



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Failure to down-regulate Bcl-2 protein in thymic germinal center B cells in myasthenia gravis                                                   |
| Author(s)    | 塩野, 裕之                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40959">https://hdl.handle.net/11094/40959</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                             |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 塩 野 裕 之                                                                                                                                     |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 4 6 2 号                                                                                                                               |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 9 年 12 月 4 日                                                                                                                            |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                            |
| 学 位 論 文 名     | Failure to down-regulate Bcl-2 protein in thymic germinal center B cells in myasthenia gravis<br>(重症筋無力症患者における胸腺内胚中心 B 細胞での Bcl-2 蛋白発現抑制障害) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 松田 暉<br>(副査)<br>教 授 岸本 忠三 教 授 辻本 賀英                                                                                             |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

重症筋無力症 (MG) 患者の胸腺内には、正常胸腺では認められない胚中心 (germinal center: 以下 GC) が形成される。我々は MG 患者の胸腺から分離したリンパ球を培養すると、抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体が産生されることを報告したが、これは自己反応性 B 細胞が negative selection から逸脱していることを示唆する。通常では、成熟 B 細胞は二次リンパ組織内 GC で増殖し選択をうける際に Bcl-2 蛋白の発現が抑制されている。大部分の不要な clone は apoptosis に陥り速かに除去される一方で、選択された細胞のみが Bcl-2 を表現し生存、成熟できる。そこで、MG 胸腺内 GC では Bcl-2 発現制御に異常があり、そのため B 細胞の apoptosis が障害をうけ自己反応性 B 細胞が negative selection から逸脱しているのではないかという仮説を立て、GC 内 B 細胞の Bcl-2 蛋白の発現を MG 胸腺と正常扁桃とで比較検討した。

### [方法ならびに成績]

①当科で拡大胸腺摘出術を施行した全身型 MG 患者 14 例の胸腺 (平均年齢 32.6 歳) と、対照として扁桃摘出術 8 例より得た扁桃 (平均年齢 20.4 歳) を用いた。GC 内の apoptosis を評価するため、パラフィン包埋切片を terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法により染色した。扁桃 GC では、選択されず apoptosis に陥った B 細胞を反映する多数の TUNEL 陽性細胞を認めるのに対し、MG 胸腺 GC では TUNEL 陽性細胞が少ない傾向にあった。

②パラフィン包埋切片に対し、抗ヒト Bcl-2 抗体を用いて免疫組織染色を行った。扁桃 GC 内には Bcl-2 陽性細胞がほとんど認められなかったのに比して、MG 胸腺 GC では Bcl-2 陽性細胞が散在していることが確認された。

③患者胸腺、扁桃からリンパ球を分離した。抗ヒト Bcl-2 抗体、抗 CD38 抗体および抗 CD19 抗体を用いた 3 color flow cytometry により、CD19 陽性 CD38 陽性細胞を GC 内 B 細胞として gating し Bcl-2 蛋白の発現を比較した。扁桃では GC 内 B 細胞の Bcl-2 陽性細胞の割合は  $20.6 \pm 8.0\%$  と低値であったのに対し、MG 胸腺では  $54.3 \pm 16.2\%$  と有意に高値を示し ( $p < 0.0001$ )、②と矛盾しない結果が得られた。

④ MG 患者 4 例について手術中胸腺と同時に縦隔リンパ節を採取し③と同様に flow cytometry により Bcl-2 蛋白の発現を比較した。4 例とも胸腺 GC 内 B 細胞の Bcl-2 陽性細胞の割合は縦隔リンパ節のそれに比し有意に高値であった。

[総括]

- 1) MG 胸腺 GC では扁桃 GC と比較すると apoptosis に陥っているリンパ球が減少している傾向にあった。
- 2) MG 胸腺 GC 内の B 細胞は、扁桃 GC 内 B 細胞に比し、apoptosis 抑制に関与する Bcl-2 蛋白を有意に高レベルで発現しており 1) との関連が示唆された。
- 3) さらに MG 患者の胸腺 GC での Bcl-2 の発現は縦隔リンパ節内 GC に比較して有意に高値であり、GC 内の Bcl-2 蛋白発現制御の異常は胸腺に限られることが示唆された。
- 4) これらの事実は MG 胸腺内 GC では、B 細胞での Bcl-2 分子の発現抑制が不十分であるために、本来除去されるべき自己反応性 B 細胞が生き残り分化、成熟している可能性を示唆しており、MG の治療法としての胸腺摘出術の理論的根拠のひとつになると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

アセチルコリン受容体に対する自己抗体が病因となる重症筋無力症において、患者の胸腺内に高率に認められる胚中心では、自己反応性 B 細胞が除去されていない状態が推察される。そこで本研究は患者胸腺内胚中心 B 細胞の細胞死および細胞死関連蛋白発現の異常を解析し、その発症機序との関連を明らかにすることを目的とした。対象は患者胸腺 14 例と正常扁桃 8 例で、肝中心内リンパ球の apoptosis と Bcl-2 蛋白の発現を比較検討した。TUNEL 法により組織標本において apoptosis を検出したところ、陽性細胞は患者胸腺胚中心では扁桃肝中心に比較し少数であった。免疫組織染色による Bcl-2 の発現の比較では、陽性細胞は患者胸腺胚中心では扁桃胚中心に比較し高率に認められた。組織よりリンパ球を単離し、3 color flow cytometry を用い、CD38 陽性 CD19 陽性細胞を胚中心 B 細胞として、Bcl-2 陽性細胞の割合を定量化、比較したところ、患者胸腺では扁桃に比較して有意に高値であった。さらに患者 4 例について胸腺と同時に縦隔リンパ節を採取し同様に Bcl-2 蛋白の発現を比較したところ、4 例とも胸腺内胚中心 B 細胞の Bcl-2 陽性細胞の割合は縦隔リンパ節のそれに比し有意に高値であった。なお胸腺リンパ球に占める胚中心 B 細胞の割合と血清抗アセチルコリン受容体抗体価との間に相関は認められなかった。

以上の結果は、重症筋無力症胸腺内胚中心では、B 細胞の Bcl-2 分子の発現が持続しているため細胞死が抑制され本来除去されるべき自己反応性 B 細胞が生き残り、分化成熟している可能性を示唆したものである。アセチルコリン受容体特異的 B 細胞の分化成熟過程についてはなお検討を要するが、重症筋無力症胸腺胚中心では自己反応性 B 細胞除去機構が障害されている可能性を示したという点で新しい知見である。さらにこの結果は重症筋無力症の治療法としての胸腺摘出術が、自己反応性 B 細胞の分化成熟の場を除去するという意味で理論的根拠を有することを明らかにしたのと考えられる。よって本研究は学位に値するものとする。