

称号及び氏名	博士（獣医学）	橋本 愛
学位授与の日付	平成30年8月31日	
論文名	膵線維化におけるマクロファージ及び筋線維芽細胞の免疫表現型に関する病理学的研究	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	岡田 利也
	副査	杉浦 喜久弥

論文要旨

緒言

膵臓は消化酵素を含む膵液を十二指腸に分泌する外分泌腺の機能と、また、インスリンやグルカゴンを血中に分泌する内分泌腺としての機能を併せ持つ、生体にとって重要な器官である。

慢性膵炎は急性膵炎から進展する進行性の難治性疾患とされ、病理組織学的には炎症細胞浸潤と線維化により特徴付けられる。初期症状としては数日間続く激しい腹痛が、さらに進行すれば消化吸収障害から消瘦及び下痢がみられる。また、内分泌腺の機能低下から糖代謝異常が生じ続発性糖尿病に陥るとされ、さらに、膵臓癌のリスクファクターであることも知られている。しかし、現在、慢性膵炎に対しては対症療法が主であり、根本的な治療法は確立されていない。

線維化は、組織傷害後の修復機転であり、そのメカニズムについては肝線維化や腎線維化において主に研究が行われている。しかし、その病理発生機序の全貌は未だ解明されていない。

傷害された部位に出現するマクロファージは多様な機能を現すとされる。近年、そのような病的部分に出現するマクロファージの機能特性に対して **M1** 型/**M2** 型分極化の概念が提唱された。**M1** 型マクロファージは組織傷害や炎症を助長し、一方 **M2** 型マクロファージは組織の修復に係るとされる。線維化におけるマクロファージの多様な機能特性については、未だ解明すべき点が多い。

筋線維芽細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質を産生することで、線維化の進展に係るとされる。この筋線維芽細胞は、免疫組織化学的に、**vimentin**、**desmin** や α -平滑筋アクチン (α -SMA) といった細胞骨格を、その形成程度において様々な割合で発現するとされ、特に、よく発達した筋線維芽細胞では α -SMA を発現する。筋線維芽細胞は、肝線維化においては肝星細胞から形成されると考えられている。近年、膵臓においても、肝星細胞と類似する膵星細胞の存在が報告され、膵線維化への関わりが示唆されているが、その役割については不明な点が多い。

本研究では、膵線維化に関わるマクロファージと筋線維芽細胞の特性を、主に免疫組織化学的手法を用いて解析し、その病理発生機序の一端を解明することを目的とした。第 1 章では、イヌ及びネコの自然発生性膵線維化病変を用いて、筋線維芽細胞の特性を中心に解析した。第 2 章では、第 3 章での薬物誘発ラット膵線維化の病態を理解するために、ラットの膵発生過程における間葉系細胞の免疫表現型の特性を追究した。第 3 章では、**dibutyltin dichloride** を用いて薬物誘発ラット膵線維化モデルを作製し、マクロファージと筋線維芽細胞の特徴を解析した。

第 1 章 イヌ及びネコの自然発生性膵線維化の病態解析

2005 年から 2011 年に剖検に供されたイヌ 12 例及びネコ 2 例から膵臓を採取し、膵臓の病理変化を解析し、線維化のグレードを 5 段階（－、±、＋、2＋、3＋）に分けた。これらのサンプルを用いて筋線維芽細胞が発現する細胞骨格である **vimentin**、グリア細線維性酸性蛋白質 (**GFAP**) 及び α -SMA に対する免疫染色を行うとともに、浸潤マクロファージを **Iba-1** で、膵管上皮の増生をサイトケラチン **19 (CK19)** で評価した。その結果、線維化のグレードに伴い、**vimentin**、**GFAP** 及び α -SMA 陽性筋線維芽細胞が増加し、加えて **Iba-1** 陽性マクロファージも増加した。自然発生性膵線維化の増悪にマクロファージと筋線維芽細胞が関与すること、そしてその筋線維芽細胞の一部は **GFAP** 陽性であり、膵星細胞に由来する可能性が示された。なお、膵線維化に伴い **CK19** 陽性の膵管上皮の増生（過形成）が生じることが分かった。

