

【18】

氏 名	於 恩 橋
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第678号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (生体構築学)
学位論文題目	Expression of area-specific M2-macrophage phenotype by recruited rat monocytes in duct-ligation pancreatitis (ラット結紮性膵炎モデルにおける単球の遊走と組織特異的M2マクロファージへの分化)
論文審査委員	(主査) 教授 今 井 康 雄 (副査) 教授 加 藤 広 行 教授 菱 沼 昭

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

急性膵炎の病因は未だ不明部分が多く、特異的な治療法がまだ確立されていない。指導教授はこれまでに膵管結紮によるラット急性膵炎モデルを用いて解析してきており、浸潤細胞の大部分がマクロファージであり組織内ではげしく増殖することを見いだしている (Yamaguchi et al., Gastroenterology, 1993, Goto et al., Arch Histol Cytol, 1993)。このとき興味深いことに、浸潤マクロファージ群は一様ではなく、形態や分子発現 (フェノタイプ) の異なるものが混在することに気づいた。マクロファージには機能的に異なる亜型が存在することが知られており、このうちM1型は従来の自然免疫を担う細胞群で炎症に伴って活性化して異物の駆除を行うのに対し、近年新たに見いだされたM2型は抗炎症や組織修復作用を有するといわれている。一方、これらの細胞亜群が様々な病態に深く関わることが示されつつあるが、急性膵炎における役割はよく分かっていない。

【目 的】

ラット結紮性膵炎モデルにおける浸潤マクロファージ亜群の組織内分布とその由来に関して免疫組織学的に解析を行い、膵炎の病態機構に及ぼすマクロファージの役割を考察する。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行った。

(1) 免疫多重染色によるマクロファージ亜群の同定と局在解析：ラットをイソフルラン麻酔下に開

腹し、実体顕微鏡下に胆管に複数流入する十二指腸区域の膵管基部を結紮した。その後、経時的に組織採取を行い、4 μ mの新鮮凍結切片またはperiodate-lysine-paraformaldehyde液で前固定した凍結切片を作製した。屠殺1時間前にはbromodeoxyuridine (BrdU) とethynyl deoxyuridine (EdU) を静脈投与し、増殖細胞を標識した。解析はまずマクロファージマーカーとIV型collagen、さらにBrdUを組み合わせた明視野三重免疫染色、または当研究室にて最近確立した蛍光4重免疫染色 (Kitazawa et al. Histochemistry Cell Biol., 2015) で行った。

(2) Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックラットを用いた膵炎浸潤マクロファージの起源解析：新規に骨髓より動員される単球と膵在住の組織マクロファージを見分けるために、GFPを発現する同系のトランスジェニックラットの骨髓細胞と末梢白血球を移入したラット (GFPキメララット) で同様に膵管結紮を行い、解析した。GFP陽性 (GFP⁺) 細胞の生着効率を高めるために、レシピエントラットは膵臓を含む腹部をシールドした上で4Gy X線照射した後、膵管結紮時に同時に脾臓を摘出した。これにより末梢白血球の約2%をGFP⁺単球にすることができた。多重免疫染色は(1)と同様に行った。

(3) データ解析：IV型collagen染色像を基に小葉内領域 (腺房間領域、interacinar area) と小葉間質域 (interlobular area) を分けながら、個々の染色所見をカウントした。

統計的解析はStudent t testでおこない、有意差を検定した (n = 3)。

【結 果】

(1) 膵管結紮後1dより汎マクロファージマーカー (CD68⁺) 細胞の著しい増加が認められた。この時、CD68⁺細胞はCD163⁻とCD163⁺細胞に大別され、前者は小さく丸い形をして小葉内に多く局在するのに対し、後者は大きく多角形で主に小葉間に局在していた。同様の所見はWistarラットでも認められた。

(2) 蛍光4重免疫染色の結果、小葉間のCD68⁺CD163⁺細胞はCD163発現の度合いによりCD68⁺CD163^{high}とCD68⁺CD163^{low}に細分化された。CD68⁺細胞におけるCD163発現は経時的に増加し、特にCD68⁺CD163^{high}は1dから2-4dにかけて5-7倍に増加した (p < 0.05)。一方、小葉内のCD68⁺細胞にCD163発現の上昇は認められなかった。

(3) 次にGFPキメララットを解析したところ、GFP⁺CD68⁺細胞は1dより小葉間で増加し、2-4dにかけてCD163発現の有意な上昇が認められた。また、GFP⁺CD68⁺細胞は約10%がEdU⁺で増殖していた。

(4) 2dより小葉間にて増加するCD68⁺CD163^{high/low}細胞におけるM2マクロファージマーカーであるCD206およびarginase 1発現を見たところ、CD68⁺CD163⁺細胞の大部分がCD206とarginase 1を発現していた。一方、M1マーカーであるnitric oxide synthase 2 (NOS2)の発現はほとんど認められなかった。

(5) 小葉内CD68⁺細胞は4dでも約80%以上がCD163⁻のままであり、これらにおけるCD206、arginase 1発現はほとんどなかった。一方、約30%にNOS2発現が見られた。

