

3. 家系例一次調査 (2002年1月集計時) : 家系例を保有している施設は7施設、計11家系 (姉妹5、母娘3、姉弟1、父娘1、兄妹1例) であった。
4. a-PBCからs-PBCへの累積移行率の検討 : a-PBCの30%は約15年でs1-PBCに移行し、18%は約18年でs2-PBCに移行した。また、1989年12月末までの既登録例の検討では、30%が約7年でs1-PBCへ、18%が約7年でs2-PBCへ移行しており、明らかに移行までの期間の延長が認められた。

D. 考察

過去の全国調査最終集計では、既登録例の回収率は60-70%程度であること、1989年以降の年間発生数が2-300例前後で推移していることから、最終的には、第11回登録症例数は増加する見込みであるが、その臨床像および予後については今回の結果を大きく覆す結果とはならないものと考えられる。全国調査登録例における肝移植症例は1996年より報告があり、年々増加しており今後長期に経過観察できる体制にある。また家系例調査については発症因子解明のための免疫遺伝学的検討を目的としてさらに二次調査を進める予定である。

今や診断時a-PBCの占める割合は80%以上となり、a-PBCの取り扱いが臨床医学的、医療経済的関心事となりつつある。欧米におけるa-PBCのnatural historyの検討では、年齢・性の一致した健常者群と比較してa-PBCの生存率は診断後11-12年目以降に有意な相違が認められることが報告されている。今回の全国調査登録例のa-PBCからs-PBCへの移行率の検討から、本邦においてもa-PBCの一部が年余にわたって徐々にs-PBCへと進行することを裏付ける結果が得られた。また、1989年以前に診断された症例と比較してs-PBCに移行するまでの期間延長が認められことは、単に早期診断例の占める割合の増加だけでなく治療効果による影響も示唆され、a-PBCに対する治療必要性の問題の観点からも今後検討すべき課題と考えられた。

E. 結論

第11回PBC全国調査で、既登録症例995例と新規登録404例の報告が得られ、総登録症例は4765例となった(中間集計)。これら登録症例中、肝移植症例は37例、家系例は11例であった。診断時a-PBCからs-PBCへの累積移行率の検討から1989年以前の症例と比較して無症候の段階から症状が発現するまでの期間延長が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano T, Inoue K, Hirohara J et al: Long-term prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC) in Japan and analysis of the factors of stage progression in asymptomatic PBC (a-PBC). *Hepatology Research* in press

2. 学会発表

- 1) 廣原淳子、仲野俊成、井上恭一：原発性胆汁性肝硬変(全国調査)による肝移植適応基準の再評価：第87回日本消化器病学会総会、シンポジウム、肝移植の適応基準の再評価、2001.4.20
- 2) 仲野俊成、井上恭一、廣原淳子他：日本における原発性胆汁性肝硬変(PBC)の長期予後の推移と無症候性PBC(a-PBC)における病期進展の要因分析：第37回日本肝臓学会総会、ワークショップ、PBCの病態と治療、2001.5.18

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

(2) 原発性胆汁性肝硬変症におけるbezafibrate投与の有効性に関する検討

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学 第三内科 助手

研究要旨：ヒト培養肝癌細胞株(Hep G2)においてMDR3が基礎発現あり、BFがMDR3遺伝子の転写レベルに作用することによりMDR3 蛋白の合成が促進されることを明らかにした。この結果より、BFがPBC患者の肝細胞において転写レベルで作用することによりMDR3蛋白質の発現を増強させることで胆汁酸排泄を促進し、病態の改善に重要な役割を果たしている事が示唆された。

共同研究者

宮崎浩彰、松本隆之
関西医科大学 第三内科

A. 研究目的

ヒト培養肝癌細胞 (HepG2) を用いて遺伝子・蛋白質レベルでBFがMDR3の発現に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

ヒト培養肝癌細胞 (Hep G2) 株を用いて一定濃度のBFを添加し、以下の実験に供した。1) ヒトMDR3 cDNAを検討し、MDR3 mRNAを特異的に検出し得るアンチセンスオリゴ核酸を合成した。BF添加24時間後のHep G2株を用いてハイブリダイズを行った後に、AP標識-BCIP/NBT染色を行った。2) 一次抗体に抗ヒトMDR3マウス抗体 (モノクローナル、IgM型)、二次抗体として蛍光標識抗マウスIgGヤギ抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

C. 研究結果

1) MDR3 mRNAの発現は非添加群においても細胞質や核膜などに認められたが、細胞質における細顆粒ないし粒状の染色は添加群において明らかに増強された。2) BF非添加群においてもMDR3蛋白の発現を認め、Hep G2ではMDR3が基礎発現していることが明らかとなった。BF添加後のMDR3蛋白の発現は簡易解析法による相対強度で明らかに増強していた。

D. 考察

MDR3を基礎発現しているHep G2株において、BFはMDR3 mRNAや蛋白の合成を促進させることが明らかとなり、BFがMDR3遺伝子の転写レベルに作用することが示唆された。我々はPBC患者の肝細胞においてMDR3蛋白の微弱な発現があることを組織学的に確認しており、ヒト肝細胞でも今回の検討と同様にBFが転写レベルで作用することにより肝細胞中のMDR3蛋白質の発現を増強させることで胆汁酸排泄を促進し、病態の改善に重要な役割を果たしているものと考えられた。

E. 結論

BF投与は MDR3 mRNA 発現誘導を介してMDR3 蛋白を増加させる事が明らかとなり、この事によりPBC患者の病態を改善し得るものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 井上恭一、廣原淳子、高須雅史：自己免疫性疾患の治療-AIH、PBCなどの治療の実際と今後-慢性肝炎最新の治療-飯野四郎編、中外医学社、東京、2001：205-217.
- 2) 廣原淳子、宮崎浩彰、井上恭一：慢性肝疾患の診断と治療の最前線5原発性胆汁性肝硬変、日医雑誌：126：MK17-20、2001.

