血をさせていただき、不活化B細胞株、卵白アルブミンと末梢血単核球をIL-2存在下で培養し、数回のサイクル後に限界希釈法でクローンを取ろうとしました。残念ながら単クローン性のT細胞株はとれず、オリゴクローンである2E7を樹立しました。2E7は、フローサイトメトリーでCD4陽性、IL-5を産生するTh2細胞

株であり、OVAのみに増殖し、HLAクラスIIのDR、DP、DQ分子のうちDR分子に対する抗体のみで増殖が100%阻害されています。DR10を発現する線維芽細胞に対する増殖反応からDR10拘束性であることがわかりました(図4中央)。さらにマウスでわかっていた既存の卵白アルブミンのT細胞エピトープを含むいくつかの合成ペプチドへの反応から、アミノ酸部位323-339の合成ペプチドがT細胞エピトープであることが判明しました。このOVA 323-339のアミノ酸を少しだけ変化させてDR10への結合は保たれてもT細胞リセプターが認識できないアナログペプチドを抗原提示細胞と混ぜておくと、OVA 323-339へのT細胞の反応が抑制されました(図4右)。すなわち、T細胞エピトープを標的とする治療法の可能性が示されました。実臨床でこのようなアプ

ローチが現実的に可能かを見るために、2E7の時と同じ手法で、複数の鶏卵アレルギー患者さんから複数の卵白アルブミン特異的T細胞株を樹立しました。ほとんどすべてのT細胞株がIL-4あるいはIL-5を産生するTh2型の細胞であることがわかりました。卵白アルブミンの385アミノ酸残基のすべてをカバーする187のオーバーラッピングペプチドを合成してエピトープを同定しました。その結果、DR分子が主な抗原提示分子であること、しかし、すくなくとも3種の異なるエピトープがあることがわかりました。これらの結果から、実臨床で多くの食物アレルギー患者さんを対象として、HLA抗原提示分子とエピトープを同定して治療をするということは、エピトープの多様性や労力の点から、容易ではないと考えました。そこで、アレルギー特異的Th2細胞の機能の解析とそれに基づく治療ができないかと考えました。

当時、基礎免疫学の研究で、腸管へのリンパ球の移動にはT細胞上の $\alpha 4\beta 7$ インテグリンと呼ばれるホーミングレセプターが重要な役割を担っていることが明らかになっていました。そこで、ヒトの $\alpha 4\beta 7$ インテグリンに対するモノクローナル抗体を海外の研究者から送ってもらい、牛乳アレルギーで下痢をする小児の末梢血単核球を牛乳の主要なアレルギーであるカゼインで刺激して、活性化T細胞上に誘導される $\alpha 4\beta 7$ インテグリン発現をフローサイトメトリーで評価しました(図5)。すると健康児ではほとんど誘導され

ないのに対し、牛乳アレルギーで腸炎を起こす乳児では $\alpha 4\beta 7$ インテグリンが高発現してくることがわかりました。また、この発現を指標に牛乳アレルギーの寛解を客観的に評価することができました。ついで、食物アレルギーに対するT細胞のホーミングをアトピー性皮膚炎患者で解析しました。幼児以降ではCutaneous lymphocyte antigen (CLA)が、乳児では $\alpha E\beta 7$ インテグリンの関与が大きいことを明らかにしました。現在、ホーミングレセプターに対する介入は炎症性腸疾患の治療法として実用化されています。食物アレルギーによる難治性消化管症状にこの抗体が用いられる日も来ると思います。

3) アレルギーの予防を目指して: コホート研究

食物アレルギーやアトピー性皮膚炎の研究をしている中で、厚労省アトピー性皮膚炎研究班での記述疫学研究のみでは不十分で、生体試料や遺伝子を調べる分子疫学、そしてアレルギー疾患の発症に関わる因子の同定と介入を行う必要を感じました。いわゆるコホート研究は多くの時間と労力がかかり、研究者としては効率の良い研究手法とはいえません。やらない方がいいとの助言もいただきました。特にアレルギー疾患は非常に多くの環境因子の関与があり、実際いまだに効果的な予防法は確立されていません。しかし、どのような疾患もそうですが、なってしまった疾患を治すより、軽症からの重症化進展を防ぐこと、さらに発症そのものを予防することがもっとも良い方法で

