Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis

メタデータ	言語: jpn
	出版者: 浜松医科大学
	公開日: 2014-11-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 塚本, 克紀
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1110

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	医博第　２５７号	学位授与年月日	平成１０年　３月２６日
氏　　名	塚　本　克　紀		
論文題目	Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (EBV LMP1 は特発性肺線維症の病変進行に関与する)		

博士(医学)　塚 本 克 紀

論文題目

Epstein−Barr virus latent membrane protein 1 is involved in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis

(EBVLMP1は特発性肺線維症の病変進行に関与する)

論 文 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

特発性肺線維症（IPF）は、肺の線維化が慢性に進行し、終末的には呼吸不全を呈してくる原因不明の疾患であり、その5年生存率は約60%と予後は不良である。Epstein−Barr virus（EBV）は、IPF の病因の可能性や病態への関与が示唆されているが、IPF の肺組織中での EBV DNA を確認した報告はいまだにない。また、EBV が本疾患の臨床像や経過にどのような影響を与えるかについても不明である。以上の点を明らかにするため下記の検討を行った。

〔対象ならびに方法〕

開胸あるいは胸腔鏡下肺生検にて病理組織学的に確診された IPF29例と、肺線維症を有する全身性進行性強皮症（SSc−IP）の5例を対象とした。生検時に得られたホルマリン固定、パラフィン包埋の肺組織を検討材料として下記の項目を検索した。対照としては、肺癌あるいは肺嚢胞切除を施行された15例よりの正常部分肺を用いた。

1）PCR法による肺組織中のEBV genome DNAの検出

肺組織より抽出したDNAを用い、two−step PCR法を用い、標的遺伝子の存在の有無を検討した。内部コントロールには、β−globinのPCRによる増幅結果を用いた。

2）肺組織におけるEBV latent membrane protein 1（LMP1）に対する免疫染色

抗 LMP1モノクローナル抗体を一次抗体とし、SAB 法にて免疫染色を施行した。さらに、IPF 症例のLMP1染色陽性例と陰性例について、初診時の臨床検査値および臨床経過を比較検討した。

〔結果〕

1）β−globinがPCRにて確認できたものがIPF 29例中25例、SSc−IP 5例中5例、対照15例中14例であった。β−globinが検出された検体での結果は、single−step PCRにてIPF25例中20例（80%）、SSc−IP5例中5例（100%）、対照14例中8例（57%）にEBV genome DNAが検出された。また、two−step PCRでは検出頻度は増加し、IPF25例中24例（96%）、SSc−IP5例中5例（100%）、対照14例中10例（71%）となり、IPFにおける検出頻度が対照に比し、有意に高率であることが判明した（$p<0.05$）。

2）IPF29例中9例の肺胞Ⅱ型上皮に、LMP1に対する免疫染色が陽性であった。一方、SSc−IP 症例と対照例は全例陰性であった。IPF 症例に関して、LMP1陽性例と陰性例の初診時の検査所見には明らかな差を認めなかった。しかし、経過観察が可能であった IPF20例において、PaO_2値が15 torr 以上低下した症例を“進行例”として予後調査を行った結果、LMP1陽性7例中5例（71%）が“進行例”であったのに対し、LMP1陰性例の“進行例”は13例中1例（8%）のみであり、有意差が認められた（$p<0.01$）。また、SSc−IP症例には“進行例”はみられなかった。

〔考察〕

EBV は、ヘルペスウイルス属に属するDNAウイルスであり、健常成人に不顕的に感染しているウイルスである。我々は、IPF病変および正常肺組織中にEBV DNAが存在することをPCR法にて確認した。このことは、気道系にはEBVが存在するという過去の報告に矛盾しないものであった。さらに、EBV DNA の検出頻度が線維化病変部において高いとの結果が得られ、IPF でみられる慢性炎症病態との関連が注目された。

