

参考文献

- 1) 井上恭一, 広原淳子, 仲野俊成 他: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 全国調査集計結果 (第18報)。厚生省特定疾患「難治性の肝疾患」調査研究班, 班長小俣政男, 報告者井上恭一, 平成9年度報告.
- 2) 小幡裕, 橋本悦子: 原発性胆汁性肝硬変における肝移植の適応, 肝移植適応基準, 市田文弘, 谷川久一編, 国際医書出版, 東京, 1991, PP.13-25.
- 3) Murtaugh PA, Dickson ER, Van Dam GM, et al: Primary biliary cirrhosis : prediction of short-term survival based on reported patients visits. Hepatology 1994; 20:126-134.
- 4) Christensen E, Altman DG, Neuberger J et al: Updating prognosis in primary biliary cirrhosis using a time-dependent Cox regression model. Gastroenterology 1993; 105:1865-1876.

表1 検討に用いた短期予後予測式

Model	日本肝移植適応研究会モデル2)	Mayo update model 3)	Europe new version model 4)
目的	任意観察時より6ヶ月後の予想死亡率:DR	任意観察時より3~24(6)ヶ月後の予測生存率	任意観察時より1,3,6ヶ月後の予測生存率
対象症例	1979~1990年 T-Bil $\geq$ 2mg/dlまたは肝不全症状を伴う症例, 141例	1974~1984年 D-ペニシラミン trial 312例	1971~1983年 アザチオプリン trial 248例
モデル式	$\lambda = -4.333$ $+1.2739 \times \log_e(\text{T-Bil})$ $+4.4880 \times \log_e(\text{GOT/GPT})$	$R = 0.051 \times (\text{Age})$ $+1.209 \times \log_e(\text{T-Bil})$ $+2.754 \times \log_e(\text{PT})$ $-3.304 \times \log_e(\text{Alb})$ $+0.675 \times \text{edema index}$	$\text{PI}(t) = 2.53 \times (\log_e(\text{T-Bil}) - 1.53)$ $+1.39$ if ascites present $-0.085 \times ((\text{Alb}) - 34.3)$ $+0.040 \times (\text{Age} - 55)$ $+0.65$ if GI bleeding present
予測法	計算式によりDRを求める $\text{DR}(\text{Death Rate}) = 1 / (1 + e^{-\lambda})$	計算式により求める $S(t, X) = [S_0(t)] \exp(R - R_0)$ $R_0 = 6.119$	計算式または図より求める $P(t, t+h) = \exp(-\lambda \cdot h \cdot \exp[\text{PI}(t)])$ $\lambda_0 = 0.035$

表2 S2-PBCにおける年代的予後の変化

(1) 総ビリルビン値別での検討対象例

1) T-Bil $\geq$ 2.0 mg/dl		Group A (N=221)	Group B (N=158)	p
M/F		22/199	19/139	0.5223
Age		50.41 $\pm$ 11.96	53.35 $\pm$ 12.27	0.2025
Alb.		3.54 $\pm$ 0.65	3.47 $\pm$ 0.57	0.2756
T-ch		303.81 $\pm$ 203.62	265.47 $\pm$ 161.46	0.0539
Histology(1:2:3:4)		20:58:53:34	23:33:36:25	0.537
UDCA(+)		74 (33.5%)	140 (88.6%)	0
2) T-Bil $\geq$ 5.0 mg/dl		Group A (N=98)	Group B (N=52)	p
M/F		13/85	7/45	0.9732
Age		49.91 $\pm$ 11.48	54.98 $\pm$ 13.19	0.0159
Alb.		3.35 $\pm$ 0.65	3.37 $\pm$ 0.84	0.835
T-ch		321.07 $\pm$ 269.87	289.53 $\pm$ 226.64	0.4784
Histology(1:2:3:4)		9:24:20:20	10:9:11:4	0.0418
UDCA(+)		27 (27.6%)	47 (90.4%)	0
3) T-Bil $\geq$ 8.0 mg/dl		Group A (N=53)	Group B (N=19)	p
M/F		6/47	4/15	0.2926
Age		50.43 $\pm$ 10.22	52.32 $\pm$ 10.44	0.4956
Alb.		3.24 $\pm$ 0.65	3.30 $\pm$ 0.72	0.7247
T-ch		312.19 $\pm$ 287.59	244.79 $\pm$ 224.34	0.3603
Histology(1:2:3:4)		2:12:10:11	3:4:5:2	0.1665
UDCA(+)		15 (28.3%)	16 (84.2%)	0.0001

(2) 組織学的病期別での検討

1) Stage 1.2		Group A (N=78)	Group B (N=56)	p
M/F		7/71	5/51	0.9927
Age		48.56 $\pm$ 12.62	50.38 $\pm$ 11.79	0.4014
T-Bil		5.55 $\pm$ 5.06	4.64 $\pm$ 4.07	0.2716
Alb.		3.68 $\pm$ 0.58	3.71 $\pm$ 0.43	0.7923
T-ch		322.76 $\pm$ 233.69	287.20 $\pm$ 163.42	0.215
UDCA(+)		17 (21.8%)	49 (87.5%)	0
2) Stage 3		Group A (N=53)	Group B (N=36)	p
M/F		1/52	5/31	0.0267
Age		50.45 $\pm$ 9.96	51.03 $\pm$ 10.54	0.7946
T-Bil		5.78 $\pm$ 5.48	4.93 $\pm$ 4.70	0.451
Alb.		3.59 $\pm$ 0.58	3.49 $\pm$ 0.54	0.4359
T-ch		339.36 $\pm$ 223.78	306.97 $\pm$ 178.73	0.4793
UDCA(+)		25 (47.2%)	33 (91.7%)	0
3) Stage 4		Group A (N=34)	Group B (N=25)	p
M/F		6/28	4/21	0.8677
Age		53.32 $\pm$ 11.25	57.84 $\pm$ 11.54	0.1373
T-Bil		6.77 $\pm$ 4.77	4.91 $\pm$ 5.87	0.1852
Alb.		3.26 $\pm$ 0.69	3.09 $\pm$ 0.59	0.3313
T-ch		219.59 $\pm$ 108.28	214.72 $\pm$ 85.46	0.8543
UDCA(+)		10 (29.4%)	23 (92.0%)	0.0008

表3 PBC全国調査二次調査集計 (1998年1月実施)

	死亡例	生存例	消息不明	計	回収率
対象症例	444	342		786	
回答症例	200	112	99	411	53%

死亡例内訳 (N=200)

肝不全が徐々に進行	
死亡時 T-Bil $\geq$ 8mg/dl	118
死亡時 T-Bil < 8mg/dl	7
食道静脈瘤破裂・消化管出血	
死亡時 T-Bil $\geq$ 8mg/dl	4
死亡時 T-Bil < 8mg/dl	11
肝移植後肝不全	1
HCC合併	8
他死亡・不明	13
data不備・転院	38

生存例内訳 (N=112)

最終確認時 T-Bil $\geq$ 5mg/dl	4
最終確認時 T-Bil < 5mg/dl	76
肝移植後	1
data不備・転院	31

表4 解析対象（肝不全による死亡症例）

症例数: 118例	組織診断(Scheuer分類):
性別: M/F=16:102	I 10
年齢: 23~83歳、平均51.4歳	II 29
観察期間(診断~死亡): 1~205月、平均58.6月	III 30
観察期間(観察開始~死亡) 1~205月、平均43.0月	IV 25
	死因:
	肝不全 67
	肝不全+消化管出血 17
	肝不全+静脈瘤破裂 28
	肝不全+消化管出血+静脈瘤破 6

