

氏名	藤田 恭史
(ふりがな)	(ふじた やすし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第21号
学位審査年月日	令和5年1月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Activation of Mast-Cell-Derived Chymase in the Lacrimal Glands of Patients with IgG4-Related Ophthalmic Disease IgG4 関連疾患患者の涙腺組織における肥満細胞 由来のキマーゼ活性の確認
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 (副) 教授 武内 徹 (副) 教授 奥 英弘

学位論文内容の要旨

目的: IgG4 関連疾患はさまざまな臓器に原因不明の高度な線維化をきたす疾患で、治療としてステロイドの長期投与が必要となるケースも多く、合併症が臨床的大きな問題となる。既報より、肥満細胞 (Mast cells: MCs) はさまざまな臓器の組織線維化部位で増加していること、また、顆粒中のプロテアーゼの種類により、トリプターゼだけを発現する MC_T タイプとトリプターゼおよびキマーゼの両方を発現する MC_{Tc} タイプが存在することが知られている。近年、MCs 由来のキマーゼは TGF- β 1 の活性化や Collagen-I の産生を促すことにより、さまざまな臓器の組織線維化に関与していることが多数報告されてきたが、IgG4 関連疾患の涙腺病態における報告はない。そこで、本研究では、IgG4 関連疾患患者の涙腺組織を用いて、本病態におけるキマーゼの発現量やキマーゼ含有肥満細胞の分布の

特徴などについて検討を行った。

対象と方法: 涙腺生検にて IgG4 関連疾患と診断された 7 名 (男 2 名, 女 5 名, 平均年齢: 52.4 ± 10.7 歳) の涙腺組織、および対照として腫瘍、外傷、薬剤によるものを除く難治性涙小管閉塞症によって摘出された 5 名 (男 3 名, 女 2 名, 平均年齢: 76.6 ± 5.8 歳) の涙腺組織の比較検討を行った。涙腺組織のリンパ球浸潤を確認するためにヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E 染色)、そして、組織線維化の程度を確認するためにアザン・マロリー染色を行った。MCs はトルイジンブルー染色、トリプターゼとキマーゼの発現細胞は免疫染色を用いて確認した。上記の発現細胞の定量には hot-spot 法を採用し、200 倍強拡大下で 3 箇所細胞数をカウントした後に平均値を算出した。また、トリプターゼ、キマーゼ、TGF- β 1 や Collagen I の遺伝子発現レベルは Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて解析した。2つのグループ間の平均値の違いや各細胞間の相関関係については、Mann-Whitney U 検定と Pearson の積率相関関係検定をそれぞれ用いて評価した。今回、トルイジンブルー染色とトリプターゼおよびキマーゼの免疫染色は 3 つの連続切片上で行った。この染色によって、増加している肥満細胞のタイプ、つまり、トリプターゼのみを発現する MC_T タイプとトリプターゼおよびキマーゼの両方を発現する MC_{TC} タイプが区別できる。また、ビメンチンと α -SMA の免疫染色も隣り合った切片で行った。この二種類の染色によって、線維性病態と密接に関連する線維芽細胞と筋線維芽細胞の割合が推測できる。TGF- β 1 は線維芽細胞の増殖だけではなく、線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換にも積極的に関与し、コラーゲン産生を促すことにより線維性病態に関与する。そこで、本研究では、TGF- β 1 と Collagen I の発現についても検討を加えた。

結果: IgG4 関連疾患患者の涙腺組織は、H&E 染色にて腺構造の破壊やリンパ球過形成が確認され、これまでの報告と一致していた。コントロールの涙腺組織に比べて、IgG4 関連疾患患者の涙腺組織の MCs、トリプターゼとキマーゼの陽性細胞は有意に増加し、トリプ

ターゼとキマーゼ遺伝子発現の増加も認められた。また、トリプターゼとキマーゼの陽性細胞数とトルイジンブルー染色で確認された MCs との間には有意な差を認めず、Pearson の積率相関関係解析において MCs、トリプターゼ、キマーゼとの間で有意な相関関係を認めることより、IgG4 関連疾患患者の涙腺組織における肥満細胞の増加は主にキマーゼ含有の MC_{TC} タイプの増加によるものであることが示された。TGF- β 1 免疫染色においては、アザン・マロリー染色で確認された組織線維化部位に一致して TGF- β 1 陽性細胞数の増加を認めた。PCR 解析においては、IgG4 関連疾患患者の涙腺組織で、TGF- β 1 と Collagen I の有意な発現上昇を認めた。また、線維性組織で TGF- β 1 陽性細胞の一部はキマーゼ陽性細胞と分布が一致しており、これらの部位におけるキマーゼによる TGF- β 1 の活性化が示唆された。ビメンチン陽性細胞がリンパ球過形成の線維性組織周囲に多数発現しており、そこに分布するほとんどの細胞が α -SMA も発現していたことより、この部位における主な細胞成分は筋線維芽細胞であることが示された。