LMP1は、EBV感染細胞の細胞膜上に存在する膜蛋白質の一つで、その機能としては、上皮細胞の分化抑制や、アポトーシスに対する抑制作用が知られている。IPF症例のうち９例の肺胞Ⅱ型上皮にLMP1が染色され、さらにこれらの症例に肺病変の“進行例”が有意に多かったとの事実は、IPF 症例の中には、EBV が、肺胞Ⅱ型上皮に感染しLMP1を発現することにより、肺の線維化病変を進行させる症例があることを示唆するものである。IPF症例において、どのような機序でLMP1が発現されるのか、LMP1の発現がどのように肺線維化の進行に関与しているのかを、今後検討していくことが本疾患の治療、病変進行の予防として重要であると思われた。

〔結論〕

線維化肺病変部においてEBVの検出頻度が高く、また、LMP1の発現が肺病変の進行する症例に多くみられたという結果は、IPFにおけるEBVの病態的関与を示すものと思われた。

論文審査の結果の要旨

特発性肺線維症（IPF）は、肺の線維化が徐々に進行する慢性の疾患であり、その５年生存率は約60％と予後不良である。IPFの病因は未だ解明されていないが、Epstein−Barrウイルス（EBV）の関与が、血清学的および免疫組織化学的検索により示唆されている。そこで、申請者はIPFにおけるEBVの関与を１）PCR 法による肺組織中の EBV DNA の検出、および２）肺組織における EBV latent membrane protein 1（LMP1）の検出により検討した。対象として IPF29例と肺線維症を有する全身性進行性強皮症（SSc−IP）５例の肺生検時に得られたホルマリン固定、およびパラフィン包埋の肺組織を用いた。また、正常対照として、肺癌あるいは肺嚢胞切除時に取られた正常部分の肺組織15例を用いた。

１）PCR法の結果：検体より、β−グロビンのプライマーで増幅可能なDNAが抽出できたものは、IPF29例中25例、SSc−IP5例中５例、対照15例中14例であった。これらを対象として、まず、single−step PCR で EBV の DNA を検出したところ、陽性反応は IPF20/25例（80％）、SSc−IP5/5例（100％）、対照8/14例（57％）に認められた。さらに感度を上げるため、two−step PCRを施行したところ、IPF24/25例（96％）、SSc−IP5/5例（100％）、対照10/14例（71％）に EBV DNA が検出された。この結果、IPF における検出率か対照に比し、有意に高率であることが判明した。

２）EBV LMP1の検出：LMP1に対する免疫組織化学的検索を行ったところ、IPF29例中９例の肺胞Ⅱ型上皮に陽性所見が認められた。一方、SSc−IP と対照は全例陰性であった。また、興味深いことに、経過観察が可能であったIPF20例のうち、LMP1陽性７例中５例が「進行例」であったのに対し、LMP1陰性13例中「進行例」は１例のみであった。

本研究はEBV−DNAの本疾患における高頻度の検出に加え、EBV LMP1の発現がIPF肺病変の進行と相関するとの所見を初めて提案した仕事であり、審査委員会は今後本疾患の治療、病変進行予防の研究の途を拓くものであると高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

1）PCRで増幅されたEBV DNAの確認を制限酵素で行っているが、この方法は適切か
2）PCRで検出されたEBV DNAが肺組織以外の例えば血液細胞由来である可能性は
3）EBV DNAの検出の対照群の年齢は疾患群とマッチさせたか
4）肺胞上皮はEBVに対する受容体（CD21）を発現しているか
5）LMP1はⅡ型肺胞上皮のみに検出されるか
6）LMP1は病変部のみに検出されるか
7）LMP1陰性例はもともとPaO_2が良いのでは
8）IPFがLMP1陽性／陰性に分離するメカニズムは
9）細胞傷害性T細胞はLMP1発現を抑制するか
10）EBNAは検討したか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、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員全員一致で判定した。

論文審査担当者　主査　教授　小　出　幸　夫
　　副査　教授　椙　村　春　彦　助教授　古　川　福　実