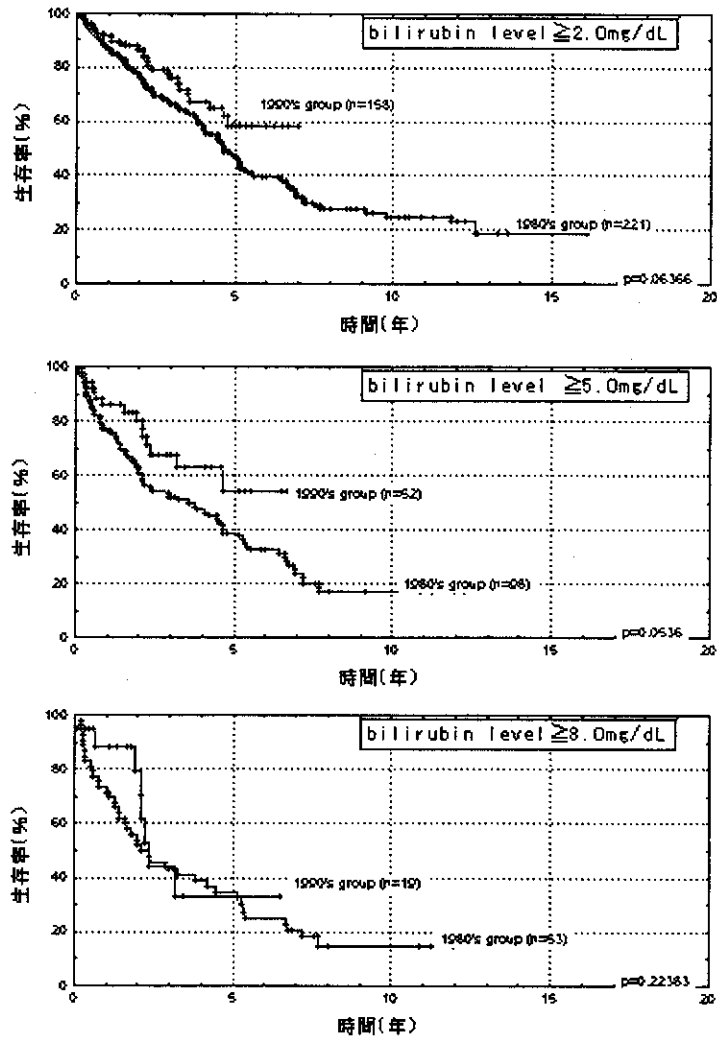


図1 s2-PBCにおける年代別生存率  
血清総ビリルビン値別検討

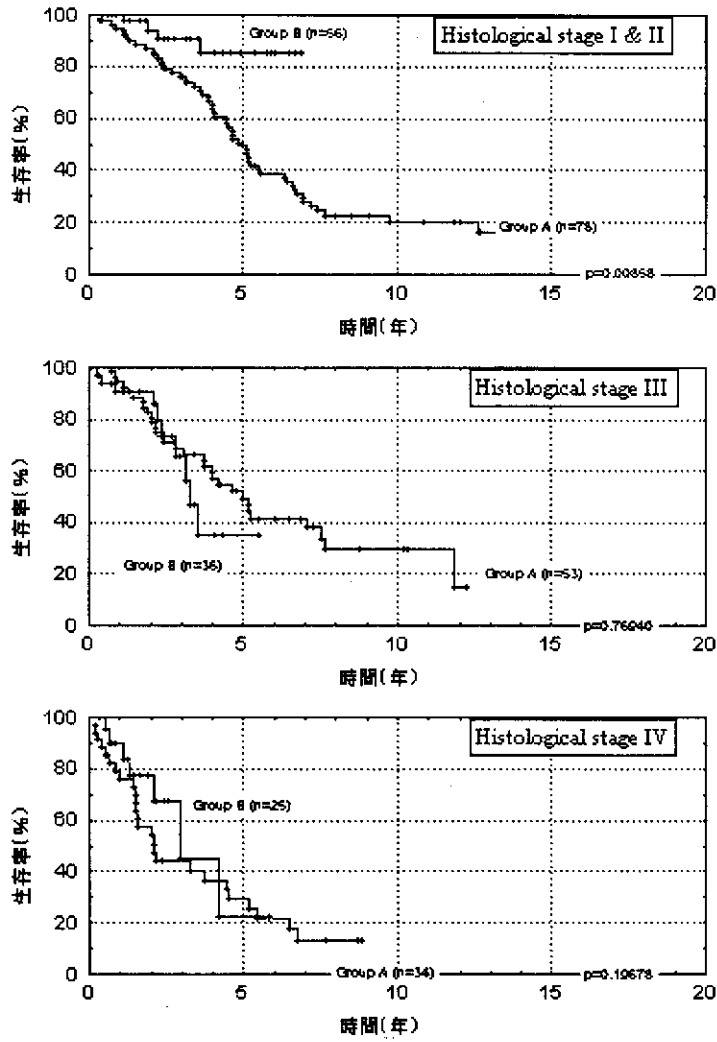
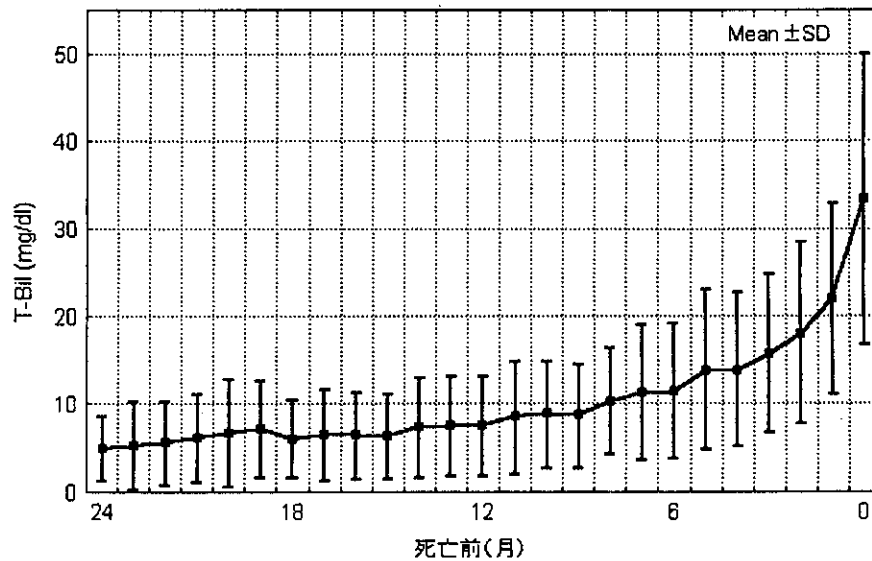


図2 s2-PBCにおける年代別生存率  
組織学的病期別検討

図3 死亡前24ヶ月の血清総ビリルビン値推移



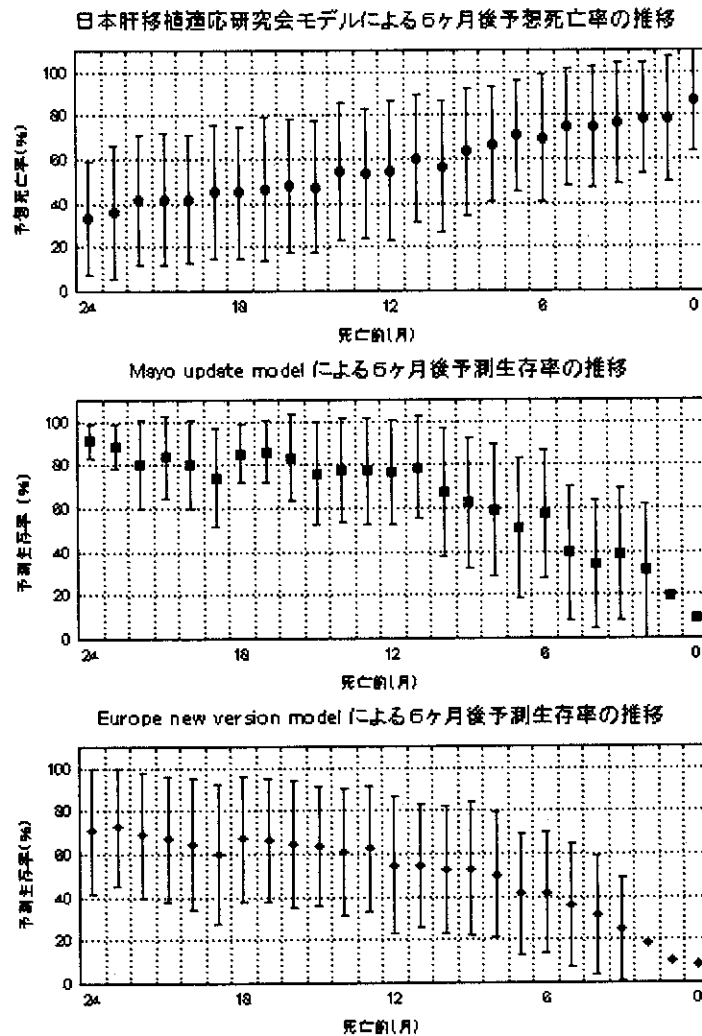


図4 短期予後予測式による検討

## PBCの病態に及ぼす樹状細胞 (DC) の役割

愛媛大学医学部・第三内科 恩地 森一  
 協同研究者：舩本俊一, アズレ アガバル  
 山本和寿, 四宮瑞穂  
 堀池典生

### はじめに

樹状細胞 (DC) は初期免疫において最も強く抗原提示を行い得ることが知られている<sup>1)</sup>。今回、PBCの肝組織でのDCの局在をIDCに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討した。また、HLA DR及び成熟、活性化したDCのマーカーであるCD83<sup>2)</sup>を用いて、局在するDCの役割について検討した。

一方、末梢血より単離したDCを用いて、代表的な自己抗原であるPDHによるT細胞増殖の誘導について検討した。DCに抗原をパルスすることにより強力な抗原提示が誘導されることが知られている<sup>3)</sup>。今回、パルスの有無によりミトコンドリア抗体陰性例 (自己免疫性胆管炎AIC) を含めたPBCと健常者におけるT細胞増殖について検討した。

### 対象と方法

厚生省「難治性の肝疾患」研究班によるPBC診断基準を満たしたPBC症例を対象とした。PDHによるT細胞増殖は、ミトコンドリア抗体陽性PBC 6症例、陰性PBC 4症例、健常者 6例を対象とした。

#### 1) 免疫組織染色<sup>4) 5)</sup>

ホルマリン固定した肝組織を用い、一次抗体として

IDC (mouse, cloneX12, BMA社), HLA DR (mouse, cloneLN-3, Zymed社), CD83 (mouse, clone HB15a, Immunotech社) に対するモノクローナル抗体を用いた。二次抗体としてビオチン化ヤギ抗マウスイムノグロブリン (DAKO社) を用い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加えてABC法にて染色した。

## 2) 共焦点レーザー顕微鏡<sup>5)</sup>

Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定した肝組織を用いた。IDCをrhodamineで、HLA DRをFITCで、それぞれ標識し2重染色したのち共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 3) DC・T細胞の分離

末梢血からのDCの分離はRomani<sup>6)</sup>らの方法に準じて行った。末梢血より単核球を分離しプラスチックデイスユ上で2時間培養。非付着性細胞を除去後、付着性細胞をIL-4 (最終濃度500U/ml), GM-CSF (最終濃度800U/ml) 存在下に8日間培養し、DCを誘導・分離した。T細胞分画は末梢血単核球からBiotex社のT cell recovery kitを用いて分離した。

## 4) 混合培養及びPDHによる刺激

分離したDCを4000radにてradiationし、刺激細胞とした。DC, T細胞を1:20の割合で96穴plateで混合培養し、PDH (最終濃度0.1mg/ml) を添加した。5日間培養後、<sup>3</sup>Hサイアミジンを添加、さらに12時間培養し、その取り込みをシンチレーションカウンターで測定した。DC, T細胞混合培養12時間前にDCにPDH (最終濃度1mg/ml) を添加し抗原パルスした群としない群で比較検討を行った。

## 結 果

### 1) 肝組織内DCの局在

IDCはPBC肝組織26例中24例 (92%) で観察された。成熟、活性化DCであるCD83陽性細胞は26例中20例 (77%) で観察された。IDCは主として門脈域に存在し異常胆管周囲に観察された。1切片 (1.5-2.0mmX15-20mm) あたりIDC陽性細胞として34.0±38.8個、CD83陽性細胞として5.5±7.1個認められた。連続切片での検討ではIDCとCD83陽性細胞は必ずしも一致しなかったが、異常胆管周囲にCD83陽性細胞を認めた。

