



腠線維化におけるマクロファージ及び筋線維芽細胞の免疫表現型に関する病理学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-10-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋本, 愛 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00016587

大阪府立大学博士(獣医学)学位論文

靭線維化におけるマクロファージ及び筋線維芽
細胞の免疫表現型に関する病理学的研究

橋本 愛

2018 年

目次

序文.....	- 4 -
第1章 イヌ及びネコの自然発生性腭線維化の病態解析	- 9 -
緒言.....	- 10 -
材料及び方法	- 12 -
成績.....	- 14 -
考察.....	- 17 -
小括.....	- 20 -
Table 1 腭線維化の発生に関与する因子	- 21 -
Table 2 評価に用いたイヌ及びネコの腭臓 HE 所見及び線維化グレード	- 22 -
Table 3 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細	- 23 -
Table 4 自然発生性腭線維化の免疫学的特性.....	- 24 -
Fig. 1 イヌ及びネコの腭線維化グレード分類	- 25 -
Fig. 2 マクロファージ細胞の出現	- 26 -
Fig. 3 筋線維芽細胞の特徴及び腭管の増生	- 27 -
Fig. 4 イヌ及びネコの自然発生性腭線維化へのマクロファージと筋線維芽細胞の関 与の模式図	- 28 -
第2章 ラットの腭発生過程における間葉系細胞の免疫表現型の解析.....	- 29 -
緒言.....	- 30 -
材料と方法	- 32 -
成績.....	- 35 -
考察.....	- 37 -
小括.....	- 40 -
Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細.....	- 41 -
Table 2 ラットの発生期における間葉系細胞及び腭管の免疫染色性.....	- 42 -
Fig. 1 胎齢 18 日の腭組織	- 43 -

Fig. 2 膵発過程における間質細胞と膵管上皮細胞の免疫組織化学染色による観察	- 44 -
Fig. 3 間葉系細胞の蛍光二重免疫染色	- 45 -
Fig. 4 ラット膵発生過程における間葉系細胞.....	- 46 -
第 3 章 薬物誘発ラット膵線維化の病態解析	- 47 -
緒 言.....	- 48 -
第 1 節 Dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発膵線維化の 病態解析	- 50 -
緒 言.....	- 50 -
材料と方法	- 52 -
成 績.....	- 55 -
考 察.....	- 57 -
小 括.....	- 61 -
Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細	- 63 -
Table 2 薬物誘発膵線維化の免疫染色性.....	- 64 -
Fig. 1 DBTC によるラット薬物誘発膵線維化の病態.....	- 65 -
Fig. 2 膵管の増生(過形成)	- 66 -
Fig. 3 オートファジー関連蛋白質の免疫組織化学的解析	- 67 -
Fig. 4 オートファジー関連蛋白質の mRNA 発現の解析.....	- 68 -
第 2 節 マクロファージの特性解析	- 69 -
緒 言.....	- 69 -
材料と方法	- 71 -
成 績.....	- 75 -
考 察.....	- 78 -
小 括.....	- 82 -
Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細	- 83 -
Table 2 薬物誘発膵線維化に出現するマクロファージの特性解析.....	- 84 -

Fig. 1 M1 型/M2 型マクロファージの出現.....	- 85 -
Fig. 2 マクロファージのその他の免疫表現型に関する 免疫組織化学的解析.....	- 86 -
Fig. 3 M1 型/M2 型マクロファージの蛍光二重免疫染色.....	- 87 -
Fig. 4 マクロファージ発現分子(MHC クラス II 及び CD204)の蛍光二重免疫染色	- 88 -
Fig. 5 炎症性サイトカインの特徴.....	- 89 -
Fig. 6 M1型/M2 型マクロファージの特徴.....	- 90 -
第 3 節 筋線維芽細胞の特性解析.....	- 91 -
緒 言.....	- 91 -
材料と方法.....	- 93 -
成 績.....	- 96 -
考 察.....	- 99 -
小 活.....	- 102 -
Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細.....	- 103 -
Table 2 筋線維芽細胞の特性解析.....	- 104 -
Fig. 1 筋線維芽細胞の特性解析.....	- 105 -
Fig. 2 筋線維芽細胞の蛍光二重免疫染色.....	- 106 -
Fig. 3 筋線維化における間葉系細胞の進展.....	- 107 -
総合討論.....	- 108 -
総 括.....	- 113 -
Fig. 1 筋線維化の病理発生機序.....	- 115 -
文 献.....	- 116 -
謝 辞.....	- 130 -

序 文

膵臓は、胃の背側に位置し、十二指腸に接して存在する外分泌腺と内分泌腺の二つの機能を併せ持つ生体にとって重要な臓器の一つである(坂井建雄 他, 2012)。その外分泌腺は消化酵素を含む膵液を十二指腸に分泌することで、口から消化管に運ばれた食物を吸収され易い小さな分子に分解する機能を有する。膵液には、糖質を分解するアミラーゼ、蛋白質を分解するトリプシン、そして脂肪を分解するリパーゼなどの酵素が含まれ、分解された低分子の栄養素は体の構成成分となり、また様々なエネルギー代謝に使われる。一方、内分泌腺として機能する膵臓のランゲルハンス島には β 細胞から分泌されるインスリン、 α 細胞から分泌されるグルカゴン、そして δ 細胞から分泌されるソマトスタチンがある。これらの内分泌腺分泌ホルモンは、糖代謝において極めて重要とされる(矢田俊彦, 2007)。インスリンは、臓器や器官でエネルギー代謝に利用される血糖の取り込みや蓄積を促し、さらには細胞内での蛋白質合成や細胞増殖に関与する極めて重要なホルモンとして知られる。グルカゴンやソマトスタチンは血糖値が低下すると肝臓に糖を作らせ血液中の糖を増加させる機能を有する(矢田俊彦, 2007)。特に、インスリンの機能異常は I 型(直接的なランゲルハンス島障害)あるいは II 型(異常血糖値による代謝障害)の糖尿病の原因となる(Jubb and Stent, 2015)。

飽食の時代と言われる近年、膵臓の疾患が増加している。2011 年の膵疾患の全国調査によると、急性膵炎は年間 6 万 3 千人の罹患者がおり、その原因にはアルコール性が最多の 33.5%を占め、続いて胆石、特発性(原因不明)が続く。また、慢性膵炎は年間 6 万 7 千人程度が受診者として登録され、その多くは急性膵炎から進展するとされている(下瀬川透, 2014; Hruban, 2009)。その慢性膵炎は、組織学的には、炎症細胞浸潤を伴った不可逆性の進行性の線維化により特徴付けられる(Hruban, 2009)。このような理由から、慢性膵炎は難治性疾患とされる。臨床的には、慢性膵炎患者は、

膵外分泌腺及び内分泌腺の機能低下が生じることから、初期症状としては数日間続く激しい腹痛が、さらに進行すれば消化吸収障害から消瘦及び下痢がみられる。また、内分泌腺の機能低下から糖代謝異常が生じ続発性(二次性)の糖尿病に陥るとされる(Hruban, 2009)。慢性膵炎は膵臓癌のリスクファクターであることも知られている(Rocca et al., 1987; Lowenfels et al., 1993)。このようなことから、慢性膵炎患者は、生命予後の短縮や quality of life(QOL)の低下が引き起こされる。現在、慢性膵炎に対しては対症療法が主であり、根本的な治療法は確立されていない。

線維化は、病理学的には、組織傷害後の修復機転であり、程度の軽い傷害では組織は復元する。しかし、傷害が繰り返されたり、慢性化すると進行性の線維化が生じる。進行性の線維化のメカニズムについては、実験的に作出された肝線維化や腎線維化において研究が進められている(Golbar et al., 2011; Yamate et al., 1996)。線維化は、基本的には傷害された組織に反応する炎症細胞、特にマクロファージと、マクロファージから産生される因子により誘導される筋線維芽細胞が重要な役割を演じるとされる(Mo et al., 1999; Schuppan et al., 1999; Ide et al., 2001)。線維原性因子としては TGF- β 1 がよく知られる(Blobe et al., 2000; Darby et al., 1990)。しかし、そのメカニズムの全貌は未だ解明されていない。特に、キー細胞とされるマクロファージについてはその機能的な役割が、筋線維芽細胞についてはその起源と細胞特性が解明すべき課題として残っている。

傷害された部位に出現するマクロファージは多様な機能を現すとされる。近年、そのような病的部位に出現するマクロファージの機能特性に対して M1 型/M2 型分極化の概念が提唱された(Patel et al., 2012; Wijesundera et al., 2014; Sporrer et al., 2009)。M1 型マクロファージは、古典的なマクロファージと言われ細胞傷害や貪食活性が高く、傷害早期に出現し、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインを産生することで、組織傷害や炎症を助長する。一方、M2 型マクロファージは M1 型に遅れて出現し TGF- β 1 や IL-10 などの線維原性因子を産生することで、組織の修復に係るとされる。さらに、M2 型マクロファージは、時に免疫反応を誘導することで、複雑な慢性病変の形成にも

係るとされる (Mantovani et al., 2002; Gordon, 2003)。免疫組織化学的には、M1 型マクロファージは CD68 抗原を、M2 型マクロファージは CD163 抗原を発現することで区別できるとされる (Golbar et al., 2012; Polfliet et al., 2006)。なお、CD68 抗原はリソソーム膜に発現し、貪食活性の指標となる (Damoiseaux et al., 1994; Dijkstra et al., 1985)。一方、CD163 抗原はヘモグロビンハプトグロブリン複合体のスカベンジャーレセプターとされる (Polfliet et al., 2006)。このようにマクロファージは、周囲の微小環境因子により容易に形質を変化させることができる多種多様な細胞群と考えられることから、近年、マクロファージのそのような機能を免疫組織化学的に評価する試みが進められている。M1 型の CD68 や M2 型の CD163 に加え、MHC クラス II、CD204 や Iba-1 などの抗原に対する抗体がマクロファージ機能の解析に用いられている。MHC クラス II は活性化した樹状細胞やマクロファージで発現するとされ、抗原提示能が高い細胞と考えられている (Ide et al., 2005; Yamashiro et al., 1994)。CD204 はクラス A のスカベンジャーレセプターとされ、脂質代謝との関連があるとされる (Greaves et al., 1998)。イオン化カルシウム結合アダプター分子 1 (Iba-1) は、マクロファージの足場を構成する蛋白質とされ、細胞の遊走やファゴサイトーシスに係るとされる (Ohsawa et al., 2000; Sasaki et al., 2001)。MHC クラス II、CD204 や Iba-1 などの抗原を発現するマクロファージが、M1 型あるいは M2 型どちらの機能を持つのかについては十分に解明されていない。線維化部位に出現するマクロファージは、その機能特性に加え、由来についても議論されている。例えば、肝線維化ではクッパー細胞と血中単球由来のマクロファージが出現し (Wijesundera et al., 2014)、腎線維化では多くは血中単球に由来すると考えられている (Yamate et al., 1998)。線維化におけるマクロファージの多様な機能と由来については、未だ解明すべき点が多い。

線維化において重要とされるもう一つの細胞である筋線維芽細胞は、線維芽細胞と平滑筋細胞の中間的な性格を有する間葉系細胞で、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質を産生することで、線維化の進展に係るとされる (Desmoulière et al., 2003)。その筋線維芽細胞の大きな特徴としては収縮能を有することであり、よって、

筋線維芽細胞は拘縮細胞とも呼ばれる (Sappino et al., 1990)。この筋線維芽細胞は、免疫組織化学的に、vimentin、desmin や α -平滑筋アクチン (α -SMA) といった細胞骨格を、その形成程度において様々な割合で発現するとされる (Sappino et al., 1990; Yamate et al., 2005; Hinz et al., 2007)。特に、よく発達した筋線維芽細胞では α -SMA を発現することから、 α -SMA の発現が筋線維芽細胞の同定に汎用されている (Wynn, 2008; Desmoulière et al., 2003)。このような筋線維芽細胞は、通常は間質にある既存の線維芽細胞から形成されるとされるが、肝線維化では肝星細胞 (類洞周囲細胞/伊東細胞) から、腎線維化では傷害尿細管の上皮-間葉転換を介して形成されると考えられている (Zeisberg et al., 2001; Kalluri and Neilson, 2003)。さらには、近年においては骨髄の幹細胞が線維化部に誘導され筋線維芽細胞に転換すると考えられている (LeBleu et al., 2013; Kisseleva and Brenner, 2008)。また、筋線維芽細胞の免疫組織化学的な興味ある特徴として、肝線維化部位の筋線維芽細胞は、脳組織にある星状膠細胞に発現するグリア細線維性酸性蛋白質 (GFAP) を発現することが見出された。これは、その由来である肝星細胞が GFAP をもともと発現していることによるとされる (Cassiman et al., 2002)。このように、筋線維芽細胞の起源と細胞特性については未だ解明すべき点が多く、興味ある研究課題といえる。

上述したように、慢性膵炎では進行性の線維化が生じる。しかし、肝線維化や腎線維化に比べるとその病理発生については未だ十分には研究されていない。そこで、本研究では、膵線維化に関わるマクロファージと筋線維芽細胞の特性を、主に免疫組織化学的手法を用いて解析し、その病理発生機序の一端を解明することを目的とした。まず、第 1 章では、イヌ及びネコの自然発生性膵線維化病変を用いて、筋線維芽細胞の免疫組織化学的な特性を中心に解析を行った。次に、第 3 章で記述する薬物誘発ラット膵線維化の病態を解析するにあたり、ラットの膵発生過程における間葉系細胞の免疫表現型の特性を第 2 章において追究した。特に、肝星細胞と同様に膵臓には膵星細胞が存在していることから、GFAP を発現する膵星細胞の出現に焦点を当てて解析した。第 3 章では、dibutyltin dichloride を用いて薬物誘発ラット膵線維化モデル

を作製し、その病態を病理組織学的に解析することに加え、マクロファージと筋線維芽細胞の免疫組織化学的な特徴を追究した。この一連の研究により得られた成果は、腓線維化の発生機序の解明や、マクロファージや筋線維芽細胞の機能を規定することに基づいた新たな治療法探索の一助になることが期待できる。

第 1 章

イヌ及びネコの自然発生性腭線維化の病態解析

緒言

多くの慢性膵炎は、膵組織の炎症(急性膵炎)が連続的又は頻発することで生じる進行性の不可逆的疾患と考えられている(Kloppel and Maillet, 1993)。ヒトの慢性膵炎は、臨床学的には腹痛と恒久的な膵機能障害があり、組織学的には巣状壊死とそれに続く小葉及び腺房内の線維化により特徴づけられる。さらには、線維化による膵導管の閉塞・狭窄に伴う二次的な膵管内結石や膵管拡張による偽嚢胞の形成をみることがある(厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班 他, 2009)。この病態が進行すれば外分泌及び内分泌機能の喪失が生じ、消化器機能の低下や二次的な糖尿病を発症する(Hruban, 2009)。

慢性膵炎の治療法を確立するためには病態を解析することによる病理発生と進展機序の解明が必要である。その一つの方策として、動物モデルの作製がある。マウスやラットを用いた慢性膵炎の動物モデルの作出が試みられ、広く使用されている(Lerch and Gorelick, 2013)。しかし、種差の特異性や感受性の観点から、マウスやラットなどのげっ歯類のみではなく、多様な動物種での膵線維化の病態を比較解析することが望ましい。また、ヒトの膵線維化の発生に関与すると考えられる病因は単一ではなく、複数の要因が考えられている(Table 1)(原田英雄 他, 1997)。モデル動物の膵線維化に加えて、異なる動物種の自然発生性の膵線維化を病理学的に評価することには意義がある。

そこで、この第1章では、2005年から2011年に大阪府立大学獣医病理学教室で剖検に供されたイヌ及びネコから膵臓を収集し、その材料を用いてマクロファージ及び筋線維芽細胞の特性を免疫組織化学的に解析した。マクロファージはイオン化カルシウム結合アダプター分子1(Iba-1)の発現を、筋線維芽細胞については vimentin と α -平滑筋アクチン(α -SMA)の発現を指標に解析した。膵星細胞が、グリア細線維性酸性蛋白質(GFAP)を発現していることから、筋線維芽細胞の特性解析に GFAP の発

現を加えた。なお、膵線維化では、膵管の増生がみられることから、膵管上皮に発現する Cytokeratin 19 (CK19) の免疫染色も併せて行った。

材料及び方法

1. 供試サンプルと腓線維化の評価

2005年から2011年に大阪府立大学獣医病理学教室で剖検に供されたイヌ13例及びネコ2例から得られた腓臓を解析対象とした。なお、イヌ4例は腓臓には異常はみられなかったことから、正常な個体として扱った。使用したこれら動物の種、性別、年齢をTable 2に示す。腓臓は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後、4 μ mに薄切してヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)と膠原線維の蓄積を評価するためのアザン染色を施した。また、免疫組織化学的染色にも供した。

腓線維化は、HE染色に加えて、アザン染色標本を用いて、5段階のグレードで半定量的に評価した。

－:線維化は見られず正常な腓組織を呈する。

±:極めてわずかに線維化が認められる。

+:わずかに線維化が認められる又は局所に線維化が認められる。

2+:中等度の線維化が認められる。

3+:びまん性の高度な線維化が認められる。

なお、これらの症例の死因については、大学の外部から得られた個体が多く、臨床的な経過を追究することができず、よって腓線維化が直接的な死亡原因であるかどうかは不明であった。腓臓に見られた付帯する病理学的所見もTable 2に記載した。

2. 免疫組織化学的染色

使用した抗体をTable 3に示す。

10%中性緩衝ホルマリンで固定され、4 μ mに薄切された腓組織はモノクローナル又はポリクローナル一次抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。Vimentin、GFAP及び α -SMA染色用組織切片は、0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)中で20分間

マイクロウェーブ処理することで賦活化を行った。CK19 染色用切片は、10 $\mu\text{g/ml}$ プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) で 10 分間処理することで賦活化を行った。次いで、これらの切片は 3% H_2O_2 /0.065% NaN_3 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、さらに非特異的結合を阻害するために 5%スキムミルクを含む PBS で 30 分間処理した。各切片は室温で一次抗体と 60 分間インキュベーションした後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した二次抗体 (Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan) と 30 分間インキュベーションした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド (DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて視覚化した。陰性対照は一次抗体の代わりに非免疫化マウス又はウサギ IgG 血清を使用した。免疫組織化学染色後、ヘマトキシリンで軽く対比染色を行った。

免疫組織化学染色を施したサンプルは、陽性細胞の出現を以下のように半定量的に評価した。

- :出現なし。
- ±:わずかに出現する。
- +:軽度に出現する。
- 2+:中等度に出現する。
- 3+:高度に出現する。

成績

1. 膵サンプルの病理組織学的評価

HE 染色及びアザン染色によって、膵臓の病態を観察し、「材料及び方法」に記載するように線維化のグレードを5段階(－、±、＋、2＋、3＋)に分けた。

正常な個体(－)が4例、極めて軽度な線維化(±)を示す個体が2例、軽度な線維化(＋)の個体が4例、中等度の線維化(2＋)の個体が4例、高度な線維化(3＋)の個体が1例であった。その評価結果を Table 2 にまとめた。なお、観察した2例のネコのうち1例は2＋、他の1例は3＋で、最も高度な線維化はこのネコ1例のみであった。イヌの症例もネコの症例も、膵線維化の HE 染色像と後述する免疫組織化学的な染色像には違いがみられないことから、イヌ及びネコの症例を区別することなく一緒の評価に用いた。

正常な個体の膵組織は、外分泌腺が小葉を作り胞巣状に整然と配置されており、その中に膵島が散見された。アザン染色により青染色される膠原線維は、正常の膵組織でほとんど認められなかった(Fig. 1 A, F, K)。極めて軽度な線維化のサンプル(±)では、膵小葉間の間質に浮腫がみられ、炎症細胞の反応に乏しく、僅かに膠原線維が認められた(Fig. 1 B, G, L)。軽度な線維化(＋)のサンプルでは、外分泌腺細胞がやや萎縮気味となり、浮腫は軽減したが、軽度の炎症細胞浸潤が見られるようになった。また、膠原線維は膵小葉間に目立ち始めた(Fig. 1 C, H, M)。中等度の線維化(2＋)のサンプルでは、外分泌腺の萎縮と炎症細胞の浸潤がさらに目立ち、束状の膠原線維の増生がみられた(Fig. 1 D, I, N)。高度な線維化のサンプル(3＋)では、外分泌腺細胞と小葉単位の萎縮が高度となり、その萎縮組織の間に炎症細胞を伴い太い束状に増生した膠原線維が認められた(Fig. 1 E, J, O)。なお、炎症細胞の多くは後述するように多くはマクロファージであった。

なお、今回用いたサンプルの膵線維化の原因は組織学的には特定できないが、膵

線維化は高齢動物で認められる傾向があった。また、腓線維化の個体には、雌雄や系統による差は認められなかった。

2. 免疫組織化学的解析

免疫組織化学染色による結果を Table 4 にまとめた。

2.1. マクロファージ細胞の出現 (Table 4)

Iba-1 を発現するマクロファージの出現を解析した。正常な腓では、Iba-1 陽性マクロファージ(既存の組織球と思われる)は、腺房周囲にわずかに存在した (Fig. 2 A)。形態学的には、紡錘形の細胞として認められた。腓線維化のグレードが高度 (±、+、2+、3+) になるに伴い Iba-1 陽性細胞の出現程度が徐々に増加した (Fig. 2 B, C)。特に、3+ のサンプルでは高度な発現が見られた (Fig. 2 C)。その Iba-1 陽性細胞は、主に膠原線維の増生部位で目立ち、その形態は、円形・類円形、そして時に大型円形を呈していた。

2.2. 筋線維芽細胞の特徴 (Table 4)

正常な腓組織には、vimentin 陽性の間質細胞が散見された。腓線維化の程度 (±、+、2+、3+) が増加するにつれて、vimentin 陽性細胞は出現程度が増加し、萎縮した外分泌腺や腓小葉間に認められた。形態学的には紡錘形から卵円形を呈していた (Fig. 3 A, E)。

腓星細胞は GFAP を発現するとされる (Bachem et al., 1998; Apte et al., 1998)。正常な腓組織において、腺房周囲に GFAP 陽性細胞が散見された。GFAP 陽性細胞は、腓線維化の程度が増加するに伴いその発現程度が増加した。形態的には、細長い紡錘形を呈する細胞が多かった (Fig. 3 C, G)。なお、出現程度は vimentin 陽性細胞よりは少ない傾向にあり、腓線維化グレード 3+ のサンプルでは、中等度の発現であった。

分化した筋線維芽細胞に認められる α -SMA 陽性細胞は、正常な腓組織では腺房周囲に極めてわずかに認められたが、認められない個体 (-) もあった。 α -SMA 陽性

細胞は、vimentin や GFAP 陽性細胞と同様に、腓線維化の程度が高度(±、+、2+、3+)になるに伴い増加した。その出現程度の推移は GFAP 陽性細胞のそれに類似し、腓線維化グレード 3+のサンプルで中等度の発現であった。形態学的には、やはり GFAP 陽性細胞と同様に、細長い紡錘形を呈していた (Fig. 3 B, F)。

なお、筋線維芽細胞に発現するとされる desmin (Schmitt-Gräff et al., 1994) の解析を試みたが、その陽性細胞は求められなかった。陽性対照として用いたサンプルでは染色されたことから、ホルマリン固定が染色に適していなかったことが考えられた。

2.3. 腓管増生の解析 (Table 4)

腓線維化では腓管上皮の増生が生じる (Sturgess, 1984; Bockman, 1997; Strobel et al., 2007)。腓管上皮は胆管上皮と同様に CK19 に対して免疫染色陽性となること (Bouwens et al., 1995; Golbar et al., 2011) から、CK19 に対する免疫染色を行った。正常な腓組織では、部位にもよるが CK19 陽性の腓管が散見された。CK19 陽性の腓管の増生は、腓線維化の程度(±、+、2+、3+)が増加するに伴いその出現程度が増加した。その陽性細胞は細い管状を呈していた (Fig. 3 D, H)。

考 察

イヌ及びネコの自然発生性腭線維化病変に出現するマクロファージと筋線維芽細胞の特徴を免疫組織化学的に解析した。

1. 腭線維化の病態解析

大阪府立大学獣医病理学教室で保管されている剖検材料から正常な腭組織の個体4例と、腭線維化の個体11例を探し出した。イヌやネコで腭線維化を発症する個体は決して多くはなく、これだけの症例を収集することは大変な作業であった。それゆえに、この研究で検査対象とした腭線維化の症例は貴重な材料と考えている。

病理組織学的な解析により、今回の症例は、極めて軽度な線維化(±)を示す個体が2例、軽度な線維化(+)の個体が4例、中等度の線維化(2+)の個体が4例、高度な線維化(3+)の個体が1例に区別することができた。イヌとネコの種差、品種の差、性差については認められなかった。この点は今後症例を増やして解析する必要がある。

イヌ及びネコの腭線維化の病変は、線維化の進行に伴い腭小葉・腺房を構成する外分泌腺・小葉の萎縮とその間隙を埋めるように増生する膠原線維の増加により特徴付けられた。また、間質には炎症細胞の反応(主に Iba-1 陽性マクロファージ)がやはり線維化の進行に伴い増加した。加えて、CK19 陽性の腭管増生が認められた。このような組織学的な特徴は、ヒトの腭線維化のそれに類似していることが示された(Sturgess, 1984; Bockman, 1997; Strobel et al., 2007)。

ヒトでは、2011年度の全国調査では、慢性腭炎の男女を合わせた成因はアルコール性が67.5%と最も多く、飲酒などの生活習慣に基づいて起こるとされるが、特発性が20.0%と飲酒をしないヒトにおいても認められることがあり、原因不明の患者も多い(下瀬川透, 2014)。イヌやネコにおいても、慢性腭炎の報告はある(Watson, 2015, Bazelle and Watson, 2014)。しかし、イヌでは他の病気で死亡した個体に偶然認められることが

多いとされ、それは約 6 割程度が慢性膵炎認められたとする報告がある (Bostrom et al., 2013)。よって、イヌでも多くは原因不明とされている。今回のイヌ及びネコの膵線維化の原因については、十分な臨床データが得られなかったこともあり、かつ組織学的に成因を特定できる所見もなかった。そもそも、線維化は、様々な臓器に生じ、いかなる原因であっても、その終末像として生じる病態である。原因特定は組織学的には難しいと考えられている。原因不明とされているイヌやネコの膵線維化の発症を防ぐためには、イヌやネコの食生活を含めた生前の臨床データなど、より多くの個体をモニターして解析する必要がある。この点は今後の課題と考える。

