

論文内容要旨

【目 的】

重症筋無力症 (MG) 患者が高頻度に胸腺異常を伴い、胸腺摘除により臨床症状の高い改善率が報告されていること等から、胸腺が MG の自己免疫過程の成立、維持に深く関与していることが従来から指摘されてきた。本来、アセチルコリンレセプター (AChR) に対する自己反応性 T 細胞は胸腺内でアポトーシスによって排除されたり、末梢に出てもアナジーを受け不活化されると考えられるが、MG ではこの機構が障害されている可能性がある。これらのことから MG 胸腺においてアポトーシス関連蛋白である Fas 抗原、Bcl-2 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。

【方 法】

臨床的に MG と確定診断され、治療的胸腺摘出術を受けた 17 歳から 49 歳までの 10 症例 (胸腺過形成 7 例、胸腺腫 3 例) を検討した。対照として、心臓外科手術を受けた 6 か月から 9 歳までの 4 例の小児胸腺組織を用いた。

PLP 固定した凍結胸腺組織を $6\mu\text{m}$ に薄切し、ABC 法を用いて免疫染色を行い、Fas 抗原、Bcl-2 蛋白を検出した。次に Fas 陽性細胞、Bcl-2 陽性細胞を同定するため二重染色を行った。Fas 陽性細胞の検出は抗 Fas 抗体と胸腺上皮細胞のマーカーである抗ケラチン抗体を用いて、PAP 法と APAAP 法の併用による二重染色で行った。Bcl-2 陽性細胞の検出は抗 Bcl-2 抗体と抗 CD3、CD19 抗体を用いて、ABC 法を繰り返す二重染色法により行った。Bcl-2 陽性細胞については $5\times 5\text{mm}$ の indexing grid を用いて、任意の 10 視野につき 0.015mm^2 あたりの陽性細胞数の割合を 400 倍にて検鏡し、定量した。

【結 果】

対照胸腺では、Fas 抗原は主に髄質の上皮細胞に発現しており、特にハッサル小体周辺、皮質との境界部に多く分布していた。胸腺細胞は Fas 陰性だった。抗 Fas 抗体と抗ケラチン抗体との二重染色で、Fas 陽性細胞が胸腺上皮細胞であることを確認した。Bcl-2 蛋白はほとんどが髄質の胸腺細胞に発現しており、皮質の胸腺細胞にはごくわずかししか発現していなかった。抗 Bcl-2 抗体と抗 CD3 抗体との二重染色で、大部分の Bcl-2 陽性細胞が胸腺細胞であることを確認した。

MG 過形成胸腺では、Fas 抗原は主に髄質および皮質と髄質の境界部の上皮細胞に発現してい

た。胸腺細胞は Fas 陰性だった。対照胸腺と比べて、Fas 陽性細胞の頻度、分布に差はみられなかった。一方、髄質の Bcl-2 陽性細胞は、全ての MG 胸腺過形成例において、対照胸腺と比べて明らかに増加していた。抗 Bcl-2 抗体と抗 CD3 抗体との二重染色により、大部分の Bcl-2 陽性細胞は胸腺細胞であった。Bcl-2 陽性の B 細胞は髄質に局限して分布していたが、症例ごとに程度差を認めた。抗 Bcl-2 抗体と抗 CD19 抗体との二重染色により、リンパ濾胞内の B 細胞は Bcl-2 陰性であったが、mantle zone には Bcl-2 陽性の B 細胞が多数認められた。髄質における Bcl-2 陽性細胞の割合は、対照胸腺 (30.2±2.3%) と比べて、MG 過形成胸腺 (63.5±6.0%) で有意に増加していた ($p<0.05$)。Bcl-2 陽性細胞の密度と患者の年齢、抗 AChR 抗体価、臨床型、ステロイド投与歴との間で相関はみられなかった。