### 2) 共焦点レーザー顕微鏡での観察

IDC陽性細胞は主として門脈域に存在した。HLA DRとの2重染色により、門脈域においてIDC陽性細胞が最も強くHLA DRを発現していた。

### 3) PDHによるT細胞増殖の誘導

健常者、PBC患者での<sup>3</sup>Hサイアミジンの取り込みは、PDHをパルスしなかった群 (パルスー)、パルス

した群 (パルス+) で、それぞれ、健常者; 3455±6377cpm (パルスー); 4242±5542cpm (パルス+), PBC; 19825±22324cpm (パルスー); 31222±26637cpm (パルス+) であった (図1)。パルスの有無により健常者では<sup>3</sup>Hサイアミジンの取り込みに差異を認めなかったが、PBCではPDHをパルスすることにより有意に (P<0.05) 増加した。パルスしていない時には健常者とPBCの間に有意な差異は認めなかったが、パルスすることにより健常者と比較してPBCでは有意に (P<0.05) <sup>3</sup>Hサイアミジンの取り込みが増加した。AICにおいてもパルスすることにより健常者と比較して有意な (P<0.05) 取り込みの増加を認めた (図2)。

## 考案・結論

初期免疫において最も強い抗原提示能を持つDCが主として門脈域に存在し、異常胆管周囲にも観察されたことは、DCが胆管病変に関与している可能性を示唆する。また、門脈域においてDCが最も強くHLA DRを発現していることも観察された。一方、DCはその成熟段階においてHeterogeneityが存在することが知られている<sup>7)</sup>。DCは未成熟の段階で抗原を取り込み、成熟するにつれてHLA DRの発現が増強し、強力な抗原提示機能を有してくる。今回の検討で、成熟、活性化したDCであるCD83陽性細胞がPBC肝組織に観察された。このCD83陽性細胞はIDCとは必ずしも一致せず、肝組織内に存在するDCにもHeterogeneityが存在することが示唆され、異なる役割をしていることが想定された。

PDHによるT細胞増殖はDCに抗原をパルスすることによりPBCでは有意に増加した。未成熟なDCに抗原をパルスすることにより強力な抗原提示が行われることが知られているが<sup>8)</sup>、PDHを抗原とした場合にも同様な結果が得られた。パルスしていない条件では健常者とPBCの間に有意な差異は認めなかったが、パルスによりPBCでは健常者と比較して有意にT細胞増殖が増加した。また、AICにおいてもT細胞の増殖が認められた。これらの成績より、DCを用いて抗原をパルスすることにより代表的な対応抗原であるPDHに対してT細胞増殖の誘導がなされ得ることが示され、B細胞からの抗体産生を認めないAICにおいても、T細胞増殖が起こり得ることが明らかとなった。また、自己抗原の同定のためにDCを用いて抗原パルスを行うことは有用となり得ると考えられた。

以上より、AICはPBCの一亜型であることが示唆された。また、PBC肝組織内には異なる成熟段階のDCが存在し、PDHを初めとする自己抗原がDCにより抗原提示され、引き続きT細胞増殖により胆管病変が惹起される

ことが示唆された。

参考文献

- 1) Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenecity. *Ann Rev Immunol*, 1991; 37:527-535.
- 2) Zhou L-J, Tedder TF: Human dendritic cells selectively express CD83, a member of immunoglobulin superfamily. *J Immunol*; 95:3821-3835, 1995.
- 3) Inaba K, Metlay P, Crowley M, et al: Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990; 180:83-93.
- 4) Tanimoto K, Akbar SMF, Michitaka K, Onji: Immunohistochemical localization of antigen presenting cells in liver from patients with primary biliary cirrhosis; highly restricted distribution of CD83 positive activated dendritic cells. *Pathology Research and Practice* 1999, in press.
- 5) Shinomiya M, Masumoto T, Nadano S, Akbar SMF, Onji M: Lymphoid dendritic cells in the liver of patients with primary biliary cirrhosis and its mouse model. *Hepatology Research*, 1998; 11:84-94.
- 6) Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Tochenbacher B, Konwalinka G, O.Fritsch P, Steinman RM, Schuler G: Proliferating dendritic cells precursor in human blood. *J Exp Med*, 1994; 180:83-93.
- 7) Hart DNJ: Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90:3245-3287.

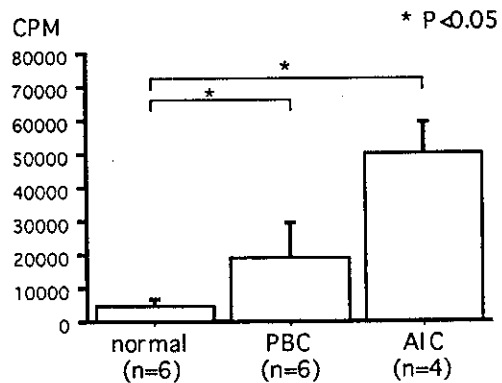


図2 健常者、PBC、AIC患者でのPDH-pulseによるT cell proliferation

ヒトおよびマウスサイトケラチン19プロモーター領域のクローニングとプロモーター活性の検討

金沢大学医学部・第一内科 小林 健一  
 協同研究者：加賀谷真希子, 大野秀棋  
 金子周一

はじめに

免疫組織染色による検討にて、原発性胆汁性肝硬変(以下PBC)の胆管上皮ではPDC-E2の発現が増強している可能性が報告されている<sup>1) 2) 3)</sup>。PDC-E2の過剰発現がPBCの病因となりうるかを検討する目的で、胆管上皮にPDC-E2を強制発現する動物実験モデルの作製は重要である。これまでに我々はマウスを用いた動物実験モデル作製のため、マウスPDC-E2遺伝子のクローニングを行った<sup>1)</sup>。このPDC-E2遺伝子を胆管細胞で特異的に発現させるために、胆管細胞に特異的なプロモーターが必要と考えられた。胆管細胞においても細胞特異的遺伝子の発現調節が行われていると考えられるが、肝細胞に比し胆管細胞特異的遺伝子の発現調節機序について未だ十分な解析は行われていない。そこで我々は、胆管細胞特異的遺伝子の一つと考えられているヒトおよびマウスサイトケラチン19遺伝子5'上流領域をクローニングし、同領域のプロモーター活性の検討を行った。

材料と方法

(1) プロモーター領域のクローニング：ヒト末梢血白血球からQIAmp Tissue Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) によりゲノムDNAを調整し、TaKaRa PCR in vitro Cloning Kits (TaKaRa BIOMEDICALS, Tokyo, Japan) を用いてクローニングを行った。ゲノムDNAを

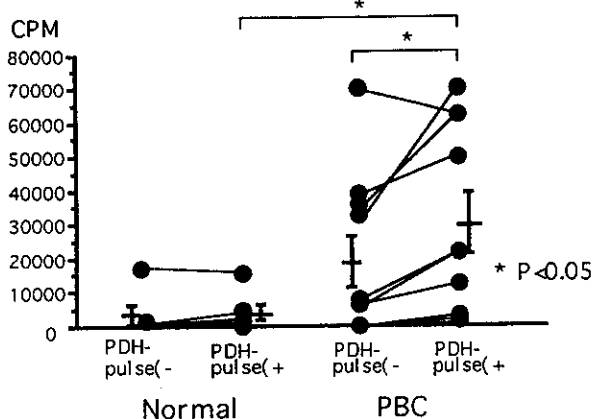


図1 健常者、PBC患者でのPDH-pulseの有無によるT cell proliferation

各種制限酵素にて消化し、制限酵素サイトをもつアダプターカセットとライゲーションを行った。このDNA断片を鋳型とし、nested-PCRを行った。プライマーはBader<sup>5)</sup>らが報告したヒトサイトケラチン19遺伝子5'上流領域387bpの塩基配列をもとに作製したプライマーとアダプターカセットに対するプライマーを用いた。得られたPCR産物をTAクローニングベクターに組み込み、クローニングを行った。同様の方法で順次5'上流をクローニングし、塩基配列を決定した。

またC57/BLマウスの肝臓よりゲノムDNAを調整し、Lussier<sup>6)</sup>らが報告しているマウスサイトケラチン19遺伝子の5'上流375bpの塩基配列をもとにプライマーを作製し、ヒトと同様の方法でクローニングを行った。

(2) 培養細胞：プロモーター活性の検討にはヒト胆管癌細胞株のKMBC、ヒト肝癌細胞株のHepG2, HuH7, ヒト骨肉腫細胞株のSaos-2, マウス線維芽細胞株のNIH3T3, 以上5種類の培養細胞株を用いた。各種培養細胞株におけるサイトケラチン19の発現量はノーザンブロットリング, 免疫染色, ウェスタンブロットリングにて評価した。

(i) ノーザンブロットリング：培養細胞から抽出したtotal RNA10mgをアガロースゲルにて展開した後、ナイロン膜に転写した。ヒトサイトケラチン19遺伝子の5'側と3'側の塩基配列をもとに作製した2種類のプローブとハイブリダイゼーションを行い、FUJIX BAS1000 system (FUJI PHOTO FILM CO., LTD., Japan)にて検出した。また陽性コントロールとして $\beta$ -actinに対するプローブを使用した。

(ii) 免疫染色：一次抗体にはヒトとマウスのサイトケラチン19に反応する抗サイトケラチン19抗体 (Amersham LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, England) を、二次抗体にはFITC標識ヤギ抗マウス抗体を用いた。

(iii) ウェスタンブロットリング：SDS-PAGEにて展開された10mgのwhole cell lysateをニトロセルロース膜に転写し、抗サイトケラチン19抗体にてプロットした。二次抗体にはHRP標識Protein Aを用い、ECLシステム (Amersham LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, England)にて検出した。

(3) プロモーター活性の検討：プロモーター活性の検討にはPromega Dual-luciferase reporter assay system (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を使用し、トップカントルミネッセンスカウンター (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA)にて発光量を測定した。リン酸カルシウム法にて培養細胞に遺伝子を導入し、40時間後にCell lysateを調整した。一次反応基質および二次反応基質添加時に二度発光量を測定し、インターナルコントロールで補正されたプロモーター活性を

