



IL-8 Expression in Granulocytic Epithelial Leisions of Idiopathic Duct-centric Pancreatitis (Type 2 Autoimmune Pancreatitis)

Ku, Yuna

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7466号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007466>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

IL-8 Expression in Granulocytic Epithelial Lesions of Idiopathic Duct-centric Pancreatitis (Type 2 Autoimmune Pancreatitis)

2 型自己免疫性膵炎における好中球上皮病変での IL-8 発現

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

指導教員：児玉 裕三教授

具 潤亜

背景と目的

自己免疫性膵炎(AIP)は腫瘍様の膵腫大、広範囲な炎症細胞浸潤ならびにステロイド治療に対する易反応性などで特徴づけられる特異な膵病態で、これまでに 2 つの異なるサブタイプが同定されている。病理組織像では著明なリンパ球および IgG4 陽性形質細胞の浸潤、花筵状繊維化、閉塞性静脈炎などの特徴を有する lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LSPS) と呼称される 1 型と、膵管上皮の病変が主体の idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP) の 2 型に区別されている。また 1 型は IgG4 関連疾患の膵病変とされているのに対し、2 型は未だ決定的な診断マーカーがなく、確定診断は容易でないのが現状である。このような中で国際的なコンセンサスとして 2 型の確定診断には好中球上皮病変(granulocytic epithelial lesion; GEL)と呼ばれる組織学的所見の存在が診断上の必須要件とされている。その一方で GEL は 2 型を特徴づける組織学的所見ではあるが、生検検体では必ずしも含まれないことが多く、診断上特異的なバイオマーカーが待たれる状況である。

近年、2 型 AIP 患者では 3 分の 1 で炎症性腸疾患を合併し 2 型 AIP における GEL は潰瘍性大腸炎でみられる陰窩炎、陰窩膿瘍など腸管上皮への好中球浸潤像が類似していることが報告されている。そこで本研究では 2 型 AIP と潰瘍性大腸炎の間に何らかの免疫学的類似性がある可能性に着目し 2 型 AIP における免疫学的特徴を検討するとともに診断に寄与しうるバイオマーカーを探る目的で各種サイトカインの発現について潰瘍性大腸炎との類似性について比較検討した。

対象

当施設の病理組織データベースより 13 例の 2 型 AIP 患者を抽出した。11 例で EUS-FNB が施行され、好中球の小葉内浸潤あるいは膵管破壊像を認めた。うち 2 例は悪性腫瘍が疑われ外科切除が施行された。国際コンセンサス診断基準では 9 例が確診で 4 例が疑診であった。

コントロール群として当施設の病理データベースより 1 型 AIP 18 例、閉塞性膵炎 12 例、原因不明の腫瘍形成性膵炎 3 例、潰瘍性大腸炎 15 例、感染性腸炎 11 例を抽出した。1 型 AIP については確診症例に限定した。うち 12 例で EUS-FNB、6 例で外科切除が施行されており、15 例で血清 IgG4 値の上昇がみられ、13 例で多臓器病変を認めた。閉塞性膵炎は全例が膵頭部の膵管癌に閉塞性膵炎を合併し、膵頭部病変の組織を使用した。3 例の原因不明の腫瘍形成性膵炎は全例に膵内に局所的腫瘍形成を認め、同部の EUS-FNB にて悪性所見や AIP の所見は否定された。潰瘍性大腸炎についてはいずれも陰窩炎や陰窩膿瘍陽性の症例に限定した。なお、本研究では全てホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) による組織切片を使用した。

方法

2 型 AIP における IFN- γ 、IL-4、IL-8、IL-10、TNF- α の mRNA の発現を real-time PCR

法 (RT-PCR) で評価した。2 型 AIP で発現したサイトカインについては 1 型 AIP でも評価し、差異について比較検討した。

次に 1 型および 2 型 AIP において RT-PCR 法で発現に差があったサイトカインを同定し免疫染色にてそれぞれの発現の特徴について解析した。コントロール群として閉塞性肺炎、原因不明の肺炎例を使用した。サイトカイン (IL-8) の炎症細胞における発現は最も炎症が強い部分での陽性細胞数による半定量的方法で評価した (0 は陰性、1+ は focal : 高倍率視野で陽性細胞が 10 個未満、2+ は moderate : 高倍率視野に陽性細胞を 10~50 個、3+ は diffuse : 高倍率視野に 50 以上の陽性細胞を認める)。また、上皮細胞における IL-8 発現については 0 (なし)、1+ (1 視野のみ)、2+ (2 視野以上で確認) というように 3 段階で評価した。

