

# 論 文 要 旨

## The 3G5 Antigen is Expressed in Dermal Mast Cells but not Pericytes.

真皮における 3G5 抗原発現細胞は周皮細胞ではなく肥満細胞である

具志 亮

### 【序論および目的】

周皮細胞は毛細血管レベルで血管の周囲に位置し、長い突起を持ち、内皮細胞を覆うように基底膜内に存在する。その機能はまだ不明な点が多いが、血管の収縮、血流の調節また血管の構築の安定化・維持に関与すると考えられている。種々の周皮細胞マーカーが知られているが、その分化段階のすべてを網羅するマーカーは知られていない。

抗 3G5 単クローン抗体に認識される 3G5 抗原はガングリオシド GM2-1 で、3G5 抗原は真皮における周皮細胞同定のための有用なマーカーとして、これまで多くの報告がなされてきた。しかしながら真皮の 3G5 抗原発現細胞は周皮細胞の特徴的なマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) やその他の周皮細胞マーカーを発現していない。そこで著者らは真皮の 3G5 抗原発現細胞について、ある特定の成熟段階の周皮細胞であるのかあるいは血管周囲に存在する周皮細胞以外の細胞であるのかという疑問をもった。

本研究では種々の周皮細胞マーカーや免疫電顕を用いて、血管新生の盛んな褥瘡皮膚と乾癬皮膚の 3G5 抗原発現細胞を検索し、真皮における 3G5 抗原発現細胞がある特定の成熟段階の周皮細胞であるのかあるいは他の細胞なのかを明らかにすることを試みた。

### 【材料および方法】

正常皮膚 8 例、血管新生の盛んな褥瘡患者の肉芽組織 4 例と炎症性疾患の乾癬患者の皮膚 4 例を組織標本として用いた。

- ① それぞれの組織における 3G5 抗原発現細胞を免疫組織化学的染色や蛍光二重染色にて観察した。さらに、3G5 抗原発現細胞と血管との位置関係を明らかにするため、抗 3G5 抗体と抗 type IV collagen 抗体を用いた蛍光二重染色にて 3G5 抗原発現細胞を観察した。
- ② 3G5 抗原発現細胞における周皮細胞のマーカー ( $\alpha$ -SMA, desmin, HMW-MAA) の発現を明らかにするため、連続切片を用いて免疫組織化学的染色を行った。
- ③ 褥瘡皮膚の 3G5 抗原発現細胞を免疫電顕にて観察した。

- ④ それぞれの組織における 3G5 抗原発現細胞の tryptase や chymase 発現を蛍光二重染色にて観察した。

#### 【結 果】

- ① 血管新生の盛んな肉芽組織や乾癬皮膚では正常皮膚に比べて 3G5 抗原発現細胞が増加していた。更に、3G5 抗原発現細胞は血管周囲のみならず間質にも存在していた。
- ② 褥瘡皮膚組織の連続切片における検討では、間質に存在する 3G5 抗原発現細胞は血管新生の最も早期に発現する周皮細胞のマーカーである desmin や HMW-MAA を発現していなかった。
- ③ 免疫電顕における観察では 3G5 抗原発現細胞は血管基底膜外に存在し、3G5 抗原は肥満細胞の細胞質顆粒に存在していた。また、周皮細胞は 3G5 抗原を発現していなかった。
- ④ 正常皮膚において、ほとんどの 3G5 抗原発現細胞は tryptase と chymase を発現していた。褥瘡皮膚や乾癬皮膚でも多くの 3G5 抗原発現細胞は tryptase と chymase を発現していた。

#### 【結論及び考察】

これまで報告された抗 3G5 抗体による周皮細胞の同定は 3G5 抗原発現細胞が血管周囲に存在するという光顕レベルでの検討の結果であったが、本研究における免疫電顕や蛍光二重染色の結果から、3G5 発現細胞は正常皮膚、褥瘡の肉芽組織、乾癬皮膚においては肥満細胞であることが示された。

3G5 抗原は肥満細胞の新たなマーカーとして有用であり、今後抗 3G5 抗体にて認識されるガングリオシド GM2-1 の肥満細胞顆粒における役割の解明が期待される。

(Journal of Cutaneous Pathology 掲載予定)