2. マクロファージの出現

線維化の進行は浸潤するマクロファージから産生される線維原性因子 (TGF- β 1) などが重要とされる (Shen et al., 2014; Vannella and Wynn, 2017)。今回のイヌ及びネコの膵線維化において Iba-1 陽性のマクロファージの出現を解析したところ膵線維化の程度 (±、+、2+、3+) が増加するに伴い Iba-1 陽性細胞が増加した。以前行ったイヌ及びネコの自然発生性腎線維化病変の解析においても、マクロファージの出現が線維化に伴い増加することが報告されている (Ide et al., 2001)。今回は、10% 緩衝ホルマリン固定材料であったことから線維原性因子の産生について、その遺伝子解析ができなかったが、Iba-1 陽性マクロファージが膵線維化の進行に係っていることが示唆された。

3. 筋線維芽細胞の出現

肝線維化や腎線維化において形成される筋線維芽細胞は、様々な程度で vimentin、desmin 及び α -SMA を発現し、線維化に伴ってその出現が増加することが知られている (Sappino et al., 1990; Yamate et al., 2005; Hinz et al., 2007)。特に、 α -SMA は、分化した筋線維芽細胞の特徴的に発現するとされる (Wynn, 2008; Desmoulière et al., 2003)。サンプルはホルマリン固定されており、抗 desmin 抗体による染色に適さな

かったため、本研究では、desmin 陽性細胞については評価することはできなかった。しかし、今回検査対象としたイヌ及びネコの自然発生性腠線維化について、vimentin 及び α -SMA 陽性細胞の発現がみられた。その vimentin 及び α -SMA 陽性細胞は、腠線維化の程度(±、+、2+、3+)の増加に伴い出現が高度となった。筋線維芽細胞は膠原線維を産生することから(Desmouliere et al., 2003)、vimentin 及び α -SMA を発現する筋線維芽細胞がイヌ及びネコの自然発生性腠線維化の進行に関与していることが初めて示された。

肝線維化では GFAP 陽性の肝星細胞が筋線維芽細胞に進展すると考えられており、実際ラットの肝線維化部位には GFAP 陽性の肝星細胞が数多くみられる(Tennakoon et al., 2013)。腠星細胞も GFAP を発現することから(Bachem et al., 1998; Apte et al., 1998)、GFAP の免疫染色を試みた。その結果、腠線維化の程度(±、+、2+、3+)の増加に伴い GFAP 陽性細胞が増加した。その出現程度は、 α -SMA 陽性細胞のそれと類似した。二重蛍光免疫染色等(今回は固定方法の関連で実施できず。)で筋線維芽細胞の vimentin、 α -SMA 及び GFAP 発現を解析する必要があるが、イヌ及びネコの自然発生性腠線維化に出現する筋線維芽細胞は腠星細胞に起源がある可能性が示された。

なお、イヌ及びネコの自然発生性腠線維化の病態の詳細な免疫組織化学的な解析の試みはこの研究が初めてである。

小 括

イヌ及びネコの自然発生性腭線維化の病態を解析し、線維化の程度をグレード(−、±、+、2+、3+)分けした。肝線維化及び腎線維化と同様に、イヌ及びネコのこのような腭線維化病変には Iba-1 陽性のマクロファージがグレードの増加に伴い増加し、さらには vimentin 及び α -SMA を発現する筋線維芽細胞も、線維化の程度に伴い発現が増加した (Fig. 4)。また、腭線維化に伴い増加した筋線維芽細胞には、腭星細胞が元来有する GFAP の発現の増加も確認されたことから、イヌ及びネコの腭線維化に出現する筋線維芽細胞は腭星細胞から進展する可能性が示唆された。

Table 1 臍線維化の発生に關与する因子

-
1. 浮腫(リンパ流のうっ滞)
 2. 門脈血流のうっ滞
 3. 虚血
 4. 臍實質細胞の萎縮、脱落、消失
 5. 炎症
 6. 臍管の狭窄、閉塞と臍管内圧の上昇
-

原田英雄 他 1997より引用

Table 2 評価に用いたイヌ及びネコの膵臓 HE 所見及び線維化
グレード

動物種:品種	性別	年齢	膵臓病理所見	線維化 グレード
イヌ:ミニチュアシュナウザー	オス	6歳2か月	正常	—
イヌ:ボーダーコリー	メス	4歳9か月	正常	—
イヌ:柴犬	避妊	4歳10か月	正常	—
イヌ:パピヨン	オス	4歳	正常	—
イヌ:ラブラドルレトリバー	オス	10歳5か月	巣状壊死多数, 出血, 急性 の壊死	±
イヌ:ミニチュアシュナウザー	去勢	8歳8か月	その他所見なし	±
イヌ:ビーグル	オス	12歳	うっ血, 血栓	+
イヌ:シーズー	オス	12歳	出血, ラ氏島腫瘍の初期 病変	+
イヌ:ウェルシュコーギー	オス	9歳2か月	その他所見なし	+
イヌ:紀州犬	メス	11歳5ヶ月	結節性過形成	+
イヌ:マルチーズ	オス	7歳	ラ氏島の消失, 糖尿病	2+
イヌ:バーニーズマウンテンドッグ	メス	5歳	悪性組織球症(膵への転 移)	2+
イヌ:ジャイアント・シュナウザー	メス	10歳8ヶ月	結節性過形成	2+
ネコ:雑種	メス	不明	細胞浸潤	2+
ネコ:雑種	オス	不明	細胞浸潤	3+

Table 3 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細

抗体	抗体タイプ	クローン	希釈率	賦活化	供給元
抗 vimentin 抗体	マウスモノクローナル	V9	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 α -SMA 抗体	マウスモノクローナル	1A4	1:1000	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 GFAP 抗体	ウサギポリクローナル	—	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Transgenic Inc, Kumamoto, Japan
抗 Iba-1 抗体	ウサギポリクローナル	—	1:1000	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan
抗 CK19 抗体	マウスモノクローナル	B170	1:100	10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) 処理	Novocastra Laboratories Ltd, UK

α -SMA: α -smooth muscle actin, GFAP: Glial fibrillary acidic protein

Table 4 自然発生性腠線維化の免疫学的特性

抗体 \ 線維化グレード	—	±	+	2+	3+
Vimentin	+	2+	2+	2+	3+
GFAP	±	±~+	±~+	+~2+	2+
α-SMA	— ~ ±	+	+~2+	2+	2+
Iba-1	±	+	+	+	3+
CK19	— ~ ±	— ~ +	+~2+	+~2+	3+

—;出現なし, ±;わずかに出現, +;軽度に出現, 2+;中等度に出現, 3+;高度に出現

GFAP; Glial fibrillary acidic protein, α-SMA; α-smooth muscle actin

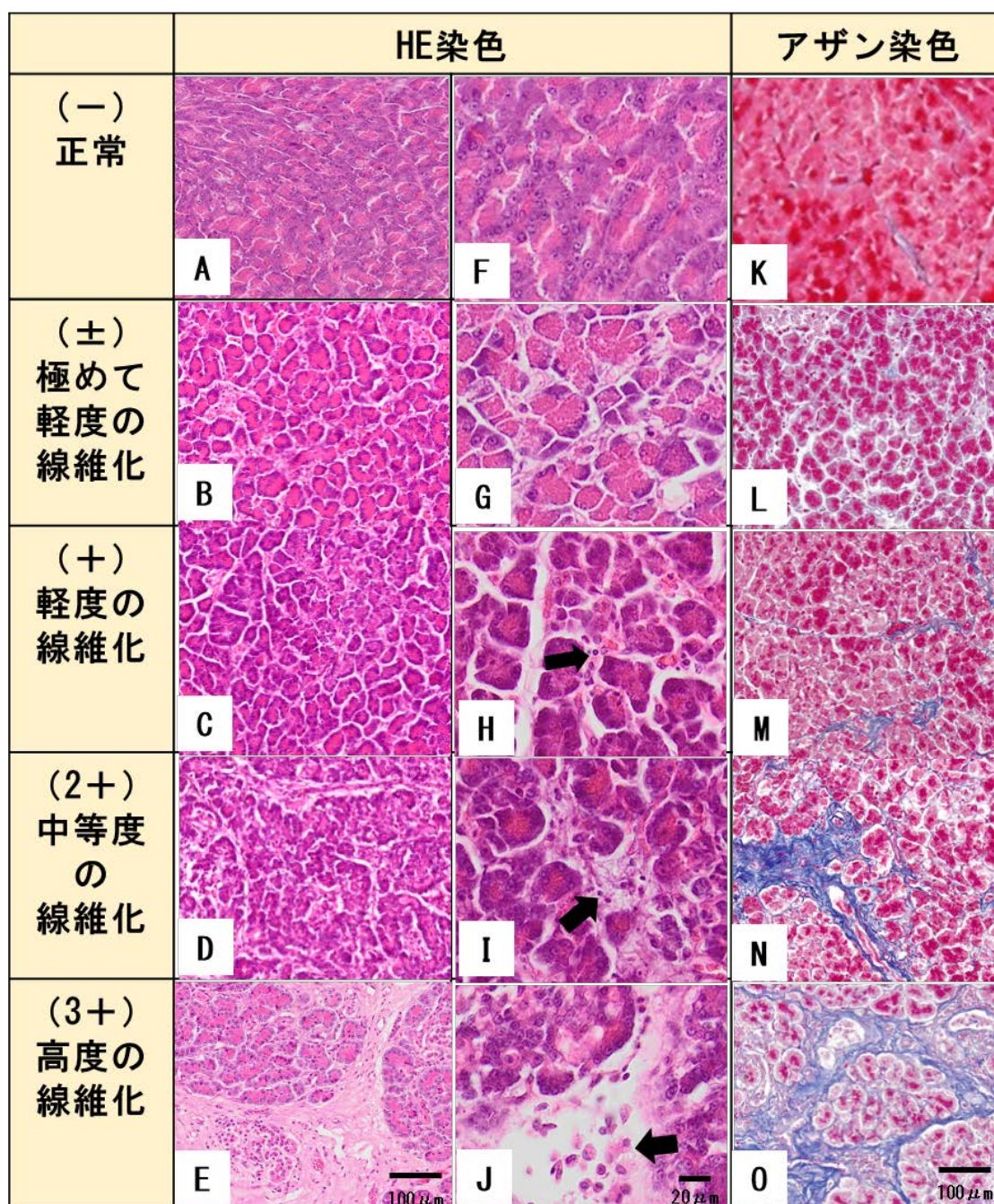


Fig. 1 イヌ及びネコの膵線維化グレード分類

HE 染色及びアザン染色によって、膵臓の病態を観察し、線維化のグレードを 5 段階(-、±、+、2+、3+)に分けた。正常～中等度はイヌの症例、高度はネコの症例。なお、各グレードの病理組織学的な特徴は本文に記載する。矢印は炎症細胞を示す。

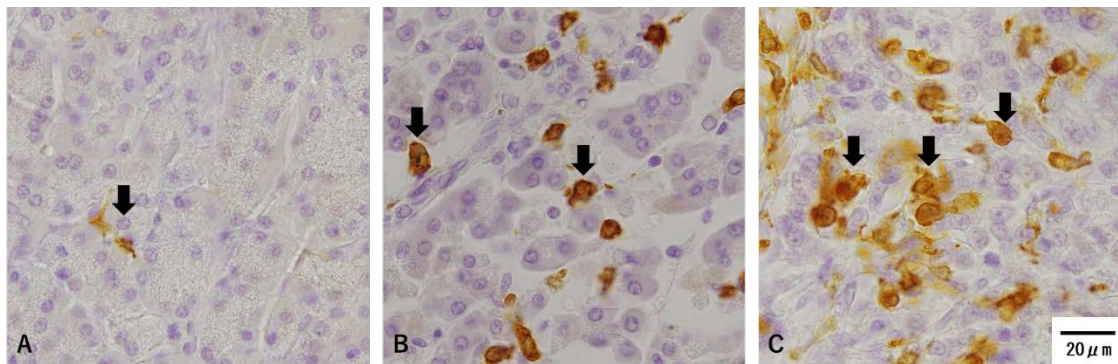


Fig. 2 マクロファージ細胞の出現

Iba-1 の免疫組織化学染色。矢印は陽性細胞を示す。A: 正常な膵(線維化グレード (-))。B: 線維化グレード 2+ の膵。C: 線維化グレード 3+ の膵。線維化グレードが高度になるに伴い、Iba-1 陽性マクロファージが増加した。Iba-1 陽性マクロファージは膠原線維の増生部位で目立ち、その形態は円形又は類円形、そして時に大型円形を呈していた。

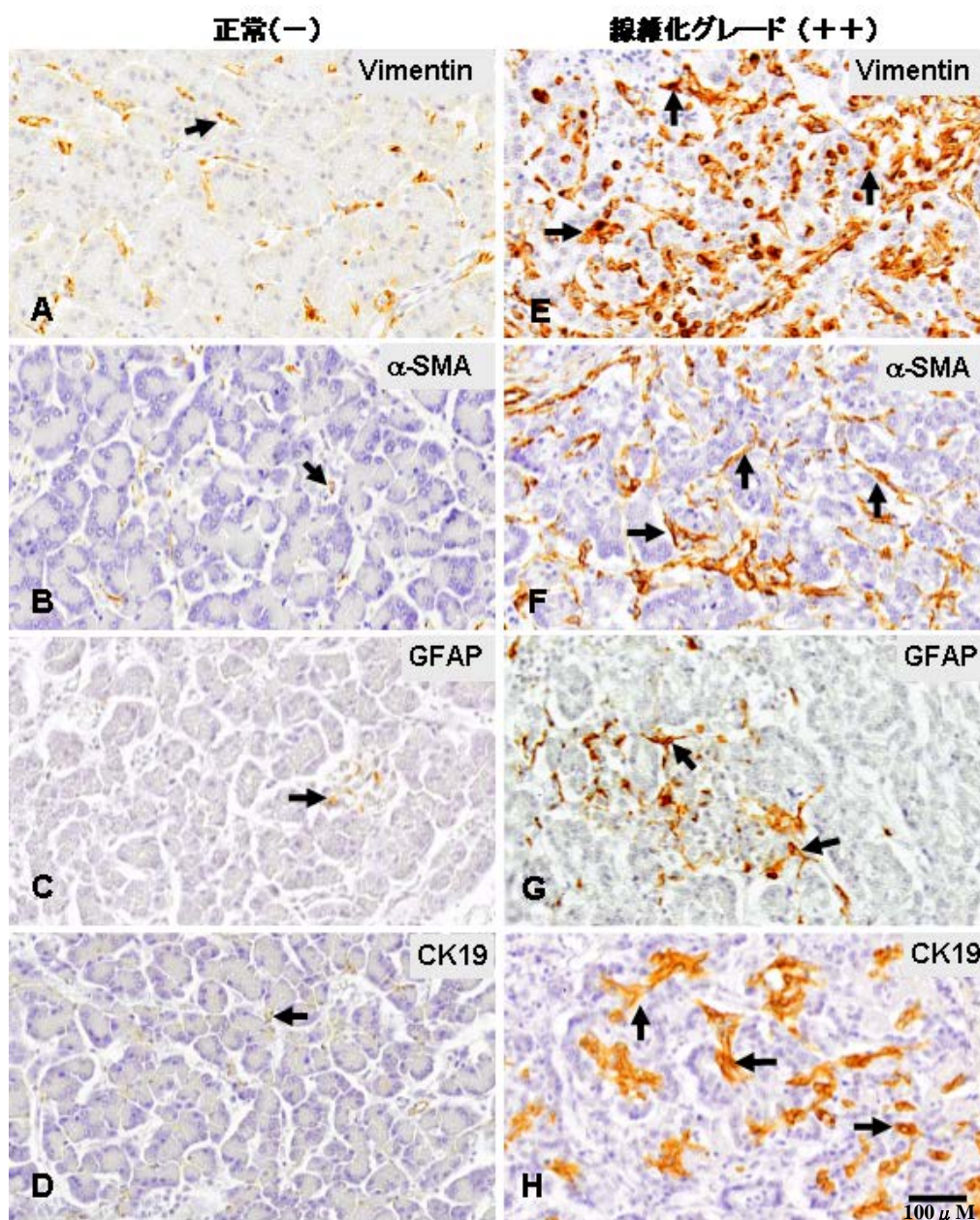


Fig. 3 筋線維芽細胞の特徴及び膵管の増生

正常(グレード(-))と線維化グレード 2+の膵サンプルにおける筋線維芽細胞に発現する vimentin、GFAP 及び α -SMA と膵管上皮に発現する CK19 に対する免疫組織化学染色結果。線維化のグレードが高度になるに伴い陽性細胞は増加した。矢印は陽性細胞を示す。

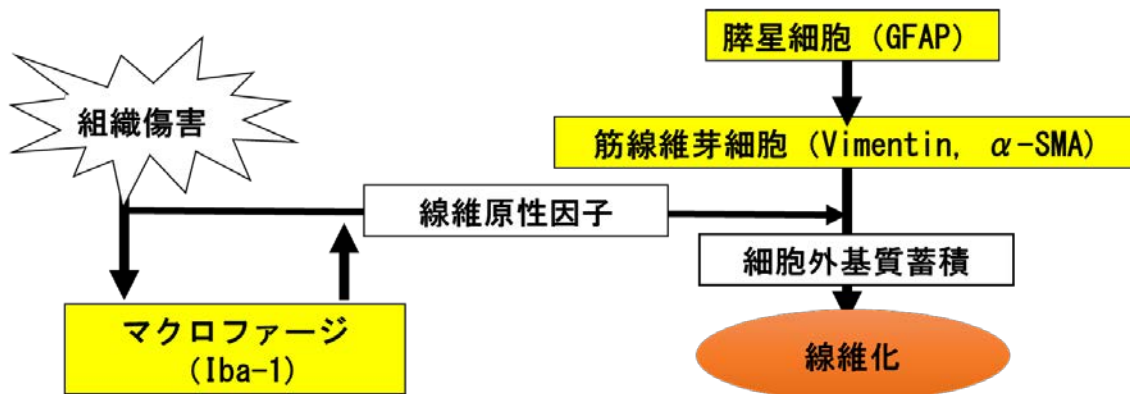


Fig. 4 イヌ及びネコの自然発生性腠線維化へのマクロファージと筋線維芽細胞の関与の模式図

Iba-1 陽性マクロファージ及び vimentin 及び α -SMA 陽性筋線維芽細胞は線維化が高度になるに伴って増加した。このことから、イヌ及びネコの自然発生性腠線維化へのマクロファージ及び筋線維芽細胞の関与が示唆された。通常、線維化の形成において、傷害に反応するマクロファージは線維原性因子を産生し、その因子が細胞外基質を産生する筋線維芽細胞を誘導すると考えられている。

第2章

ラットの膵発生過程における間葉系細胞の免疫表現型の解析

緒言

膵線維化は慢性炎症の病態で、それは長期にわたる、あるいは繰り返される炎症細胞の反応と膠原線維を産生する間質線維芽細胞/筋線維芽細胞の増生により特徴付けられる(Hruban, 2009)。それは組織の傷害と傷害後の修復機転であるリモデリングとして捉えることができる。リモデリングは、実質細胞と間質細胞の相互作用により惹起され、細胞の配置が変わり組織の構造が変化する(Tanaka and Miyajima, 2016)。リモデリングが、正常な方向に進めば、完全な組織の修復や再生(完全再生)が起こり、異常な方向に進めば、線維化や瘢痕になる(不完全再生)(Hruban, 2009)。そのため、リモデリングの機転を解析することは、線維化の病態を正常に導く治療法のために重要な知見になると考えられる。

一方、胎児期の器官の発生過程での組織形成はモデリングと呼ばれるが、その現象は傷害組織のリモデリングの現象と類似しているとされる(Ito et al., 2007; Stanger and Hebrok, 2013)。膵臓の発生は肝臓と同様に前腸の内胚葉上皮に由来し、前駆細胞を経て、膵管、外分泌腺及び内分泌腺といった膵実質細胞に分化する(安田峯生, 2010; Cattly, 2013)。また、間質には組織マクロファージや膵星細胞などの間質構成細胞が定座し、実質細胞とこれら細胞の相互作用により膵組織の恒常性が維持されていると考えられている(Calderon et al., 2015)。

ラットは毒性試験に繁用される実験動物であり、様々な手法による病態モデルの作製にも広く用いられる。ラットを用いた肝や腎線維化のモデル動物の作製も試みられており、線維化モデルとして多くの知見が蓄積されている(Golbar et al., 2011; Yamate et al., 1996)。今回のこの一連の研究では、第3章において薬物誘発性膵線維化モデルを作製し、その病態を詳細に解析している。それに先立ち、この第2章では、ラットにおける正常な膵組織のモデリング、特に間質細胞の免疫組織化学的な特性について、発生過程の膵組織を用いて解析した。膵線維化では、膠原線維を産生する筋線

維芽細胞が、vimentin、desmin あるいは α -平滑筋アクチン(α -SMA)などの細胞骨格を発現し、その筋線維芽細胞は腭星細胞に由来すると考えられていることから(Omary et al., 2007)、種々の細胞骨格の発現状態と、グリア細線維性酸性蛋白質(GFAP)を発現する腭星細胞の動態に焦点を置いて解析した。腭発生過程でのモデリングにおける間質細胞の動態は、薬物誘発腭線維化のリモデリングの病態解析における基礎的な知見を提示するものとする。

材料と方法

1. 供試動物及びサンプルの採取

供試動物として、4週齢雄及び妊娠雌F344ラットを日本チャールスリバー株式会社（日野生産場）から購入して用いた。供試動物の飼育は、本学動物科学教育研究センターのSPF動物飼育室において行った。餌及び水は自由摂取とした。2匹の妊娠ラットから得た胎齢18、20日、3匹の妊娠ラットを分娩させて得た生後1、8、12、15及び21日齢及び5週齢雄（入手後1週間馴化）の膵組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン又はPeriodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定した。また一部はコンパウンドに包埋して-80度で凍結保存した。

10%中性緩衝ホルマリン及びPLP固定した膵臓は、パラフィン包埋した後、4 μ mに薄切してヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色) 及び免疫組織学染色 (vimentin、GFAP、 α -SMA及びThy-1) を行い、凍結サンプルは10 μ mに薄切してdesminの免疫組織学染色と、加えてdesminとvimentinに対する蛍光二重免疫染色に使用した。

なお、動物飼育と実験手法に関する研究プロトコルは、大阪府立大学動物実験委員会によって承認 (承認番号21-16) されている。

2. 免疫組織化学染色

使用した抗体を Table 1 に示す。

膵組織は 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後、4 μ m に薄切してモノクローナル又はポリクローナル一次抗体で免疫組織化学染色を行った。vimentin、GFAP、 α -SMA 及び Thy-1 染色用組織切片は、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 20 分間マイクロウェーブ処理することで賦活化を行った。Cytokeratin 19 (CK19) 染色用切片は、10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) で 10 分間処理することで賦活化を行った。次いで、これらの切片は、3% H

$2\text{O}_2/0.065\%\text{NaN}_3$ を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、さらに非特異的結合を阻害するために、5%スキムミルク含有 PBS で 30 分間処理した。各切片は室温で一次抗体と 60 分間インキュベーションした後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した二次抗体 (Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan) と 30 分間インキュベーションした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド (DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて視覚化した。陰性対照は一次抗体の代わりに非免疫化マウス又はウサギ IgG を使用した。免疫組織化学染色後、ヘマトキシリンで軽く対比核染色を施した。

凍結サンプルは $10\ \mu\text{m}$ に薄切し、desmin の免疫組織化学染色に用いた。冷アセトン:メタノール(1:1)に 4°C で 10 分間固定した後、非特異的結合を阻害するために切片を 5%スキムミルク含有リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で 15 分間処理した。次いで、切片を室温で抗 desmin 抗体と 60 分間反応させた。PBS で洗浄した後、切片はホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗マウス抗体 (Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan) と共に 60 分間インキュベートした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド (DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて視覚化した。一次抗体の代わりに使用した非免疫化マウス IgG を陰性対照として用いた。切片はヘマトキシリンで軽く対比核染色を施した。

免疫組織化学染色を施したサンプルは、陽性細胞の出現を以下のように半定量的に評価した。

- : 出現なし。
- ±: わずかに出現する。
- +: 軽度に出現する。
- 2+: 中等度に出現する。
- 3+: 高度に出現する。

3. 蛍光二重免疫染色

生後 12 日の新生仔の腭組織を用いて、凍結切片(厚さ 10 μ m)を作製し、冷アセトン:メタノール(1:1)中に 4°Cで 10 分間固定した後、切片を 10%ヤギ血清と共に 30 分間インキュベートした。切片は一次抗体として Hilyte flour 555 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を結合させた抗 vimentin 抗体及び抗 desmin 抗体と共に 4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を結合させた二次抗体であるマウス IgG に 45 分間反応させた。この切片を、核染色のために 40, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で染色し、バーチャルスライドスキャナー (VS-120, Olympus, Tokyo, Japan)でスキャンし、観察した。

成績

1. 病理組織学的観察

HE染色の観察により、胎齢18及び20日にはすでに外分泌腺から成る膵腺房組織の形成及びその中に散見されるランゲルハンス島が確認された(Fig. 1 A, B)。しかし、膵小葉単位で見ると、胎仔よりは新生仔の膵組織で、その構造がより明瞭となり、生後21日にはほぼ成体の膵組織の構造になった。なお、腺小葉間には紡錘形の間葉系細胞や僅かの膠原線維が存在していた。

2. 免疫組織化学染色による観察

免疫組織化学染色の結果をTable 2にまとめた。

2.1. Vimentin 及び desmin 陽性の間質細胞 (Table 2)

Vimentin 陽性の間質細胞は胎齢 18 日の胎仔から生後 12 日齢の新生仔まで膵小葉間にしばしば認められた(2+~3+)、その後成体になるに伴い徐々に減少した(+)。すなわち、vimentin 陽性細胞は胎仔から生後間もない新生仔に高頻度で出現することが分かった。

また、desmin 陽性の間質細胞についても、胎仔と生後間もない 8 日齢までの新生仔に高頻度(2+~3+)で認められ、その後成体になるに伴い減少(+))しており、vimentin 陽性細胞の動態と同様の傾向を示した。

膵小葉・腺房に接して存在する vimentin 及び desmin 陽性細胞は形態学的には紡錘形を呈していた(Fig. 2 A, B)。

2.2. α -SMA及びThy-1陽性の間質細胞 (Table 2)