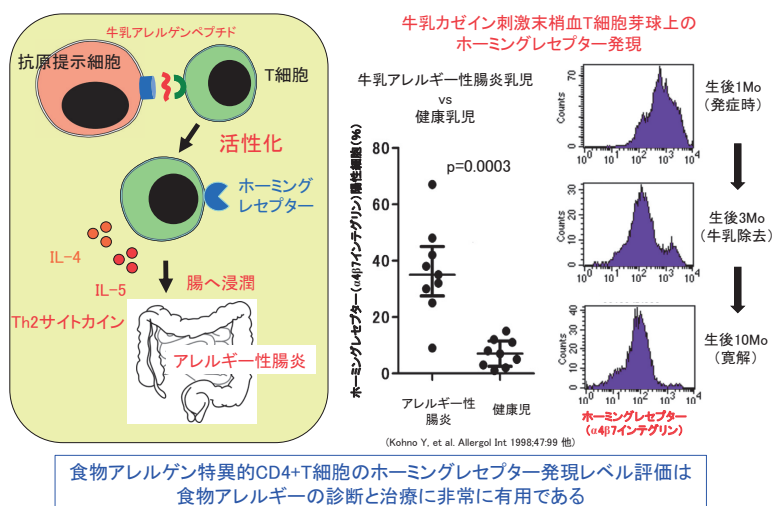


図5 牛乳アレルギー特異的CD4⁺T細胞の標的臓器特異性解析

あることは間違いありません。ご存知のように、アレルギー疾患はこの30年間で著明に増加しています。遺伝子そのものはかわっていないでしょうから、発症には環境因子が大きく関与することは確かです。ただ、アレルギー疾患の発症には世界各地で共通の因子もあるでしょうが、地域によりその重みに差がある可能性があります。臨床的な介入の効果を考えるなら、日本で出生コホートを自ら立ち上げる必要があると考えました。そこで、理化学研究所との共同研究として、千葉市での出生コホートを立ち上げました(図6)。ここに示すように、できる限り多くの生体試料を採取しています。このCHIBA studyでの研究成果の一部を紹介します。まず、皮膚黄色ブドウ球菌の定着とアトピー性皮膚炎発症の関係です(図7)。本コホートでは生後1か月と6か月の時点でスタ

ンプ型培地により頬部の黄色ブドウ球菌定着の有無とコロニー数を見えています。この図にあるように、生後1か月でも6か月でも多くの児の頬部に黄色ブドウ球菌が検出されていますが、生後6か月での定着のみが1歳でのアトピー性皮膚炎と関連していました。興味深いことに、生後1か月で黄色ブドウ球菌が定着していた児をアトピー性皮膚炎発症群と非発症群に分けて菌数の変化をみると、アトピー性皮膚炎非発症児では菌数が減少しているのに対し、アトピー性皮膚炎発症児では減少がみられません。すなわち、アトピー性皮膚炎を発症するお子さんで皮膚に黄色ブドウ球菌が定着し続けてしまっていることとなります。我々は検出された黄色ブドウ球菌を全て保存していたので、共同研究者の皮膚科松岡悠美先生が、すべての菌の遺伝子を解析してアトピー性皮膚炎発症に

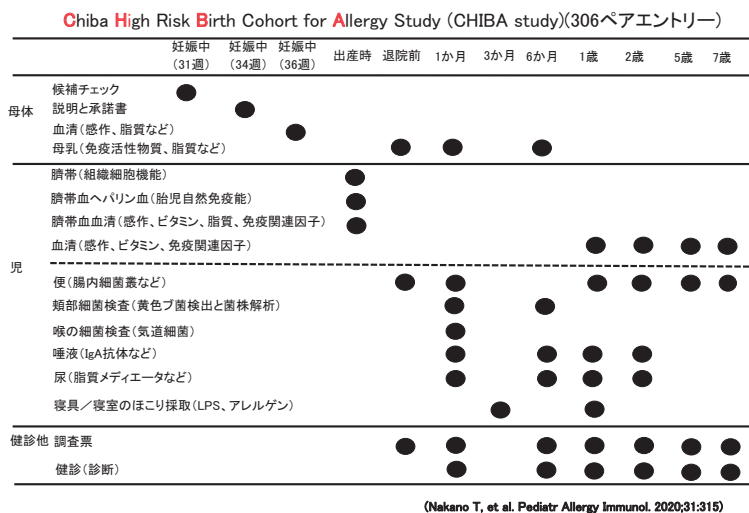


図6 アレルギー発症関連因子探索のための出生コホート

	1歳でのAD (%)	補正オッズ比 (95%CI)	p-value
生後1か月定着			
なし (n=165)	24 (14.6%)	1	
あり (n=103)	17 (16.5%)	1.056 (0.517-2.199)	0.882
生後6か月定着			
なし (n=135)	8 (5.9%)	1	
あり (n=133)	33 (24.8%)	5.433 (2.469-13.332)	<0.001