算出した。クローニングしたヒトおよびマウスサイトケラチン19プロモーター領域をfirefly luciferase遺伝子を持つpGL3-Basic (Promega Corporation, Madison, WI, USA)に組み込み、レポータープラスミドを作製した(図1A)。対照にはSV40 promoterが組み込まれたpGL3-Promoter (Promega Corporation, Madison, WI, USA)を用いた(図1B)。またインターナルコントロールにはRenilla luciferase遺伝子とSV40 Enhancer/Early promoterが組み込まれたpRL-SV40 (Promega Corporation, Madison, WI, USA)を用いた。

またサイトケラチン19遺伝子の5'上流転写調節領域長とプロモーター活性の変動を検討するためにTaKaRa Kilo-Sequence用Deletion Kit (TaKaRa BIOMEDICALS, Tokyo, Japan)を用いて5'上流領域を5'側から順次短くしたレポータープラスミドを作製し、プロモーター活性を測定した。

## 結 果

(1) プロモーター領域のクローニング(図2)(図3)：ヒトサイトケラチン19 5'上流領域は重なり合う2本のDNA断片としてクローニングされた。得られた塩基配列を元に遺伝子特異的プライマーを作製し、ゲノムDNAよりPCR法にて約2.9kbpの1本のDNA断片が得られた(図2)。同様の手法にてマウスサイトケラチン19 5'上流領域約2.7kbpをクローニングした(図3)。

シーケンスの結果、ヒトサイトケラチン19プロモーター領域2952bp, マウスサイトケラチン19プロモーター領域2691bpの塩基配列が得られ、同領域は48.2%の相同性を示した。

(2) 培養細胞株におけるサイトケラチン19の発現量(図4)(図5)(図6)：ノーザンブロットリングの結果、KMBC, HepG2, HuH7でバンドを認めたが、発現量はKMBCが一番強く、それぞれの $\beta$ -actinのバンドに対するサイトケラチン19のバンド量比はKMBCで42.5, HepG2で22.5, HuH7で26.3であった(図4)。

免疫染色では胆管細胞株のKMBCは強い染色性を示した。肝細胞株のHepG2は弱い染色性を示したが、HuH7は染色されなかった。また非上皮系のSaos-2やNIH3T3も染色されなかった(図5)。

ウェスタンブロットリングではKMBCで太いバンドが認められた。またHepG2, そして免疫染色では陰性であったHuH7でもバンドを検出したが、KMBCに比し、その量は少量であった。免疫染色同様にSaos-2, NIH3T3はウェスタンプロットにおいても陰性であった。相対的バンド量比をNIHイメージにて定量化したところ、KMBCは6983, HepG2は2667, HuH7は1747であった(図6)。ノーザンブロットリング, 免疫染色, ウェスタンブロッ



ティングの結果より、サイトケラチン19の発現量は培養細胞株間で異なり、胆管細胞株のKMBCで一番多く、次いで肝細胞株のHepG2、そしてHuH7にも発現していることが判明した。また骨肉腫細胞株のSaos-2、線維芽細胞株のNIH3T3では発現量は非常に少ないと考えられた。

(3) ルシフェラーゼアッセイ：5'上流領域を5'側より順次短くしたレポータープラスミドを用いて、KMBCにおけるヒトおよびマウスサイトケラチン19遺伝子の5'上流領域長とプロモーター活性の関連を検討したところ、ヒトの最大活性は-2249bpに、またマウスの最大活性は-2035bpに存在した(図7)。

次に、最大活性を示した各々ベクターを用いて、各種培養細胞間でのプロモーター活性を比較した(表1)。KMBC、HepG2、HuH7のサイトケラチン19陽性細胞株では対照としたSV40 promoterと比べ、ヒトでは6.3~9.2倍、マウスでは3.3~8.3倍と強い活性を示した。この比活性はサイトケラチン陰性細胞株であるSaos-2、NIH3T3の約10倍強い値であった。これらの結果はRNAや蛋白の発現レベルの結果と符合すると考えられた。サイトケラチン陽性細胞における5'上流の転写調節領域長とプロモーター活性の変動について検討した(図8)。ヒトでは5'側を順次短くすると活性が2段階に減少し、いずれの細胞株においても類似した変動パターンを示した。しかし、-176bpでは比較的胆管細胞株のKMBCにおける活性が保たれていた。マウスでも5'側を順次削っていくと同様の変動を示した。またKMBCにおける比活性は強く、特に-589bpの領域で最大に近い活性を示した。

## 考 案

我々は今回これまで未報告であったヒトおよびマウスのサイトケラチン19遺伝子の5'上流領域をクローニングし、塩基配列を決定した。ヒト2952bp、マウス2691bpの領域が得られ、それらの相同性は48.2%であった。

クローニングされたヒトおよびマウスの5'上流領域はサイトケラチン19陽性細胞では陰性細胞と比べ、それぞれ6.3~9.2倍、3.3~8.3倍と強い活性を示し、RNAや蛋白の発現レベルの結果と符合した。5'上流の転写調節領域の長さとはプロモーター活性の変動はサイトケラチン19陽性細胞群において一致した。

またヒトでは-705~-176bpの領域が最大活性の約45~70%、マウスでは-589~-161bpの領域が最大活性の約80~100%を示した。同領域の一部は180bpの長さにわたって約75%の相同性を示し、重要な転写調節領域が存在すると考えられ、今後胆管細胞における遺伝子発現を検討する上で、詳細に解析する必要があると考えられた。

## 結 語

ヒトおよびマウスのサイトケラチン19遺伝子の5'上流領域をクローニングし、塩基配列を決定した。クローニングされた5'上流領域はサイトケラチン19陽性細胞では陰性細胞と比べ、強いプロモーター活性を示し、PBC実験動物モデル作製に有用であると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Van de Water J, Ansari AA, Surh CD et al.: Evidence for the targeting by 2-oxo-dehydrogenase enzymes in the T cell response of primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 146:89-94, 1991.
- 2) Joplin R, Lindsay JG, Hubscher SG et al.: Distribution of dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) in the liver and portal lymph nodes of patients with primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study. *Hepatology* 14:442-447, 1991.
- 3) Joplin R, Lindsay JG, Johnson GD et al.: Membrane dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) on human biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis. *Lancet* 339:93-94, 1994.
- 4) 加賀谷真希子, 大野秀棋, 金子周一, 他: マウスPDC-E2 cDNAのクローニング。平成10年度厚生省特定疾患調査研究事業研究報告書(26162)
- 5) Bernhard L, Bader, Lothar Jahn, Werner W. Franke: Low level expression of cytokeratin 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *European Journal of Cell Biology* 47:300-319, 1998.
- 6) Marc Lussier, Mario Fillion, John G. Compton et al.: The mouse keratin 19-encoding gene: sequence, structure and chromosomal assignment. *Gene* 95:203-213, 1990.

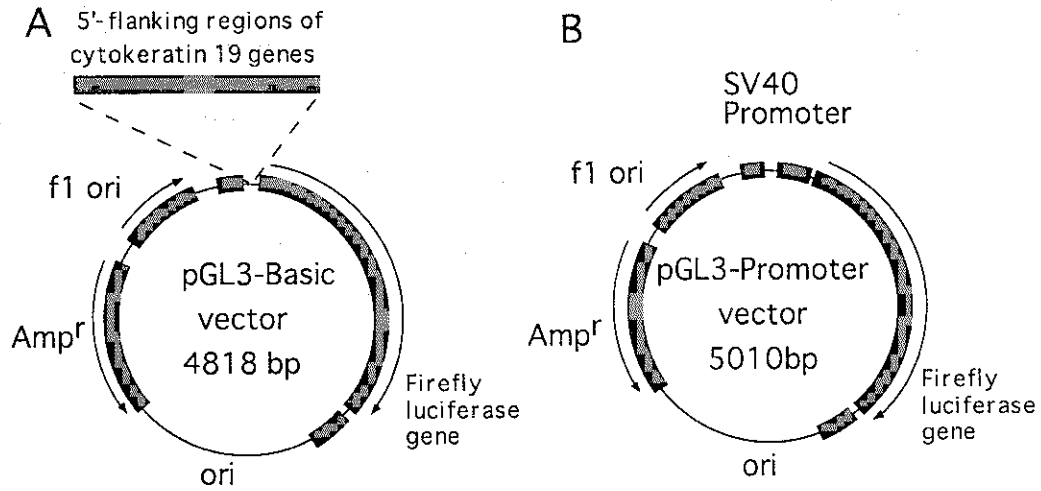


Figure 1: Illustrated are constructs of reporter plasmids and a control reporter plasmid. A. Various lengths of human and murine cytochrome 19 gene 5'-flanking region were inserted into firefly luciferase reporter plasmids. B. A control reporter plasmid was driven by the early SV 40 promoter.

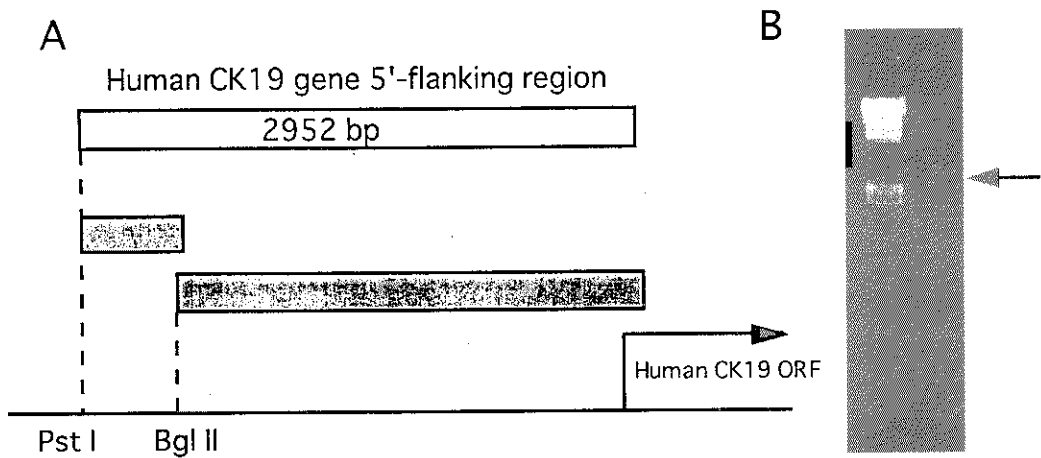


Figure 2: A. Illustrated are various regions of 5'-flanking regions of human cytochrome 19 gene. Closed bars indicate the regions which were cloned by in vitro cloning system described in "Materials and Methods". A open bar indicates the region which was cloned by PCR using gene specific primers. B. The arrow indicates 2952 bp length of DNA fragment which was amplified by PCR using gene specific primers.