成熟した筋線維芽細胞で認められる α -SMA 陽性細胞は、発生期間を通じてほとんど認められなかった(-又は±) (Fig. 2 C)。

未熟な間葉系細胞に発現するとされる Thy-1 に対する陽性の間質細胞は、18 日齢と 20 日齢の胎仔期に軽度(+)存在し、その後新生仔期においては生後 1~15 日に増加(+~2+)していた。その後、成体に伴い減少した(+)。Thy-1 陽性細胞は、生後一過性に増加することが示された。Thy-1 陽性細胞は、形態学的に紡錘形から楕円形を呈し、腓小葉・腺房に沿って存在した(Fig. 2 D)。

2.3. GFAP陽性の腓星細胞 (Table 2)

GFAP 陽性の腓星細胞は胎仔 18 日齢からその後の新生仔、そして成体に至るまで、腓組織の発生期間を通して腓腺房周囲や小葉間の間質に少数(+)認められた。その形態は紡錘形から楕円形であった(Fig. 2 E)。

2.4. CK19陽性腓管上皮細胞 (Table 2)

CK19 はサイトケラチンの一つで腓管及び肝胆管上皮細胞で発現が認められる (Bouwens et al., 1995、Golbar et al., 2011)。CK19 陽性の腓管上皮細胞は、胎齢 18 日と 20 日の胎仔から生後 1 日では軽度の発現であったが、生後 8 日~成体にかけて発現が増加し明瞭となった。この時期では、CK19 陽性細胞は管状を呈していた (Fig. 2 F)。

3. 二重蛍光免疫染色による観察

上記するようにvimentin及びdesmin陽性の間質細胞が最も特徴的に認められたことから、生後12日のサンプルを用いてvimentin及びdesminの蛍光二重免疫染色を行ったところ、ほとんど全ての間葉系細胞がvimentin及びdesminを共発現していることが分かった (Fig. 3)。

考 察

ラットの膵発生過程のモデリングの組織を用いて、特に間葉系細胞の免疫表現型の特徴を解析した。

1. 膵組織の発生

観察した胎齢 18 日からすでに外分泌腺の形成と外分泌腺から成る腺房組織内に散見されるランゲルハンス島が確認された。しかし、膵腺房と膵小葉の組織構造は、胎仔ではやや不明瞭であったが、生後 1 日の新生時から成体に至るまでの間に徐々に明瞭となることが分かった。さらに、膵腺房と膵小葉構造が明瞭になるに伴い CK19 陽性の膵管細胞の出現が確認され膵管を伴う外分泌腺が形成されていることが示された。また、膵腺房や膵小葉の間に間質細胞がみられた。

2. 膵発生過程での vimentin 及び desmin 陽性の間質細胞の免疫組織化学的な特性

間質細胞の多くが vimentin と desmin を発現する特徴があった。特に、これらの陽性間質細胞は、胎仔期から生後間もない新生仔の 12 日齢ごろまでの期間、最も高頻度で出現することがわかった。また、この時期の vimentin と desmin 陽性細胞は二重蛍光免疫染色により、ほとんどがそれらの細胞骨格を共発現することが分かった。胎仔から新生仔初期の時期は、膵組織の構造がまだまだ未熟な状態で、より明瞭な組織が構成され始めようとする時期である。この時期に vimentin 及び desmin 陽性細胞が多く認められ、また成体ではこれら陽性細胞が減少したことから、胎仔から新生仔初期の未熟な膵は、より多くの vimentin 及び desmin 陽性の間質細胞により組織が支持される必要があるのかもしれない。

3. 膵発生過程での Thy-1 及び α -SMA 陽性の間質細胞の免疫組織化学的な特性

Thy-1 陽性細胞は血管周皮細胞など未熟な間葉系細胞に発現するとされている (Bryder et al., 2006; Dominici et al., 2006; Bae et al., 2008; Yuasa et al., 2013)。ラット膵発生過程では、この Thy-1 陽性細胞は新生仔 1 日齢から 15 日齢において一過性に増加することが示された。この時期は、膵腺房や膵小葉の構造が明瞭になり始める時期に一致することから、膵組織のモデリングにおける未熟な間葉系細胞の関与が示唆された。また、第 3 章で記述するが薬物誘発ラット膵線維化では Thy-1 陽性細胞が持続的に認められており、ラットの皮膚線維化で述べられているように、Thy-1 陽性細胞は vimentin や desmin を発現する筋線維芽細胞の起源と考察されている (Juniantito et al., 2012)。膵発生過程での Thy-1 陽性細胞は、vimentin 及び desmin 陽性細胞の増加時期と一致することから、vimentin 及び desmin を発現する間葉系細胞の供給源になっていたのかもしれない。なお、ラットの胎仔期の後腎芽体の Thy-1 陽性細胞は、腎線維化での筋線維芽細胞の前駆体細胞と考察されている (Yuasa et al., 2010)。Thy-1 陽性の未分化な間葉系細胞の動態は、モデリングとリモデリング、どちらにおいても重要な前駆細胞なのかもしれない。

成熟した筋線維芽細胞で発現する α -SMA 陽性細胞 (Wynn, 2008; Desmoulière et al., 2003) はラットの膵発生過程においてはほとんど認められなかった。正常な膵発生過程でのモデリングは、vimentin 及び desmin 陽性細胞が主体となる間質細胞と考えられた。そして、上記したように Thy-1 陽性細胞は、この間質細胞の起源となる細胞かもしれない。

4. 膵発生過程での GFAP 陽性の間質細胞の免疫組織化学的な特性

ラットの肝星細胞は GFAP を発現しており、肝線維化病変では GFAP 発現細胞が増加することが報告されている (Tennakoon et al., 2015)。肝星細胞は、肝線維化での筋線維芽細胞の起源とされる所以である。膵星細胞も GFAP を発現し、膵腺房の周囲に位置し、膵外分泌腺の構造維持に係っているとされる (Omary et al., 2007)。今回、ラッ

トの腭発生過程における GFAP 陽性の腭星細胞の動態を観察した。胎齢 18 日から新生仔、そして成体に至るまで一定数の腭星細胞が観察された。その出現程度は、腭発生過程においてほとんど変化しなかった。腭星細胞は、腭発生過程の組織においてすでに組織の支持機能を発揮している可能性が示唆された。第 1 章のイヌ及びネコの腭線維化の病態では腭星細胞が増加することが示されている。既存の腭星細胞は腭線維化において筋線維芽細胞に発展し得る間質細胞として貢献していると考えられる。この研究で提示した腭発生段階の腭星細胞の動態は、腭線維化の間質細胞の特性を理解する上での基礎データとなり、有用と考える。

小 括

腭発生過程での間葉系細胞の特徴を免疫組織化学的に解析した。その結果、線維化に出現する筋線維芽細胞に発現するとされる vimentin と desmin 陽性細胞が、胎仔 18 日齢から新生仔期に最も頻繁に観察され、その後成体になるに伴い減少した。また、vimentin と desmin 陽性細胞の多くは、それらの細胞骨格を共発現していた。未分化間葉系細胞に発現する Thy-1 は生後の新生仔の時期に一過性に発現することが示された。また、グリア細線維性酸性蛋白質 (GFAP) 発現の腭星細胞は胎仔から成体に至るまでコンスタントに存在した。以上の間葉系細胞は腭組織のモデリングに間質細胞として貢献していることが示された。一方、腭線維化に出現する筋線維芽細胞に特徴的に発現するとされる α -平滑筋アクチン (α -SMA) 発現の間質細胞はほとんど観察されなかった。この点は、腭線維化のリモデリングとは異なる所見である (Fig. 4)。

Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細

抗体	抗体タイプ	クローン	希釈率	賦活化	供給元
抗 vimentin 抗体	マウスモノクローナル	V9	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 α -SMA 抗体	マウスモノクローナル	1A4	1:1000	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 desmin 抗体	マウスモノクローナル	D33	1:200	凍結切片を使用	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 GFAP 抗体	ウサギポリクローナル	—	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Transgenic Inc, Kumamoto, Japan
抗 Thy-1 抗体	マウスモノクローナル	CD90	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Cedarlane Laboratories Ltd., Ontario, Canada
抗 CK19 抗体	マウスモノクローナル	B170	1:100	10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) 処理	Novocastra Laboratories Ltd, UK

α -SMA; α -smooth muscle actin, GFAP; Glial fibrillary acidic protein

Table 2 ラットの発生期における間葉系細胞及び腭管の免疫染色性

抗体	胎齢		生後					成体
	18日	20日	1日	8日	12日	15日	21日	
Vimentin	3+	2+	3+	3+	2+~3+	2+	+~2+	+
Desmin	3+	2+~3+	2+~3+	3+	2+	2+	2+	+
GFAP	+	+	+	+	+	+	+	+
Thy-1	+	+	2+	+~2+	+~2+	2+	+	+
α -SMA	-	-	-	±	±	±	±	±
CK19	+	+	NT	+~2+	2+	2+	2+	2+

—;出現なし, ±;わずかに出現, +;軽度に出現, 2+;中等度に出現, 3+;高度に出現, NT;実施していない

GFAP; Glial fibrillary acidic protein, α -SMA; α -smooth muscle actin

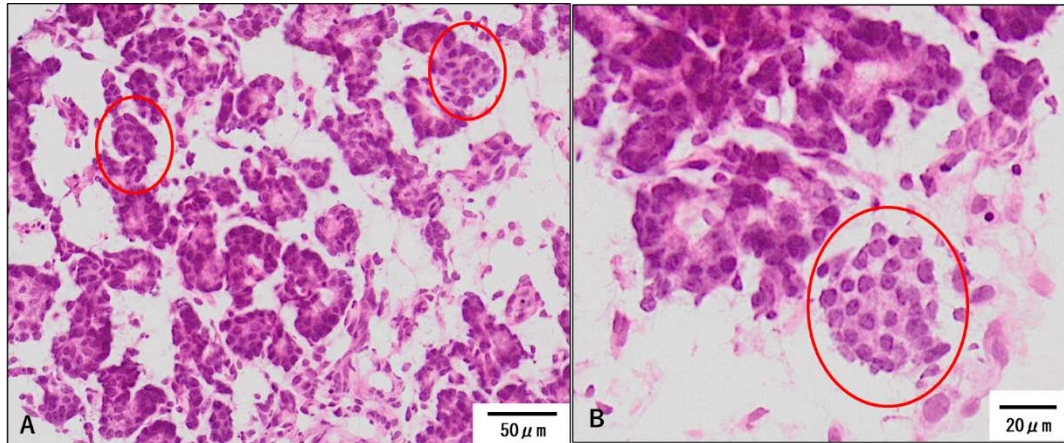


Fig. 1 胎齡 18 日の膵組織

A: 胎齡 18 日の膵組織の HE 染色像。B: 拡大像を示す。胎齡 18 日にはすでに外分泌腺から成る膵腺房組織の形成及びその中にランゲルハンス島が散見された。なお、間質には脂肪組織が認められる。赤丸はランゲルハンス島を示す。

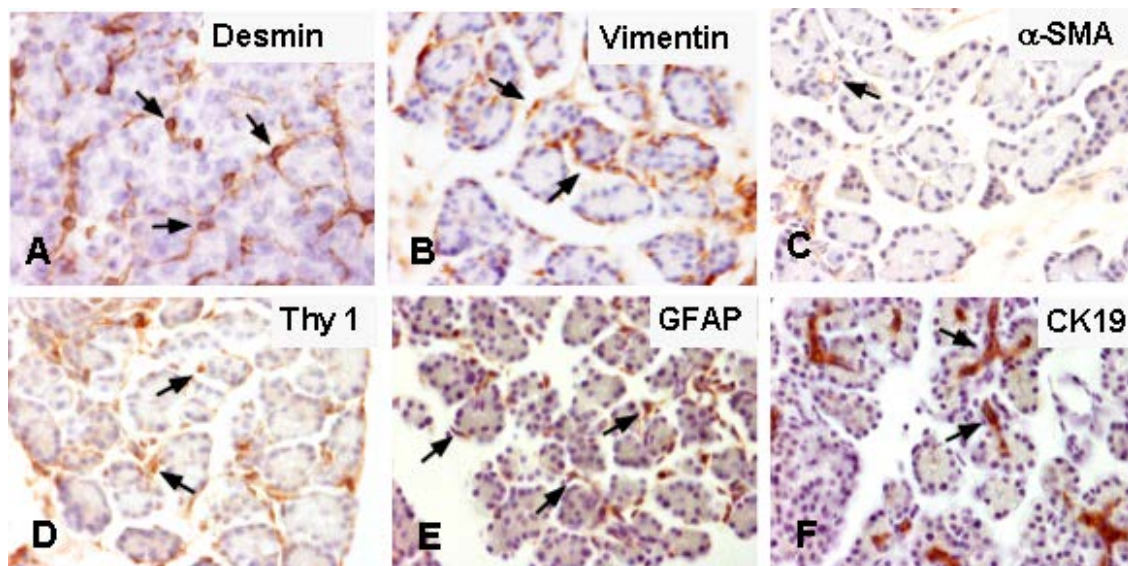


Fig. 2 膵発過程における間質細胞と膵管上皮細胞の免疫組織化学染色による観察

A-E: 生後 12 日齢のラット膵サンプルにおける vimentin、desmin、 α -SMA、Thy-1 及び GFAP 発現の膵間質細胞及び CK19 発現の膵管上皮細胞の免疫組織化学染色。矢印は陽性細胞を示す。

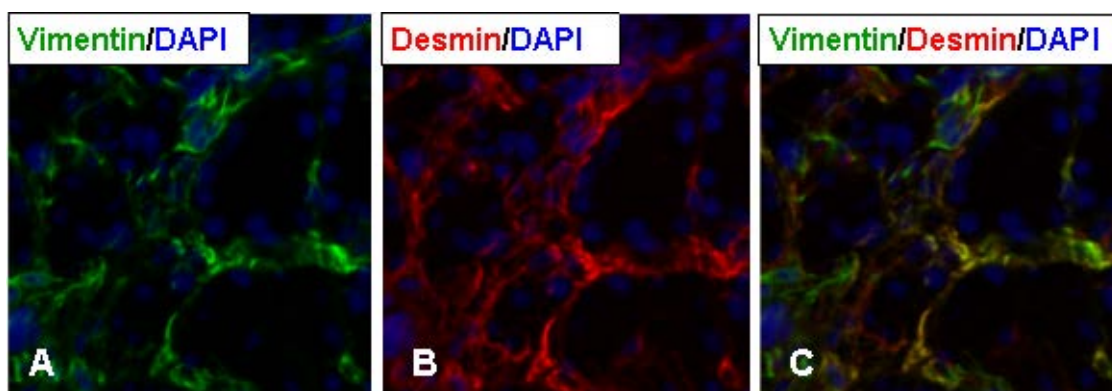


Fig. 3 間葉系細胞の蛍光二重免疫染色

A-C: 生後 12 日齢のラット膵サンプルにおける vimentin 及び desmin の蛍光二重免疫染色結果。DAPI は核蛍光染色。

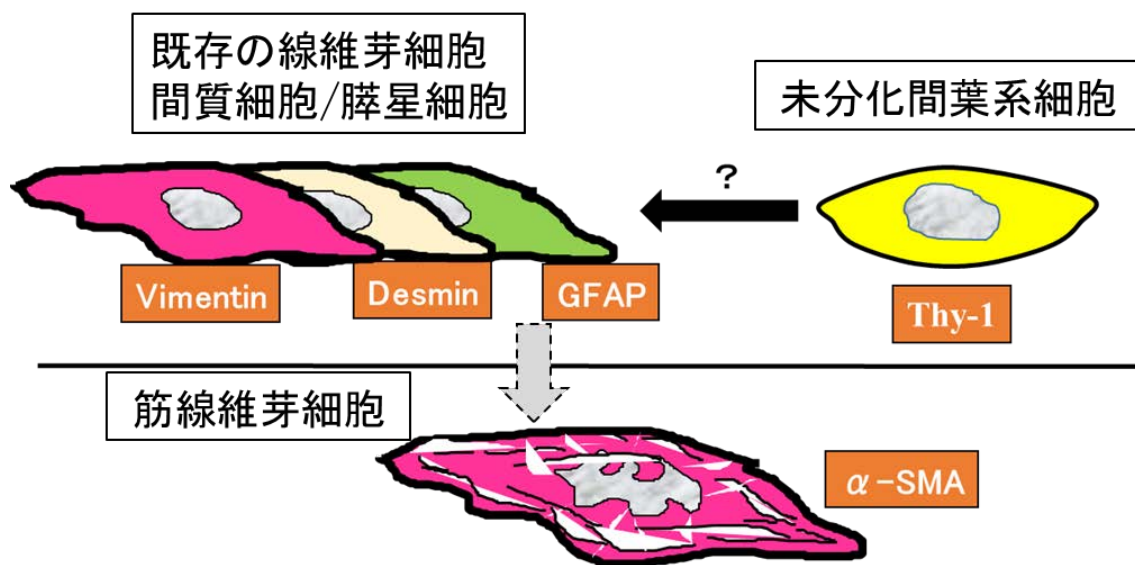


Fig. 4 ラット睥発生過程における間葉系細胞

vimentin、desmin 及び GFAP 陽性の間葉系細胞は睥組織のモデリングに間質細胞として貢献していることが示された。一方、睥線維化に出現する筋線維芽細胞に特徴的に発現するとされる α -SMA を発現する間質細胞は、睥発生過程ではほとんど観察されず、睥線維化のリモデリングとは異なる。また、Thy-1 陽性細胞は、vimentin 及び desmin 陽性細胞の起源となる可能性がある。なお、(?)は、更なる検討を要することを示す。

第3章

薬物誘発ラット膵線維化の病態解析

緒言

慢性膵炎は、不可逆的な進行性の線維化によって特徴付けられる連続的で、かつ頻発する膵臓の炎症性疾患として捉えられている (Kloppel and Maillet, 1993)。ヒトの慢性膵炎には原因不明な症例も多いが、一般的には急性膵炎による組織傷害を繰り返すことによって、慢性膵炎に移行するとされている (Hruban, 2009)。また、度重なる炎症を引き起こさなくても、一度強い組織傷害が生じることで慢性膵炎に徐々に移行する症例があることも知られている (Lerch and Gorelick, 2013)。いずれの機序においても、膵組織の傷害が初期病変であり、それ故に膵組織傷害の誘導に基づいた慢性膵炎の動物モデルが作製されている (Markus and Fred, 2013)。そのようなモデルを用いて膵線維化の病理発生機序の解明が試みられているが、その全貌は未だ解明されていない。

慢性膵炎を誘発する良く知られるモデルとして、消化管ホルモンであるガストリンやコレシストキニンの活性部分に類似した化学物質で、膵臓の消化酵素分泌を促進する作用のあるセルレインをラットやマウスに長期複数回投与することで、膵臓に急性から慢性の膵炎を誘導するモデルがある。結果として、病理組織学的には、膵線維化を惹起できるが、かなりの長期間投与を継続しなければ膵線維化のような複雑な病態を誘導することができないとされる (Neuschwander-Tetri et al., 2000)。このモデルは、動物福祉の観点から動物への負荷が長期に及ぶことと、実験作業として連回投与であることから煩雑である。また、アルコールの過剰摂取はヒトの急性膵炎の原因とされることから (Lew et al., 2017; Hruban, 2009)、アルコールとグラム陰性菌が産生する lipopolysaccharide を長期間併用投与するモデルが作製されたが、このモデルでは膵星細胞の活性化は認められるものの、膵外分泌腺の傷害が不十分で、結果として膵線維化の病態を再現できないとされている (Vonlaufen, 2011)。一方、Dibutyltin dichloride (DBTC) を用いた動物モデルは単回静脈内投与することによって、膵臓に

急性炎症を起こし、その後慢性の炎症を惹起できるとの報告がある。この DBTC モデルは他のモデルと異なり、腭組織の傷害が高度で、それ故に回復することなく進行性の線維化が形成されると報告されている (Merkord et al., 1999)。一度強い組織傷害が生じることで惹起されるヒトの慢性腭炎に類似したモデルと考えている。しかし、DBTC モデルの詳細な病態解析は必ずしも十分ではない。

この DBTC は、船底の汚れを防止するために船底に塗られる塗料として用いられ (Anger et al., 1994)、この作業に従事していた旧東ドイツの造船工において腭臓障害が生じることが知られていた。よって、この DBTC は、職業病として過剰に暴露されたヒトにおいて腭線維化を引き起こすことが知られている (Markus and Fred, 2013)。これらのことから、DBTC 誘発腭線維化モデルは腭線維化の病理発生機序を解析し、ヒトでの腭線維化の治療法を探索する上で有用なモデルであると考えられた。よって、第 3 章の研究では薬物誘発性腭線維化モデルとして DBTC を用いることとし、第 1 節においては、DBTC 投与ラットにおける腭組織の病態を詳細に解析した。そして、第 2 節では第 1 節で作製した腭線維化を用いて、マクロファージの機能特性を、第 3 節では筋線維芽細胞の細胞特性を解析した。

第1節 Dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発膵線維化の 病態解析

緒言

Dibutyltin dichloride (DBTC) は、ポリ塩化ビニルの安定剤として使用され、また、古くは船底の汚れ防止や海藻やフジツボなどの付着を防ぐために塗料の原料の一部として用いられてきた (Anger et al., 1994)。DBTC は、DBTC を長期使用する労働者に慢性膵炎が職業病として生じることが知られている (Markus and Fred, 2013)。それ故にげっ歯類に投与することで膵線維化の動物モデルの作製に用いられている (Markus and Fred, 2013)。

毒性発現機序としては、DBTC に含まれる高濃度の有機スズに暴露されると、主に胆膵管上皮細胞に壊死が生じ、その結果壊死した上皮細胞が胆膵管を塞栓したり、胆膵管上皮が再生により過形成となり、胆汁や膵液がうっ滞し、逆流が起こることで、膵外分泌腺の傷害や壊死が生じるとされる。結果として、膵間質に浮腫や炎症が惹起される (Merkord et al., 1989; Merkord et al., 1991; Merkord et al., 1999)。また、有機スズは、膵腺房細胞への直接的な細胞毒性(ミトコンドリア毒性、オートファジー機能障害、細胞壊死)を引き起こすとされるが、このような細胞毒性の機序は未だ不明な点が多い。膵腺房を構成する外分泌腺細胞はオートファジーが活発に行われる細胞である (Mizushima et al., 2004)。外分泌細胞は消化酵素を分泌する細胞であり、非常に高い蛋白質合成速度を有する (Wheeler et al., 1949)。そのため、異常蛋白質や過剰な蛋白質を除去する必要性がより高いと推測される。急性膵炎では、オートファジーの機能不全がその病態に係わる可能性について、多くの研究がなされている (Gukovskaya et al., 2017)。しかし一方で、慢性膵炎へのオートファジーの関与についてはあまり研究がなされていない。

以上のように、複合的な要因から、膵組織の傷害が起こり慢性的な膵線維化が誘発

されると考えられている(Sparmann et al., 1997; Merkord, et al., 1997)。しかし、上記したように腭線維化の病理発生機序の全貌は未だ解明されていないことから、この第 3 章第 1 節では、DBTC 投与ラットにおける腭組織の病態を詳細に解析した。特に、DBTC の直接的な細胞毒性に係わるとされている、オートファジーの機能障害については、詳細に検討を行った。オートファジー形成時に生成され、オートファゴソーム膜に特異的に局在する LC3B の発現を免疫組織化学的に評価し、さらに、LC3B に加え、オートファジー機能に係る Beclin1、p62、Lamp2 及び TLR4 の遺伝子発現を Realtime-PCR で解析した。

材料と方法

1. 供試動物

供試動物として7週齢雄F344ラット28匹を日本チャールスリバー株式会社(日野生産場)から購入し、1週間馴化後の8週齢時に実験に供した。これら動物には、ラット用の固形飼料(MF、オリエンタル酵母株式会社)と水道水を自由摂取させた。なお、この動物実験は、本学動物科学教育研究センターのSPF動物飼育室において行った。研究プロトコルは、大阪府立大学動物実験委員会(承認番号21-16)によって承認されている。

2. 膵組織の採取と病変の病理組織学的評価

慢性膵炎モデルの投与量と観察期間については既存の報告を参考に実施した(Sparmann et al., 1997)。8週齢時にDBTCを4及び8 mg/mL/kgで単回尾静脈内投与した。媒体対照群には投与媒体として使用した、エタノール:グリセロール=2:3を1 mL/kgの投与量で投与した。投与後1、3、7及び15日にイソフルラン麻酔下で膵を採取し、10%中性緩衝ホルマリンあるいはPeriodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)で固定し、一部はRNAlater Stabilization Solution(Qiagen, Hilden, Germany)に浸漬した。また、一部組織はコンパウンドに包埋して-80度で凍結保存した。

DBTC 投与ラットから得た膵組織は、HE 染色を行い、線維化の程度により次のように3段階で評価した。

+:軽度の線維化。

2+:中等度の線維化。

3+:高度の線維化。

なお、投与後1日の媒体投与対照群の正常な膵組織はグレード(-)とした。詳細な病理組織所見は成績に記載する。

3. 免疫組織化学的染色

使用した抗体を Table 1 に示す。

10%中性緩衝ホルマリンで固定され、4 μ m に薄切された膵組織はモノクローナル及びポリクローナル一次抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。CK19 染色用切片は、10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) で 10 分間処理することで賦活化を行った。LC3B 染色用切片は 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 20 分間マイクロウェーブ処理することで賦活化を行った。次いで、切片は 3% H_2O_2 / 0.065% NaN_3 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、さらに非特異的結合を阻害するために 5% スキムミルクを含む PBS で 30 分間処理した。切片は室温で一次抗体と 60 分間インキュベーションした後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した二次抗体 (Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan) と 30 分間インキュベーションした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド (DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて視覚化した。陰性対照は一次抗体の代わりに非免疫化マウス IgG 血清を使用した。免疫組織化学染色後、ヘマトキシリンで軽く対比染色を行った。

免疫組織化学染色を施したサンプルは、陽性細胞の出現を以下のように半定量的に評価した。

—: 出現なし。

±: わずかに出現する。

+: 軽度に出現する。

2+: 中等度に出現する。

3+: 高度に出現する。

4. オートファジー関連蛋白質の mRNA 発現の測定

膵組織は RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) に浸漬し、4°C で一晩静置し、測定に供するまで -80°C で保存した。Total RNA は SV Total RNA Isolation System (Promega,

Fitchburg, WI, USA) で抽出し、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR は、TaqMan® Gene Expression Assays (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて PikoReal Real-Time 96 PCR System (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) で測定を行った。TaqMan プローブは以下のものを使用した。