第 2 章 ラットの膵発生過程における間葉系細胞の免疫表現型の解析

F344 ラットの胎齢 18、20 日、生後 1、8、12、15 及び 21 日齢の膵組織を採取し、**vimentin**、**desmin**、**GFAP**、 α -SMA 及び **Thy-1** に対する免疫染色を施した。その結果、**vimentin** と **desmin** 陽性細胞は、胎生期から生後初期に多く見られ、生後組織形成が進むにつれて減少した。また、二重蛍光免疫染色により **vimentin** と **desmin** 陽性細胞の多くは、それらの細胞骨格を共発現していることが分かった。一方、未分化間葉系幹細胞に発現する **Thy-1** は生後一過性に発現することが示された。また、発生期間を通じて、**GFAP** 陽性細胞は一定数が常に存在した。以上の間葉系細胞は、膵組織のモデリングにおいて支持細胞として貢献していると考えられた。一方、膵線維化に出現する筋線維芽細胞に

特徴的に発現するとされる α -SMA 陽性の間質細胞は認められなかった。

第3章 薬物誘発ラット膵線維化の病態解析

第1節 Dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発膵線維化の病態解析

8週齢のF344ラットにDBTC(4及び8mg/kg)を単回静脈内投与し、投与後1、3、7、及び15日に膵組織を採取し、解析した。その結果、投与量に拘わらず腺房細胞の萎縮、膵小葉間の浮腫、炎症細胞浸潤、膵管増生と線維化が様々な程度で認められた。よって、その病変の出現程度により、線維化のグレードを軽度(+)、中程度(2+)、高度(3+)の3段階に分けて評価した。このサンプルを用いて、マクロファージ及び筋線維芽細胞の特性解析を進めた。また、オートファゴゾームのマーカーであるLC3Bを用いて、本サンプルを解析したところ、正常なラット膵組織においては、外分泌腺細胞の多くにLC3Bに対する微細顆粒状の陽性反応が見られた。外分泌腺細胞のLC3B陽性反応は、DBTC誘発膵線維化のグレード+では対照群と同程度であったが、2+のサンプルでは出現がやや低下し、かつLC3B陽性の大型の顆粒や空胞が見られた。さらに、膵線維化グレード3+ではLC3B陽性反応はみられなくなった。この空胞は、処理できない細胞内残屑が溜まったオートファゴゾームとされることから、線維化に伴い、オートファジーはその機能が障害されていることが示唆された。

第2節 マクロファージの特性解析

ラットDBTC誘発膵線維化病変を用いて、マクロファージの機能特性を解析した。その結果、膵線維化グレードが高度になるに伴って、CD68発現M1型マクロファージが早期に出現し、続いてCD163発現M2型マクロファージが増加し始めることが分かった。また、二重蛍光免疫染色により、CD68とCD163の両方を発現するマクロファージが44%存在しており、これはM1型からM2型へとシフトする所見と考えられた。さらに、MHCクラスII、CD204、Iba-1発現マクロファージが観察され、これらマクロファージも膵線維化のグレードとともに増加することが示された。二重蛍光免疫染色によりMHCクラスIIはCD68発現M1型マクロファージに、CD204はCD163発現M2型マクロファージに分極化していることが分かった。さらに、M1型マクロファージ関連因子であるIL-6、IL-1 β 及びMCP-1と、M2型マクロファージ関連因子であるIL-4とIL-10が、膵線維化のグレードが高度になるに伴って増加する傾向が見られた。

第3節 筋線維芽細胞の特性解析

ラットDBTC誘発膵線維化のグレード増加に伴ってvimentin、desmin、 α -SMA、GFAP及びThy-1を発現する細胞が増加した。線維化グレード2+を用いた蛍光二重免疫染色により、vimentin、desmin及びGFAP発現細胞の半数以上が α -SMAを共発現していた。vimentinやdesminを発現する間葉系細胞が細胞外基質を産生する α -SMA発現筋線維芽細胞に転換していること

