



Mast cells in pterygium : number and phenotype

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中神, 哲司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1602

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 3 2 5 号	学位授与年月日	平成 1 2 年 1 1 月 6 日
氏 名	中 神 哲 司		
論文題目	Mast cells in pterygium: number and phenotype (翼状片の肥満細胞：密度と表現型)		

博士(医学) 中 神 哲 司

論文題目

Mast cells in pterygium: number and phenotype

(翼状片の肥満細胞：密度と表現型)

論文の内容の要旨

[はじめに]

病理組織学的に翼状片上皮下組織には多くの線維芽細胞浸潤、弾性線維変性物質や異常な膠原線維の集積が認められる。また肥満細胞をはじめ、リンパ球、形質細胞浸潤が認められ、線維化を伴う慢性炎症像であると考えられる。肥満細胞はアレルギー反応を引き起こす主要な細胞の一つであるが、アレルギー反応のみでなく非アレルギー性の慢性炎症や線維化を伴う病変の形成にも強く関与することが知られており、この点から肥満細胞は翼状片の病態形成に関与している可能性がある。

ヒトの肥満細胞は含有するプロテアーゼにより、トリプターゼ陽性、キマーゼ陰性肥満細胞(MC_T)とトリプターゼ陽性、キマーゼ陽性肥満細胞(MC_{TC})の二つの表現型が区別され、薬剤に対する反応性や機能的役割の違いが明らかとなっている。また、組織によりその分布が異なることや病態によりその分布が変化することが報告されている。今回、翼状片の病態を考える上で翼状片組織の肥満細胞に注目し、肥満細胞密度、表現型を正常結膜と比較した。

[対象ならびに方法]

組織の使用に対し、十分な説明の上同意を得た後に切除された初発翼状片、および角膜輪部近くの正常球結膜を対象とし、トルイジン青染色および免疫組織染色により検討した。組織片の作成にあたり、病変の先端部から基底部までが観察できるように中央部を長軸に沿って細切し、切片全範囲で検討した。

トルイジン青染色では、翼状片30例(平均年齢 53.4 ± 7.5 歳)および正常球結膜11例(平均年齢 51.5 ± 15.3 歳)を対象とした。組織を固定後樹脂包埋を行い、 $1\mu\text{m}$ で薄切し1%トルイジン青染色した。メタクロマジーを呈した細胞を肥満細胞として肥満細胞密度を計測した。

免疫組織染色では、翼状片5例(平均年齢 48.8 ± 5.2 歳)および正常結膜5例(平均年齢 61.8 ± 11.5 歳)を対象とした。連続凍結切片($5\mu\text{m}$)を作成し、肥満細胞の表現型を検討するため一次抗体として抗トリプターゼ抗体、抗キマーゼ抗体および抗c-kit抗体を用いてlabeled streptavidin biotin法で免疫組織染色を行い陽性細胞密度を計測した。

[結果]

トルイジン青染色での検討から翼状片組織に浸潤する肥満細胞は、先端部には少なく体部の血管や変性物質の周囲に多く認められた。肥満細胞密度は、翼状片 34.5 ± 18.0 個/ mm^2 、正常結膜 15.5 ± 9.0 個/ mm^2 であり、有意に翼状片に多かった。免疫組織染色において、トリプターゼ陽性細胞密度は、翼状片 50.7 ± 6.9 個/ mm^2 、正常結膜 24.1 ± 8.9 個/ mm^2 と有意に翼状片に多かった。隣接切片における検討で、トリプターゼ陽性細胞数に対するキマーゼ陽性細胞数の割合は、翼状片 $94.2 \pm 5.3\%$ 、正常結膜 $96.7 \pm 4.6\%$ 、トリプターゼ陽性細胞数に対するc-kit陽性細胞数の割合は、翼状片 $97.8 \pm 5.8\%$ 、正常結膜 $103.6 \pm 8.4\%$ であり、翼状片と正常結膜との間には有意差を認めなかった。

〔考察〕

トルイジン青染色により翼状片組織での肥満細胞密度は、正常結膜に比較し約2倍と高く認められた。しかし、メタクロマジーは好塩基球にも見られ、またその程度は固定法にも影響される。そこで、免疫組織染色により肥満細胞特異的であるトリプターゼ陽性細胞数を検討したが、同様の結果が確認された。

従来、翼状片組織には肥満細胞やリンパ球、形質細胞浸潤が見られることから、翼状片の発生機序にアレルギー反応の関与が推測されてきた。しかし、今回の検討から翼状片組織の肥満細胞表現型に正常球結膜との差は認められなかった。すなわち、増加した翼状片組織の肥満細胞は、主にアレルギー疾患において増加がみられるMC_Tではなく、主に血管新生、組織の再構築や線維化に関与するMC_{TC}であることが判明した。この結果から、非アレルギー性の機序により刺激され増加した肥満細胞が種々の生理活性物質の放出を介して翼状片の病態形成に関与しているのではないかと推測された。