オートファジー関連プローブ:

LC3B, Rn02132764_s1

Beclin 1, Rn00586976_m1

p62, Rn00677357_g1

Lamp2, Rn00567053_m1

TLR4, Rn00569848_m1

内在性コントロール:

18S ribosomal RNA, Hs99999901_s1

それぞれの mRNA 発現は、内在性コントロールの 18S ribosomal RNA mRNA を用いてノーマライズし、比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) を用いてデータ解析した。

5. 統計計算

RT-PCR 法で得られたデータは平均±標準偏差 (SD) として示した。Dunnett の多重比較試験によって統計学的に評価した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

成績

1. 膵組織の病理組織学的評価

DBTC をラットに 4 mg/kg 又は 8 mg/kg で単回尾静脈内投与し、投与後 1、3、7 及び 15 日に採取した膵組織について HE 染色を行い、病理組織学的解析を行った。当初、投与後経時的に、あるいは投与量に依存した病態評価を行う予定であったが、線維化の程度は投与量や時間経過に拘わらず個体差が認められた。そこで、得られた膵組織を「材料及び方法」に記載した線維化のグレード(－、＋、2＋、3＋)に分け、病理組織学的に解析した(Fig. 1)。それぞれのグレードに 4～6 匹が含まれ、評価することができた。

対照群の膵組織には変化はみられなかった(－)(Fig.1 A, B)。軽度の線維化(＋)では、腺房細胞の軽度の萎縮及び膵小葉間の浮腫がみられ、さらに膵小葉間には軽度の炎症細胞の浸潤と膠原線維の沈着があった(Fig. 1 C, D)。中等度の線維化(2＋)では、腺房細胞の萎縮がさらに生じ、小葉間にさらに炎症細胞浸潤がより目立ち、中等度の膠原線維の沈着が観察された(Fig. 1 E, F)。高度の線維化(3＋)では、炎症細胞の浸潤がさらに高度となり、線維化によって膵組織が破壊され、小葉構造が不明瞭になっていた(Fig. 1 G, H)。

2. 免疫組織化学的解析

免疫組織化学的染色による結果を Table 2 に示す。

2.1. 膵管上皮細胞の解析(Table 2、Fig. 2)

膵管上皮に発現するサイトケラチンである CK19 の免疫組織化学的染色を行ったところ、陽性の膵管上皮細胞がグレード(－、＋、2＋、3＋)に伴い増加し、特に高度の線維化(3＋)では特に目立った。膵線維化部位に認められる CK19 陽性の膵管上皮は、小管状から管状を呈し、膵管上皮の過形成の所見が見られた。

2.2. オートファジー関連蛋白質の解析 (Table 2、Fig. 3)

オートファジー形成時に生成され、オートファゴソーム膜に特異的に局在する LC3B の発現を免疫組織化学的に評価した。

正常な腓 (グレード(-)) では、腓外分泌細胞に顆粒状の陽性反応が見られた (Fig. 3 A)。線維化のグレード+では、正常な腓とほぼ同様であった。線維化グレード 2+では染色性は減少しているものの、細胞質に大型の顆粒状の LC3B 陽性を呈する細胞が散見され、その中には LC3B に陽性を示す空胞を有する細胞も混在していた (Fig. 3 B)。しかし、線維化グレード 3+では、腓外分泌細胞には LC3B 陽性所見はほとんど観察されなかった (Fig. 3 C)。

以上より、腓外分泌細胞における LC3B の発現は、腓線維化が高度になるに伴い低下することが分かった。

3. オートファジー関連蛋白質の mRNA 発現の測定 (Fig. 4)

オートファジーに関連する蛋白質である、LC3B、Beclin1、p62、Lamp2 及び TLR4 について、Real-time PCR で解析した。

今回解析した全てのオートファジー関連 mRNA は、ばらつきが大きく、対照群と比較して、統計学的に有意な変動が見られなかった。しかし、LC3B、Beclin1、Lamp2 及び TLR4 については、腓線維化のグレードが高度になるに伴って、増加する傾向が見られた。p62 については、対照群と比較して、統計学的に有意な変動ではなかったが、腓線維化グレード+で上昇し、その後減少した。

考 察

1. ラット DBTC 誘発膵線維化モデルの特徴

ラットに DBTC を投与し膵線維化モデルを作製し、その病態を解析した。当初は投与量(4 mg/kg 又は 8 mg/kg)と投与後の観察期間に依存した病変の推移が期待されたが、投与後 1、3、7 及び 15 日で採取した膵組織には、経時的な炎症や線維化の増悪所見がみられなかった。これは、例えば、投与後 1 と 3 日での 4 mg/kg 投与と 8 mg/kg の所見は同等で用量相関性がみられず、投与後 7 と 15 日においても 8 mg/kg でより高度の線維化が生じると期待したが、4 mg/kg 投与と違いがなかった。さらには、4 mg/kg 投与において、投与後 3 日においてみられた線維化の程度が、投与後 7 日で見られた線維化の程度よりもより高度であった。すなわち、投与個体において個体差がみられた。投与量は文献(Sparmann et al., 1997)を参照して決定したが、その文献においても、この研究と同様に投与量と観察期間に相関した病態推移の所見は得られていないようである。その理由は既存の論文(Sparmann et al., 1997)には明確には記載されていないが、これは DBTC に含まれる高濃度の有機スズの毒性発現機序と関連すると推測している。

その毒性発現は、「緒言」にも記載したが、有機スズに暴露され胆膵管上皮細胞には壊死が生じ、その結果壊死した上皮細胞が胆膵管を塞栓したり、一方胆膵管上皮が再生により過形成となり、膵液がうっ滞し、逆流が生じることで、膵外分泌腺の傷害や壊死が生じるとされる(Sparmann et al., 1997)。すなわち、膵管上皮に生じる壊死や再生後の過形成による膵管閉塞が、その傷害の程度により早期に生じる個体や、ある程度経過して生じる個体の違い、また同じ個体でも膵組織の膵管の分布により傷害が出やすい部位とそうでない部位の違いがあり、そのような違いが均一な経時的な病変を作製できない理由として考えられた。

以上のことから、この研究では HE 染色で観察された DBTC 誘発病変を、投与量と

投与期間に関係なく評価し、程度を 4 グレード(一、+、2+、3+)に分けて評価した。その結果、軽度(+)及び中等度(2+)では小葉間に、前者では軽度の後者では中等度の炎症細胞の浸潤と膠原線維の沈着が見られ、高度(3+)では、これら所見が顕著となり線維化によって膵組織の破壊が生じ、膵小葉・腺房構造が不明瞭になっていた。さらに、膵線維化に伴い CK19 陽性の膵管の増生(過形成)が一つの特徴的な所見として見られた。

ヒトの慢性膵炎は病変が進行すると、腺房細胞の壊死・消失、それを置換するような線維化が顕著となり、膵小葉・腺房内に不規則に拡張し、過形成となった小膵管が散見され、時には集簇して認められるとされる(Sturges, 1984; Bockman, 1997; Strobel et al., 2007)。この研究で確立したラット DBTC 誘発膵線維化モデルでもヒトの慢性膵炎と同様の病態の推移がみられ、かつ、第 1 章で検討したイヌ及びネコの自然発生性膵線維化の病態(膵線維化の程度に伴い、浮腫、炎症細胞反応、線維化、胆管過形成が増加する所見)と類似することが示された。現在、慢性膵炎の急性期治療に用いられているカモスタットメシル酸は DBTC 誘発膵線維化モデルにも適応され、膵線維化を抑制することが報告されている(Gibo et al., 2005)。このような応用性を含めて、今回確立したラット DBTC 誘発膵線維化モデルは膵線維化の病態解析に利用可能であると考えられ、以下の第 2 節及び第 3 節の解析を進めた。

2. ラット DBTC 誘発膵線維化モデルにおけるオートファジーの係わり

2.1. 免疫組織化学的解析

膵外分泌細胞は消化酵素を分泌する細胞であり、高い蛋白質合成速度を有する(Wheeler et al., 1949)。このことから、異常蛋白質や過剰な蛋白質を除去する必要性がより高く、よってオートファジー機能が高いと考えられる。今回の正常なラット膵組織において、外分泌腺から成る膵腺房細胞の多くに顆粒状の LC3B 陽性反応が確認された。

ラット DBTC 誘発膵線維化のグレード+では、対照群との間に LC3B の発現に違い

はなかったが、線維化グレード 2+のサンプルにおいては、LC3B 陽性顆粒の出現がやや低下したが、加えてLC3B 陽性の大型の顆粒や空胞が外分泌腺の細胞質にみられた。この空胞の所見は、オートファジーが正常に行われず、内容物が溜まって生じた所見と考えられた。セルレインや L-アルギニンで誘発した急性膵炎ラットモデル及びヒトの急性膵炎のサンプルにおいても、同様に大型の空胞の出現が報告され、それはオートファジーの障害によるとされている(Mareninova et al., 2009)。一方、膵線維化グレード 3+では、外分泌腺細胞には LC3B 陽性所見は見られなかった。膵線維化グレード 3+では、腺房を構成する外分泌腺細胞は、線維化により傷害を受け、かつ萎縮した状態であることから、LC3B 発現の低下は外分泌腺細胞の機能がほとんど減退していることを示唆する。

以上より、ラット DBCT 誘発膵線維化では、異常なオートファジーが生じ、線維化の増加に伴いその機能が障害されていることが示唆された。

2.2. オートファジー関連蛋白質の mRNA 発現の解析

オートファジーに関連する蛋白質である、LC3B、p62、Beclin1、Lamp2 及び TLR4 について、Realtime PCR で解析した。

p62 は、ユビキチン化された蛋白質をオートファゴソームへと運ぶ役割を持つ因子であり、オートファジーによって特異的に分解される蛋白質である。オートファジーを評価するためには、LC3B 及び p62 を同時に測定することによって評価することができる。LC3B の増加に伴う p62 の減少は、オートファジーが活性化され、効率的にオートファジーが行われていることを示し、p62 及び LC3B の両方が増加する場合は、オートファジーが阻害され、処理が遅れていることを示す(Gukovskaya and Gukovsky, 2012)。また、オートファゴソームの形成には、Beclin1 が係わっており、その発現は、オートファゴソーム形成に対して抑制的に働く(Pattingre and Levine, 2006)。Lamp2 はオートファゴソームとリソソームの融合に(Huynh et al., 2007)、TLR4 はオートファジーの誘導に係るとされる(Neal et al., 2013)。

今回の DBCT 誘発ラット膵線維化モデルでは、LC3B、Beclin 1、Lamp2 及び TLR4 は線維化のグレードが高度になるに伴って、増加する傾向が見られた。このことは、DBTC による膵障害によって変性蛋白質が増加することや、障害によって飢餓状態に陥った細胞が、オートファジーを誘導して組織の保護を行っている可能性が考えられた。p62 については、線維化グレード+で増加するが、線維化グレードが高度になると減少した。p62 はオートファジーによって特異的に分解される蛋白質であり、LC3B の mRNA は線維化グレードが高度になるに伴って増加傾向があったことから、p62 の減少は、オートファジーが活性化され、オートファジーが効率的に行われていることが推測された。

しかし、これらの mRNA 発現はばらつきが大きく、かつ LC3B については免疫組織学的解析では、線維化に伴い、特にグレード 3+では、その発現が減少しており、増加傾向を示した LC3B の mRNA 発現とは一致しなかった。よって、オートファジー関連因子の mRNA 発現を評価することは難しいと考えられた。これは、ラット DBTC 誘発膵線維化においては、前項で考察したように、同一個体の膵組織においても病変の形成に違いがあったことが原因と考えられた。

小 括

Dibutyltin dichloride (DBTC) をラットに 4 mg/kg 又は 8 mg/kg で単回尾静脈内投与し、投与後 1、3、7 及び 15 日に採取した膵組織について、病理組織学的解析を行った。その結果、得られた膵線維化病変を 4 つのグレード(−、+、2+、3+)に分けることができた。(−)は対照群である。軽度の線維化(+)では、腺房細胞の軽度の萎縮及び膵小葉間の浮腫がみられ、さらに膵小葉間には軽度の炎症細胞の浸潤と膠原線維の沈着があった。中等度の線維化(2+)では、腺房細胞の萎縮がさらに生じ、小葉間に中等度の炎症細胞浸潤と膠原線維の沈着が観察された。高度の線維化(3+)では、炎症細胞の浸潤がより高度となり、線維化によって膵組織が破壊され、膵小葉・腺房構造が不明瞭になっていた。また、CK19 陽性の膵管上皮の過形成がグレードに伴い増加した。この研究で確立したラット DBTC 誘発膵線維化モデルのこのような所見は、ヒトの慢性膵炎の病態の推移と同様であり、かつ、第 1 章で検討したイヌ及びネコの自然発生性膵線維化の病態と類似することが示された。以上より、ラット DBTC 誘発膵線維化モデルは膵線維化の病態解析に有用であると考えられた。また、ラット DBTC 誘発膵線維化におけるオートファジーの関与について解析した。その結果、免疫組織化学染色によって、ラット DBTC 誘発膵線維化サンプルでは、特にグレード 2+で、腺房細胞の細胞質内に LC3B 陽性の大型顆粒や空胞が増加し、線維化グレード 3+では、LC3B 発現が見られなくなった。これは、DBTC 投与によって、オートファゴソーム形成に障害が生じていることと、さらには線維化によりオートファジー機能が減退していることを示唆する。一方、Real-time PCR においては、オートファジー関連蛋白質の LC3B、Beclin 1、Lamp2 及び TLR4 の mRNA が膵線維化が高度になるに伴い増加する傾向が見られた。これは、LC3B の免疫組織化学染色の結果と相反するものであった。これは、ラット DBTC 誘発膵線維化において、同じ個体でも膵組織の膵管の分布により傷害が出やすい部位とそうでない部位の違いがあり、データのばらつきとなったと考えら

れた。

膵線維化モデルにおけるオートファジーの関与については、さらなる検討が必要であるが、LC3B に対する免疫組織化学染色結果から、少なくとも線維化によりオートファジー機能に障害が生じていることが明らかになった。

Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細

抗体	抗体タイプ	クローン	希釈率	賦活化	供給元
抗 CK19 抗体	マウスモノクローナル	B170	1:100	10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) 処理	Novocastra Laboratories Ltd, UK
抗 LC3B 抗体	ウサギポリクローナル	—	1:2000	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Sigma-Aldrich Co., MO, USA

Table 2 薬物誘発膵線維化の免疫染色性

抗体 \ 線維化グレード	—	+	2+	3+
CK19	±	±	2+	2+
LC3B	±～+	—～+	—～±	—

—:出現なし, ±:わずかに出現, +:軽度に出現, 2+:中等度に出現, 3+:高度に出現

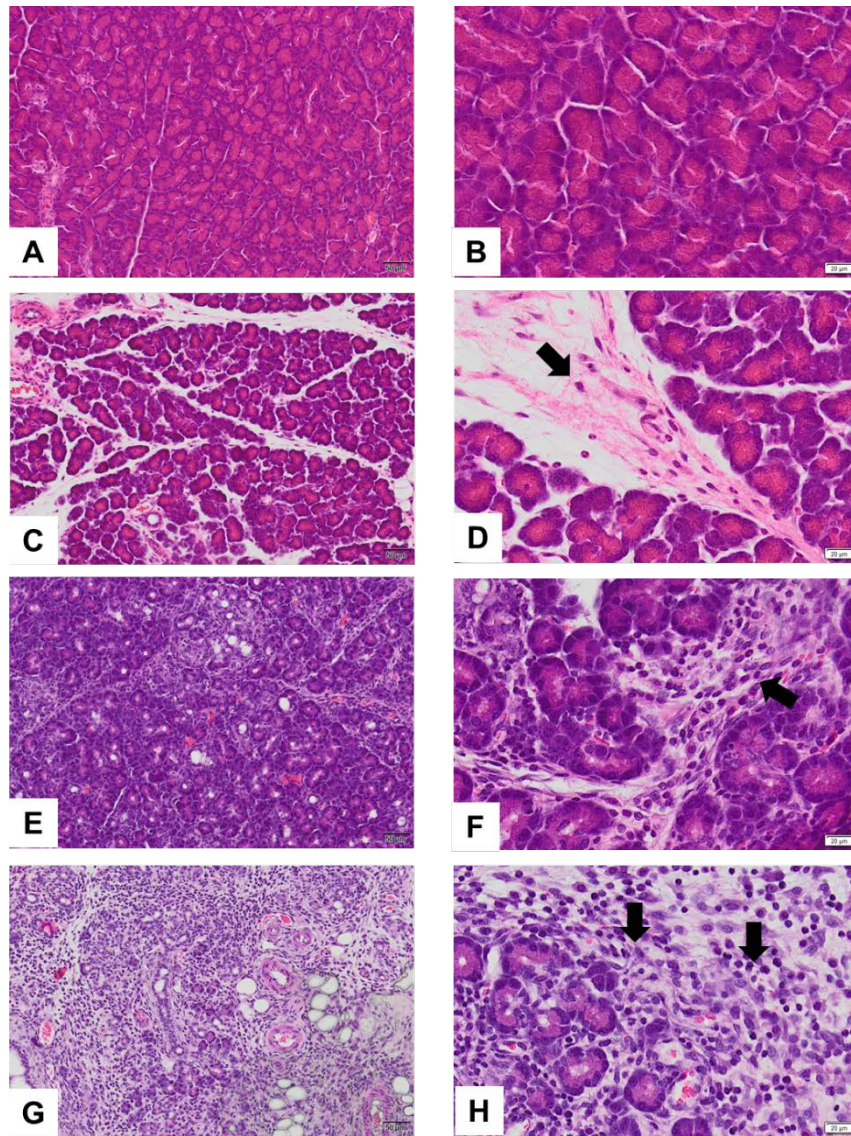


Fig. 1 DBTC によるラット薬物誘発膵線維化の病態

DBTC 投与によってラットに作製した膵線維化の HE 染色所見を示す。A、B: 対照群に変化は見られなかった。C、D: 軽度の線維化では腺房細胞の萎縮及び膵小葉間の浮腫がみられ、さらに、膵小葉間には軽度の炎症細胞浸潤と膠原線維の沈着が見られた。E、F: 中等度の線維化では腺房細胞の萎縮が進み、小葉間に炎症細胞浸潤と、中等度の膠原線維の沈着が見られた。G、H: 高度の線維化では炎症細胞の浸潤が高度となり、線維化によって組織が破壊され、小葉構造が不明瞭になった。矢印は炎症細胞を示す。

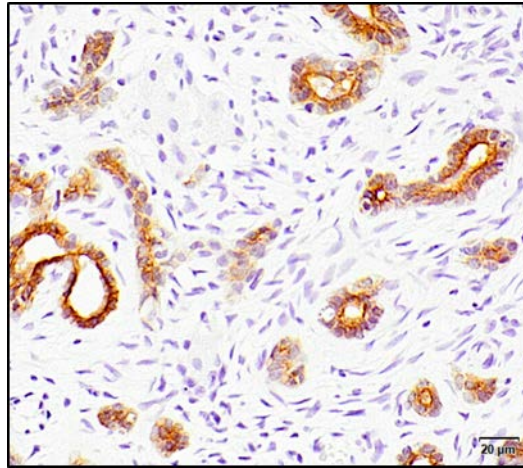


Fig. 2 膵管の増生(過形成)

線維化グレード 3+のサンプルにおける CK19 の免疫組織学的染色を示す。CK19 陽性の膵管上皮が増加し、過形成の所見が見られた。

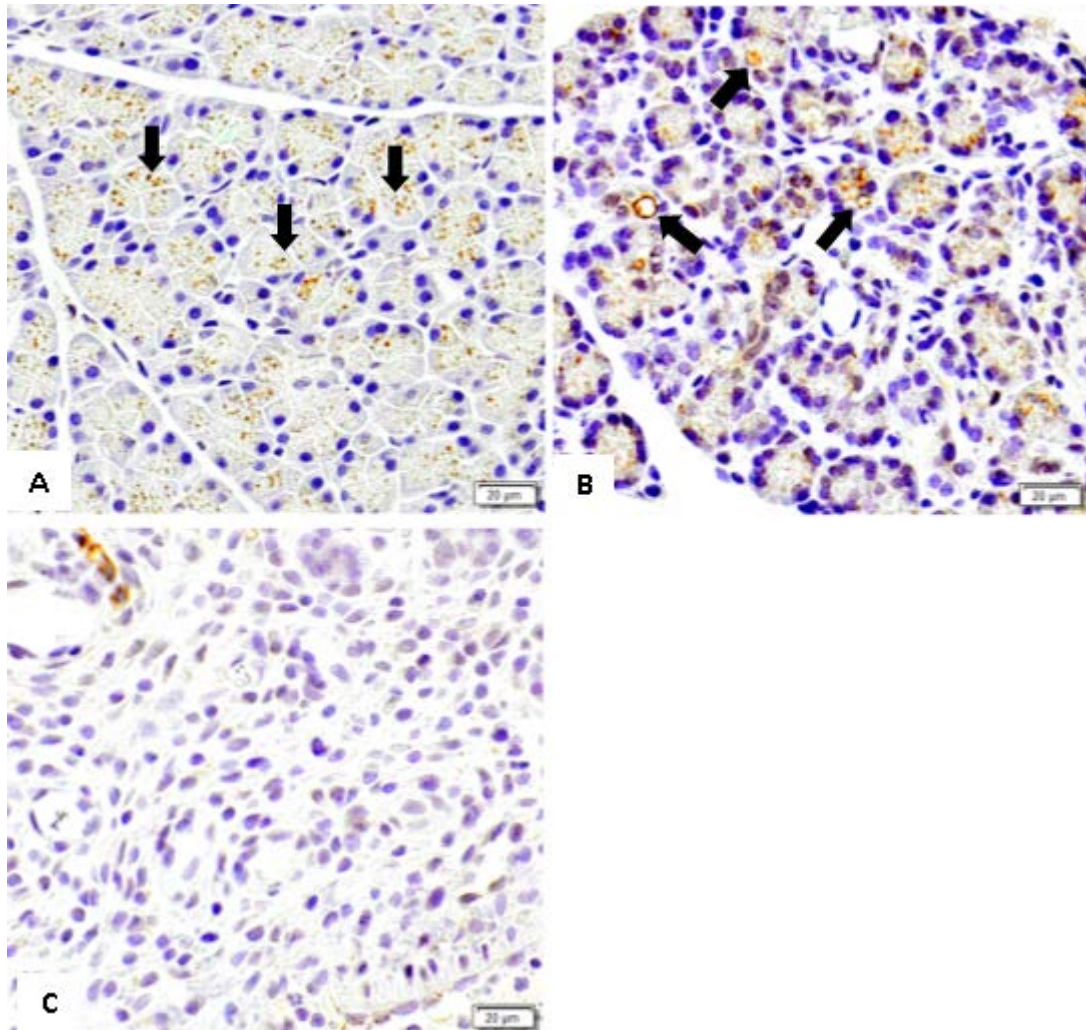


Fig. 3 オートファジー関連蛋白質の免疫組織化学的解析

オートファジー関連蛋白質 LC3B の免疫組織化学染色。矢印は陽性反応を示す。
A: 正常な膵(グレード(-))。腺房細胞内に顆粒状の陽性反応が見られる。**B:** 線維化グレード 2+ の膵。染色性は減少しているものの、細胞質に大型の顆粒状の LC3B 陽性を呈する細胞が散見され、その中には LC3B に陽性を示す腔包を有する細胞も混在した。**C:** 線維化グレード 3+ の膵。腺房細胞中には LC3B 陽性所見はほとんど観察されなかった。

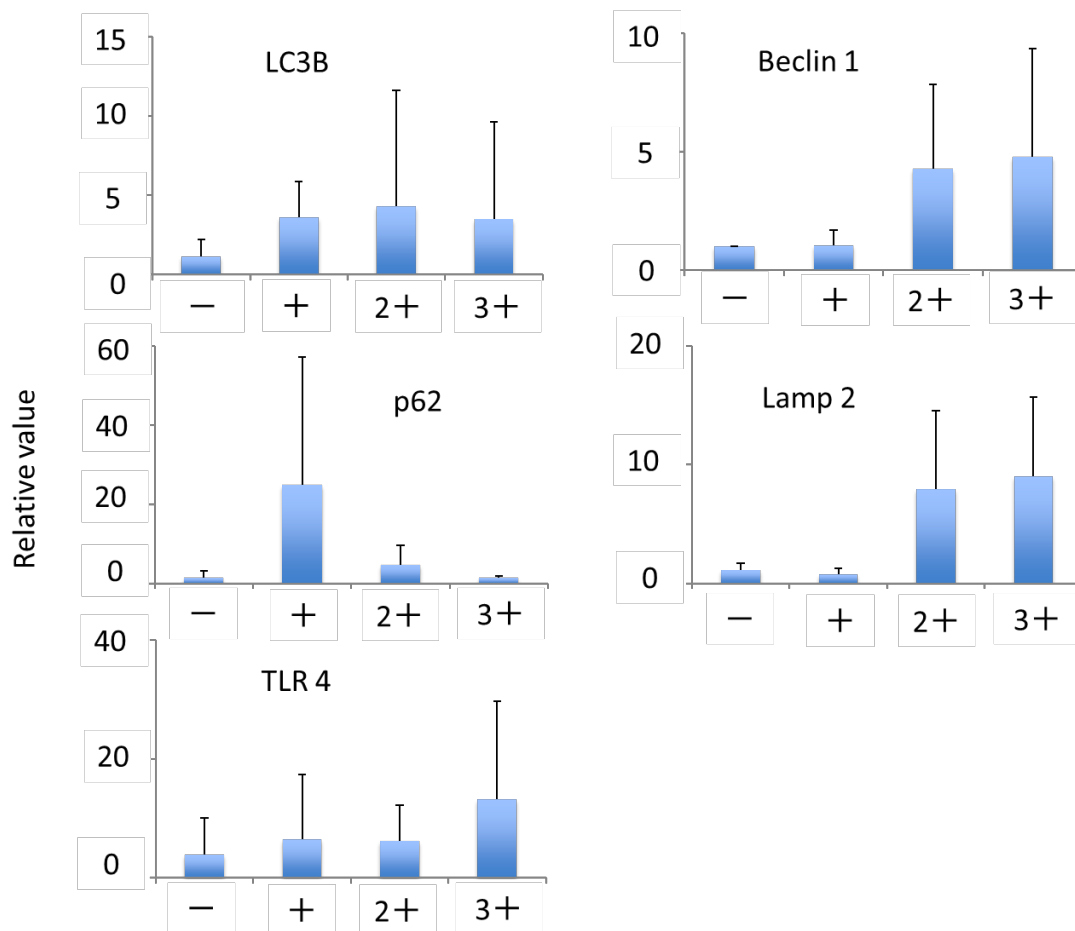


Fig. 4 オートファジー関連蛋白質の mRNA 発現の解析

オートファジー関連蛋白質として、LC3B、Beclin 1、p62、Lamp2 及び TLR4 の mRNA について Real-time PCR で解析した。平均±標準偏差(SD)として示す。いずれの mRNA 発現においても、ばらつきが大きく、正常な膵と比較して有意な差は見られなかった。しかし、LC3B、Beclin1、Lamp2 及び TLR4 については、線維化のグレードが高度になるに伴って、増加する傾向が見られた。p62 については、線維化グレード+で上昇し、その後減少していた。