が示された。また、**GFAP** 発現腭星細胞から筋線維芽細胞が誘導され、線維化の進展に重要な働きをしていると考えられた。さらに、**Thy-1** 発現の未分化間葉系幹細胞が筋線維芽細胞の起源となる可能性が示された

総括

本研究では、イヌ及びネコの自然発生性腭線維化病変と、ラット **DBTC** 誘発腭線維化病変におけるマクロファージと筋線維芽細胞の特性を免疫組織化学的に解析し、以下の成果を得た。

1. イヌ及びネコの自然発生性腭線維化病変において、浸潤マクロファージの増加と、それに伴い、**vimentin**、**GFAP** 及び **-SMA** 陽性の筋線維芽細胞が増加することが分かった。
2. ラットの腭発生過程の胎仔期から生後初期にかけて **vimentin** と **desmin** を発現する筋線維芽細胞の特性を備えた間葉系細胞が増加し、かつ発生期間を通じ **GFAP** 発現腭星細胞が存在することが分かった。
3. ラット **DBTC** 誘発腭線維化において、線維化の進行に伴い **CD68** 発現 **M1** 型マクロファージがまず出現し、その後 **CD163** 発現 **M2** 型マクロファージが増加することが分かった。
4. ラット **DBTC** 誘発腭線維化において、**Iba-1**、**MHC** クラス II と **CD204** 陽性マクロファージも同様に線維化に伴い増加し、特に **MHC** クラス II 発現細胞は **M1** 型マクロファージに、**CD204** 発現細胞は **M2** 型マクロファージに分極化することが分かった。
5. ラット **DBTC** 誘発腭線維化では、イヌ及びネコの自然発生性腭線維化と同様に、**vimentin**、**desmin**、**GFAP** 及び **-SMA** を発現する筋線維芽細胞が増加することが分かり、これら細胞が線維化に関与すること、そして **GFAP** 陽性腭星細胞がその形成に係わることが分かった。
6. ラット **DBTC** 誘発腭線維化では、**Thy-1** 陽性の未分化間葉系幹細胞が線維化の進展に係る可能性が示された。
7. ラット **DBTC** 誘発腭線維化モデルの病態は、イヌ及びネコの自然発生性腭線維化と類似すること、また線維化に伴いオートファジー機能障害が生じていることが分かった。このラットモデルは腭線維化の病態解析に有用であると考えられた。

以上、この研究で得られた成果は、腭線維化の病態解析及び有効な医薬品開発に、有用な基礎情報を提示すると考える。

審査結果の要旨

膵臓は外分泌腺と内分泌腺を併せ持つ臓器で、そのうち血糖値を調節する内分泌機能としてのインスリンの作用は生体のエネルギー代謝において極めて重要である。それ故に、急性・慢性膵疾患は、ヒトのQOL (Quality of Life) の低下に繋がる。慢性膵炎は、近年増加傾向にある難治性疾患で、病理組織学的には、炎症細胞浸潤を伴った進行性の線維化により特徴付けられる。また、膵臓癌発生との関連性も示唆されている。現在、慢性膵炎に対しては対症療法が主であり、根本的な治療法は未だ確立されていない。線維化は、病理学的には、組織傷害後の修復機転であり、傷害が繰り返されたり、慢性化すると進行性の線維化が生じる。進行性線維化のメカニズムについては、実験的に作出された肝線維化や腎線維化において研究が進められており、基本的には傷害された組織に反応する炎症細胞、特にマクロファージと、マクロファージから産生される因子により誘導される筋線維芽細胞が重要な役割を演じるとされる。しかし、膵線維化については、十分な研究が行われておらず、そのメカニズムの全貌は未だ解明されていない。特に、重要な細胞とされるマクロファージについてはその機能的な役割が、筋線維芽細胞についてはその起源と細胞特性が解明すべき課題として残されている。

この一連の研究では、イヌ及びネコの自然発生性膵線維化とラットの薬物誘発性膵線維化モデルを用いて、出現するマクロファージ及び筋線維芽細胞の細胞特性を、ラットの膵発生過程での間葉系細胞との関連を追究することで、免疫組織化学的に解析し、これら細胞の膵線維化への係わりを明らかにしている。