児の性別、年長兄弟の有無、出産様式、父親のアレルギー歴、母親のアレルギー歴、4か月までの栄養方法で補正

(Nakamura Y, et al. *Sci Transl Med* 2020;12:eaay4068)

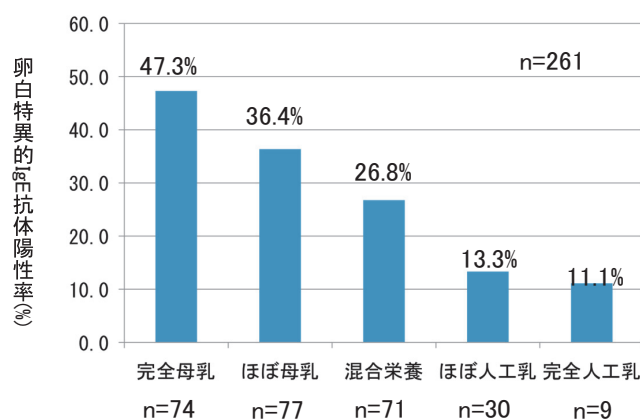
図7 生後1か月と6か月の黄色ブドウ球菌の定着と1歳時のアトピー性皮膚炎(AD)(CHIBA study) - 多変量解析 -

は黄色ブドウ球菌のクオラムセンシングを担う Agr 遺伝子の存在が重要であることを明らかにされました。Agr に変異が入った黄色ブドウ球菌はマウスに定着できず、炎症を起こすことができません。Agr 遺伝子発現を標的とする新規のアトピー性皮膚炎発症予防法の確立につながるものであると思います。CHIBA study では先に述べたように糞便の解析も理研の大野博司先生が進めておられ、今後、アレルギー発症と腸内細菌叢・代謝物の関連に新しい知見が得られることを期待しています。

もうひとつ、紹介したいのは母乳とアレルギーの関連です。図8は、CHIBA studyにおける乳児期栄養法と1歳での卵白感作の関係です。世界的には、「母乳栄養はアレルギーを予防する」との研究が多いのですが、我が国での最近の横断的疫学研究では母乳栄養がアトピー性皮膚炎の発症リスクになっているとする結果が多く報告されています。我々のCHIBA studyでは、母乳栄養であるほどアレルギー感作率が高くなるという結果で多変量解析でも有意でした。我々は母乳中の免疫活性物質の多寡がアレルギー発症やアレルギー感作に関連するとの仮説をたて、母乳中の免疫活性物質を測定しました。母乳中には、アレルギー発症を抑制する因子も、促進する因子も含まれていると考えられます。そのバランスが発症や感作に関連するという仮説です。我々は、コホートで採取した母乳中の可溶性CD14 (sCD14) が多いとアトピー性皮膚炎発症が抑制されること

を示しました。sCD14は自然免疫細胞である樹状細胞上にも発現する Toll like receptor 4 (TLR4) のコリセプターです。腸内には常在細菌叢の一部としてグラム陰性菌が存在します。このグラム陰性菌の成分である Lipopolysaccharide (LPS) は TLR4 により認識されて免疫系の発達につながると考えられています。母乳中の sCD14 は LPS の TLR4 への結合の結合効率を上げることにより児の腸管免疫の発達(すなわち、Th2細胞の抑制、Th1やTreg細胞の分化)を促進する可能性があります。また、母乳栄養児ではビタミンD (VD) 不足になりやすいのですが、実際に、1歳での卵白感作と1歳での血中VD低値の関連は多変量解析で有意であることがわかりました。現在、VDによる感作の予防が可能か否かについて、新生児から生後6か月までのVD摂取による卵白感作の予防効果を評価するランダム化ダブルブラインド試験 (D-PAC study) を開始しています。