第2節 マクロファージの特性解析

緒言

マクロファージは周囲の環境に応じて多種多彩な機能を現す細胞である。線維化病変に出現するマクロファージも多様な特性を現すことが知られ、その解析は肝臓や腎臓の薬剤誘発性線維化病変を用いてマクロファージ特異抗体に対する免疫組織化学的手法により探究されている (Golbar et al., 2011; Yamate et al., 1996)。しかし、腓線維化に出現するマクロファージの機能特性については、これまで取り組まれておらず、未だ不明な点が多い。

病理学的には、傷害された部位に出現するマクロファージは多様な機能を現すとされる。近年、そのような病的部位に出現するマクロファージの機能特性に対して M1 型/M2 型分極化の概念が提唱された (Patel et al., 2012; Wijesundera et al., 2014; Sporrer et al., 2009)。M1 型は、貪食活性が高く、炎症を誘起し、一方 M2 型は抗炎症作用があり線維化を導くとされる。免疫組織化学的には、M1 型マクロファージは CD68 抗原を、M2 型マクロファージは CD163 抗原を発現することで区別できるとされる (Golbar et al. 2012; Polfliet et al., 2006)。また、マクロファージは M1 型の CD68 や M2 型の CD163 に加え、MHC クラス II、CD204 や Iba-1 などの抗原に対する抗体が、病理学的なマクロファージの機能解析に用いられている (Yamashiro et al., 1994; Greaves et al., 1998; Ohsawa et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Ide et al., 2005)。

この第2節では、第3章第1節で記載したラット Dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発腓線維化モデルを用い、その病態をマクロファージの機能特性を中心に免疫組織化学的に解析した。特に、マクロファージの動態は M1 型/M2 型分極化と、それらのマクロファージがそれぞれ特異的に産生するとされるサイトカインの分析評価に基づいて行った。さらに、MHC クラス II、CD204 及び Iba-1 抗体を用いてマクロファージの機能に関わる分子表現についても解析を加え、薬物誘発性の腓線維化に出現するマクロ

ファージの機能特性を評価した。

材料と方法

1. 供試動物

第3章第1節に記載するラットDBTC誘発腩線維化モデルを用いた。

2. サンプルの採取と組織病変の病理組織学的評価

第3章第1節に記載するように、得られた腩組織は、10%中性緩衝ホルマリンあるいはPeriodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定し、一部はRNAlater Stabilization Solution (Qiagen, Hilden, Germany) に浸漬した。また、一部組織はコンパウンドに包埋して-80度で凍結保存した。10%中性緩衝ホルマリン及びPLP固定した腩組織は、パラフィン包埋した後、4 μ m に薄切し免疫組織化学染色 (CD68、CD163、MHCクラスII、CD204、Iba-1) を行った。凍結サンプルは10 μ m に薄切して蛍光二重免疫染色に供した。

DBTC 投与ラットから得た腩組織は、第3章第1節で記述するように、HE 染色に基づいて、線維化の程度により 3 段階で評価し、それに相応するマクロファージの機能特性と産生されるサイトカインを解析した。

+: 軽度の線維化。

2+: 中等度の線維化。

3+: 高度の線維化。

なお、投与後 1 日の媒体投与対照群の正常な腩組織はグレード(-)とした。

3. マクロファージの免疫組織化学染色

使用した抗体を Table 1 に示す。

10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した腩組織は、4 μ m に薄切し、切片を作製した。モノクローナル又はポリクローナル一次抗体をその切片に適応する

ことで免疫組織化学染色を行った。

MHC クラス II、CD204 及び Iba-1 抗体を用いた染色用組織用の切片は、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 20 分間マイクロウェーブ処理することで賦活化を行った。CD68 及び CD163 に対する免疫染色用切片は、10 µg/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) で 10 分間処理することで賦活化を行った。これらの切片は、次いで、3% H_2O_2 /0.065% NaN_3 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、さらに非特異的結合を阻害するために 5%スキムミルク含有 PBS で 30 分間処理した。各切片は室温で一次抗体と 60 分間インキュベーションした後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した二次抗体 (Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan) と 30 分間インキュベーションした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド (DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて視覚化した。陰性対照は一次抗体の代わりに非免疫化マウス又はウサギ IgG を使用した。免疫組織化学染色後、ヘマトキシリンで軽く対比核染色を行った。

免疫組織化学染色を施したサンプルは、陽性細胞の出現を以下のように半定量的に評価した。

- : 出現なし。
- ±: わずかに出現する。
- +: 軽度に出現する。
- 2+: 中等度に出現する。
- 3+: 高度に出現する。

4. マクロファージに対する蛍光二重免疫染色

蛍光二重免疫染色は CD68/CD163、CD68/CD204、CD163/CD204、CD68/MHC クラス II、CD163/MHC クラス II の組み合わせで実施した。抗 Iba-1 抗体についても蛍光二重免疫染色を検討したが、今回検討した方法では Iba-1 に対する二重蛍光免疫

染色はできなかった。

凍結したラット臍組織から切片(厚さ 10 μ m)を作製し、冷アセトン:メタノール(1:1)中に 4°Cで 10 分間固定した後、切片を 10%ヤギ血清と共に室温で 30 分間インキュベートした。切片は一次抗体に 4°Cで一晩反応させた。切片を洗浄後、二次抗体であるヤギ抗マウス IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)及びヤギ抗マウス IgG2a-Alexa 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を室温で 45 分間反応させた。この切片を、PBS で洗浄後、核染色のために 40, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で染色し、バーチャルスライドスキャナー (VS-120, Olympus, Tokyo, Japan)でスキャンした。

5. M1 型/M2 型マクロファージ関連サイトカイン測定

臍組織は RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany)に浸漬し、4°Cで一晩静置し、測定に供するまで-80°Cで保存した。Total RNA は SV Total RNA Isolation System (Promega, Fitchburg, WI, USA)で抽出し、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて RNA を cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR は、TaqMan® Gene Expression Assays (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて PikoReal Real-Time 96 PCR System (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)で測定を行った。TaqMan プローブは以下のものを使用した。

M1 型マクロファージ関連サイトカイン:

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): Rn00580555_m1

Interleukin-1 β (IL-1 β): Rn00580432_m1

Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Rn01525859_g1

Interleukin-6 (IL-6), Rn01410330_m1

M2 型マクロファージ関連サイトカイン:

Interleukin-4 (IL-4), Rn01456866_m1

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Rn00572010_m1

Interleukin-10 (IL-10), Rn00563409_m1

内在性コントロール:

18S ribosomal RNA, Hs99999901_s1

それぞれの mRNA 発現は、内在性コントロールの 18S ribosomal RNA mRNA を用いてノーマライズし、比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) を用いてデータ解析した。

6. 統計計算

Real-time PCR 法で得られたデータは平均±標準偏差(SD)として示した。Dunnett の多重比較試験によって統計学的に評価した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

成績

1. 免疫組織化学的解析

免疫組織化学的染色による結果を Table 2 に示す。

1.1. M1 型/M2 型マクロファージの出現 (Table 2、Fig. 1)

M1型マクロファージとしてCD68陽性細胞を、M2型マクロファージとしてCD163陽性細胞を解析した。

正常な膵(グレード(-))では、CD163発現M2型マクロファージが小葉間や腺房周囲に散見されたが、CD68発現M1型マクロファージは認められなかった。前者は、いわゆる固着マクロファージと思われる(Fig. 1 A, C)。

ラット膵線維化病変では、線維化のグレードが高度(+、2+、3+)になるに伴いM1型マクロファージ、M2型マクロファージどちらも徐々に増加した。しかし、CD68発現M1型マクロファージはグレード+から、CD163発現M2型マクロファージはやや遅れてグレード2+から増加する特徴があった。これらのマクロファージは形態学的には、円形から紡錘形を呈した(Fig. 1 B, D)。

1.2. マクロファージのその他の免疫表現型に関する解析 (Table 2、Fig. 2)

マクロファージの免疫表現型に係る抗原分子としてMHCクラスII、CD204及びIba-1の解析を行った。

MHCクラスII陽性マクロファージは、正常な膵においては存在しなかったが、グレード2+からわずかに出現が見られ、グレード3+では腺房周囲や小葉間に中等度から高度に見られるようになった(Fig. 2 A, B)。CD204陽性マクロファージは正常な膵組織においてもわずかに存在していたが、線維化のグレードが高度(2+、3+)になると腺房周囲や小葉間に出現するようになり、その数がやや増加した(Fig. 2 C, D)。Iba-1陽性細胞は正常膵で散見されているが、線維化のグレードが高度になるに伴い腺房周

囲や小葉間において増加する傾向が見られた。これらのマクロファージは円形から紡錘形、時に大型円形を呈した (Fig. 2 E, F)。

2. 蛍光二重免疫染色 (Fig. 3, 4)

線維化グレード2+の材料を用いて各種マクロファージのマーカーについて蛍光二重免疫染色を実施した。上記したように、Iba-1についても染色を試みたが、この抗体が今回用いた方法では反応せず、二重蛍光免疫染色で評価することが出来なかった。

CD68発現M1型マクロファージとCD163発現M2型マクロファージの蛍光二重免疫染色したところ、両マーカーを共発現するマクロファージは全体の44%、CD68のみを発現するマクロファージは全体の47%、CD163のみを発現するマクロファージは全体の9%となり、グレード2+の線維化病変においては、半数近くのマクロファージが両マーカーを共発現することが分かった (Fig. 3)。

CD68陽性M1型マクロファージとMHCクラスIIあるいはCD204との蛍光二重免疫染色を行ったところ、CD68及びMHCクラスIIを共発現するマクロファージは全体の34%であり、CD68及びCD204を共発現するマクロファージは全体の23%であった (Fig. 4)。

CD163陽性M2型マクロファージとMHCクラスIIあるいはCD204との蛍光二重免疫染色を行ったところ、CD163及びMHCクラスIIを共発現するマクロファージは全体の3%であり、CD163及びCD204を共発現するマクロファージは全体の89%であった (Fig. 4)。

3. M1型マクロファージあるいはM2型マクロファージ関連サイトカインの解析 (Fig. 5)

M1型マクロファージと関連する炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、MCP-1 と、M2型マクロファージと関連する IL-4、IL-10 と TGF- β 1 について Realtime PCR で解析した。

IL-6 は線維化グレード 2+の材料において、対照群に比べ有意な増加が見られたが、線維化グレード 3+では低下したものの、線維化のグレードが高度になるに伴って

増加する傾向が見られた。IL-1 β 、MCP-1、IL-4 及び IL-10 は対照群のそれと比較して有意な上昇は見られなかったが、線維化のグレード(+、2+、3+)が高度になるに伴い増加する傾向が見られた。

TGF- β 1 については、線維化グレード+ではほとんど検出されず、逆に低下しており、線維化グレードが高度となっても、対照群と同程度であった。

以上のように、マクロファージから産生されるサイトカインの解析では、ばらつきが見られた。これは、ラット DBTC 誘発腭線維化においては、第 3 章第 1 節で考察したように、同一個体の腭組織においても病変の形成に違いがあったことが原因と考えられた。しかし、生物学的な意義については検証する必要があるが、TGF- β 1 以外は、腭線維化に伴い増加する傾向がみられたことは所見として評価できると判断した。

考 察

1. 免疫組織化学的解析

1.1. CD68 発現 M1 型/CD163 発現 M2 型マクロファージの出現

傷害部位に出現するマクロファージは M1 型/M2 型分極化によりその特性が評価できると考えられている (Patel et al., 2012; Wijesundera et al., 2014; Sporrer et al., 2009; Fig 5)。DBCT 誘発ラット腓線維化病変では CD68 発現 M1 型マクロファージはグレード+から、CD163 発現 M2 型マクロファージはやや遅れてグレード 2+から増加し始めた。一般的には、組織が傷害されると M1 型マクロファージがまず出現し、傷害組織を取り除くために貪食活性を示すとともに、炎症性因子を産生し、組織傷害がさらに助長されるとされる (Martinez et al., 2008; Gratchev et al., 2006)。一方、M2 型マクロファージは M1 型に遅れて出現し、抗炎症作用や線維化を誘導することで傷害組織の修復に係るとされる (Gratchev et al., 2006; Sica and Mantovani, 2012) 今回のラット腓線維化モデルでは、一般的に言われているように M1 型がまず出現し、M2 型が遅れて出現した。グレード 2+の腓線維化のサンプルを用いた二重蛍光染色では、CD68 及び CD163 を共発現するマクロファージが 44%存在していた。これは、CD68 発現 M1 型マクロファージが CD163 発現 M2 型マクロファージへと M1/M2 シフトが起こっていることが考えられた (Fig. 6)。

興味ある所見として、CD163 は肝臓では固着マクロファージであるクッパー細胞に発現する (Wijesundera, et al., 2014)。腓組織においても、CD163 発現 M2 型マクロファージは組織常在型マクロファージとして、多くはないが、存在していた。一方、正常なラット腓組織においては、CD68 発現 M1 型マクロファージはほとんど見られない (Yu et al., 2016.; Honda et al., 1990)。しかし、ラット DBTC 誘発腓線維化の病態では、まず CD68 発現 M1 型マクロファージが早期に増加したことは、古典的なマクロファージである M1 型マクロファージが腓組織の傷害に関与することが考えられる。このような

CD68 発現マクロファージは、通常、血中単球に由来し、傷害組織に対し即座に動員されると考えられている。

以上より、腓線維化に出現するマクロファージは、まず血中単球に由来する CD68 発現 M1 型マクロファージが動員され、その後 CD68/CD163 共発現マクロファージが 44%存在することから、M1/M2 シフトが生じ CD163 発現 M2 型マクロファージが増加し、線維化の進展に寄与することが推察された。なお、肝線維化では肝構成細胞の 20%を占めるクッパー細胞が、CD163 発現 M2 型マクロファージとして参画されるとされるが (Wijesundera et al., 2014)、腓組織には CD163 発現固着マクロファージの存在は僅かであり、腓固着マクロファージの腓線維化への関与は肝線維化程貢献していないのではと考えられた。しかし、薬物誘発腓線維化に動員されるマクロファージの由来についてはさらに検討が必要である。

以上の所見より、ラット DBTC 誘発腓線維化において、初期には M1 型マクロファージが、続いて M2 型マクロファージに係ることが初めて示された。

1.2. マクロファージに発現するその他の免疫表現型

病変部に出現するマクロファージは多彩な機能特性を現し、それを免疫組織化学的に評価する試みが行われている。MHC クラス II は活性化した樹状細胞やマクロファージで発現するとされ、抗原提示能が高い細胞に見られる (Ide et al., 2005; Yamashiro et al., 1994)。CD204 はクラス A のスカベンジャーレセプター抗原で、脂質代謝と関連があるとされる (Greaves et al., 1998)。Iba-1 は、マクロファージの足場を構成する蛋白質とされ、細胞の遊走やファゴサイトーシスに係るとされる (Ohsawa et al., 2000; Sasaki et al., 2001)。

ラット DBTC 誘発腓線維化においては、出現の程度には差があるが、MHC クラス II、CD204 あるいは Iba-1 発現マクロファージが線維化のグレードに伴って増加した。腓線維化の形成におけるこれらマクロファージの機能特性については不明な点もあるが、この病態では腓組織の傷害が進んでおり、そのような傷害細胞に含まれる脂質を

処理するため脂質代謝との関連がある CD204 の増加が生じたと考えられた。また、MHC クラス II は傷害された分子群(例えば Damage-associated molecular patterns; DAMPs)により誘導される(Kuramochi et al. 2016)。そのために、MHC クラス II を発現する抗原提示マクロファージの増加が生じたと考えられた。さらには、マクロファージは病変部に遊走することから、Iba-1 発現浸潤マクロファージが増加したことが考えられた。

興味ある所見として、グレード 2+ の腓線維化のサンプルを用いて二重蛍光染色を行ったところ、MHC クラス II 発現マクロファージは CD68 を共発現し(全体の 34%)、CD204 発現マクロファージの多くが CD163 を共発現しており(全体の 89%)、それぞれ M1 型と M2 型に分極する傾向があった。ラットの実験的肝線維化においても、MHC クラス II は M1 型に、CD204 は M2 型に分極することが報告されている(Wijesundera et al., 2014)。M1 型/M2 型分極化の概念に基づけば、MHC クラス II 発現マクロファージは炎症促進、CD204 発現マクロファージは抗炎症・線維化促進に働く機能を有するのかもしれない。さらなる検討が必要であるが、病理学的にマクロファージの免疫組織学的な機能特性(免疫表現系)を調べることは腓線維化の病態解析に有用であると考えられる。

2. M1 型/M2 型マクロファージ関連因子の解析

M1 型マクロファージ関連因子である IL-6、IL-1 β 及び MCP-1 と、M2 型マクロファージ関連因子である IL-4 と IL-10 は、腓線維化のグレードが高度になるに伴って増加する傾向が見られた。

IL-6 は、M1 型マクロファージの誘導及び活性化に係り(Martinez, 2011; Pello et al., 2011)、IL-1 β は前炎症性因子として知られており、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、内皮細胞などの活性化、好中球増加、接着分子の発現促進を行う(Garlanda et al., 2013)。また、MCP-1 は、ケモカインファミリーのメンバーで、血液中の単球及び常在マクロファージの走化性因子として作用するとされる(Zamara et al., 2007; Sakai et al., 2006)。これらの因子は、腓線維化に伴い増加傾向があったことから、M1 型マクロファージの出

現と M1 型マクロファージに係わる炎症促進機能に貢献していたものと考えられた。

一方、IL-4 は M2 型マクロファージを誘導するとされる (Martinez, 2011; Meghari et al., 2007)。M2 型マクロファージは線維化 2+ で増加し始めたことから、IL-4 は M2 型マクロファージの誘導と機能付加に貢献していたと思われた。IL-10 は、その生物活性は多岐にわたるとされるが、主に単球系細胞に作用して炎症性サイトカインの産生を始めとする免疫機能を抑制的に制御するとされる (Couper et al., 2008)。MHC クラス II 発現マクロファージは二蛍光二重免疫染色で M1 型に分極化する傾向にあったことから、IL-10 は免疫機能に係る MHC クラス II 発現 M1 型マクロファージに対抗する機能を有し、M2 型マクロファージの組織修復に貢献していたのかもしれない。なお、M2 型マクロファージが産生する線維原性因子である TGF- β 1 の明らかな増加発現はなかった。しかし、実際には病理組織学的には腭線維化の進行が確認されていることから、このサイトカイン TGF- β 1 の動態と腭線維化の進行との齟齬は、サンプリングの問題があると考えられた。第 3 章第 1 節に記載したように、ラット DBTC 誘発腭線維化病変の形成はやはり個体差や部位差が生じやすいのかもしれない。

小 括

ラット dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発腠線維化病変を用いて、マクロファージ機能の特性を解析した。その結果、腠線維化のグレードが高度になるのに伴って、まず CD68 発現 M1 型マクロファージが早期に出現し、続いて CD163 発現 M2 型マクロファージが増加し始めることが分かった。また、二重蛍光免疫染色により、CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型の両方を発現するマクロファージが 44% 存在しており、これは M1 型から M2 型へとシフトする所見と考えられた。また、MHC クラス II、CD204、Iba-1 発現マクロファージが観察され、これらマクロファージも腠線維化のグレードと共に増加することが示された。興味ある所見として、二重蛍光免疫染色により MHC クラス II は CD68 発現 M1 型マクロファージに、CD204 は CD163 発現 M2 型マクロファージに分極化している傾向が分かった。さらに、M1 型マクロファージ関連因子である IL-6、IL-1 β 及び MCP-1 と、M2 型マクロファージ関連因子である IL-4 と IL-10 が、腠線維化のグレードが高度になるに伴って増加する傾向が見られた。

以上より、薬物誘発ラット腠線維化の病態は、M1 型と M2 型マクロファージが関与することで形成されることが初めて示された。

Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細

抗体	抗体タイプ	クローン	希釈率	賦活化	供給元
抗 CD68 抗体	マウスモノクローナル	ED1	1:500	10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) 処理	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
抗 CD163 抗体	マウスモノクローナル	ED2	1:500	10 μ g/ml プロテアーゼ K を含むトリス緩衝生理食塩液 (pH7.5) 処理	AbD Serotec, Oxford, UK
抗 CD204 抗体	マウスモノクローナル	SRA-E5	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Transgenic Inc., Kumamoto, Japan
抗 MHC クラス II 抗体	マウスモノクローナル	OX6	1:300	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	AbD Serotec, Oxford, UK
抗 Iba-1 抗体	ウサギポリクローナル	—	1:1000	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan

Table 2 薬物誘発腠線維化に出現するマクロファージの特性解析

抗体 \ 線維化グレード	—	+	2+	3+
CD68	—	— ~ ±	± ~ +	2+
CD163	+	±	+ ~ 2+	2+ ~ 3+
CD204	±	±	+	+
MHC クラス II	—	—	— ~ ±	+ ~ 3+
Iba-1	+	± ~ +	2+ ~ 3+	3+

—;出現なし, ±;わずかに出現, +;軽度に出現, 2+;中等度に出現, 3+;高度に出現

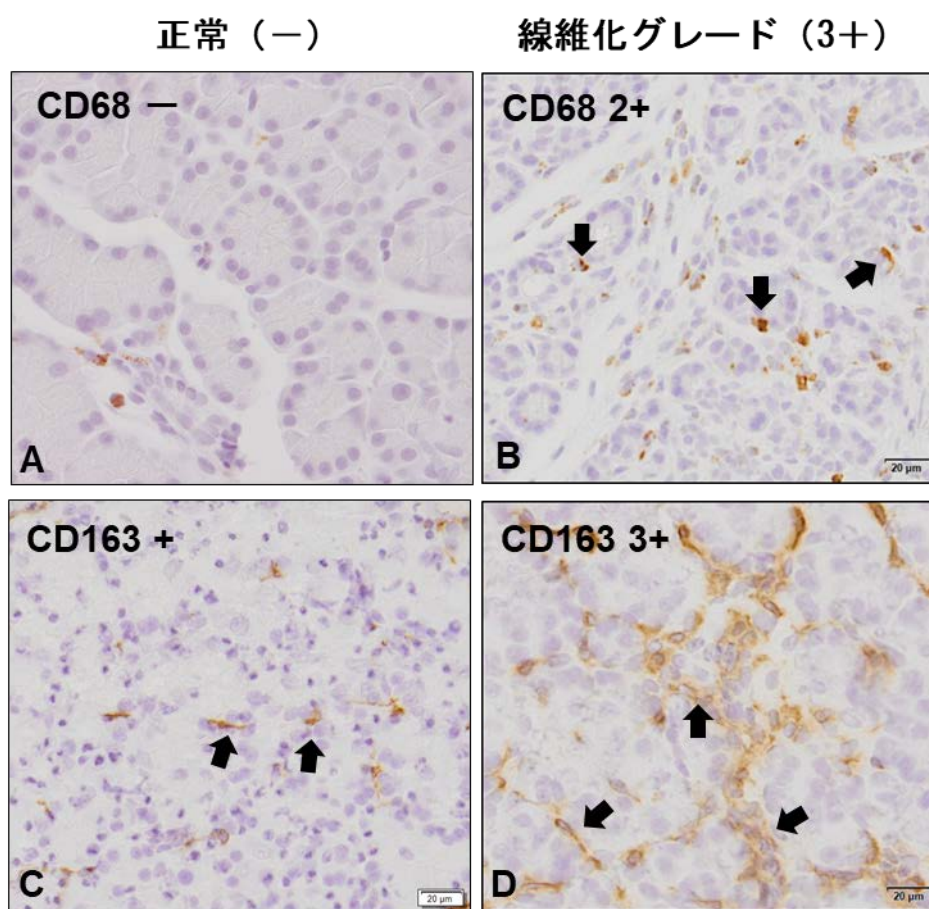


Fig. 1 M1 型/M2 型マクロファージの出現

A-D: ラット DBTC 誘発腓線維化における CD68 及び CD163 に対する免疫組織学的染色。各陽性細胞の出現は、-: 出現なし、+: 軽度に出現する、2+: 中等度に出現する、3+: 高度に出現する、とした。矢印は陽性細胞を示す。

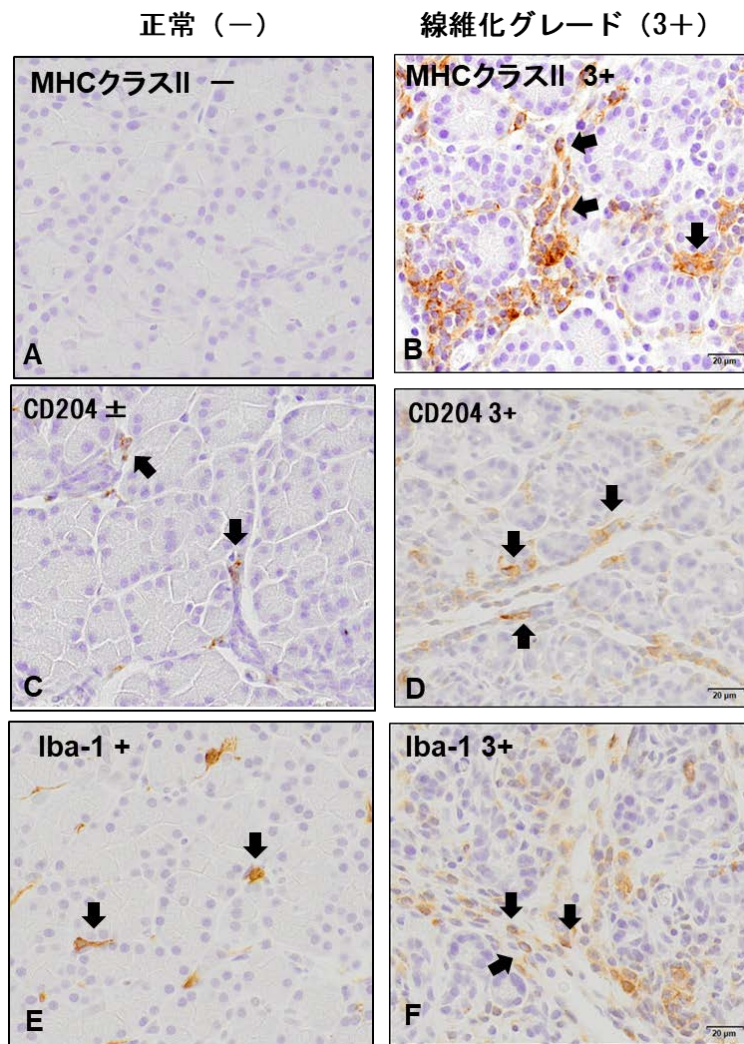


Fig. 2 マクロファージのその他の免疫表現型に関する
免疫組織化学的解析

A-F: MHC クラス II、CD204 及び Iba-1 に対する免疫組織学的染色。各陽性細胞の出現は、-:出現なし、±:わずかに出現する、+:軽度に出現する、2+:中等度に出現する、3+:高度に出現する、とした。矢印は陽性細胞を示す。