# 論文審査の要旨

|      |            |       |       |
|------|------------|-------|-------|
| 報告番号 | 医論第 1451 号 | 氏名    | 具志 亮  |
| 審査委員 | 主 査        | 米澤 傑  |       |
|      | 副 査        | 坂本 泰二 | 黒野 祐一 |

## The 3G5 Antigen is Expressed in Dermal Mast Cells but not Pericytes.

3G5 抗原は真皮において周皮細胞ではなく、肥満細胞に発現している

正常組織や病的組織において周皮細胞の分化段階をすべて網羅するマーカーはなく、これまで報告された周皮細胞マーカーは周皮細胞の成熟過程で異なる発現パターンを示すことが知られている。3G5 抗原は皮膚真皮浅層において、周皮細胞の有用なマーカーであることが報告されているが、これらの細胞は周皮細胞の特徴的なマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) やその他の周皮細胞マーカーを発現していない。そこで本研究では、皮膚の 3G5 抗原発現細胞はある特定の成熟段階の周皮細胞であるのかあるいは血管周囲に存在する周皮細胞以外の細胞であるのかについて検討がなされた。

組織標本として、正常皮膚 8 例と血管新生が盛んな褥瘡患者肉芽組織 4 例、炎症疾患である乾癬患者皮膚 4 例を用いた。それぞれの組織における 3G5 抗原発現細胞を免疫染色、二重免疫蛍光染色、免疫電顕にて観察した。正常皮膚において 3G5 抗原発現細胞は真皮浅層の血管周囲にのみ存在した。一方、血管新生の盛んな肉芽組織や乾癬皮膚では、3G5 抗原発現細胞は、真皮浅層から深層にかけて血管周囲のみならず間質にも存在し、その数は正常皮膚に比べて増加していた。肉芽組織の連続切片での検討では、間質の 3G5 抗原発現細胞は  $\alpha$ -SMA 発現細胞や血管新生の初期の周皮細胞のマーカーである desmin、High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen (HMW-MAA) 発現細胞とは異なる分布を示した。免疫電顕では、3G5 抗原発現細胞は血管基底膜外の血管周囲や間質に存在し、紡錘形の細胞で細胞膜に絨毛を有し、細胞質内に多数の電子密度の均一な顆粒を持ち、3G5 抗原は顆粒内に発現していた。これらの所見から、3G5 抗原発現細胞は肥満細胞であることが示唆された。また、周皮細胞に 3G5 抗原の発現は見られなかった。更に正常皮膚、肉芽組織や乾癬皮膚では 3G5 抗原発現細胞の多くは tryptase、chymase を発現していた。以上の結果から 3G5 抗原発現細胞は正常皮膚、病的皮膚において肥満細胞であることが示された。

本研究は、これまで周皮細胞のマーカーとして有用とされていた 3G5 抗原が、実は肥満細胞に発現していたことを示した点で非常に興味深い研究であり、今後の周皮細胞、肥満細胞の研究に寄与すると考える。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