潰瘍性大腸炎についても同様のサイトカインの発現を免疫染色で評価し、感染性腸炎症例をコントロールとした。さらに 2 型 AIP と潰瘍性大腸炎で上皮やリンパ球のサイトカイン発現について評価するため、IL-8/cytokeratin (CK)、IL-8/CD3 の蛍光 2 重染色法を行い両疾患の異同について検討した。

結果

Real-time PCR

2 型 AIP では IL-8、IFN γ の発現が認められた。同サイトカインについて 1 型 AIP と比較したところ、IFN γ は 2 型でやや低値であったが、IL-8 は 1 型と比べ 13 倍と著明な高値を示した。

2 型 AIP での IL-8 発現

2 型 AIP、1 型 AIP、閉塞性肺炎、原因不明の腫瘍形成性肺炎例において IL-8 免疫染色を行い比較した。2 型 AIP は 13 例で検討した。HE では 7 例で GEL が認められ、多核球細胞が小腺管や腺房へ浸潤している例も認めた。IL-8 免疫染色では 11 例で上皮に発現が認められ、うち 3 例が focal に、8 例が diffuse に発現していた。全例で IL-8 陽性の炎症細胞が認められ、それらは共通して腭管周囲に観察された。1 型 AIP では全例で GEL は観察できず、2 例を除いて上皮細胞や炎症細胞に IL-8 陽性細胞は認めなかった。閉塞性肺炎では腭管に focal に発現している例が 3 例あり、IL-8 陽性の好中球集簇を 10 例に認めたが、斑様で 2 型 AIP に比べると発現程度は軽度であった。原因不明の腫瘍形成性肺炎では 1 例のみで浸潤好中球に IL-8 陽性を認めたが、上皮にはなかった。

次に各々の組織学的所見の診断的価値について検討したが GEL は 2 型 AIP で最も特異的な変化であるが感度は 54% であった。特異度の高い変化としては IL-8 の上皮での発現が認められた。IL-8 陽性細胞による小葉や腺管への好中球浸潤は閉塞性肺炎でも認められ、特異度は低かった。GEL または上皮細胞での IL-8 発現は 2 型 AIP と 1 型 AIP、閉塞性肺炎を区別するのに感度 92%、特異度 92-100% と有用であった。

UC での IL-8 発現

HE では全例で陰窩炎、8 例で陰窩膿瘍を認めた。IL-8 免疫染色では 15 例中 10 例で炎症

をおこしている陰窩上皮に IL-8 発現を認め、全例で陰窩炎、陰窩膿瘍の周囲に IL-8 陽性の炎症細胞を認めた。感染性腸炎でも多くの炎症細胞を認めたが、上皮に IL-8 が発現している症例はなく、IL-8 陽性炎症細胞を部分的に観察できるものは 4 例のみで、UC で有意に IL-8 発現が認められた。

蛍光 2 重染色

上皮細胞での IL-8 発現を評価するため、2 型 AIP と UC で IL-8/CK の蛍光 2 重染色を行った結果、いずれの症例でも IL-8/CK 両方が陽性となった。次に T 細胞における IL-8 発現の評価のため、IL-8/CD3 の蛍光 2 重染色を行ったが、2 型 AIP では IL-8/CD3 の両方が陽性の細胞を認めたのに対し、UC と閉塞性肺炎では認められず、2 型 AIP でのみ T 細胞が IL-8 を発現していることが示された。

考察

本研究は 2 型 AIP の免疫学的特徴について検討した初めての試みである。RT-PCR 法で各種サイトカインについて検討した結果、2 型 AIP では 1 型 AIP と比較して、IL-8 の発現が有意に高値であることが示された。また、2 型 AIP における IL-8 発現は主として腭管や腭管上皮に存在する好中球や T リンパ球などの炎症浸潤細胞で認められた。国際コンセンサス診断基準では 2 型 AIP は GEL や好中球の小葉浸潤の確認によって診断することになっているが、検体が微小な症例では GEL を確認できないことがあったり、小葉浸潤は特異的でなかったりと診断は困難である。その場合でも IL-8 免疫染色は診断に補助的方法として寄与しうる。

2 型 AIP の病態に好中球による腭管破壊が関与していることは知られているが、病態は解明されていない。IL-8 が好中球遊走作用を有していることから、腭管上皮における IL-8 の過剰発現が好中球浸潤を促進し、最終的に GEL を導くことが示唆された。