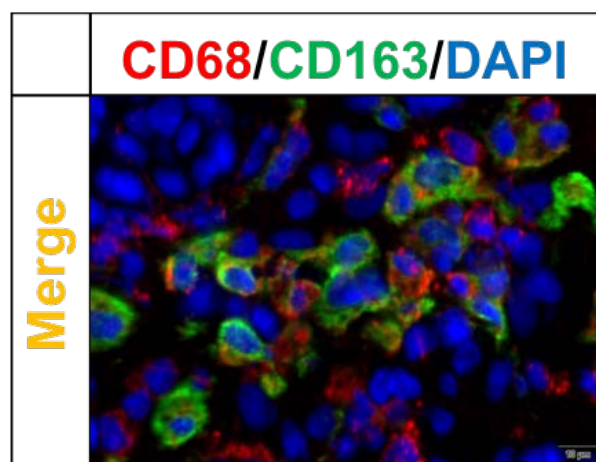
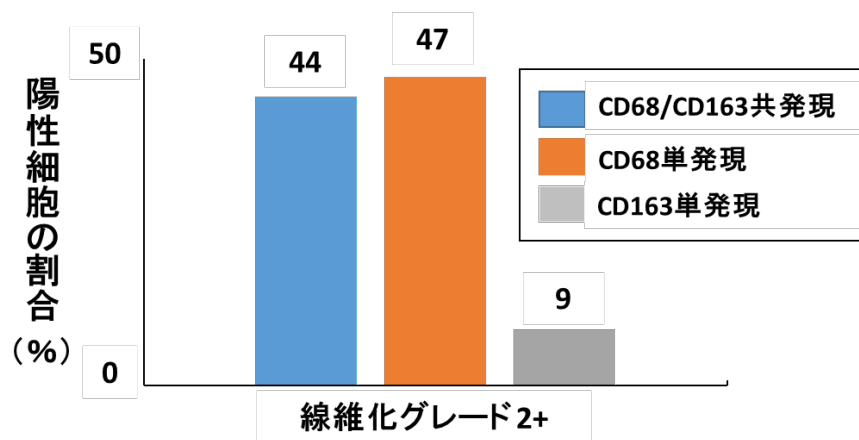


Fig. 3 M1 型/M2 型マクロファージの蛍光二重免疫染色

線維化グレード 2+のサンプルを用いて、M1 型マクロファージのマーカである CD68 及び M2 型マクロファージのマーカである CD163 の蛍光二重免疫染色を行った。その結果、44%のマクロファージが CD68 及び CD163 を共発現していた。

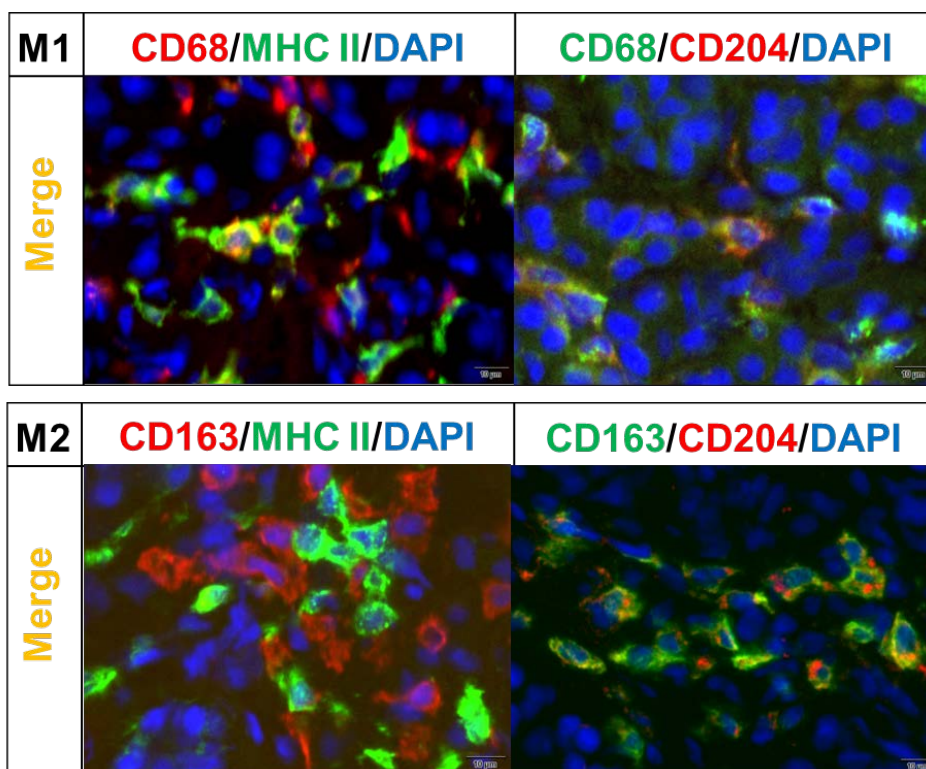
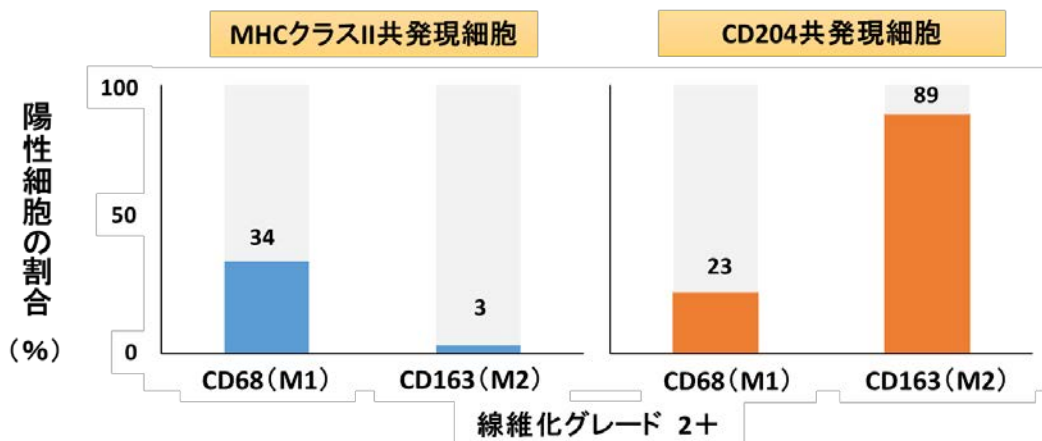


Fig. 4 マクロファージ発現分子(MHC クラス II 及び CD204)の
 蛍光二重免疫染色

嚢線維化グレード 2+のサンプルを用いて、CD68 又は CD163 に対する MHC クラス II 又は CD204 の発現を観察した。MHC クラス II は CD68 発現 M1 型マクロファージに、CD204 は CD163 発現 M2 型マクロファージに分極していることが分かった。

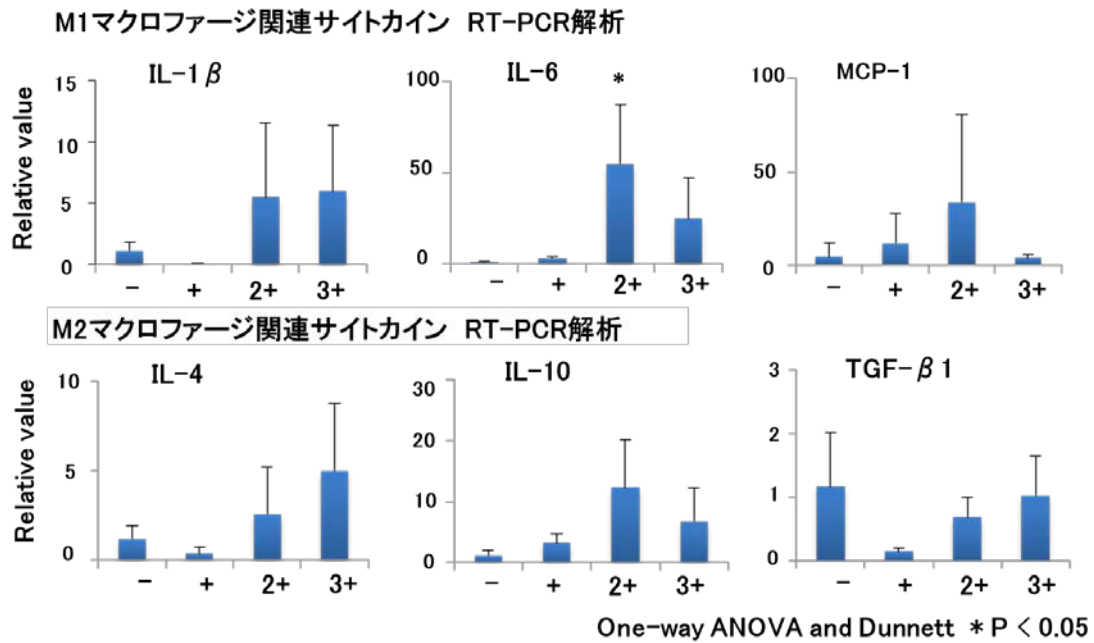


Fig. 5 炎症性サイトカインの特徴

M1 型マクロファージと関連する炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、MCP-1 と、M2 型マクロファージと関連する IL-4、IL-10 と TGF- β 1 について Real-time PCR で解析した。平均±標準偏差(SD)として示す。これらのサイトカインの発現動態については、本文に記載する。

－:正常な腓、+:軽度な腓線維化、2+:中等度の腓線維化、3+:高度の腓線維化を示す。

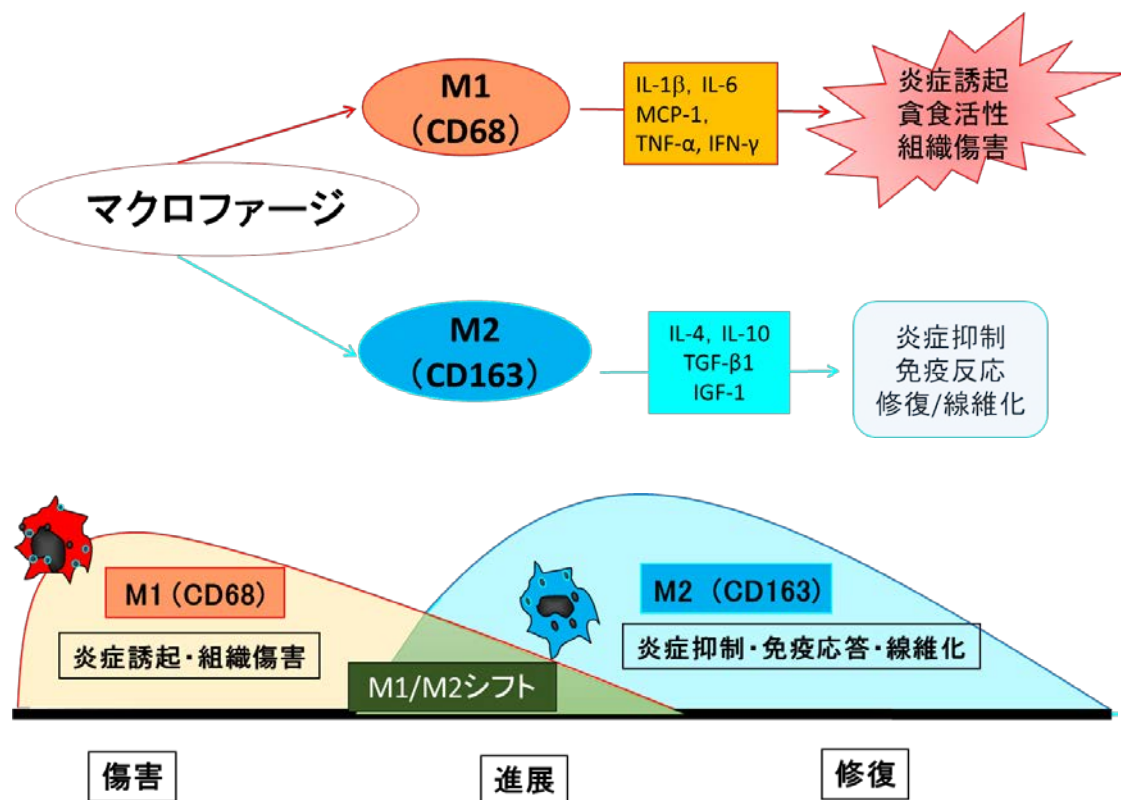


Fig. 6 M1型/M2型マクロファージの特徴

傷害された部位に出現するマクロファージは M1 型/M2 型に分極化する。M1 型マクロファージは、細胞傷害や貪食活性が高く、傷害早期に出現し、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインを産生することで、組織傷害や炎症を助長する。一方、M2 型マクロファージは M1 型に遅れて出現し TGF- β 1や IL-10などの線維原性因子を産生することで、組織の修復に係るとされる。M1 型マクロファージは CD68 抗原を、M2 型マクロファージは CD163 抗原を発現することで区別できるとされる。

第3節 筋線維芽細胞の特性解析

緒言

筋線維芽細胞は、膠原線維やフィブロネクチンなどの細胞外基質を過剰に産生することで線維化の進展に係る重要な細胞とされる。この筋線維芽細胞は、線維芽細胞と平滑筋細胞の中間的な性格を示し、傷害組織の組織が乖離・分離することを抑制するために収縮能を有する。よって、拘縮細胞とも呼ばれる (Desmouliere et al., 2003)。

筋線維芽細胞の特性は、肝臓、腎臓、肺及び皮膚等様々な器官の線維化病変で解析が行われ、免疫組織化学的に、vimentin、desmin 及び α -平滑筋アクチン (α -SMA) といった細胞骨格を、その形成程度において様々な割合で発現するとされる (Yamate et al., 2005; Hinz et al., 2007)。機能的に活性化した筋線維芽細胞では α -SMA をよく発現することから、 α -SMA の発現が筋線維芽細胞の免疫組織化学的な同定に汎用されている (Wynn, 2008)。

しかし、腓線維化における筋線維芽細胞の特性は未だ十分に解明されておらず検討が必要である。また、腓線維化に出現する筋線維芽細胞の起源についても未解明な点が多い。筋線維芽細胞は通常は間質にある既存の線維芽細胞から形成されるとされるが、肝線維化では肝星細胞 (類洞周囲細胞/伊東細胞) から、腎線維化では傷害尿細管の上皮-間葉転換を介して形成されると考えられている (Zeisberg et al., 2001; Kalluri and Neilson, 2003)。特に、肝線維化での肝星細胞由来説は、肝星細胞が元来グリア細線維性酸性蛋白質 (GFAP) を発現し、肝線維化部位に多くの GFAP 陽性細胞が出現することから考察されている (Cassiman et al., 2002)。同様に、腓星細胞でも GFAP を発現していることが見出された (Bachem et al., 1998; Apte et al., 1998)。

腓線維化と肝線維化では、GFAP 発現細胞の動態を解析することは筋線維芽細胞の起源を解明する上で有用であると考えられる。また、Thy-1 (CD90) は、細胞の接着及び移動、神経再生、及び線維化において重要な役割を有し、細胞-細胞間及び細胞-マトリックス間での相互作用に重要な因子とされる (Rege and Hagood, 2006)。

Thy-1 は、既存の線維芽細胞において時に発現が認められ、その発現は子宮、肺、皮膚、眼窩、角膜及び腎臓の線維化病変において、筋線維芽細胞の形成と関連するとの報告がある (Koumas et al., 2003; Zhou et al., 2004; Hagood et al., 2005; Rajkumar et al., 2005)。さらに、ヒトにおいては造血幹細胞、肝幹/前駆細胞、間葉系幹細胞などの体性幹細胞のマーカーとされる (Dan et al., 2006; Herrera et al., 2006)。Thy-1 発現細胞の動態を解析することは、筋線維芽細胞の幹細胞起源を探索する上で有用であると考えられる。

この第 3 節では、第 3 章第 1 節で作製したラット Dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発線維化モデルを用いて、細胞骨格である vimentin、desmin、 α -SMA 及び GFAP の発現と、間葉系幹細胞マーカーの Thy-1 を免疫組織化学的に解析することによって、線維化における筋線維芽細胞の細胞特性と起源について検討した。

材料と方法

1. 供試動物

第3章第1節に記述するラット DBTC 誘発腓線維化モデルを用いた。

2. サンプルの採取と組織病変の病理組織学的評価

得られた腓組織は、10%中性緩衝ホルマリンあるいは Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定し、一部組織はコンパウンドに包埋して-80度で凍結保存した。

第3章第1節に記載するように DBTC 投与ラットから得た腓組織は、HE 染色を行い、線維化の程度により3段階で評価し、その評価に基づいて筋線維芽細胞の細胞特性を解析した。

+:軽度の線維化。

2+:中等度の線維化。

3+:高度の線維化。

なお、投与後1日の媒体投与対照群の正常な腓組織はグレード(-)とした。

3. 筋線維芽細胞の免疫組織化学染色

使用した抗体を Table 1 に示す。

10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した腓組織は、4 μ m に薄切し、切片を作製した。モノクローナル又はポリクローナル一次抗体をその切片に適応することで免疫組織化学染色を行った。

Vimentin、GFAP、 α -SMA 及び Thy-1 染色用組織切片は、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 20 分間マイクロウェーブ処理することで賦活化を行った。これらの切片は、次いで、3% H_2O_2 /0.065% NaN_3 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間

処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、さらに非特異的結合を阻害するために5%スキムミルク含有PBSで30分間処理した。各切片は室温で一次抗体と60分間インキュベーションした後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した二次抗体(Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan)と30分間インキュベーションした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド(DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて視覚化した。陰性対照は一次抗体の代わりに非免疫化マウス又はウサギ IgG を使用した。免疫組織化学染色後、ヘマトキシリンで軽く対比核染色を行った。

10 μ m に薄切した凍結切片は、desmin に対する免疫組織化学染色に用いた。切片は、冷アセトン:メタノール(1:1)に4°Cで10分間固定した後、非特異的結合を阻害するために5%スキムミルク含有リン酸緩衝食塩水(PBS)中で15分間処理した。次いで、切片を室温で抗 desmin 抗体と60分間反応させた。PBSで洗浄した後、切片はホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗マウス抗体(Histofine simplestain MAX-PO, Nichirei, Tokyo, Japan)と共に60分間インキュベートした。シグナルは、3,3'-ジアミノビザジンテトラヒドロクロライド(DAB 基質キット, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて視覚化した。一次抗体の代わりに使用した非免疫化マウス IgG を陰性対照として用いた。切片をヘマトキシリンで軽く対比核染色した。

免疫組織化学染色を施したサンプルは、陽性細胞の出現を以下のように半定量的に評価した。

- :出現なし。
- ±:わずかに出現する。
- +:軽度に出現する。
- 2+:中等度に出現する。
- 3+:高度に出現する。

4. 筋線維芽細胞の特性に関する蛍光二重免疫染色

蛍光二重免疫染色は、vimentin/ α -SMA、desmin/ α -SMA 及び GFAP/ α -SMA、の組み合わせで実施した。凍結したラット腓組織から切片(厚さ 10 μ m)を作製し、冷アセトン:メタノール(1:1)中に 4°Cで 10 分間固定した後、切片を 10%ヤギ血清と共に室温で 30 分間インキュベートした。切片は一次抗体として抗 vimentin 抗体、抗 desmin 抗体、抗 GFAP 抗体及び抗 α -SMA 抗体と共に 4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、GFAP には、Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を結合させたヤギ抗ウサギ抗体を、vimentin 及び desmin には Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を結合させたヤギ抗マウス IgG1 抗体を、 α -SMA には Alexa Fluor 488 又は Alexa Fluor 568 を結合させたヤギ抗マウス IgG2a 抗体を二次抗体として室温で 45 分間反応させた。これらの切片は、核染色のために 40, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で染色し、バーチャルスライドスキャナー (VS-120, Olympus, Tokyo, Japan)でスキャンした。

成績

免疫組織化学的染色による結果を Table 2 に示す。

1. 筋線維芽細胞の細胞特性の解析 (Table 2)

筋線維芽細胞は、その形成過程において様々な程度で vimentin、desmin 及び α -SMA などの細胞骨格を発現する (Yamate et al., 2005; Hinz et al., 2007)。そこで、第 3 章第 1 節で確立したラット DBTC 誘発腓線維化に出現する筋線維芽細胞の細胞骨格を免疫組織化学的に解析した。

Vimentin を発現する紡錘形の間葉系細胞は、正常腓では腺房周囲に僅かに見られたが、腓線維化のグレードが増加するに伴ってその発現が増強し、特に、グレード 3+ では症例によるが軽度～高度の発現であった (Fig. 1 A)。Desmin 発現細胞の動態も、vimentin 発現細胞と同様の動態を示した。すなわち、desmin 発現の紡錘形の間葉系細胞は、正常腓では腺房周囲に僅かに散見されたが、腓線維化のグレードが高度になるに伴い増加し、特にグレード 3+ では、個体によるが軽度～高度の発現であった (Fig. 1 B)。 α -SMA を発現する間葉系細胞は、正常腓ではみられなかったが、腓線維化のグレードが高度になるに伴って、紡錘形の細胞にその発現が増加し、特にグレード 3+ では、個体によるが軽度～中等度の発現であった (Fig. 1 C)。

以上のように、vimentin、desmin あるいは α -SMA を発現する間葉系の細胞は腓線維化部位に出現しており、細胞外基質を産生する筋線維芽細胞とみなされた。

2. GFAP 陽性筋線維芽細胞の特性解析 (Table 2)

膵腺房の外分泌腺周囲には膵星細胞が存在し、膵腺房の構造維持に係っているとされる。この膵星細胞は GFAP を発現する特徴があることが報告されている (Bachem et al., 1998; Apte et al., 1998)。肝線維化では、GFAP を発現する肝星細胞が、筋線維芽細胞に転換するとされていることから (Tennakoon et al., 2013)、膵星細胞の動態をラッ

ト DBTC 誘発腠線維化モデルで解析した。

第 2 章で検討したように、対照群の正常腠組織においては、GFAP 陽性間質細胞は vimentin 陽性間質細胞と比較すると少ないが散見され、このような細胞が腠星細胞とみなされた。興味ある所見として、腠線維化のグレードが高度になるに伴って紡錘形の GFAP 陽性細胞が増加する傾向があり、特に、線維化のグレード 3+ では中等度の発現であった (Fig. 1 D)。

このように、対照群の腠組織に比べると、腠線維化に伴い GFAP 発現細胞が増加することが示された。肝線維化での、GFAP 陽性肝星細胞と同様 (Tennakoon et al., 2013) に、腠線維化においても、GFAP 発現腠星細胞が、筋線維芽細胞の形成に係ることが示された。

3. Thy-1 陽性間葉系細胞の特性解析 (Table 2)

Thy-1 は、血管周皮細胞や骨髄幹細胞などの体性幹細胞の膜表面に発現する分子である。ヒトでは、間葉系幹細胞のマーカーとして利用されている (Herrera et al., 2006; Dan et al., 2006)。そこで、第 3 章第 1 節で確立したラット DBTC 誘発腠線維化にモデルを用いて、Thy-1 発現細胞の動態を免疫組織化学的に解析した。

対照群の正常な腠組織においては、Thy-1 陽性の間質細胞の出現には、個体によりバラつきがあることが示された。すなわち、ほとんど見られない個体から散見される個体までであった。一方、腠線維化病変では、紡錘形の Thy-1 陽性細胞は、腠線維化のグレードが高度になるに伴い、軽度が増加する傾向がみられ、特にグレード 3+ では軽度～中等度の発現であった (Fig. 1 E)。

腠線維化において、子宮、肺、皮膚、眼窩、角膜及び腎臓の線維化病変において報告されているように (Koumas et al., 2003; Zhou et al., 2004; Hagood et al., 2005; Rajkumar et al., 2005)、Thy-1 発現の未分化な間葉系細胞が出現することが示された。

4. 蛍光二重免疫染色による筋線維芽細胞の特性解析 (Fig. 2)

線維芽細胞は免疫組織化学的に、vimentin、desmin や α -SMA といった細胞骨格を、その形成過程において様々な割合で発現するとされる。一般的には、よく発達した筋線維芽細胞では α -SMA の発現が特徴的であると報告されている (Yamate et al., 2005; Hinz et al., 2007; Wynn, 2008)。それゆえに、vimentin 単独発現タイプ (V-type)、vimentin 及び desmin 両発現タイプ (VD-type)、vimentin, desmin 及び α -SMA タイプの三つを発現するタイプ (VAD-type) に分けられるとされる (Sappino et al., 1990)。

上記したようにラット DBTC 誘発腭線維化モデルにおいて、GFAP 発現に加え、腭線維化のグレードに伴って、vimentin、desmin 及び α -SMA 発現細胞が増加したことから、腭線維化のグレード 2+のサンプルを用いて vimentin/ α -SMA、desmin/ α -SMA 及び GFAP/ α -SMA を共発現する筋線維芽細胞の割合を解析した。

その結果、vimentin 陽性細胞中の α -SMA 陽性細胞率は 65%、desmin 陽性細胞中の α -SMA 陽性細胞率は 50%、GFAP 陽性細胞中の α -SMA 陽性細胞率は 60% であった (Fig. 2)。