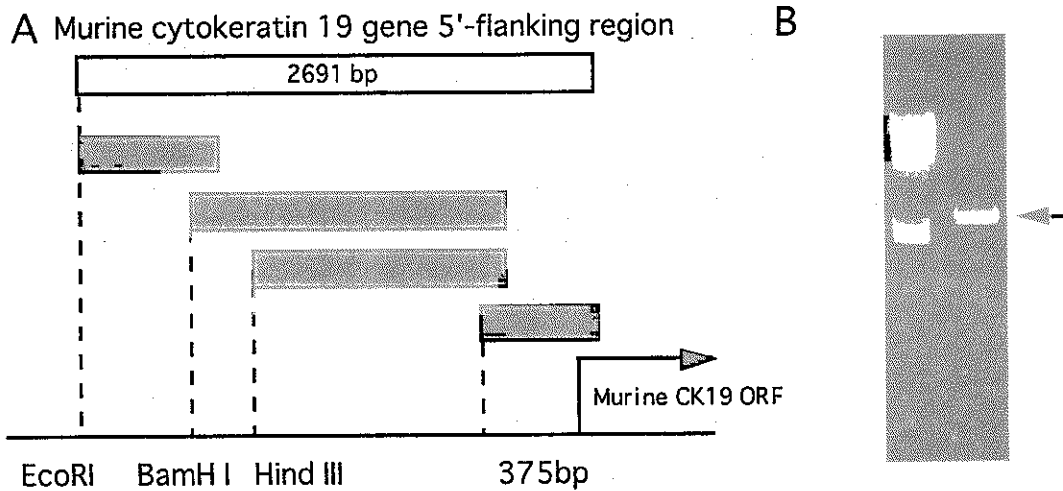


Fig 3: A. Illustrated are various regions of 5'-flanking regions of murine cytokeratin 19 gene. Closed bars indicate the regions which were cloned by in vitro cloning system described as before. An open bar indicates the region cloned by PCR using gene specific primers. B. The arrow indicates 2691 bp length of DNA fragment which was amplified by PCR using gene specific primers.

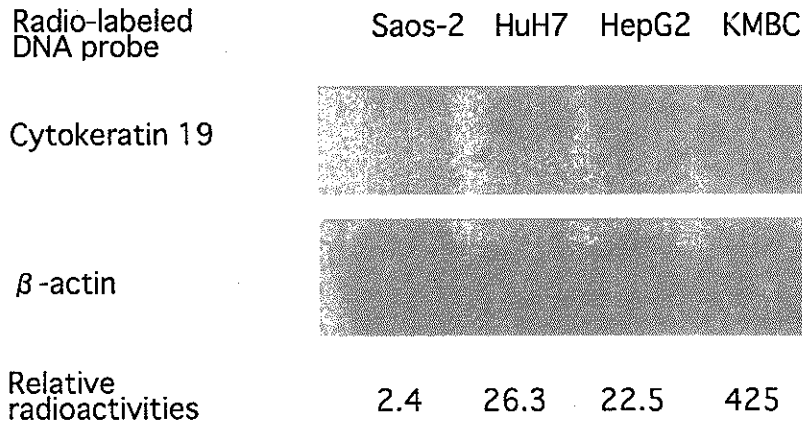


Fig 4: Northern blotting analysis of cytokeratin 19 gene in each cell line. Upper and lower panels demonstrated the results of hybridization by cytokeratin probe and  $\beta$ -actin probe, respectively. Relative radioactivities of cytokeratin 19 to that of  $\beta$ -actin were indicated at bottom.

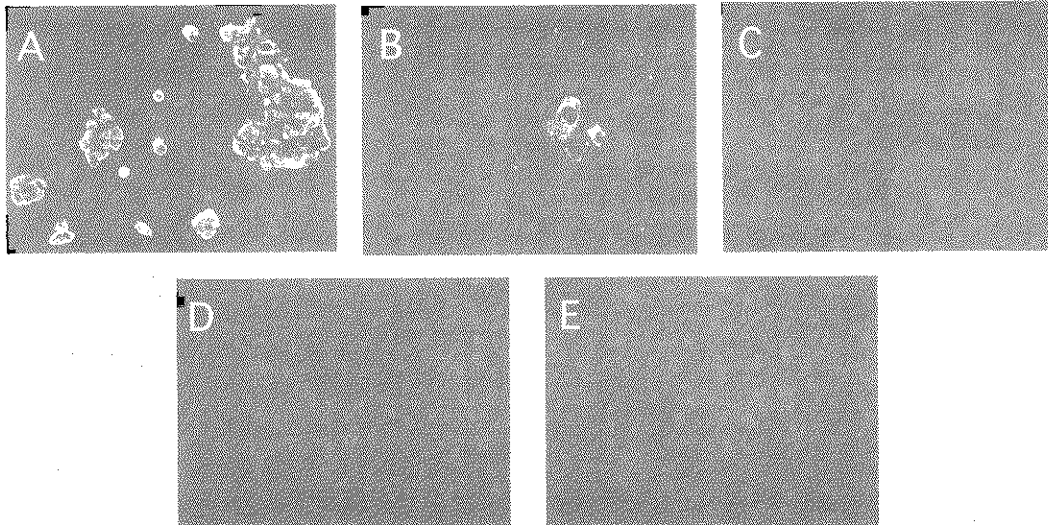


图5: Immunostaining of each cell line using anti-cytokeratin 19 antibody. Panel A, B, C, D, and E showed the results of KMBC, HepG2, HuH7, Saos-2, and NIH3T3, respectively.

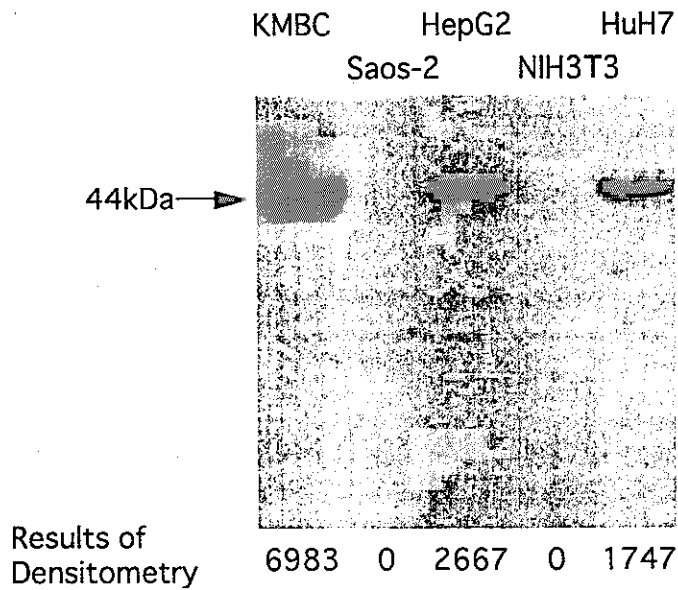


图6: Western blotting analysis of each cell line using anti-cytokeratin 19 antibody. Relative amounts of cytokeratin 19 protein was measured by NIHimage, and shown at bottom of the figure.

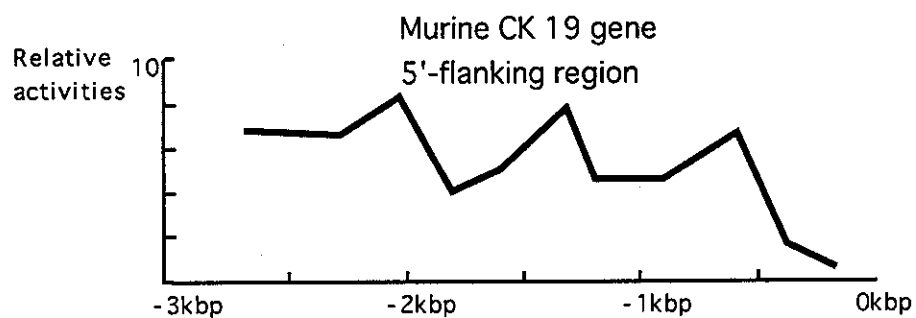
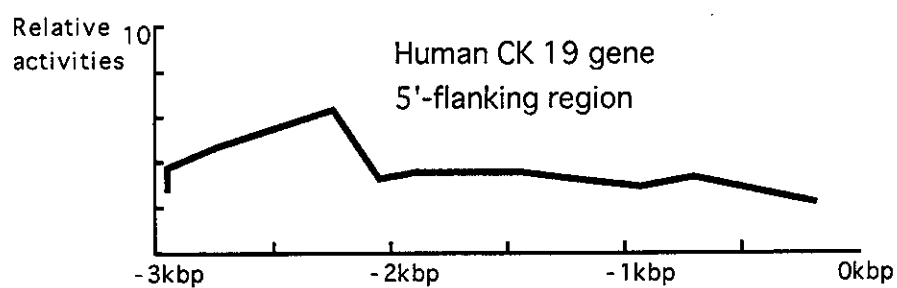


図7: Deletional analysis of promoter activities of 5'-flanking region of human and murine cytokeratin 19 gene in KMBC cell line, using dual luciferase assay system described in "Materials and Methods".