考察: IgG4 関連疾患患者の涙腺線維性組織に存在する MCs は、キマーゼを含む MC_{TC} タイプが主であった。涙腺線維性組織の免疫染色の解析ではキマーゼによる TGF- β 1 の活性化が示唆され、TGF- β 1 による線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換機構をうかがわせた。一般的に、形質転換された筋線維芽細胞は線維芽細胞と比べて Collagen I 産生能が高いことが知られており、IgG4 関連疾患の涙腺組織における線維化機序の一部に、キマーゼによる TGF- β 1 の活性化、それによる線維芽細胞の形質転換、コラーゲン産生増加といった一連の機序が関わっていることが示唆された。また、キマーゼは潜在型 TGF- β 1 の活性化に加えて、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II (Ang II) への変換にも寄与し、この経路によって産生された Ang II はプロスタグランジン類、Vascular endothelial growth factor や TGF- β 1 の産生増加を介して、炎症細胞の浸潤や組織線維化にも関与することも近年明らかになりつつある。

結論: IgG4 関連疾患患者の涙腺組織病態生理に肥満細胞由来のキマーゼが深く関与する可

能性があることが初めて明らかになった。キマーゼは本疾患の新しい治療ターゲットになる可能性がある。

論文審査結果の要旨

IgG4 関連疾患はさまざまな臓器に原因不明の高度な線維化をきたす疾患であるが、臨床
上ではステロイド治療以外に有効な治療法がない。本研究では、IgG4 関連疾患の涙腺組織
におけるキマーゼの発現やキマーゼ含有肥満細胞の分布、並びにキマーゼによって活性化
される TGF- β 1 の発現や分布について非 IgG4 関連疾患由来の涙腺組織と比較検討を行っ
た。また、線維化病態には TGF- β 1 による線維芽細胞の形質転換なども関与する可能性が
あるので、ビメンチンや α -SMA の免疫染色を用いて線維芽細胞と筋線維芽細胞の分布に
についても検討を加えた。

IgG4 関連疾患患者の涙腺組織においては、キマーゼ遺伝子の発現やキマーゼ含有の
MC_{TC} タイプの肥満細胞数の有意な増加が認められた。また、病変涙腺組織の線維化部位
でのキマーゼ陽性細胞の分布と一部の TGF- β 1 陽性細胞の分布が一致しており、組織局所
で増加したキマーゼが酵素学的に TGF- β 1 を活性化しうる位置に存在することが示され
た。キマーゼは潜在型 TGF- β 1 の活性化に加えて、アンギオテンシン I からアンギオテン
シン II (Ang II) への変換にも寄与し、この経路によって産生された Ang II はプロスタグ
ランジン類、Vascular endothelial growth factor、TGF- β 1 の産生を増加させることより、
炎症細胞の浸潤や組織線維化に関与する可能性も考えられた。ビメンチンと α -SMA に対
する免疫染色においては、ビメンチン陽性細胞がリンパ球過形成の線維性組織周囲に多数
発現しており、そこに分布するほとんどの細胞が α -SMA も発現していたことより、この
部位における主な細胞成分は筋線維芽細胞であることが示された。形質転換された筋線維
芽細胞は線維芽細胞と比べて Collagen I 産生能がより高いことから、IgG4 関連疾患の涙
腺組織における線維化機序の一部に、キマーゼによる TGF- β 1 の活性化、それによる線維芽
細胞の形質転換、コラーゲン産生増加といった一連の機序が関わっている可能性を示した。

本研究により IgG4 関連疾患の涙腺組織病態生理に肥満細胞由来のキマーゼが深く関連
する可能性を示した。また、キマーゼは本疾患の新しい治療ターゲットになりうる可能性
がある。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences.

23(5):2556, 2022.