もうひとつの興味深い結果は潰瘍性大腸炎において、特に陰窩炎や陰窩膿瘍の存在する陰窩上皮で IL-8 が過剰発現していたことで、両疾患での IL-8 発現形態の類似は同様の免疫学的特徴を有していることを示唆している。ただし、2 型 AIP では CD3 陽性浸潤 T 細胞でも IL-8 発現がみられたのに対し、潰瘍性大腸炎では同リンパ球での IL-8 発現はみられなかった点で異なっていた。炎症性腸疾患での IL-8 発現についての検討は多数行われており、組織における IL-8 の mRNA 発現が健常人に比べ、潰瘍性大腸炎やクローン病患者で強く発現し、疾患活動性と関連していることも示されている。また、血清 IL-8 は内視鏡的、組織学的重症度とも正の相関を示しており、IL-8 の診断的価値や疾患モニタリングの価値が示されている。そのため、2 型 AIP においても血清 IL-8 が病態を評価しうるのか、診断的マーカーとして利用できるのかをさらなる研究で明確にする必要がある。

本研究で 2 型 AIP の腭管上皮や炎症浸潤細胞で IL-8 の過剰発現を認めたことより、IL-8 が GEL 形成に関与している可能性があること、IL-8 免疫染色や蛍光 2 重染色が診断に寄与しうることが示された。また潰瘍性大腸炎でも 2 型 AIP での IL-8 発現と類似した発現形態

がみられたことから両疾患の病態に関連性があることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2865号	氏 名	具 潤亜
論文題目 Title of Dissertation	IL-8 Expression in Granulocytic Epithelial Lesions of Idiopathic Duct-centric Pancreatitis (Type 2 Autoimmune Pancreatitis) 2型自己免疫性膵炎における好中球上皮病変でのIL-8発現		
審査委員 Examiner	主 査 林 祥剛 Chief Examiner 副 査 掛 地 弘 弘 Vice-examiner 副 査 角 康 博 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

要旨
自己免疫性膵炎(AIP)は腫瘍様の膵腫大、広範囲な炎症細胞浸潤ならびにステロイド治療に対する易反応性などで特徴づけられる特異な膵病態で、これまでに2つの異なるサブタイプが同定されている。病理組織像では著明なリンパ球および IgG4 陽性形質細胞の浸潤、花筈状繊維化、閉塞性静脈炎などの特徴を有する lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LSP) と呼称される1型と、膵管上皮の病変が主体の idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP) の2型に区別されている。また1型はIgG4 関連疾患の膵病変とされているのに対し、2型は未だ決定的な診断マーカーがなく、確定診断は容易でないのが現状である。このような中で国際的なコンセンサスとして2型の確定診断には好中球上皮病変(granulocytic epithelial lesion; GEL)と呼ばれる組織学的所見の存在が診断上の必須要件とされている。その一方でGELは2型を特徴づける組織学的所見ではあるが、生検検体では必ずしも含まれないことが多く、診断上特異的なバイオマーカーが待たれる状況である。近年、2型AIP患者では3分の1で炎症性腸疾患を合併し2型AIPにおけるGELは潰瘍性大腸炎でみられる陰窩炎、陰窩膿瘍など腸管上皮への好中球浸潤像が類似していることが報告されている。そこで本研究では2型AIPと潰瘍性大腸炎の間に何らかの免疫学的類似性がある可能性に着目し2型AIPにおける免疫学的特徴を検討するとともに診断に寄与しうるバイオマーカーを探る目的で各種サイトカインの発現について潰瘍性大腸炎との類似性について比較検討した。神戸大学の病理組織データベースより13例の2型AIP患者を抽出した。11例でEUS-FNBが施行され、好中球の小葉内浸潤あるいは膵管破壊像を認めた。うち2例は悪性腫瘍が疑われ外科切除が施行された。国際コンセンサス診断基準では9例が確定で4例が疑診であった。コントロール群として病理データベースより1型AIP 18例、閉塞性膵炎12例、原因不明の腫瘍形成性膵炎3例、潰瘍性大腸炎15例、感染性腸炎11例を抽出した。1型AIPについては確定症例に限定した。うち12例でEUS-FNB、6例で外科切除が施行されており、15例で血清IgG4値の上昇がみられ、13例で多臓器病変を認めた。閉塞性膵炎は全例が膵頭部の膵管癌に閉塞性膵炎を合併し、膵頭部病変の組織を使用した。3例の原因不明の腫瘍形成性膵炎は全例に膵内に局所的腫瘍形成を認め、同部のEUS-FNBにて悪性所見やAIPの所見は否定された。潰瘍性大腸炎についてはいずれも陰窩炎や陰窩膿瘍陽性の症例に限定した。なお、本研究では全てホルマリン固定パラフィン包埋標本(FPPE)による組織切片を使用した。 Real time PCRで2型AIPではIL-8、IFNγの発現が認められた。同サイトカインについて1型AIPと比較したところ、IFNγは2型でやや低値であったが、IL-8は1型と比べ13倍と著明な高値を示した。IL-8免疫染色で2型AIPでのIL-8発現を13例で検討した。HEでは7例でGELが認められ、多核球細胞が小腺管や腺房へ浸潤している例も認めた。IL-8免疫染色では11例で上皮に発現が認められ、うち3例がfocalに、8例がdiffuseに発現していた。全例でIL-8陽性の炎症細胞が認められ、それらは共通して膵管周囲に観察された。1型AIPでは全例でGELは観察できず、2例を除いて上皮細胞や炎症細胞にIL-8陽性細胞は認めなかった。閉塞性膵炎では膵管にfocalに発現している例が3例あり、IL-8陽性の好中球集簇を10例に認めたが、斑様で2型AIPに比べると発現程度は軽度であった。原因不明の腫瘍形成性膵炎では1例のみで浸潤好中球にIL-8陽性を認めたが、上皮にはなかった。 次に各々の組織学的所見の診断的価値について検討したがGELは2型AIPで最も特異的な変化である