考 察

1. 筋線維芽細胞の特性解析

線維化の進展に係る筋線維芽細胞の特性は、免疫組織化学的に vimentin、desmin、 α -SMA などの細胞骨格を、その形成程度において様々な割合で発現するとされる(Yamate et al., 2005; Hinz et al., 2007)。これらの細胞骨格を評価することによって、筋線維芽細胞の出現動態を解析できる。

第 3 章第 3 節ではラット DBTC 誘発腓線維化の病変部に出現する筋線維芽細胞の細胞特性を解析した。その結果、vimentin、desmin 及び α -SMA を発現する筋線維芽細胞は、線維化のグレードが高度になるに伴って増加することが分かった。これは、desmin については固定条件のために解析が出来なかったが、第 1 節で検討した、イヌ及びネコの自然発生性腓線維化での vimentin と α -SMA 発現の筋線維芽細胞の動態(腓線維化に伴い増加する)と類似した。また、ラットを用いた実験的誘発肝・腎線維化の形成においても、vimentin、desmin 及び α -SMA 陽性筋線維芽細胞が増加することが知られている(Yamate et al., 1996.; Yamate et al., 2005; Tennakoon et al., 2015)。

以上より、腓線維化(イヌ及びネコの自然発生病変と実験的誘発ラット病変)においても、肝線維化や腎線維化と同様に vimentin、desmin 及び α -SMA を発現する筋線維芽細胞の増加が生じ、この細胞が線維化の進展に寄与することが示された。

2. GFAP 発現筋線維芽細胞の特性

肝線維化では GFAP 発現肝星細胞に由来する筋線維芽細胞が線維化部位に数多く出現することが報告されている(Tennakoon et al., 2013)。腓星細胞も肝星細胞と同様に GFAP を発現することが報告されている(Bachem et al., 1998; Apte et al., 1998)。本節においてラット DBTC 誘発腓線維化における、GFAP 発現細胞の動態を解析したと

ころ、腓線維化が高度になるに伴い GFAP 発現筋線維芽細胞が増加することが分かった。

第 2 章のラットの腓発生過程と本節の結果から、正常なラット腓組織には GFAP を発現する腓星細胞が腺房を構成する外分泌腺周囲に点在する。第 1 章で記述するよう、イヌ及びネコの腓線維化病変においても線維化グレードに伴い、GFAP 発現細胞の増加が見られた。以上、これらの所見を総じて勘案すると、肝における筋線維芽細胞と同様に、腓線維化部位に出現する筋線維芽細胞は GFAP 発現腓星細胞から形成される可能性が示された。

3. 蛍光二重免疫染色による筋線維芽細胞の特性

筋線維芽細胞は、免疫組織化学的に、細胞骨格の発現程度で、vimentin 単発現タイプ (V-type)、vimentin 及び desmin 共発現タイプ (VD-type)、vimentin、desmin 及び α -SMA の三発現タイプ (VAD-type) があると報告されている (Sappino et al., 1990)。基本的には、その中でも α -SMA を発現する筋線維芽細胞が最も成熟の進んだ細胞で、細胞外基質を過剰に産生するとされる (Wynn, 2008)。そこで、筋線維芽細胞の細胞特性をさらに解析するために、腓線維化グレード 2+ のサンプルを用いて vimentin/ α -SMA と desmin/ α -SMA の組み合わせで蛍光二重免疫染色を行った。

その結果、vimentin 陽性細胞の 65%、desmin 陽性細胞の 50% が α -SMA を発現しており、vimentin や desmin 陽性の筋線維芽細胞が α -SMA を発現することで、より高度の機能を有する筋線維芽細胞に転換している可能性が示された。これは実験的に誘発された肝・腎線維化病変でも観察されている (Golbar et al., 2011; Yuasa et al., 2013)。

さらに、腓線維化のグレードが高度になるに伴って、GFAP 陽性の腓星細胞が増加したことから、GFAP についても線維化グレード 2+ のサンプルを用いて α -SMA との蛍光二重免疫染色を行った。その結果、GFAP 陽性細胞については、60% の細胞が α -SMA を共発現していた。第 1 章で報告したイヌ及びネコの自然発生性腓線維化では、

固定方法の関係でこの蛍光二重免疫染色による解析はできなかったが、ラット DBTC 誘発腓線維化病変の解析により、腓線維化の進行に係る筋線維芽細胞は GFAP 発現 腓星細胞に由来することが分かった。

4. Thy-1 陽性間葉系細胞の特性

Thy-1 は、子宮、肺、皮膚、眼窩、角膜及び腎臓において、筋線維芽細胞の発現と関連するとする報告がある (Koumas et al., 2003; Zhou et al., 2004; Hagood et al., 2005; Rajkumar et al., 2005)。すなわち、Thy-1 は未分化な間葉系幹細胞に発現する細胞膜分子であることから、筋線維芽細胞の起源は体性幹細胞である可能性が示唆される。

本節において、ラット DBTC 誘発腓線維化における Thy-1 発現細胞の動態を解析したところ、腓線維化が高度になるに伴い Thy-1 発現の間葉系の体性幹細胞が増加していた。また、同様に vimentin、desmin 及び α -SMA 発現の筋線維芽細胞も腓線維化に伴い増加していることから、他の臓器の線維化で報告されているように (Koumas et al., 2003; Zhou et al., 2004; Hagood et al., 2005; Rajkumar et al., 2005)、Thy-1 発現の間葉系の体性幹細胞が、腓線維化に出現する筋線維芽細胞の一つの起源と考えられた。

なお、薬物誘発性腓線維化における、Thy-1 発現細胞の動態を検討した研究は、本研究が初めてである。

小 活

細胞外基質を産生することで線維化の進展に係る筋線維芽細胞の細胞特性を、ラット dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発腓線維化病変を用いて解析した。その結果、腓線維化のグレード(−、+、2+、3+)が高度になるに伴って vimentin、desmin 及び α -SMA などの細胞骨格を発現する筋線維芽細胞が増加した。線維化グレード 2+を用いた蛍光二重免疫染色により、vimentin 又は desmin 発現細胞の半数以上が α -SMA を共発現しており、腓線維化においても肝線維化や腎線維化と同様に、vimentin や desmin を発現する間葉系細胞が細胞外基質を活発に産生する α -SMA 発現筋線維芽細胞に転換していることが示された。また、GFAP を発現する腓星細胞も腓線維化のグレードに伴い増加し、腓線維化グレード 2+における蛍光二重免疫染色により、その半数以上が α -SMA を共発現していた。このことから、ラット DBTC 誘発腓線維化においても、第 1 章でイヌ及びネコの自然発生性腓線維化で報告したように、腓星細胞から筋線維芽細胞が誘導され、線維化の進展に重要な働きをしていると考えられた。

さらに、興味ある所見として、腓の線維化のグレードが高度になるに伴い Thy-1 を発現する間葉系幹細胞が増加したことから、Thy-1 発現の間葉系の体性幹細胞が腓線維化の進展に重要な、筋線維芽細胞の起源となる可能性が示された (Fig. 3)。

Table 1 免疫組織化学染色に用いた抗体の詳細

抗体	抗体タイプ	クローン	希釈率	賦活化	供給元
抗 vimentin 抗体	マウスモノクローナル	V9	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 α -SMA 抗体	マウスモノクローナル	1A4	1:1000	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 desmin 抗体	マウスモノクローナル	D33	1:200	凍結切片を使用	Dako Corp, Glostrup, Denmark
抗 GFAP 抗体	ウサギポリクローナル	—	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Transgenic Inc, Kumamoto, Japan
抗 Thy-1 抗体	マウスモノクローナル	CD90	1:500	0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理	Cedarlane Laboratories Ltd., Ontario, Canada

α -SMA; α -smooth muscle actin, GFAP; Glial fibrillary acidic protein

Table 2 筋線維芽細胞の特性解析

抗体 \ 線維化グレード	—	+	2+	3+
Vimentin	±~+	±~+	+~3+	+~3+
Desmin	±~+	NE	+~2+	3+
α-SMA	—	—	±~2+	+~2+
GFAP	±	±	±~+	+~2+
Thy-1	—~+	—~2+	+	+~2+

—;出現なし, ±;わずかに出現, +;軽度に出現, 2+;中等度に出現, 3+;高度に出現, NE;実施していない
 GFAP; Glial fibrillary acidic protein, α-SMA; α-smooth muscle actin

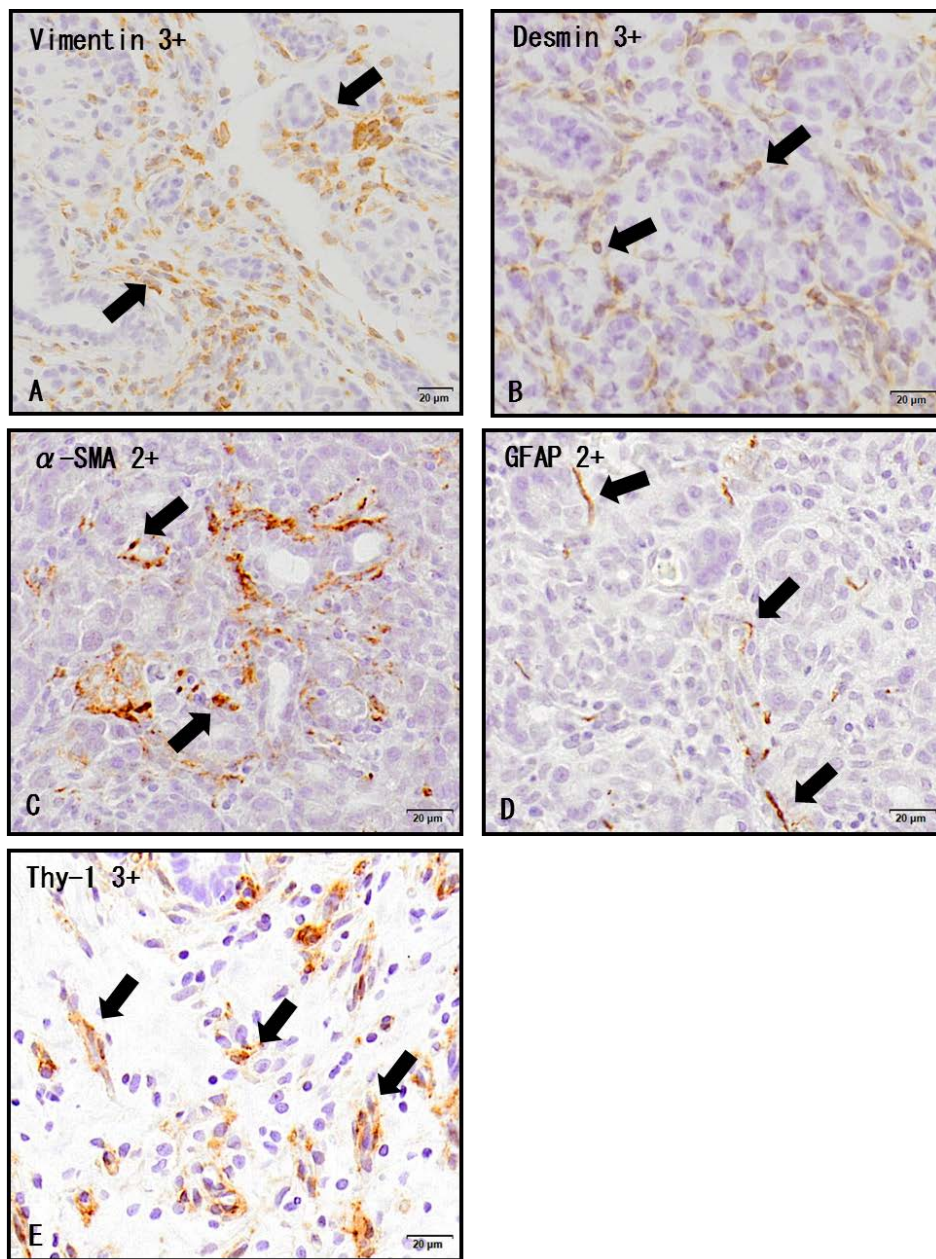


Fig. 1 筋線維芽細胞の特性解析

A-E: ラット DBTC 誘発腓線維化における vimentin、desmin、 α -SMA、GFAP 及び Thy-1 に対する免疫組織学的染色。これらの陽性細胞に関する所見は本文に記載する。矢印は陽性細胞を示す。

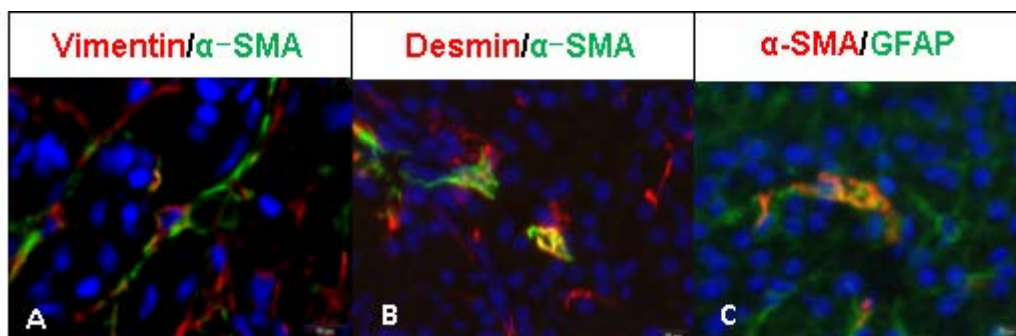
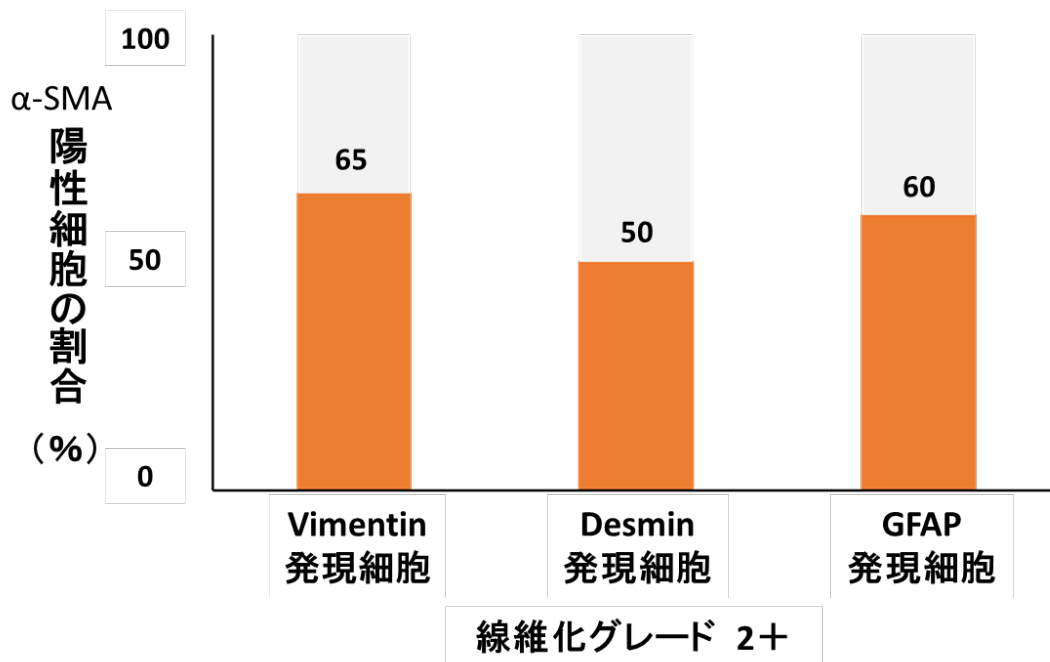


Fig. 2 筋線維芽細胞の蛍光二重免疫染色

腠線維化グレード 2+のサンプルを用いて、vimentin、desmin 及び GFAP に対する α -SMA の蛍光二重免疫染色を行った。その結果、vimentin、desmin 及び GFAP 陽性細胞の半数以上が α -SMA を発現していることが分かった。

A-C: 線維化グレード 2+のサンプルの蛍光二重免疫染色結果。

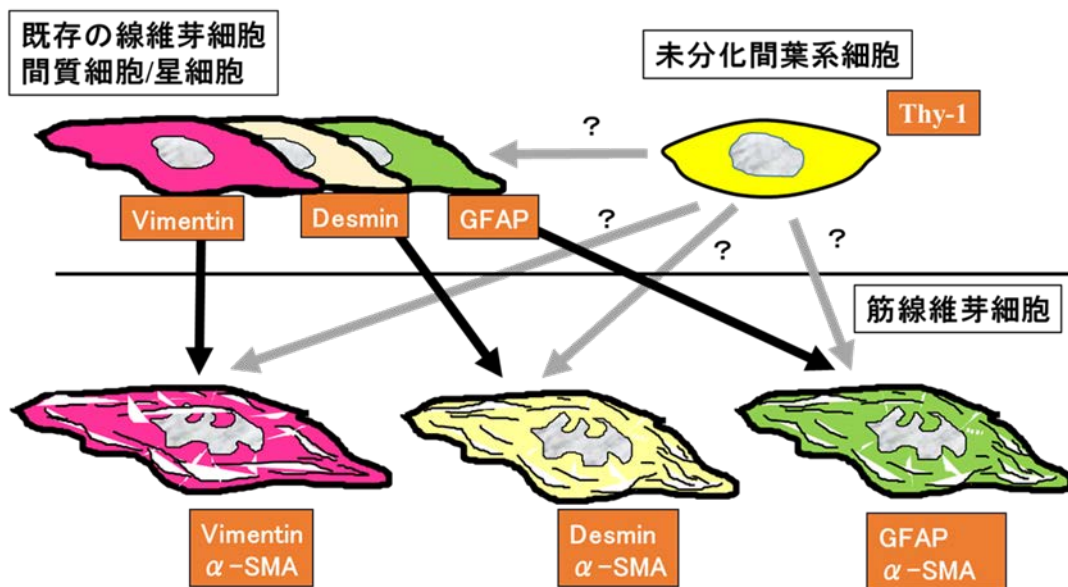


Fig. 3 腠線維化における間葉系細胞の進展

第3章第3節の成績に基づいて腠線維化における腠線維化の進展機序を提示する。ラット DBTC 誘発腠線維化においては、vimentin、desmin 及び GFAP 陽性細胞は線維化のグレードが高度になるに伴って増加した。また、vimentin、desmin 及び GFAP 陽性細胞は、中等度の線維化グレードのサンプルにおいて、半数以上が α -SMA を発現しており、成熟した筋線維芽細胞に進展していることが分かった。また、ラット DBTC 誘発腠線維化においては、Thy-1 陽性の間葉系の体性幹細胞が線維化のグレードが高度になるのに伴って軽度増加しており、間葉系幹細胞から線維化に係る線維芽細胞又は筋線維芽細胞への誘導が起こっている可能性が考えられた。なお、(?)は、更なる検討を要することを示す。

総合討論

本研究では、病理学的には腭線維化の病態である慢性腭炎について、マクロファージと筋線維芽細胞の特性を、主に免疫組織化学的手法を用いて解析し、その病理発生機序の一端を解明することを目的として、イヌ及びネコの自然発生性腭線維化病変を用いた解析、ラットの腭発生過程における間葉系細胞の特性解明、そしてラット dibutyltin dichloride (DBTC) 誘発腭線維化の病態解析を行った。

1. 腭線維化の病態

ヒトの慢性腭炎の多くは急性腭炎から進展するとされる。慢性腭炎は、組織学的には、炎症細胞浸潤を伴った不可逆性の進行性の線維化により特徴付けられる。このような理由から、慢性腭炎は難治性疾患とされる。第1章において、イヌ及びネコの腭線維化の病変を収集し、その病態を解析した。イヌ及びネコの症例を総じて評価したところ、極めて軽度な線維化(±)、軽度な線維化(+)、中等度の線維化(2+)、高度な線維化(3+)に分けられた。極めて軽度な線維化のサンプル(±)では、腭小葉間の間質に浮腫がみられ、炎症細胞の反応に乏しく、僅かに膠原線維が認められた。軽度な線維化(+のサンプル)では、外分泌腺細胞がやや萎縮気味となり、浮腫は軽減したが、軽度の炎症細胞浸潤が見られるようになった。また、膠原線維が腭小葉間に目立った中等度の線維化(2+)のサンプルでは、外分泌腺の萎縮と炎症細胞の浸潤がさらに顕著となり、束状の膠原線維の増生がみられた。高度な線維化のサンプル(3+)では、外分泌腺細胞と腭小葉単位の萎縮が高度となり、その萎縮組織を置換するように炎症細胞を伴った太い束状に増生した膠原線維が認められた。なお、アザン染色により青染色される膠原線維が腭線維化のグレードに伴って増加した。また、第3章第1節においては、ラット DBTC 誘発腭線維化病変を解析し、線維化の程度により3つのグレード(+、2+、3+)に分けることができた。軽度の線維化(+では、腺房細胞の軽度の萎

縮及び膵小葉間の浮腫がみられ、さらに膵小葉間には軽度の炎症細胞の浸潤と膠原線維の沈着があった。中等度の線維化(2+)では、腺房細胞の萎縮がさらに生じ、小葉間に中等度の炎症細胞浸潤と膠原線維の沈着が観察された。高度の線維化(3+)では、炎症細胞の浸潤がより高度となり、線維化によって膵組織が破壊され、膵小葉・腺房構造が不明瞭になっていた。また、ラット DBTC 誘発膵線維化では CK19 陽性の膵管上皮の過形成が、イヌやネコの膵線維化と同様に、グレードに伴い増加した。さらに、膵外分泌腺細胞で通常発現する LC3B 陽性のオートファゴゾームが減少し、膵線維化に伴いオートファジー機構が障害されていることが示された。以上、この研究で確立したラット DBTC 誘発膵線維化モデルは、イヌやネコの自然発生性膵線維化の病態と類似し、さらに、ヒトの慢性膵炎の病態の推移と同様であった。よって、ラット DBTC 誘発膵線維化モデルは膵線維化の病態解析に有用であると考えられた。

2. マクロファージの特性

線維化病変に出現するマクロファージは多様な特性を現すが、その機能特性の全貌は未だ十分には解明されていない。第 1 章でイヌ及びネコの膵線維化病変を解析したところ、線維化のグレードが増加するに伴い、Iba-1 陽性のマクロファージが増加した。さらに、ラット DBTC 誘発膵線維化病変を用いて、マクロファージ機能の特性を詳細に解析した。その結果、膵線維化のグレードが高度になるに伴って、まず CD68 発現 M1 型マクロファージが早期に出現し、続いて CD163 発現 M2 型マクロファージが増加し始めることが分かった。また、二重蛍光免疫染色により、CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型の両方を発現するマクロファージが存在しており、これは M1 型から M2 型へとシフトする所見と考えられた。また、MHC クラス II、CD204、Iba-1 発現マクロファージが観察され、これらマクロファージも膵線維化のグレードと共に増加することが示された。なお、二重免疫蛍光染色により、MHC クラス II は CD68 発現 M1 型マ

クロファージに、CD204 は CD163 発現 M2 型マクロファージに分極化する傾向が分かった。さらに、M1 型マクロファージ関連因子である IL-6、IL-1 β 及び MCP-1 と、M2 型マクロファージ関連因子である IL-4 と IL-10 が、腓線維化のグレードが高度になるに伴って増加する傾向が見られた。以上より、腓線維化の病態は、M1 型と M2 型マクロファージが関与することで形成されることが示された。

3. 筋線維芽細胞の特性

筋線維芽細胞は、細胞外基質を過剰に産生することで線維化の進展に係る重要な細胞とされる。この細胞は、免疫組織化学的に、vimentin、desmin や α -SMA などの細胞骨格を、その形成程度において様々な割合で発現する。第 1 章では、イヌ及びネコの腓線維化病変を解析し、vimentin と α -SMA 発現筋線維細胞が線維化の程度に伴い増加することが示された。さらに、第 3 章第 3 節ではラット DBTC 誘発腓線維化の病変部位に出現する筋線維芽細胞の細胞特性を解析した。その結果、同様に vimentin、desmin 及び α -SMA を発現する筋線維芽細胞は、線維化のグレードが高度になるに伴って増加することが分かった。Desmin については固定条件のために解析が出来なかったが、イヌ及びネコの自然発生性腓線維化での vimentin と α -SMA 発現の筋線維芽細胞の動態と類似した。 α -SMA 発現筋線維芽細胞は最も活性化している細胞と考えられている。二重蛍光免疫染色により、 α -SMA と vimentin あるいは desmin 発現筋線維芽細胞がラット DBTC 誘発腓線維化病変で認められた。

腓線維化はリモデリングの状態であり、一方腓発生過程はモデリングの状態と考えられる。第 2 章での、ラット腓発生過程での間質細胞を解析したところ、vimentin 及び desmin 陽性間質細胞は胎仔期から生後間もない新生仔までの期間、最も高頻度で出

現することが分かった。この胎仔から新生仔の時期は、腓組織の構造がいまだ未熟な状態であること、また成体の腓組織ではこれら陽性細胞が減少していることを含めて勘案すると、腓発生過程での vimentin 及び desmin 陽性の間質細胞は、筋線維芽細胞の細胞骨格の特徴に類似しており、モデリングに係る腓組織の支持機能において重要であるのかもしれない。

腓星細胞は肝星細胞と同様に GFAP を発現することが知られている。腓発生過程において GFAP 発現腓星細胞は恒常的にみられた。イヌ及びネコの自然発生性腓線維化病変とラット DBTC 誘発腓線維化病変において、GFAP 発現細胞が線維化のグレードに伴って増加し、誘発病変では、GFAP と α -SMA を共発現する筋線維芽細胞が存在した。これらの所見を総じて勘案すると、腓線維化部位に出現する筋線維芽細胞は GFAP 発現腓星細胞から形成される可能性が考えられた。

Thy-1 は未分化な間葉系幹細胞に発現する細胞膜分子である。第 3 章第 3 節では、ラット DBTC 誘発腓線維化において、腓線維化が高度になるに伴い Thy-1 発現の間葉系細胞が増加していた。また、同様に vimentin、desmin 及び α -SMA 発現の筋線維芽細胞も腓線維化に伴い増加していたことから、Thy-1 発現の間葉系幹細胞が、腓線維化に出現する筋線維芽細胞の一つの起源と考えられた。また、第 2 章では、Thy-1 発現間質細胞は腓発生過程において新生仔の初期に主にみられ、間質細胞のモデリングに係ることが示唆されている。これらの所見を総じて勘案すると、間質細胞や筋線維芽細胞の起源として Thy-1 発現の体性幹細胞が関与することが考えられた。

以上、この一連の研究を通じ、腓線維化に係るマクロファージの機能特性と、筋線維芽細胞の細胞特性と起源について、その病理発生機序の一端を明らかにすることができた。得られた成果は、腓線維化の創薬開発に有用な基礎データを提示するも