第1章では、イヌ及びネコの自然発生性膵線維化病変を収集し、線維化のグレードとマクロファージと筋線維芽細胞との係わりを解析している。線維化のグレードの上昇に伴って、イオン化カルシウム結合アダプター分子1 (Iba-1) を発現するマクロファージと筋線維芽細胞が発現する細胞骨格であるvimentin及び α -平滑筋アクチン (α -SMA) 発現細胞の増加が認められ、イヌ及びネコの自然発生性膵線維化において、他の臓器での線維化と同様にマクロファージと筋線維芽細胞が重要な細胞であることを明らかにしている。また、線維化のグレードの上昇に伴ってグリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) 発現筋線維芽細胞の増加も認められ、これは肝線維化においてGFAP発現の肝星細胞が筋線維芽細胞の由来であるとする報告と同様に、膵線維化においてもGFAP発現の膵星細胞が筋線維芽細胞に形質転換している可能性を示している。

第2章では、胎児期の器官形成 (モデリング) は、傷害組織の修復過程のリモデリングの現象と類似しているとされることから、第3章で行う実験的誘発ラット膵線維化の病態を解析するための基礎データを得るために、ラット膵発生過程における間葉系細胞の動態を解析している。ラット膵発生過程においては、

vimentin及びdesmin発現細胞は同様の動態を示し、胎児期から生後初期に増加し、その後成体になるに伴い減少した。また、ほとんどの間葉系細胞でvimentin及びdesminを共発現していた。GFAP発現の腭星細胞については、発生過程において一定数存在することが確認され、Thy-1発現未分化間葉系細胞は生後腭組織が構築される時期に一過性に増加することが分かった。一方、腭線維化で増加する α -SMA発現の筋線維芽細胞は発生期間を通して見られず、腭組織の形成過程と腭線維化との間で違いがあることも分かった。モデリングにおける腭間質細胞の動態と特性を初めて明らかにしている。

第3章では、腭毒性があるとされるdibutyltin dichlorideをラットに単回静脈内投与することで薬物誘発性腭線維化モデルを作製し、マクロファージ及び筋線維芽細胞の腭線維化への係わりを詳細に解析している。第1節では、まず、誘発腭線維化の病態解析を行い、イヌやネコの自然発生性腭線維化と同様の組織像を呈すること、またその病態形成に腭外分泌腺細胞のオートファジー機能の低下が係ることを明らかにしている。第2節では、マクロファージの機能特性をM1/M2分極化に基づいて解析している。その結果、腭線維化のグレード上昇に伴ってCD68発現の組織傷害性M1型マクロファージがまず出現し、その後CD163発現の修復性M2型マクロファージが増加し始めることが分かった。二重蛍光免疫染色により、MHCクラスII及びCD204発現マクロファージは、それぞれM1型とM2型に分極化することも明らかにしている。第3節では、筋線維芽細胞の細胞特性を解析している。筋線維芽細胞は、vimentin、desmin、GFAP及び α -SMAを発現し、線維化のグレード上昇に伴い出現が増加すること、またvimentin、desmin及びGFAPを発現する細胞の半数以上が、筋線維芽細胞に最も特徴的に発現するとされる α -SMAを共発現していることを見出している。さらに、Thy-1発現細胞も線維化に伴い増加することが分かった。以上より、薬物誘発性腭線維化に出現する筋線維芽細胞は、Thy-1発現の未分化間葉系細胞や第2章で示されたGFAP発現の既存の腭星細胞から形成され、vimentin、desmin及び α -SMAを種々の程度に発現することを明らかにしている。

本研究では、イヌ及びネコの自然発生性腭線維化と薬物誘発性ラット腭線維化モデルを用いて、出現するマクロファージ及び筋線維芽細胞の細胞特性を免疫組織化学的に解析し、マクロファージの機能的な性状や筋線維芽細胞の形成過程について新たな知見を提示している。この研究成果は、腭線維化の病理発生機序の一端を明らかにしており、獣医学・医学、特に毒性病理学や実験動物学の研究分野の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。