が感度は54%であった。特異度の高い変化としてはIL-8の上皮での発現が認められた。IL-8陽性細胞による小葉や腺管への好中球浸潤は閉塞性肺炎でも認められ、特異度は低かった。GELまたは上皮細胞でのIL-8発現は2型AIPと1型AIP、閉塞性肺炎を区別するのに感度92%、特異度92-100%と有用であった。

UCでのIL-8発現の検索において、IL-8免疫染色では15例中10例で炎症をおこしている陰窩上皮にIL-8発現を認め、全例で陰窩炎、陰窩膿瘍の周囲にIL-8陽性の炎症細胞を認めた。感染性腸炎でも多くの炎症細胞を認めたが、上皮にIL-8が発現している症例はなく、IL-8陽性炎症細胞を部分的に観察できるものは4例のみで、UCで有意にIL-8発現が認められた。

上皮細胞でのIL-8発現を評価するため、2型AIPとUCでIL-8/CKの蛍光2重染色を行った結果、いずれの症例でもIL-8/CK両方が陽性となった。次にT細胞におけるIL-8発現の評価のため、IL-8/CD3の蛍光2重染色を行ったが、2型AIPではIL-8/CD3の両方が陽性の細胞を認めたのに対し、UCと閉塞性肺炎では認められず、2型AIPでのみT細胞がIL-8を発現していることが示された。本研究は2型AIPの免疫学的特徴について検討した初めての試みである。RT-PCR法で各種サイトカインについて検討した結果、2型AIPでは1型AIPと比較して、IL-8の発現が有意に高値であることが示された。また、2型AIPにおけるIL-8発現は主として膵管や膵管上皮に存在する好中球やTリンパ球などの炎症浸潤細胞で認められた。国際コンセンサス診断基準では2型AIPはGELや好中球の小葉浸潤の確認によって診断することになっているが、検体が微小な症例ではGELを確認できないことがあったり、小葉浸潤は特異的でなかったりと診断は困難である。その場合でもIL-8免疫染色は診断に補助的方法として寄与しうる。

2型AIPの病態に好中球による膵管破壊が関与していることは知られているが、病態の機序は解明されていない。IL-8が好中球遊走作用を有していることから、膵管上皮におけるIL-8の過剰発現が好中球浸潤を促進し、最終的にGELを導くことが示唆された。

もうひとつの興味深い結果は潰瘍性大腸炎において、特に陰窩炎や陰窩膿瘍の存在する陰窩上皮でIL-8が過剰発現していたことで、両疾患でのIL-8発現形態の類似は同様の免疫学的特徴を有していることを示唆している。ただし、2型AIPではCD3陽性浸潤T細胞でもIL-8発現がみられたのに対し、潰瘍性大腸炎では同リンパ球でのIL-8発現はみられなかった点で異なっていた。炎症性腸疾患でのIL-8発現についての検討は多数行われており、組織におけるIL-8のmRNA発現が健常人に比べ、潰瘍性大腸炎やクローン病患者で強く発現し、疾患活動性と関連していることも示されている。また、血清IL-8は内視鏡的、組織学的重症度とも正の相関を示しており、IL-8の診断的価値や疾患モニタリングの価値が示されている。そのため、2型AIPにおいても血清IL-8が病態を評価しうるのか、診断的マーカーとして利用できるのかをさらなる研究で明確にする必要がある。

本研究は2型AIPの病理組織学的、免疫学的特徴を解析した研究であるが、従来ほとんど行われなかったIL-8の病態生理バイオマーカーとしての意義を示した研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。