【考 察】

GFP キメララットを用いることにより、膵管結紮後に増加するマクロファージの多くは骨髓より

動員された単球であることが明らかとなった。また、多重免疫染色を駆使することで、これら浸潤マクロファージには明らかに局在やフェノタイプが明らかになる亜型が存在することを見いだした。ラットではCD163は組織マクロファージの代表的なマーカーであるが、このように単球が炎症組織に遊走して素早くCD163を発現することはこれまで報告が無い。さらにヒト、マウス解析において代表的なM2マクロファージマーカーであるCD206、arginase 1のいずれもが小葉間CD68⁺細胞に発現していたことから、膀胱に遊走してきた単球は組織内で増殖しつつ小葉間でM2型に分化して、組織修復を担っていると考えられた。一方、小葉内に入った単球は一部がM1型となり、腺房障害に関連することが示唆された。

【結 論】

本研究により、急性膀胱炎におけるマクロファージの増加は炎症性単球によるものであること、また組織内で増殖して機能と組織内局在が異なるマクロファージ亜群に分化することが明らかとなった。このうち小葉間はCD68⁺CD163⁺CD206⁺arginase 1⁺のM2型であり、組織修復を促進するのに対し、小葉内はCD68⁺CD163⁻CD206⁻arginase 1⁻で一部がNOS2⁺であり、腺房障害に関連することが示唆された。

炎症性単球の組織内遊走やM1/M2分化を調節することができれば、膀胱治療の一助になり得ると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

急性膀胱炎の病因は未だ不明部分が多く、特異的な治療法がまだ確立されていない。膀胱結紮によるラット急性膀胱炎モデルでは、浸潤細胞の大部分がマクロファージである。本研究では、本モデルにおける浸潤マクロファージ亜群の組織内分布とその由来に関して免疫組織学的に解析を行い、膀胱の病態におけるマクロファージの役割を検討している。本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行われている。その結果、急性膀胱炎におけるマクロファージの増加は主として炎症性単球によるものであること、また組織内で活性化・増殖し機能と組織内局在が異なるマクロファージ亜群に分化することを明らかにしている。このうち小葉間はほとんどがCD68⁺CD163⁺CD206⁺arginase 1⁺のM2型マクロファージであり、小葉内はほとんどがCD68⁺CD163⁻CD206⁻arginase 1⁻で、~30%がNOS2⁺のM1型、残りがNOS2⁻群である事を見いだしている。このNOS2⁻群はまだ活性化していない非M2型のマクロファージと考察し、M2型は組織修復を促進するのに対し、M1型は腺房障害に関連することが示唆されるとしている。

【研究方法の妥当性】

膀胱結紮を血管組織障害の少ない術式でおこない、手術傷害がほとんど無い膀胱炎モデルを作製していること、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックラットの単球を同系のレシピエントに投与することにより、膀胱の浸潤マクロファージの由来を直接証明できる実験系を設定していること、多重免疫染色により、マクロファージ亜群の分類と活性化指標を客観的に解析していることか

ら、本研究方法は妥当なものと考えらる。

【研究結果の新奇性・独創性】

本研究により、急性膵炎におけるマクロファージの増加は炎症性単球によるものが主であること、組織内で活性化・増殖して組織内局在と機能が異なるマクロファージ亜群に分化すること、特にラットの単球がM2型に分化することを証明している。これは今までに報告がない新知見であり新規性が高い。また、膵臓の小葉内と小葉間で環境が異なり、マクロファージのM1またはM2型への分化・活性化を起こす可能性を示唆したことはこれまでに無い仮説であり、今後独創的な研究に繋がる可能性が高い。

【結論の妥当性】

単球が炎症組織内へ浸潤することは既成事実であり、本モデルでも妥当な結果である。好中球の浸潤が少ないが、好中球は感染巣、壊死巣に入ることが多い。本モデルでは、血管組織障害の少ない術式をとることにより、感染・壊死を最小限にしており、そのために好中球浸潤が少なくても問題は無い。M1/M2マーカーを含めたマクロファージに対する抗体は論文で認められたものを使用しており、多重免疫染色は申請者の指導研究室で確立した精度の高い妥当なものである。以上から導きだされた結論は理論的にも矛盾するものではなく妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

マクロファージには機能的に異なる亜型が存在することが知られており、このうちM1型は従来の自然免疫を担う細胞群で炎症に伴って活性化して異物の駆除を行うのに対し、近年新たに見いだされたM2型は抗炎症や組織修復作用を有するといわれている。これらの細胞亜群の急性膵炎における役割はよく分かっていない。本研究により、ラット膵炎モデルでは、単球由来マクロファージ亜群により小葉内は腺房破壊が進むが、小葉間は修復機転が起こっていることが示唆された。これにより、炎症性単球の組織内遊走やM1/M2分化を調節することができれば、膵炎治療の一助になり得ると考えられ、膵臓病学の進展に貢献出来る研究であると位置づけられる。

【申請者の研究能力】

申請者は、4年間の本学への留学期間中、大学院生としてフルタイムで研究指導を受け、本研究関連の手術・免疫染色・フローサイトメトリなどの実験手技をマスターした上で、自分でほとんどの実験をおこなっている。その研究内容は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の能力の高さを評価できる。

【学位授与の可否】

本研究は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Histochemistry and Cell Biology

145 : 659-673, 2016