表1 Luciferase Assay

	ヒト promoter	マウス 活性	Northern Blot (バンド量比)	免疫染色	Western Blot (バンド量比)
KMBC	6.34	8.36	425	2+	6983
HepG2	9.22	4.57]	22.5	+	2667
HuH7	7.40	3.30	26.3	-	1747
Saos-2	0.84	NE	2.4	-	0
NIH3T3	NE	0.59	NE	-	0

NE;not examined

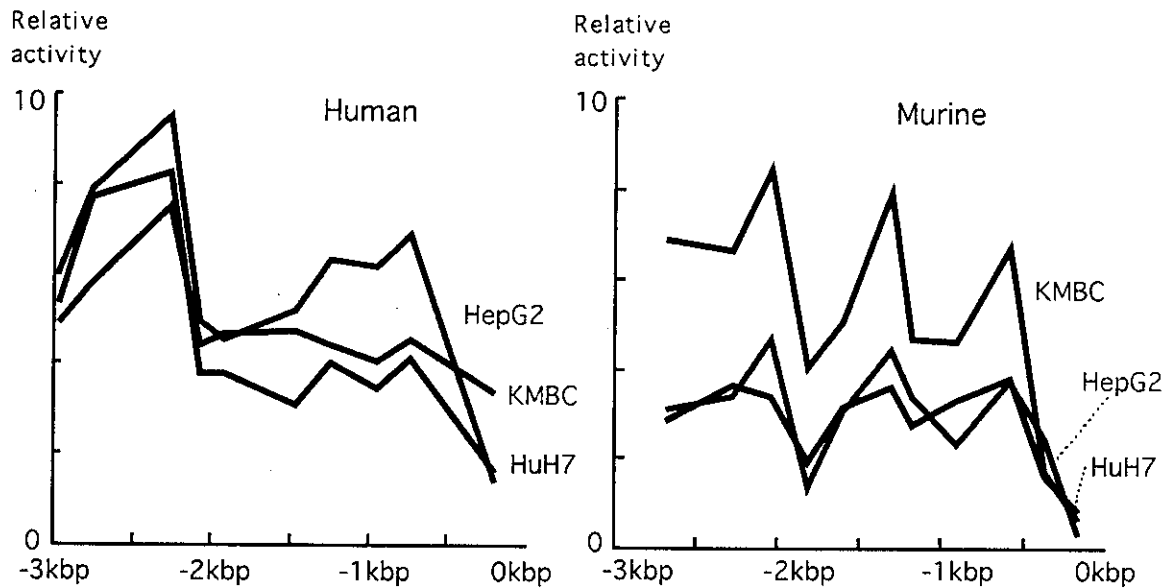


図8: Deletional analysis of promoter activities of 5'-flanking region of human and murine cytochrome 19 gene in cytochrome-expressed cell lines.

## マウス PDC-E2 cDNA のクローニング

金沢大学医学部・第一内科 小林 健一  
 協同研究者：加賀谷真希子，大野秀棋  
 金子周一

### はじめに

抗ミトコンドリア抗体，ないしその対応抗原である pyruvate dehydrogenase complex E2 component (PDC-E2) は，原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病因とは直接関係しない，いわゆる epiphenomenon であるとする考えがある一方，病因とは直接関連するとの考えもあり未だ明らかではない<sup>1), 2)</sup>。よって，PBC の病態解明のために胆管上皮細胞で PDC-E2 遺伝子を強制発現する実験モデルを作製し，in vivo において PDC-E2 の役割を解析する必要がある。そこで，これまでに未報告であったマウス PDC-E2 遺伝子の cDNA をクローニングし，マウス実験モデル作製のための基礎的検討を行った。

### 材料と方法

マウス PDC-E2 cDNA のクローニング：C57/BL マウスの肝臓から FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen Corporation San Diego, CA, USA) により調整した 1 mg の mRNA を用い，reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-nest-

ed PCR) を用いてクローニングを行った。reverse transcriptase の反応には 6 bp のランダム primer と SuperScript II (GIBCO BRL Grand Island, NY USA) を用い，42℃ で 50 分間反応させた。Nested PCR には TaKaRa EX Taq (TaKaRa BIOMEDICALS, Tokyo, Japan) を用いた。プライマーは 5'側はヒト PDC-E2 の塩基配列をもとに<sup>3)</sup>，また 3'側はこれまで我々がクローニングしたマウス PDC-E2 の 3'非翻訳領域の塩基配列をもとに作製した。1st PCR のプライマーには，5'-TTACTGCTGCAGCTTTTGGGGT CGCCCG-3' と 5'CCC TGCACTAGGAGTG TCC AGCTTTAAACTGATGT-3'，そして 2nd PCR のプライマーには 5'-AGTCTTCCCCCGCATCAGAAGGTTCCATTGCCT-3' と 5'ATAATGTCAGCAGAGAAAGAGTAGAAGTTCCTGGG-3' を用いた。PCR 産物を Eukaryotic TA Cloning Kit (Invitrogen Corporation San Diego, CA, USA) を用いてサブクローニングし，塩基配列を決定した。

### 結果

リーダーペプチド以下のマウス mature PDC-E2 cDNA の ORF を含む 1713 bp をクローニングし塩基配列を決定した。ヒト PDC-E2 cDNA<sup>3)</sup> と比較して 86.1% の相同性であった。また AMA の重要な対応エピトープ領域とされる lipoyl-binding region (LBR) である VETDKATVGFESLEEC (42-57aa) と IETDKATIGFEVQEEG (169-184aa) を 2 箇所にて認めた。この 2 個の LBR は，ヒトの LBR と完全に

一致していた。またクローニングされたマウスPDC-E2はHepG2細胞で一過性に強発現可能であり、ウェスタンブロットにて一つの蛋白産物として認められた。(データ非提示)

### 考案・結語

慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) は、PBCにおいて観察される特徴的な病理学的所見であり、胆管上皮自体が抗原提示能を有することも考えられている。従来、抗ミトコンドリア抗体ないし抗pyruvate dehydrogenase complex-E2 component (PDC-E2) 抗体は、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病因とは直接関係しない、いわゆるepiphenomenonであるとされてきた<sup>4)</sup>ものの、近年病因に直接関連する可能性も示唆されている<sup>1, 2)</sup>。よって、PBCの病態解明のために胆管細胞上皮でPDC-E2遺伝子を強制発現する実験モデルを作製し、in vivoにおいてPDC-E2の役割を解析する必要がある。今回、これまで未報告であったマウスPDC-E2のcDNAをクローニングした。塩基配列の解析ではAMAの重要な対応エピトープ領域とされるlipoyl-binding regionはヒトのPDC-E2と一致していた。また培養細胞において一過性に強制発現することが可能であったことから、今後胆管上皮においてPDC-E2を過剰発現する<sup>5)</sup> transgenic mouse を作製し、PDC-E2ないし抗ミトコンドリア抗体のPBCの病態における意義を検討してゆきたい。

### 参考文献

- 1) Joplin R, Lindsay JG, Hubscher SG et al.: Distribution of dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) in the liver and portal lymph nodes of patients with primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study. *Hepatology* 14:442-447, 1991.
- 2) Van de Water J, Ansari AA, Surh CD et al.: Evidence for the targeting by 2-oxo-dehydrogenase enzymes in the T cell response of primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 146:89-94, 1991.
- 3) Coppel RL, McNeilage LJ, Surh CD et al.: Primary structure of the human M2 mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis: dihydrolipoamide acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7317-7321, 1988.
- 4) Sherlock S, Dooley J.: *Diseases of the Liver and Biliary System*. 10th ed., Blackwell Sci Pub., London, 239-252, 1997.
- 5) 加賀谷真希子, 大野秀棋, 金子周一, 他: ヒトおよびマウスサイトケラチン19プロモーター領域のクローニングとプロモーター活性の検討. 平成10年度厚

## 原発性胆汁性肝硬変におけるT細胞の解析およびサイトケラチン7 (CK7) を用いた進行度判定

岡山大学医学部・第一内科 辻 孝夫  
協同研究者: 山本和秀, 東 俊宏  
坂口孝作, 下村宏之

### はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中年女性に好発する予後不良な疾患で、末期では肝移植以外に有効な治療法がなく、わが国でも最近生体部分肝移植が行われている。本症の病因は未だ明らかでないが、肝内胆管周囲に多数のリンパ球やマクロファージが浸潤していること、他の自己免疫疾患を合併しやすいことなどより、自己免疫学的機序による胆管病変が推察されている<sup>1)</sup>。しかし現在まで、胆管上皮細胞における標的抗原の解析とそれに反応しているT細胞の解析は不十分で未解決の問題が多く残されている。そこで我々は肝組織中および末梢血中のT細胞レパトアを解析することにより、PBC症例において病因と関わるT細胞クローンが存在するか否かにつき検討を試みた。

一方、PBCの病期分類としてはScheuer<sup>2)</sup>やLudwig<sup>3)</sup>の分類が用いられているが、前者は胆管病変の進展、後者は線維化や病変の広がりに基づく分類であり、臨床病態との間に乖離する症例がある。サイトケラチンは細胞の由来により特異的な分子を発現しており、CK7は肝では通常胆管上皮細胞のみに発現されている<sup>4)</sup>。しかし、胆汁うっ滞の病態では肝細胞の形質変化が認められ、肝細胞にも発現が認められることが知られている<sup>5)</sup>。そこで、PBCにおけるCK7の発現を免疫組織学的に検討することにより、胆汁うっ滞の程度を把握できる可能性につき検討した。

### 対象と方法

#### 1. T細胞レパトアの解析

当科において臨床的および組織学的にPBCと診断され、プレドニゾン治療により経過良好である3例を対象にした。生検肝組織および治療前後の末梢血単核球 (PBMC) から、total RNAを抽出後、cDNAに変換した。T細胞レセプターのβ鎖 (TCR Vβの各ファミリー) に特異的なプライマー (Vβ1-24) およびビオチン標識Cβプライマーを用いてPCRにて増幅した。さらに増幅されたPCR産物についてSSCP法を用いて解

析した<sup>6)</sup>。すなわち、PCR産物を変性後、電気泳動し、プロテイング後、アルカリフォスファターゼで発色し、X線フィルムに感光した。特定のバンドについては、ゲルから切り出し、抽出後、PCRにて増幅し、direct sequenceにより塩基配列を決定した。

## 2. CK7の発現と進行度判定

CK7の発現についてはPBC112例のホルマリン固定・パラフィン包埋切片を作成し、抗CK7モノクローナル抗体(DAKO)を反応後、SABC法を用いて染色しDABにて発色した。CK7の染色パターンと生検時の各種肝機能検査と対比した。