一部の肥満細胞が増加することが知られている疾患で、肥満細胞の増殖や遊走および化学伝達物質の産生、放出に関与する因子stem cell factor(SCF)の過剰発現が、その受容体c-kitの発現を抑制する可能性が報告されているが、今回検討した翼状片組織のほとんどすべての肥満細胞にc-kitの発現が認められ、正常結膜との差はなかった。翼状片組織でのSCF発現程度を含め、どのような要因が肥満細胞のc-kit発現に影響しているかは不明である。

〔結論〕

翼状片組織には、正常結膜に比較して有意に肥満細胞密度の高いことが、メタクロマジーによる同定法及びトリプターゼ陽性細胞数の検討から確認された。翼状片組織の増加した肥満細胞の表現型に正常結膜との差はなく、そのほとんどは血管新生、組織の再構築や線維化に関与するMC_{TC}であり、c-kitを発現していた。今回の検討から、非アレルギー性の機序により増加した肥満細胞が翼状片の病態形成に深く関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

翼状片は紫外線などの誘因によって結膜から角膜へ肥厚充血した組織が侵入する病変で、角膜に混濁を来し、視力障害を来すことがあり、その予防、治療のために病理発生の解明が重要である。翼状片には線維芽細胞の増生、リンパ球、形質細胞、肥満細胞などが認められ、慢性炎症性反応が関与していると考えられている。肥満細胞はアレルギー性反応を引き起こす要因であるが、アレルギー性反応のみでなく非アレルギー性の慢性炎症や線維化にも強く関与していることが知られている。ヒトの肥満細胞は含有するプロテアーゼにより、トリプターゼ陽性、キマーゼ陽性の肥満細胞(MC_{TC})とトリプターゼ陽性、キマーゼ陰性の肥満細胞(MC_T)の二つの表現型が区別され、機能的役割に違いがあると考えられている。申請者は翼状片の成因のひとつとして肥満細胞の関与に着目し、細胞密度、表現型を正常結膜と比較解析を行った。

十分な説明によって同意を得た上で切除された初発翼状片30例、角膜輪部近くの正常球結膜11例を対象とし、組織を固定後、樹脂包埋、1μmに薄切し、トルイジン青染色を行い、メタクロマジーした細胞を肥満細胞とした。免疫組織染色では翼状片5例、正常結膜5例について連続切片で解析した。一次抗体として、抗トリプターゼ抗体、抗キマーゼ抗体および抗c-kit抗体を用いた。Streptavidin biotin法で免疫染色を行い、数えて陽性細胞密度を算出した。

翼状片に浸潤する肥満細胞は、先端部では少なく、体部の血管や類弾性線維変性物質の周囲に多く認められた。肥満細胞密度は、翼状片 34.5 ± 18.0 個/ mm^2 、正常結膜 15.5 ± 9.0 個/ mm^2 であり、翼状片が約2倍高いことが明らかとなった。免疫染色によるトリプターゼ陽性細胞の密度もトルイジン青メタクロマジー陽性細胞の結果と同様であった。隣接切片による検討で、トリプターゼ陽性細胞に対するキマーゼ陽性細胞、トリプターゼ陽性細胞に対するc-kit陽性細胞はそれぞれ94%以上であった。このことから翼状片に浸潤している肥満細胞はMC_{TC}型で、c-kit陽性で、正常結膜と同じであることが明らかとなった。

本研究で、翼状片において肥満細胞密度が増加するという従来の報告を抗トリプターゼ抗体を用いた免疫染色も行っており確認し、その表現型が非アレルギー性の機序で役割を果たすと考えられているMC_{TC}型肥満細胞であることを示した。

審査委員会では、これらの結果は肥満細胞が、翼状片の線維化、血管新生に関与することを示唆する重要な研究であると評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 翼状片の頭部と体部で肥満細胞密度に差があるかどうか
- 2) 翼状片の肥満細胞の活性や機能を生化学的に測定することは出来ないか
- 3) 類弾性線維変性変化と肥満細胞との関連について
- 4) 翼状片と創傷治癒の時の肉芽の肥満細胞の働きの相違について
- 5) 翼状片形成過程において最初に刺激を受ける細胞について
- 6) 翼状片の形成が進行していく要因は何か
- 7) 翼状片においてp53の発現が上昇するのになぜ癌化は少ないのか
- 8) c-kitは肥満細胞の増殖にも分化にも関与するとしたら、そのsignal cascadesの特徴について
- 9) Stem cell factor(SCF)の発現が翼状片の先端部で強いとしたら、肥満細胞のc-kitの発現は部位によって異なるか
- 10) 翼状片を切除後、露出強膜を結膜で覆うとなぜ再発が防げるか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 筒井 祥 博

副査 平 光 忠 久 副査 戸 倉 新 樹