のと考える。

総 括

本研究では、イヌ及びネコの自然発生性腓線維化病変と、ラット DBTC 誘発腓線維化病変におけるマクロファージと筋線維化芽細胞の特性を免疫組織化学的に解析し、以下の成果を得た (Fig. 1)。

1. イヌ及びネコの自然発生性腓線維化病変において、浸潤マクロファージの増加と、それに伴い、vimentin、GFAP 及び α -SMA 陽性の筋線維芽細胞が増加することが分かった。
2. ラットの腓発生過程の胎仔期から生後初期にかけて vimentin と desmin を発現する筋線維芽細胞の特性を備えた間葉系細胞が増加し、かつ発生期間を通じ GFAP 発現腓星細胞が存在することが分かった。
3. ラット DBTC 誘発腓線維化において、線維化の進行に伴い CD68 発現 M1 型マクロファージがまず出現し、その後 CD163 発現 M2 型マクロファージが増加することが分かった。
4. ラット DBTC 誘発腓線維化において、Iba-1、MHC クラス II と CD204 陽性マクロファージも同様に線維化に伴い増加し、特に MHC クラス II 発現細胞は M1 型マクロファージに、CD204 発現細胞は M2 型マクロファージに分極化することが分かった。
5. ラット DBTC 誘発腓線維化では、イヌ及びネコの自然発生性腓線維化と同様に、vimentin、desmin、GFAP 及び α -SMA を発現する筋線維芽細胞が増加することが分かり、これら細胞が線維化に関与すること、そして GFAP 陽性腓星細胞がその形成に係わることが分かった。
6. ラット DBTC 誘発腓線維化では、Thy-1 陽性の未分化間葉系幹細胞が線維化の進展に係る可能性が示された。

7. ラット DBTC 誘発腭線維化モデルの病態は、イヌ及びネコの自然発生性腭線維化と類似すること、また線維化に伴いオートファジー機能障害が生じていることが分かった。このラットモデルは腭線維化の病態解析に有用であると考えられた。

以上、この研究で得られた成果は、腭線維化の病態解析及び有効な医薬品開発に有用な基礎情報を提示すると考える。

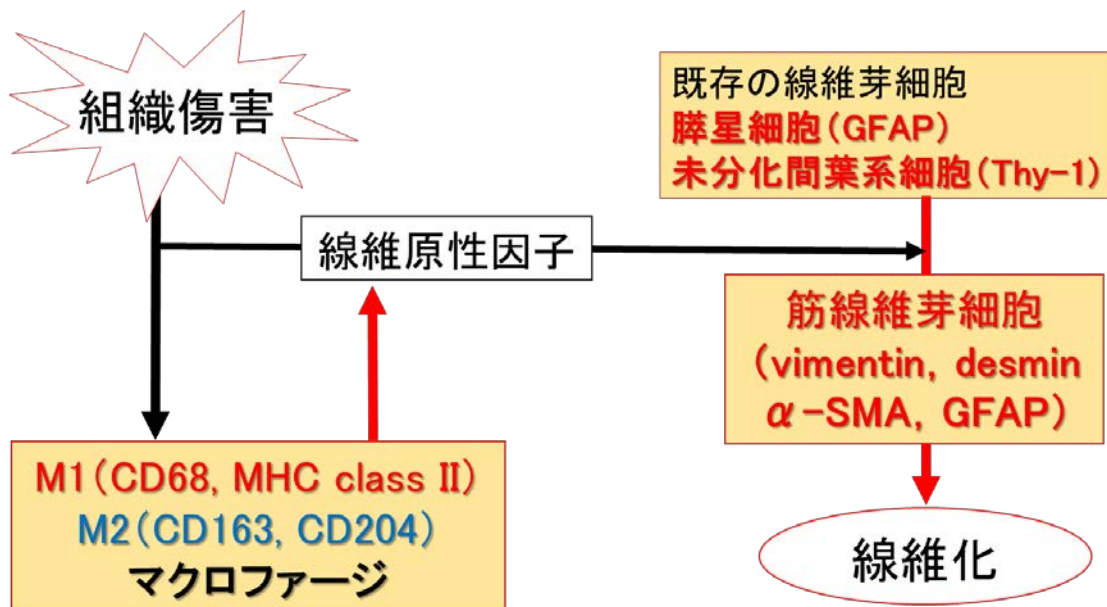


Fig. 1 腭線維化の病理発生機序

腭線維化においても、肝線維化や腎線維化と同様に、マクロファージ及び筋線維芽細胞が線維化の進展に重要な役割を果たすことが分かった。マクロファージについては、CD68 発現 M1 型マクロファージは MHC クラス II に、CD163 発現 M2 型マクロファージは CD204 に分極していた。筋線維芽細胞は線維化グレードが高度になるに伴って、vimentin、desmin、 α -SMA 陽性細胞が増加した。また、腭星細胞由来と考えられる、GFAP 陽性筋線維芽細胞の増加が見られた。さらに、腭線維化においては、線維化グレードが高度になるに伴って、Thy-1 陽性未分化間葉系細胞の軽度な増加が見られ、Thy-1 陽性細胞が腭線維化の進展に係る可能性が示唆された。

文 献

- 泉井亮, 妹尾春樹, 金田研司, 2012 年, 肝・胆・膵, 坂井健雄, 川原克雅(編), 人体の正常構造と機能 改訂第 2 版, 日本医事新報社, pp 260-325.
- 厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班, 日本膵臓学会, 日本消化器病学会. 2009. 慢性膵炎臨床診断基準 2009. 膵臓. 24: 645-646.
- 下瀬川透. 2014 年. 難治性膵疾患に関する調査研究. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 平成 25 年度総括・分担研究報告書. 7-55 頁.
- 原田 英雄, 越智 浩二, Choudhury, R., 松村 直樹, 水島 孝明, 妹尾 敏伸, 一村光子, 田中 淳太郎. 1997 年. 膵線維化研究の最近の動向. 本間 達二, 原田 英雄(編). 膵の線維化はなぜおこるか. 医学図書出版株式会社. 11-16 頁.
- 安田 峯生. 2010 年. 消化器系. 安田 峯生(編). ラングマン人体発生学 原書11版. 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル. 221-245 頁.
- 矢田 俊彦. 2007 年. ギャング生理学 原書 22 版. 岡田 泰伸(編). 膵臓の内分泌機能と炭水化物代謝の調節. 丸善株式会社. 235-377 頁.
- Anger, J.P., Curtes, J.P. 1994. Tin, In: Seiler, H.G., Sigel, H.(eds.) Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Marcel Dekker. pp 613-625.
- Apte, M.V., Haber, P.S., Applegate, T.L., Norton, I.D., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., Wilson, J.S. 1998. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut. 43: 128-133.
- Bachem, M.G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R.M., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Grünert, A., Adler, G. 1998. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology. 115: 421-432.

- Bae, S.H., Choi, J.Y., Yoon, S.K., Oh, I.H., Yoon, K.H., Park, S.T., Kim, G.D., Oh, S.H., Petersen, B.E. 2008. Thy1-positive bone marrow stem cells express liver-specific genes in vitro and can mature into hepatocytes in vivo. *Hepatol. Int.* 2: 63–71.
- Bazelle, J., Watson, P. 2014. Pancreatitis in cats: is it acute, is it chronic, is it significant? *J. Feline. Med. Surg.* 16: 395-406.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342: 1350-1358.
- Bockman, D.E. 1997. Morphology of the exocrine pancreas related to pancreatitis. *Microsc. Res. Tech.* 37: 509-519.
- Bostrom, B.M., Xenoulis, P.G., Newman, S.J., Pool, R.R., Fosgate, G.T., Steiner, J.M. 2013. Chronic pancreatitis in dogs: a retrospective study of clinical, clinicopathological, and histopathological findings in 61 cases. *Vet. J.* 195:73-79.
- Bouwens, L., Braet, F., Heimberg, H. 1995. Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 245-253.
- Bryder, D., Rossi, D.J., Weissman, I.L. 2006. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* 169: 338–346.
- Calderon, B., Carrero, J.A., Ferris, S.T., Sojka, D.K., Moore, L., Epelman, S., Murphy, K.M., Yokoyama, W.M., Randolph, G.J., Unanue, E.R. 2015. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J. Exp. Med.* 212: 1497-1512.
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Deneef, C., Roskams, T. 2002. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.* 36: 200–209.
- Cattly, R.C., Popp, J.A., Vonderfecht, S.L. 2013. Liver, gallbladder, and exocrine pancreas. In: Sahota, P.S., Popp, J.A., Hardisty, J.F., Gopinath, C. (eds.) *Toxicologic*

- pathology. CRC press. pp 313-366.
- Colwell, A.S., Longaker, M.T., Lorenz, H.P. 2003. Fetal wound healing. *Front. Biosci.* 8: s1240-1248.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180: 5771-5777.
- Damoiseaux, J.G., Dopp, E.A., Calame, W., Chao, D., MacPherson, G.G., Dijkstra, C.D. 1994. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology.* 83: 140–147.
- Dan, Y.Y., Riehle, K.J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J, Campbell, J.S., Fausto, N. 2006. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 9912–9917.
- Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest.* 63: 21-29.
- Desmoulière, A., Darby, I.A., Gabbiani, G. 2003. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab. Invest.* 83:1689-1707.
- Detlefsen, S., Sipos, B., Feyerabend, B., Klöppel, G. 2006. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. *Mod. Pathol.* 19:1019-1026.
- Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Joling, P., Kraal, G. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rats recognized by monoclonal antibody ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 54: 589–599.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.j., Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 8: 315-317.
- Eskelinen, E.L., Saftig, P. 2009. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 1793: 664-673.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A. 2013. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 39: 1003-1018.
- Gibo, J., Ito, T., Kawabe, K., Hisano, T., Inoue, M., Fujimori, N., Oono, T., Arita, Y., Nawata, H. 2005. Camostat mesilate attenuates pancreatic fibrosis via inhibition of monocytes and pancreatic stellate cells activity. *Lab. Invest.* 85: 75–89.
- Golbar, H. M., Izawa, T., Murai, F., Kuwamura, M., Yamate, J. 2010. Immunohistochemical analyses of the kinetics and distribution of macrophages, hepatic stellate cells and bile duct epithelia in the developing rat liver. *Exp. Toxic. Pathol.* 64: 1-8.
- Golbar, H. M., Izawa, T., Yano, R., Ichikawa, C., Sawamoto, O., Kuwamura, M., Lamarre, J. Yamate, J. 2011. Immunohistochemical characterization of macrophages and myofibroblasts in α -naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced bile duct injury and subsequent fibrogenesis in rats. *Toxicol. Pathol.* 39: 795-808.
- Golbar, H.M., Izawa, T., Murai, F., Kuwamura, M. Yamate, J. 2012. Immunohistochemical analyses of the kinetics and distribution of macrophages, hepatic stellate cells and bile duct epithelia in the developing rat liver. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64: 1-8.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23-25.
- Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Köthe, K., Muller-Molinet, I., Kannookadan, S., Utikal, J., Goerdts, S. 2006. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*. 211: 473-486.
- Greaves, D. R., Gough, P. J., Gordon, S. 1998. Recent progress in defining the role of

- scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defense. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 425-432.
- Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Algül, H., Habtezion, A. 2017. Autophagy, inflammation, and Immune dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis. *Gastroenterology.* 153: 1212-1226.
- Hagood, J.S., Prabhakaran, P., Kumbla, P., Salazar, L., MacEwen, M.W., Barker, T.H., Ortiz, L.A., Schoeb, T., Siegal, G.P., Alexander, C.B., Pardo, A., Selman, M. 2005. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 167: 365-379.
- Herrera, M.B., Bruno, S., Buttiglieri, S., Tetta, C., Gatti, S., Deregibus, M.C., Bussolati, B., Camussi, G. 2006. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells.* 24: 2840–2850.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* 170, 1807-1816.
- Honda, H., Kimura, H., Rostami, A. 1990. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology.* 70: 272-277.
- Hruban, R.H. 2009. The Pancreas. In: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. (eds.) *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease eighth edition.* Saunders Elsevier. pp891-904.
- Huynh, K.K., Eskelinen, E.L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., Grinstein, S. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 26: 313-324.
- Ide, M., Kuwamura, M., Kotani, T., Sawamoto, O., Yamate, J. 2005. Effects of gadolinium chloride (GdCl₃) on the appearance of macrophage populations and

- fibrogenesis in the thioacetamide induced rat hepatic lesions. *J. Comp. Pathol.* 133: 92–102.
- Ide, M., Yamate, J., Kuwamura, M., Kotani, T., Sakuma, S., Takeya, M. 2001. Immunohistochemical analysis of macrophages and myofibroblasts appearing in hepatic and renal fibrosis of dogs. *J. Comp. Pathol.* 124: 60–69.
- Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S.E., Cotsarelis, G. 2007. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature.* 447: 316-320.
- Jubb, K.V.F. and Stent A.W. 2015. Pancreas. In: Maxie, M.G. (ed.) Jubb, Kenndy, and Palmer's Pathology of domestic animals, sixth edition. Elsevier. pp 353-375.
- Juniantito, V., Izawa, T., Yuasa, T., Ichikawa, C., Yamamoto, E., Kuwamura, M., Yamate, J. 2012. Immunophenotypical analyses of myofibroblasts in rat excisional wound healing: possible transdifferentiation of blood vessel pericytes and perifollicular dermal sheath cells into myofibroblasts. *Histol. Histopathol.* 27: 515-527.
- Kalluri, R., Neilson, E.G. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112: 1776-1784.
- Kisseleva, T., Brenner, D.A. 2008. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5: 338-342.
- Klöppel, G. Maillet, B. 1993. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas.* 8: 659-670.
- Koumas, L., Smith, T.J., Feldon, S., Blumberg, N., Phipps, R.P. 2003. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am. J. Pathol.* 163: 1291-1300.
- Kuramochi, M., Izawa, T., Pervin, M., Bondoc, A., Kuwamura, M., Yamate, J. 2016. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 68:471-

477.

- LeBleu, V.S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V.G., Woda, C., Sugimoto, H., Kalluri, R. 2013. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat. Med.* 19: 1047-1053.
- Lerch, M.M., Gorelick, F.S. 2013. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology.* 144: 1180-1193.
- Levine, B., Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132: 27-42.
- Lew, D., Afghani, E., Pandol, S. 2017. Chronic pancreatitis: current status and challenges for prevention and treatment. *Dig. Dis. Sci.* 62:1702-1712.
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Andersen, J.R., Dimagno, E.P., Andrén-Sandberg, A. Domellöf, L. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 328: 1433-1437.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Tends. Immunol.* 23: 549-555.
- Mareninova, O.A., Hermann, K., French, S.W., O'Konski, M.S., Pandol, S.J., Webster, P., Erickson, A.H., Katunuma, N., Gorelick, F.S., Gukovsky, I., Gukovskaya, A.S. 2009. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* 119: 3340-3355
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13: 453-461.
- Martinez, F.O. 2011. Regulators of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.* 41: 1531-1534.
- Meghari, S., Berruyer, C., Lepidi, H., Galland, F., Naquet. P., Mege, J.L. 2007. Vanin-1

- controls granuloma formation and macrophage polarization in *Coxiella burnetii* infection. *Eur. J. Immunol.* 37: 24-32.
- Merkord, J., Hennighausen, G. 1989. Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride. *Exp. Pathol.* 36: 59-62.
- Merkord, J., Jonas, L., Hennighausen, G. 1991. Morphological lesions of pancreas and bile ducts in rats induced by dibutyltin dichloride. *Arch.Toxicol. Supple.* 14: 75-79.
- Merkord, J., Jonas, L., Weber, H., Kroning, G., Nizze, H., Hennighausen, G. 1997. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions. *Pancreas.* 15:392-401.
- Merkord, J., Weber, H., Sparmann, G., Jonas, L., Hennighausen, G. 1999. The course of pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 880: 231-237.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* 15: 1101-1111.
- Mo, W., Brecklin, C., Garber, S. L., Song, R. H., Pegoraro, A. A., Au, J., Arruda, J. A., Dunea, G., Singh, A. K. 1999. Changes in collagenases and TGF-beta precede structural alterations in a model of chronic renal fibrosis. *Kidney Int.* 56, 145-153.
- Neal, M.D., Sodhi, C.P., Dyer, M., Craig, B.T., Good, M., Jia, H., Yazji, I., Afrazi, A., Richardson, W.M., Beer-Stolz, D., Ma, C., Prindle, T., Grant, Z., Branca, M.F., Ozolek, J., Hackam, D.J. 2013. A critical role for TLR4 induction of autophagy in the regulation of enterocyte migration and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J. Immunol.* 190: 3541-3551.
- Neuschewander-Tetri, B. A., Bridle, K.R., Wells, L.D., Marcu, M., Rammet, G. A. 2000. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha 1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. *Lab. Invest.* 80: 143-150.

- Njoku, D.B., Li, Z., Washington, N.D., Mellerson, J.L., Talor, M.V., Sharma, R., Rose, N.R. 2009. Suppressive and pro-inflammatory roles for IL-4 in the pathogenesis of experimental drug-induced liver injury. *Eur. J. Immunol.* 39: 1652-1663.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y., Kohsaka, S. Involvement of Iba 1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell. Sci.* 2000. 113: 3073-3084.
- Omary, M.B., Lugea, A., Lowe, A.W., Pandol, S.J. 2007. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* 117: 50-59.
- Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., Mortara, L. 2018. Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases: killers or builders? *J. Immunol. Res.* Article ID 8917804, 25 pages.
- Patel, N.R., Bole, M., Chen, C., Hardin, C.C., Kho, A.T., Mih, J., Deng, L., Butler, J., Tschumperlin, D., Fredberg, J.J., Krishnan, R., Koziel, H. 2012. Cell elasticity determines macrophage function. *PLoS One.* 7: e41024.
- Pattingre, S., Levine, B. 2006. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res.* 66: 2885-2888.
- Pello, O.M., Silvestre, C., De Pizzol, M., Andrés, V. 2011. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 216: 1172-1176.
- Polfliet, M.M., Fabriek, B.O., Daniëls, W.P., Dijkstra, C.D., Van den Berg, T.K. 2006. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 211: 419-425.
- Rajkumar, V.S., Howell, K., Csiszar, K., Denton, C.P., Black, C.M., Abraham, D.J. 2005. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* 7: R1113-1123.
- Rege, T.A., Hagood, J.S. 2006. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular

- adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763: 991-999.
- Rocca, G., Gaia, E., Iuliano, R., Caselle, M.T., Rocca, N., Calcamuggi, G., Emanuelli, G. 1987. Increased incidence of cancer in chronic pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 9: 175-179.
- Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Shimizu, K., Kokubo, S., Hara, A., Yamahana, J., Okumura, T., Matsushima, K., Yokoyama, H., Kaneko, S. 2006. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD-14 positive monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79: 555-563.
- Sappino, A.P., Schürch, W., Gabbiani, G. 1990. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.* 63: 144-161.
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., Imai, Y. 2001. Iba-1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 292-297.
- Schmitt-Gräff, A., Desmoulière, A., Gabbiani, G. 1994. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows. Arch.* 425: 3-24.
- Schuppan, D., Cho, J. J., Jia, J. D., Hahn, E. G. 1999. Interplay of matrix and myofibroblasts during hepatic fibrogenesis. *Curr. Top. Pathol.* 93, 205–218.
- Shen, B., Liu, X., Fan, Y., Qiu, J. 2014. Macrophages regulate renal fibrosis through modulating TGF β superfamily signaling. *Inflammation.* 37: 2076-2084.
- Sica, A., Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122: 787-795.
- Sica, A., Invernizzi, P., Mantovani, A. 2013. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology.* 59: 2035-2043.

- Sparmann, G., Merkord, J., Jäschke, A., Nizze, H., Jonas, L., Löhr, M., Liebe, S., Emmrich, J. 1997. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology*. 112: 1664-1672.
- Spooner, B.S., Walther, B.T., Rutter, W.J. 1970. The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *J. Cell. Biol.* 47: 235-246.
- Sporrer, D., Weber, M., Wanninger, J., Weigert, J., Neumeier, M., Stögbauer, F., Lieberer, E., Bala, M., Kopp, A., Schäffler, A., Buechler, C. 2009. Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* 39: 671-679.
- Stanger, B.Z., Hebrok, M. 2013. Control of cell identity in pancreas development and regeneration. *Gastroenterology*. 144: 1170-1179.
- Strobel, O., Dor, Y., Alsina, J., Stirman, A., Lauwers, G., Trainor, A., Castillo, C.F., Warshaw, A.L., Thayer, S.P. 2007. In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology*. 133:1999-2009.
- Sturgess, J.M. 1984. Structural and developmental abnormalities of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3 Suppl 1: S55-66.
- Tanaka, M., Miyajima, A. 2016. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm. Regen.* 36: 19.
- Tennakoon, A.H., Izawa, T., Wijesundera, K.K., Golbar, H.M., Tanaka, M., Ichikawa, C., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65: 1159-1171.
- Tennakoon, A.H., Izawa, T., Wijesundera, K.K., Murakami, H., Katou-Ichikawa, C., Tanaka, M., Golbar, H.M., Kuwamura, M., Yamate, J. 2015. Immunohistochemical characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing cells in a rat liver

- cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Exp. Toxicol. Pathol.* 67: 53-63.
- Vannella, K.M., Wynn, T.A. 2017. Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. *Annu. Rev. Physiol.* 79: 593-617.
- Vonlaufen, A., Phillips, P.A., Xu, Z., Zhang, X., Yang, L., Pirola, R.C., Wilson, J.S., Apte, M.V. 2011. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats. *Gut.* 60: 238-246.
- Watson, P. 2015. Pancreatitis in dogs and cats: definitions and pathophysiology. *J. Small. Anim. Pract.* 56: 3-12.
- Wheeler, J.E., Lukens, F.D., Gyorgy, P. 1949. Studies on the localization of tagged methionine within the pancreas. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70: 187-189.
- Wijesundera, K.K., Izawa, T., Tennakoon, A.H., Murakami, H., Golbar, H.M., Katou-Ichikawa, C., Tanaka, M., Kuwamura, M., Yamate, J. 2014. M1 and M2 macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba-1 and galectin-3. *Exp. Mol. Pathol.* 96: 382-392.
- Wijesundera, K.K., Izawa, T., Murakami, H., Tennakoon, A.H., Golbar, H.M., Kato-Ichikawa, C., Tanaka, M., Kuwamura, M., Yamate, J. 2014. M1 and M2 macrophage polarization in thioacetamide (TAA)-induced rat liver lesions; a possible analysis for hepato-pathology. *Histol. Histopathol.* 29: 497-511.
- Wynn, T. A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214: 199-210.
- Yamashiro, S., Takeya, M., Nishi, T., Kuratsu, J., Yoshimura, T., Ushio. Y., Takahashi, K. 1994. Tumor derived monocyte chemoattractant protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. *Am. J. Pathol.* 145: 856-867.

- Yamate, J., Ishida, A., Tsujino, K., Tatsumi, M., Nakatsuji, S., Kuwamura, M., Kotani, T., Sakuma, S. 1996. Immunohistochemical study of rat renal interstitial fibrosis induced by repeated injection of cisplatin, with special reference to the kinetics of macrophages and myofibroblasts. *Toxicol. Pathol.* 24: 199-206.
- Yamate, J., Okado, A., Kuwamura, M., Tsukamoto, Y., Ohashi, F., Kiso, Y., Nakatsuji, S., Kotani, T., Sakuma, S., Lamarre, J. 1998. Immunohistochemical analysis of macrophages, myofibroblasts, and transforming growth factor-beta localization during rat renal interstitial fibrosis following long-term unilateral ureteral obstruction. *Toxicol. Pathol.* 26: 793-801.
- Yamate, J., Kuribayashi, M., Kuwamura, M., Kotani, T., Ogihara, K. 2005. Differential immunoexpressions of cytoskeletons in renal epithelial and interstitial cells in rat and canine fibrotic kidneys, and in kidney-related cell lines under fibrogenic stimuli. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57: 135-147.
- Yu, E., Goto, M., Ueta, H., Kitazawa, Y., Sawanobori, Y., Kariya, T., Sasaki, M., Matsuno, K. 2016. Expression of area-specific M2-macrophage phenotype by recruited rat monocytes in duct-ligation pancreatitis. *Histochem. Cell. Biol.* 145: 659-673.
- Yuasa, T., Izawa, T., Kuwamura, M., Yamate, J. 2010. Thy-1 expressing mesenchymal cells in rat nephrogenesis in correlation with cells immunoreactive for α -smooth muscle actin and vimentin. *J. Toxicol. Pathol.* 23: 1-10.
- Yuasa, T., Juniantito, V., Ichikawa, C., Yano, R., Izawa, T., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Thy-1 expression, a possible marker of early myofibroblast development, in renal tubulointerstitial fibrosis induced in rats by cisplatin. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65: 651-659.
- Zamara, E., Galastri, S., Aleffi, S., Petrai, I., Aragno, M., Mastrocola, R., Novo, E., Bertolani, C., Milani, S., Vizzutti, F., Vercelli, A., Pinzani, M., Laffi, G., LaVilla, G., Parola, M., Marra, F. 2007. Prevention of severe toxic liver injury and oxidative stress

in MCP-1-deficient mice. *J. Hepatol.* 46: 230-238.

Zeisberg, M., Bonner, G., Maeshima, Y., Colorado, P., Muller G.A., Strutz, F., Kalluri, R. 2001. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am. J. Pathol.* 159: 1313-1321.

Zhou, Y., Hagood, J.S., Murphy-Ullrich, J.E. 2004. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am. J. Pathol.* 165: 659-669.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、直接指導していただき、御鞭撻を賜りました本学獣医病理学教室の山手丈至教授に心から御礼申し上げます。卒業研究の遂行ならびに論文作成にあたり、有益な御助言と御援助を賜りました。

卒業研究の遂行ならびに論文作成にあたり、有益な御助言と御援助を賜りました本学実験動物学教室の岡田利也教授、本学細胞病態学教室の杉浦喜久弥教授に心から御礼申し上げます。

また、本学獣医病理学教室の井澤武史准教授には免疫組織化学染色についてご指導とご援助を賜りました。また、諸事にわたり、温かい御指導と御助言を賜りました本学獣医病理学教室の桑村充准教授に感謝の意を表します。

さらに実際の実験作業を手伝ってくださった獣医病理学教室の皆様に感謝いたします。