## 結 果

### 1. T細胞レパトアの解析

肝組織中のTCR V $\beta$ のSSCP法による解析では、ほとんどのV $\beta$ ファミリーにおいて、スメアと共に数本のバンドが検出され、クローナルに増殖しているT細胞の存在が示された。他の2症例においてもほとんどのV $\beta$ においてクローナルなT細胞の集積が観察された。さらに症例1において、2カ所の離れた部位からの生検組織でTCRを検討したところ、同一のバンドが検出され、肝組織内に共通のクローンが存在していることが示された。肝組織内と末梢血におけるT細胞レパトアを比較すると、肝組織中に認められたクローンと同一のものが、PBMCのCD4あるいはCD8の分画に認められ、両分画に肝組織中と同一のクローンが存在することが示された(図1)。

さらに、ゲルよりバンドを切り出し、CDR3領域のアミノ酸配列を検討すると、共通のアミノ酸配列が認められ、対応する抗原ペプチドが限定されている可能性が示唆された。

一方、3症例において治療前後でのT細胞レパトアを比較すると、治療前と同一のクローンが治療後も存在している場合と、治療後消失しているクローンが認められた。多くのV $\beta$ においては治療後クローナルな集積が減少する傾向にあった。

### 2. CK7の発現と進行度判定

正常肝においてはCK7の発現は胆管上皮細胞に限定されていた。一方、PBCにおいては、胆管消失や胆汁うっ滞の病態に応じて、門脈域の増殖胆管、細胆管、肝細胞に発現が認められた。その発現程度より、門脈域の胆管や増殖細胆管のみに発現が認められるもの(Stage 1)、さらにperiportalの肝細胞にも発現が認められるもの(Stage 2)、門脈域周囲の肝細胞のみならず小葉内の肝細胞に発現が認められるもの(Stage 3)、ほとんどの肝細胞に発現が認められるもの(Stage 4)に分類された。生検時の肝機能検査

とStageを対比してみると、胆道系酵素はほとんど相関を示さず、ビリルビンはStageの進行と共に増加する傾向を認めた(図2)。

## 考案・結語

### 1. T細胞レパトア

PBCにおける胆管障害の機序については自己免疫的機序が推察され、胆管上皮細胞に呈示された自己抗原をT細胞が認識し、障害を惹起することが示唆されている。しかし、自己抗原の同定、細胞障害性のT細胞についてはまだ解明されていない。我々はPBC肝組織中に浸潤しているT細胞の解析の目的で、T細胞レパトアの検討を行い、これらのT細胞がスーパー抗原などによる特定のT細胞クローンの集積ではなく、抗原特異的に複数のT細胞クローンから成ることを報告してきた<sup>6)</sup>。今回の検討では、異なる2カ所からの肝組織中に共通のクローンが存在すること、同一患者の末梢血中CD4またはCD8の分画に同一のクローンが存在することを明らかにした。さらにこれらのクローンについて、CDR3領域のアミノ酸配列の解析より、共通のアミノ酸配列が存在することから、特定の抗原に反応しているT細胞の可能性が推察される。肝組織中の異なる部位に存在するT細胞クローンについては、病因と関わるT細胞クローンの可能性があり、今後より詳細に検討する必要がある。

本症に特徴的に出現する抗ミトコンドリア抗体の対応抗原がピルビン酸脱水素酵素(PDC)であることが判明している<sup>7)</sup>。またPBCの胆管上皮細胞にPDC類似の抗原が発現されており、PBCの肝組織中や末梢血中にPDCと反応するT細胞が存在することが報告されている<sup>8)・9)</sup>。今後、PDCあるいはmolecular mimicryを示す未知の抗原が胆管上皮細胞における標的抗原であるか否か検討する必要がある。

またプレドニゾン治療を行い、良好な経過を示した3症例において、治療前後の末梢血クローンを比較すると、治療前に存在したクローンの一部は継続して存在し、また一部は治療後消失していた。また全体的に治療後クローン数の減少を認めている。このことはプレドニゾンによる治療により病因と関わるクローンが減少消失した可能性が示唆される。肝組織中の病因と関わりと推察されたクローンについて末梢血中での推移をさらに検討する予定である。

### 2. CK7の発現による進行度判定

PBCの病期分類として、ScheuerやLudwigの組織学的分類が良く用いられている。Scheuerの分類では胆管病変の推移に注目し、florid bile duct lesionをみとめるI期からIV期肝硬変までに分けられている。一方、



Ludwigの分類では病変の部位的な広がりや線維化の状態から、portalに限局するI期から肝硬変のIV期に分類している。しかし、PBCの組織学的所見は多彩で、部位差も認められ、必ずしもこれらの分類でその病態を把握できない。またこれらの分類は炎症や線維化の程度による分類であり、胆汁うっ滞の程度を表現していない。

肝細胞と胆管細胞は肝芽細胞から分化し、異なる形質を発現しているが、病的な状態では肝細胞が胆管細胞様の形質を発現したり、その逆もあることが知られている<sup>9)</sup>。サイトケラチンは細胞の由来に基づき異なる分子を発現しており、肝細胞と胆管細胞もそれぞれ異なる種類のサイトケラチンを発現している。特にCK7は正常肝では胆管上皮細胞のみに発現され肝細胞に発現されていないことから、胆管細胞の指標となることが知られている。またPBCや原発性硬化性胆管炎などの胆汁うっ滞を示す病態では、肝細胞が胆管細胞様形質を示し、CK7を発現することが報告されている<sup>5)</sup>。そこでPBCにおいて、肝細胞におけるCK7の発現を検討したところ、胆管の変性・消失に伴い増殖胆管、periportal hepatocytesさらに小葉内の肝細胞に発現が認められることが示され、胆汁うっ滞の指標として有用であることが示唆された。

さらに経過観察を行うことが可能であった2症例についてCK7の発現を検討すると、免疫抑制剤の使用により臨床経過良好であった症例では、治療前には肝細胞に発現が認められていたが、治療後胆汁うっ滞の改善と共にその発現が認められなくなっていた。逆に進行した症例では、初回には胆管細胞のみの発現であったものが、2回目では肝細胞にも発現するようになり、病期の進展が把握可能であった。

以上のことから、CK7を用いたstagingは従来の分類の欠点を補うもので、胆汁うっ滞の病態の把握に有用であると考えられた。今後、CK7から見たStage分類とPBCの予後との関係を検討する必要があると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Sherlock S, Dooley J: In: Primary biliary cirrhosis. Diseases of liver and biliary system. Ed9, London, Blackwell, 1993: 236-248.
- 2) Scheuer PJ. In: Biliary disease. Liver biopsy interpretation. Ed. 5, London, Saunders, 1994: 36-61.
- 3) Ludwig J, Dickson ER, McDonald GSA: Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1978; 379:103-112.

- 4) Van Eyken P, Sciote R, Van Damme B, et al: Keratin immunohistochemistry in normal human liver. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient. Virchow Arch A 1987; 412:63-72.
- 5) Van Eyken P, Sciote R, Desmet VJ: A cytokeratin immunohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can express 'bile duct-type' cytokeratins. Histopathology 1989; 15:125-135.
- 6) Ohmoto M, Yamamoto K, Nagano T, et al: Accumulation of multiple T-cell clonotypes in the liver of primary biliary cirrhosis. Hepatology 1997; 25:33-37.
- 7) Van de Water, Gershwin ME, Leung P, et al: The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. J Exp Med 1988; 167:1791-1799.
- 8) Van de Water J, Ansari A, Prindiville T, et al: Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. J Exp Med 1995; 181:723-733.
- 9) Jones DEJ, Palmer JM, James OFW, et al: T-cell responses to the components of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. Hepatology 1995; 21:995-1002.

図1 TCRのSSCP解析

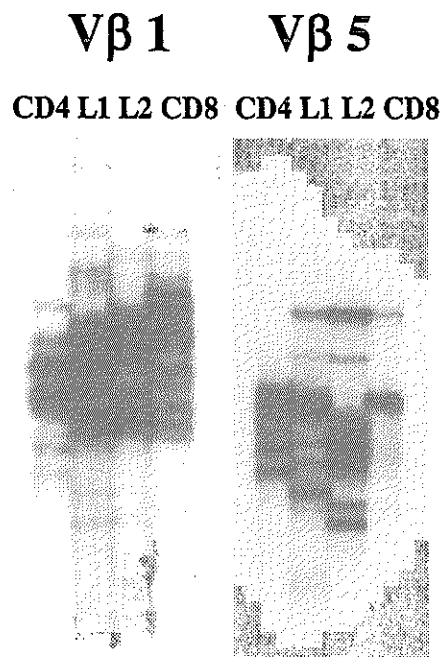
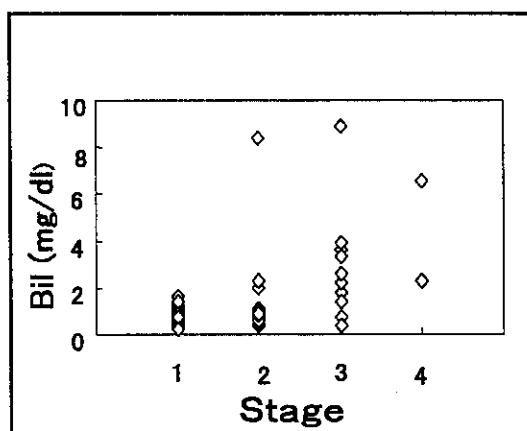


図2 BilとStageの相関



## Concanavalin A 誘発マウス肝炎モデルにおける免疫学的肝細胞障害発症機序と性差の検討

旭川医科大学・第二内科 牧野 勲  
協同研究者：中村公英

### はじめに

現在、種々の薬剤を用いた肝障害動物モデルが作成され検討されている。近年Tiegらにより、マウスにT細胞に対しマイトジェン活性を持つConcanavalin A (Con A) を静脈内投与することにより、T細胞を活性化し、サイトカイン産生亢進を介した、免疫学的肝炎モデルが報告されている<sup>1)</sup>。一方、自己免疫性肝炎を含む自己免疫疾患は女性に好発し<sup>2)</sup>、免疫機能に性差が存在することが推測されているが<sup>3)</sup>、その機序については未だ不明な点が多い。そこで今回、本肝炎モデルを用いて、免疫学的肝細胞障害発症機序を検討するとともに、肝細胞障害の重症度とサイトカイン産生能に性差が存在するか否かについて検討した。