MG 胸腺腫では、Fas 抗原は上皮型の胸腺腫で発現していたが、リンパ球型では発現していなかった。抗ケラチン抗体との二重染色により、上皮型の胸腺腫が二重染色された。Bcl-2 蛋白はリンパ球型で弱く発現していたが、上皮型では発現していなかった。しかしながら、胸腺腫に隣接した胸腺部では、Fas 抗原と Bcl-2 蛋白が MG 過形成胸腺と同程度検出され、リンパ濾胞周囲の髄質では Bcl-2 蛋白の強い発現が認められた。このように MG 胸腺では過形成、胸腺腫いずれにおいても Bcl-2 蛋白の発現亢進が認められた。

【結 論】

MG 胸腺で、胸腺細胞における Bcl-2 蛋白の発現が、対照胸腺と比べて有意に亢進していることを初めて明らかにした。Bcl-2 蛋白はアポトーシスを抑制するはたらきがあり、胸腺内での胸腺細胞の分化、成熟に関与していると考えられている。MG 胸腺で Bcl-2 蛋白の発現が亢進していたことは、本来アポトーシスによって選択、除去されるべき自己反応性の胸腺細胞が十分除去されずに自己免疫反応を惹起するなど、MG の病態に深く関与している可能性を示唆するものと考えられる。

審査結果の要旨

本研究は重症筋無力症 (MG) 胸腺におけるアポトーシス関連蛋白である Fas 抗原, Bcl-2 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討したものである。

MG 患者に高頻度に胸腺異常を伴い, 治療的に胸腺摘出により臨床症状の高い改善率がみられること等から, 胸腺が MG の自己免疫過程の成立, 維持に深く関与していることが従来から指摘されてきた。なかでも MG の病因に重要なアセチルコリン受容体 (AChR) に対する自己反応性 T 細胞は, 通常では胸腺内でアポトーシスによって排除されたり, 末梢に出てもアナジーを受け不活化されると考えられるが, MG ではこの機構が障害されている可能性が従来から指摘されている。

本研究では臨床的に MG と確定診断され, 治療的胸腺摘出術を受けた 17 歳から 49 歳までの 10 症例の胸腺 (胸腺過形成 7 例, 胸腺腫 3 例) を用いた。PLP 固定し凍結切片を作成し ABC 法を用いて Fas 抗原, Bcl-2 蛋白に関して免疫染色を行った。対照として, 心臓外科手術を受けた 6 か月から 9 歳までの 4 例の胸腺組織を用いた。

細胞同定の為に抗ケラチン抗体, CD3, CD19 抗体を用いて二重染色を行った。その結果, 対照胸腺では Fas 抗原は主に髄質の上皮細胞に発現しており, 特にハッサル小体周辺や皮質との境界部に多く分布していたが, 胸腺細胞は陰性だった。一方, Bcl-2 蛋白はほとんどが髄質の胸腺細胞に発現しており, 皮質の胸腺細胞にはごくわずかしこ発現していなかった。MG 過形成胸腺では対照胸腺に比べて, Fas 陽性細胞の頻度や分布に差はみられなかった。一方, 髄質の Bcl-2 陽性胸腺細胞は, 対照胸腺 ($30.2 \pm 2.3\%$) と比べて, MG 過形成胸腺 ($63.5 \pm 6.0\%$) で有意に増加していた ($p < 0.05$)。抗 Bcl-2 陽性細胞の密度と患者の年齢, 抗 AChR 抗体価, 臨床型, ステロイド投与歴との間で相関はみられなかった。MG 胸腺腫では, 胸腺腫に隣接した胸腺部の髄質では Bcl-2 蛋白の強い発現が認められた。

Bcl-2 蛋白はアポトーシスを抑制するはたらきがあり, 胸腺内での胸腺細胞の分化や成熟に関与していると考えられている。MG 胸腺で Bcl-2 蛋白の発現が亢進していたことは, 本来アポトーシスによって選択, 除去されるべき自己反応性の胸腺細胞が十分除去されずに自己免疫反応を惹起するなど, MG の病態に深く関与している可能性を示唆するものと考えられる。

以上より本研究は MG 胸腺にて胸腺細胞における Bcl-2 蛋白の発現が, 対照胸腺と比べて有意に亢進していることを初めて明らかにしたものであり, 学位に値するものとする。