母乳中にはアレルギーを促進する免疫活性物質もあります。ここでは、広島大学免疫学の菅野雅元先生との共同研究について紹介したいと思います。菅野先生は、我々が千葉市で設定した出生コホートで収集した初乳中のDAMPs活性を測定しました。DAMPsとは danger-associated molecular patterns の略で、ダメージを受けた細胞や細胞外基質から放出される成分で、炎症を司る重要な細胞内タンパク複合体であるインフラマソームを活性化することができる炎症誘導物質の総称です。菅野先生は、アトピー性皮膚炎を発症



母乳の割合が高い程、卵白特異的IgE抗体陽性率が高い

(Nakano T, et al. Pediatr Allergy Immunol 2020;31:315)

図8 4か月までの栄養法と卵白特異的IgE抗体陽性率 (CHIBA study)

した乳児に与えられた母乳中のみDAMPs活性が存在することを見出しました(図9)。そして母乳中の成分を統計的手法と質量分析により解析し、DAMPs活性を示す物質が飽和脂肪酸であることを明らかにしました。菅野先生は、マウスの系で飽和脂肪酸を摂取している母マウスの母乳で育った仔マウスがアトピー性皮膚炎様の皮膚炎を発症し、IgEも上昇することを明らかにしています(投稿中)。母乳中の免疫活性物質は母体の摂取する食品や栄養素に左右されることから、母体の食事への介入により児のアレルギーの予防が期待されます。母乳中の免疫活性物質は、乳児の免疫系のみでなく腸管上皮などにも作用し、その成熟やバリア機能に影響を与える可能性も大きく、母乳中の生理活性物質の解析は今後の母子保健において大きな研究テーマになると思います。

医師のキャリアに大事なこと(私見)

私は、自分自身や周りを見渡しての経験から、「リサーチマインドは、リサーチをしないとできない」と考えるようになりました。いわゆるフィジシャン・サイエンティストやリサーチフィジシャンのトレーニングはしかるべき環境でないとできません。それには、やはり大学院が大切だと思います。千葉大学は歴史がある総合大学です。この素晴らしい環境を生かして、千葉大学の大学院で研究というものに触れて欲しいと思います。最後に私から次世代に伝えたいことをいくつか挙げてみました(図10)。本最終講義が千葉大学医学部生そして若手医師に研究の楽しさを伝えることができたら幸せです。

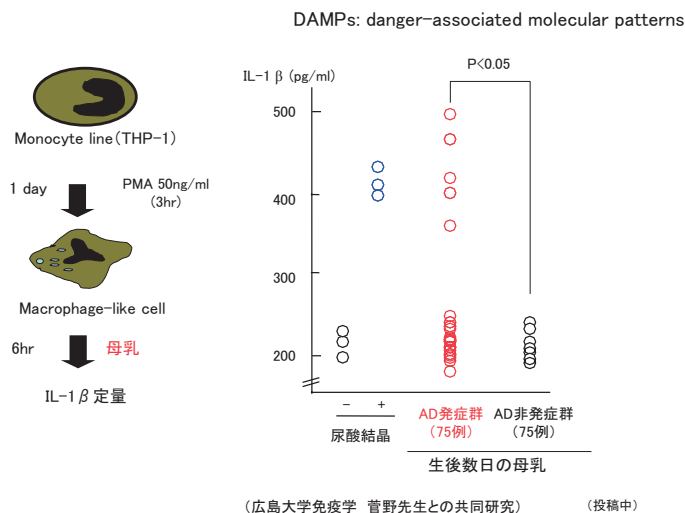


図9 生後6か月でのアトピー性皮膚炎と母乳中DAMPs活性

- ・ 継続の重要性(疑問・興味を持ち、自らやること)
- ・ 良い師に会う・良い仲間を作る(伝統・個人から組織へ)
- ・ 今いる場所ですら懸命(人は見ている)
- ・ 失敗してもやりなおすことができる(諦めない)
- ・ 人と比べない(人に振り回されない)
- ・ 苦手な人も経験のひとつ(フェアであること)
- ・ 医学のみでは医療としては不十分(リベラルアーツも)
- ・ 豊かな人生(感謝と畏怖を大事に)

図10 次世代に伝えたいこと