### 方法

7-8週令のBalb/c雌雄マウスを用いて、Con A (Type IV, Sigma社) 0, 10, 20, 30mg/kg体重を生理食塩水0.3mlに溶解、尾静脈より1回静注し、肝炎モデルを作製した。24時間後雌雄マウスを屠殺し、血清GPT値を酵素法にて測定した。また、肝臓を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、肝細胞の壊死炎症の程度をA0:None, A1:Minimal to Mild, A2:Moderate, A3:Severeの4段階に分類し、比較検討した。血中サイトカインの測定は雌雄マウスにCon A 20 mg/kgを投与後、2,

4, 6, 8時間で屠殺し、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine-4 (IL-4), Interleukine-10 (IL-10) (以上Genzyme社キット), Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) (IBL社キット)の血中濃度をELISA法で測定し、比較検討した。また、雌雄マウスにTNF- $\alpha$  2 $\mu$ gを生理食塩水0.3mlに溶解、尾静脈より1回静注し、2時間後の血中MIP-2産生量を比較検討した。統計学的検討は、血清GPT値ならびに血中サイトカイン濃度の結果をMean $\pm$ SEで示し、雌雄間の有意差検定は分散分析(ANOVA)にて行った。

### 結果

#### 1. 血中GPT値の経時変化と性差の検討

雌雄マウス共、Con A投与後8時間をピークに血中GPTの上昇が認められたが、その上昇は雌マウスで顕著であった(図-1)。また、雌雄マウス共Con A投与量の増加とともに血中GPT値は上昇し、Con A 20, 30mg/kg体重投与24時間後の血中GPT値は、雄マウスに比べ雌マウスで有意に高値であった(図-2)。

#### 2. 組織学的検討

Con A 10mg/kg投与24時間後の肝組織像では、雌雄マウス共門脈域に同程度の炎症性細胞浸潤が認められたが、肝細胞壊死像は観察されなかった。Con A 20mg/kg投与群では雌マウスにおいて肝小葉中間帯に帯状の壊死巣の出現が認められたが、雄マウスでは壊死巣は観察されなかった。さらにCon A 30mg/kg投与群では、雌マウスにおいて広汎な壊死巣を認め、また雄マウスにおいても、肝小葉中間帯にA2相当の壊死巣の出現を認めた。すなわち、Con Aの投与量の増加とともに、肝細胞の壊死炎症の程度が強くなり、特にCon A 20, 30mg/kg投与では、雄マウスに比べ雌マウスでより強い壊死炎症像が認められた(図-3)。

#### 3. 各種サイトカイン産生能における性差の検討

Con A 20mg/kg投与2, 4, 6, 8時間後の血中TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ はいずれの時間においても雄マウスに比べ雌マウスで有意に高値であった(図-4)。しかし、血中IL-4はCon A投与2時間後に雌マウスで有意に高値であったが、6, 8時間後では逆に雄マウスにおいて有意に高値であった。血中IL-10はいずれの時間においても雌雄マウス間で差は見られなかった。一方、血中MIP-2はINF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ と同様雄マウスに比べ雌マウスで有意に高値であったが、TNF- $\alpha$ 投与2時間後のMIP-2産生量には雌雄差は認められなかった(図-5)。

### 考察

Con A誘発肝炎の発症機序としては、Con AによりT

細胞が活性化され、過剰産生されたサイトカインによって肝に特異的な壊死炎症が生じるとされている。その発症に関わるサイトカインとしては、中和抗体やノックアウトマウスを用いた検討からINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインが重要な役割を担っており<sup>4-7)</sup>、ヒトの自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの研究に有用なモデルと考えられている。一方、自己免疫性肝炎を含めた自己免疫疾患は女性に好発し<sup>2)</sup>、さらに自己免疫疾患モデル動物においても雌においてより早期に重症な疾患が発症することが古くから知られていること<sup>8)、9)</sup>などから、免疫機能に性差の存在が示唆されている。しかし、その機序については未だ不明な点が多く残されている。

以上のことから本研究では、Con A肝炎モデルを用いて免疫学的肝細胞障害発症機序における性差の関与をサイトカイン産生能の面から検討した。その結果、組織学的変化および血清GPT値の上昇の程度から、本モデルにおいても雌マウスでより重度の肝細胞障害が生じることが明らかとなった。また、本肝炎モデルの肝細胞障害発症に関与するINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインが雌マウスでより過剰産生されることが明らかとなった。さらに、今回新たにC-X-Cケモカインに属し、白血球遊走活性化因子であるMIP-2が本肝炎モデルの発症と性差に関与していることが明らかとなった。MIP-2は主としてTNF- $\alpha$ により誘導産生されることが報告されていることから<sup>10)、11)</sup>、TNF- $\alpha$ 投与によりMIP-2産生に性差が生じるか否かを検討したが、雌雄差は見られなかった。従って、Con A投与によるMIP-2産生能の性差は前述のTNF- $\alpha$ 産生量が雌マウスで高値であることによると推測された。

Con A肝炎モデルにおけるこれまでの検討では、過剰産生された炎症性サイトカインにより引き起こされる肝細胞障害機序としては、特にTNF- $\alpha$ による肝細胞のアポトーシスの誘導が主因とされてきた<sup>12)、13)</sup>。しかし最近、過剰産生されたINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ により肝類洞内で血球成分の粘着、鬱血が生じ、その結果類洞の血流障害から、肝細胞の壊死が起こるとする説が報告されている<sup>14)</sup>。一方、肝虚血再灌流モデルやエンドトキシンモデルなどの他の肝障害モデルにおいては、肝類洞内で血球成分の粘着、鬱血が肝細胞障害の主因であることが明らかにされている<sup>15)、16)</sup>。さらにこれらのモデルでは、サイトカインによる類洞内皮細胞の障害、接着因子の発現亢進による類洞内への白血球遊走活性化が類洞の血流を障害し、さらには活性化白血球から産生されるプロテアーゼ、活性酸素による直接的な肝細胞障害機序が考えられている<sup>17)、18)</sup>。今回の検討ではマウスの白血球遊走活性化因子として最も強力なケモカインとされる<sup>19)</sup>MIP-2がCon A投与早期から過剰産生されていることから、本肝炎モデ

ルにおいても白血球が重要な役割を担っていることが考えられる。現在組織学的に浸潤白血球について更に検討を行っている。

一方、今回の検討により本肝炎モデルにおいて雌マウスでより重度の肝細胞障害が生じ、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MIP-2などのサイトカイン産生の雌雄差が明らかとなったが、このような性差がいかなる機序で生じるのかについては明らかではない。これまでの多くの報告では、性ホルモンの関与が示唆されている<sup>3)、19)、20)</sup>。すなわち、雌マウスにおいてテストステロン投与や卵巣摘出は自己免疫疾患発症を遅延ないしは軽減すると報告されている<sup>8)、9)、20)</sup>。我々も予備実験において雌マウスにテストステロンを前投与するとCon A肝障害が軽快し、雄マウスをあらかじめ去勢すると肝障害が重症化することを観察している。今後より詳細な性差の発症機序を検討するとともに、本肝炎モデルを用いて自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性疾患の新たな治療法の開発につなげたいと考えている。

## 結 語

Con A誘発肝炎は雌マウスにおいてより重症の肝細胞障害が発現し、その発症機序に炎症性サイトカインとケモカイン産生能の性差が関与すると考えられた。本モデルは免疫学的肝細胞障害発症機序とその治療法を検討する上で有用なモデルであると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Tiegs G, Hentschel J, Wendel A: A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90:196-203.
- 2) Beeson PB: Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* 1994; 96:457-462.
- 3) Schuur AHWM, Verheul HAM: Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J steroid Biochem* 1990; 35:157-172.
- 4) Mizuhara H, O'Neill, Seki N al: T cell activation-associated hepatic injury: Mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 179:1529-1537.
- 5) Gantner F, Leist M, Lohse AW et al: Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: The role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995; 21:190-198.
- 6) Kusters S, Gantner F, Kunstle G et al: Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A. *Gastroenterology* 1996; 111:462-471.

- 7) Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y: Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN- $\gamma$   $-/-$  mice, but not in TNF- $\alpha$   $-/-$  mice. *J Immunology* 1997; 159:1418-1428.
- 8) Roubinian JR, Papoian R, Talal N: Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. *J Clin Invest* 1977; 59:1066-1070.
- 9) Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS et al: Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp Med* 1978; 147:1568-1583.
- 10) Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I et al: Chemokine networks in vivo: Involvement of C-X-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo. *J Immunology* 1997; 159:3595-3602.
- 11) Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ et al: Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infect Immun* 1997; 65:3847-3851.
- 12) Seino K, Kayagaki N, Takeda K et al: Contribution of Fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology* 1997; 113:1315-1322.
- 13) Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD et al: Disparate roles for TNF- $\alpha$  and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunology* 1998; 160:4082-4089.
- 14) Miyazawa Y, Tsutsui H, Mizuhara H et al: Involvement of intrasinusoidal hemostasis in the development of Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1997; 27:497-506.
- 15) Shibuya H, Ohkohchi N, Tukamoto S et al: Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 1997; 26:113-120.
- 16) Ohira H, Ueno T, Torimura T et al: Leukocyte adhesion molecules in liver and plasma cytokine levels in edotoxin-induced rat liver injury. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30:1027-1035.
- 17) Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ et al: Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol* 1997; 272:G1195-G1200.
- 18) Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG et al: Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: Roles for macrophage inflammatory protein-2 and kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27:505-512.
- 19) Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N: Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 1985; 121:531-551.
- 20) Dalal M, Kim S, Voskuhl RR et al: Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunology* 1997; 159:3-6.

図1 Con A (20mg/kg) 投与後の血中GPT値の変化