|   |                   |       |       |
|---|-------------------|-------|-------|
| 報告番号  | 医論第 <b>1451</b> 号 | 氏名    | 具志 亮  |
| 審査委員  | 主 査               | 米澤 傑  |       |
|   | 副 査               | 坂本 泰二 | 黒野 祐一 |
| <p>主査および副査の3名は、平成19年11月26日、学位請求者 具志 亮 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) これまで3G5抗原が周皮細胞のマーカーとして用いられていたのはどうしてか。<br/>                 (回答) 皮膚に関してこれまでの報告では、血管周囲にのみ発現を認めた正常皮膚のみの検討であったためと、光顕のみの所見で電顕的観察がなかったからだと思われる。</p> <p>質問2) これまでの報告と異なり病的皮膚だけではなく、正常皮膚でも3G5抗原陽性細胞は肥満細胞か。<br/>                 (回答) 正常皮膚でも3G5抗原陽性細胞は肥満細胞である。</p> <p>質問3) 電顕的に認めた血管周囲の肥満細胞と間質の肥満細胞の性状に相違点はなかったか。<br/>                 特に血管周囲の肥満細胞は粘膜型ではないか。<br/>                 (回答) 二重染色の所見で、今回の研究ではどちらも tryptase、chymase とともに陽性の結合組織型の肥満細胞である。</p> <p>質問4) 褥瘡皮膚を用いたのはなぜか<br/>                 (回答) 血管新生の盛んな組織においては周皮細胞が増加し、特に sprout 血管については <math>\alpha</math> SMA 陰性周皮細胞の報告がある。3G5 抗原は皮膚真皮浅層の <math>\alpha</math> SMA 陰性周皮細胞に発現を認め、これまでのマーカーと異なる可能性が報告され、sprout 血管についても不明である。そこで血管新生の盛んな褥瘡皮膚を用いて 3G5 抗原の発現を確認した。</p> <p>質問5) 炎症組織で浸潤している間質にある3G5抗原発現細胞について、特に tryptase や chymase の発現を認めない3G5抗原単独発現細胞は肥満細胞以外にどのような細胞の可能性があるか。<br/>                 (回答) Fibroblast、macrophage、leukocyte、fibrocyte を二重染色で調べたが、これらのマーカーは陰性で、どのような細胞かははっきりしなかった。</p> <p>質問6) 3G5 抗原は粘膜型肥満細胞のマーカーになるか。特にアトピー性皮膚炎ではどうか。<br/>                 (回答) アトピー性皮膚炎では検討を行っていない。褥瘡皮膚、乾癬皮膚では 3G5 抗原発現肥満細胞は tryptase、chymase とともに陽性の結合組織型の肥満細胞であった。今後、粘膜型肥満細胞のマーカーになるかは検討したい。</p> <p>質問7) 二重染色で3G5抗原発現細胞と tryptase、chymase の発現細胞の定量化をおこなっているか。</p> |                   |       |       |

(回答) 行っていない。正常皮膚では 100%近く、褥瘡皮膚、乾癬皮膚では 70%くらいが 3G5 抗原と tryptase、及び chymase が double positive 細胞であった。

質問 8) 論文では言及していないが、皮膚の 3G5 抗原発現細胞はある特定の成熟段階の周皮細胞ではなかったのか。

(回答) 周皮細胞ではなく肥満細胞であった。

質問 9) 炎症のステージによって、3G5 抗原発現に違いはみられたか。

(回答) 今回は炎症のステージによる検討は行っていない。

質問 10) In vitro の検討は。

(回答) 3G5 抗原陽性の周皮細胞を分離したとの報告があるため、magnet beads で褥瘡組織の 3G5 抗原陽性細胞の分離を行ったが出来なかった。おそらく細胞表面に発現していないためと考えている。報告したドイツのグループにその細胞の入手を直接依頼したが、送付されなかった。

質問 11) 電顕所見で細胞表面に 3G5 抗原を認めないのは。

(回答) ひとつは、電顕処理の過程の問題で膜 3G5 抗原の抗原性が失活した可能性、もうひとつはこれまでの光顕での細胞表面の発現は流出した顆粒を観察している可能性があると考えた。1984 年の最初の報告でも、今回と同様にすい臓の islet cell 内の分泌顆粒に 3G5 抗原の発現を認めている。

質問 12) 血管壁のマーカーは typeIV collagen 以外になにか使用したか。

(回答) Factor VIII を使用したが同様の結果であった。typeIV collagen がきれいに染色できたので血管壁のマーカーとして typeIV collagen を用いた。

質問 13) アレルギー反応で肥満細胞が脱顆粒した時、この 3G5 抗原はどうか。

(回答) アレルギーに関与するかどうか等、3G5 抗原の機能に関しては検討していない。

質問 14) Tryptase、chymase は電顕的に肥満細胞の顆粒内でどのような分布をするか。

(回答) 文献的に tryptase や chymase に対する抗体を用いた免疫電顕で、immunogold の沈着は 3G5 抗原と同様に顆粒内にびまん性に分布を認める。

質問 15) 文献的に他の報告で皮膚の血管新生組織を用いての検討は行われていないか。

(回答) 正常皮膚と新生児の包皮の皮膚での報告はあるが病的組織での検討はない。

質問 16) 免疫組織染色での血管周囲の 3G5 抗原発現細胞も肥満細胞か。

(回答) 免疫電顕と二重染色の所見から肥満細胞である。

質問 17) Neurofibroma のような肥満細胞が増加する皮膚疾患での組織学的検討は。

(回答) 今回検討していないが、おそらく発現を認めると思われる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。