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

- (1) 潜在性のPBCに関する研究
- (2) PBCにおける樹状細胞機能異常

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨：(1) 潜在性の原発性胆汁性肝硬変の検索を行う目的で、PBC血縁者の調査、とくに抗ミトコンドリア抗体(AMA)の精査を行った。肝機能検査正常の11例のうちimmunoblot法では3例にAMAが検出された。(2) Bezafibrate を投与したPBC患者では投与後にDCの一酸化窒素産生が抑制された。また、DCの一分画であるインターフェロン産生細胞はPBCで増加していた。PBCの発症・進展にDCが抗原特異的免疫応答の低下に加えて抗原非特異的免疫応答にも関与していると考えられた。

(1) 潜在性のPBCに関する研究

A. 研究目的

肝機能検査が正常であっても抗ミトコンドリア抗体(AMA)陽性で慢性非化膿性破壊性胆管炎を認める症例や、IIF法やELISA法でAMAが検出できないが、immunoblot法では検出可能である症例が存在する。このような症例は潜在性のPBCと考えられる。今回、潜在性のPBCの検索を行う目的で、PBCの家族調査を行った。

B. 研究方法

PBC患者の血縁者15人の同意を得て家族調査、とくにAMAの精査を行った。Immunoblot法については、抗原の供与および手技の御指導を帝京大学宮川浩先生に頂いた。

C. 研究結果

15人のうち4人は組織学的検索を行いPBCと診断した。他の11人は一般肝機能検査が正常であった。

この11人について AMA の検索を行うと IIF 法、ELISA法ではAMA, M2抗体が検出される例は無かった。しかし、immunoblot法では姉妹の3例(27%)にM2抗体が検出された。

D. 考察

PBCの血縁者には免疫学的検査異常が多い、またAMAの陽性率が高いとする報告がある。今回の検討から、感度の高いimmunoblot法を用いれば血縁者に潜在性PBCがさらに高率に検出されることが考えられる。本邦ではPBCに対して主に血縁者をドナーとする生体肝移植が施行されているが、脳死肝移植に比し再発が高率であることが報告されている。ドナーについては一般肝機能検査が正常であってもAMAの精査が必要と考えられる。

E. 結論

PBCの血縁者では潜在性PBCが高率であると考えられた。今後、症例数を増加し検討をすすめる予定で

ある。

F. 健康保険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

(2) PBCにおける樹状細胞機能異常

A. 研究目的

我々は、免疫応答の中心に位置する樹状細胞(DC)に着目して研究を行ってきた。現在までにPBCにおいてDCのT細胞幼若化能補助の低下があること、その原因として一酸化窒素(NO)の産生亢進があることを示した。今回、bezafibrate (BF) 投与前後でのDCのNO産生の変化について解析した。

また近年、生体内での主要なI型インターフェロン産生細胞(IPC)がDCの一分画であることが報告された。今回、PBC患者のIPCについての検討も行った。

B. 研究方法

1. BF投与を行ったPBC9例の投与前後でDCを採取し、SACS刺激下に培養し、培養上清中のNO濃度を測定した。
2. PBC14例、健常者13例の末梢血単核球分画からFACSを用いて、CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56陰性、CD4陽性の分画をDCとして、またそのうちCD123強陽性の分画をIPCとしてその数を算定した。

C. 研究結果

1. BF投与前のDCのNO産生能は健常者より有意に高値であった。BF投与後には、DCのNO産生は投与前に比較して有意に低下した。
2. PBCでは健常者と比し末梢血DC数には差がなか

った。しかし、末梢血IPC数はPBCでは健常者に比し有意に増加していた。

D. 考察

PBCにおけるBFの作用機序としてMDR-3やPPAR-a, bなどの関与が示唆されているが、BFには抗酸化作用があることも報告されている。また、PBCでは血清中および肝組織においてNO濃度が高いことが報告されている。今回の検討でBF投与によりDCのNO産生が抑制していることが示され、BFの作用機序の一つに抗酸化作用が関与していることが示唆された。

自己免疫疾患の発症には抗原特異的な免疫応答に加えて、サイトカインなどの抗原非特異的免疫応答が必要である。I型インターフェロンも自己免疫減現象の発症・顕在化に役割を担っていることが報告されている。今回、DCの一分画であるIPCについて検討を行い、PBCでは末梢血にIPCが増加していることを示した。今後インターフェロン産生能や肝組織における局在などの解析が必要である。

E. 結論

PBCでは、DCが抗原特異的免疫応答の低下に加え、I型インターフェロン産生など抗原非特異的免疫応答にも関与していると考えられた。

F. 健康保険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Akbar SMF, Yamamoto K, Miyakawa H et al. Peripheral blood T-cell response to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: role of antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Clin Invest* 31: 639-646, 2001.

2. 学会発表

第34回日本肝臓学会西部会シンポジウム PBCにおけるBezafibrate投与の樹状細胞一酸化窒素産生に及ぼす影響 SMF Akbar, 阿部雅則, 恩地森一 [肝臓 42(suppl 3), A456, 2001]

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

抗IL-10抗体投与による自己免疫性GVHR肝病変の進展

研究協力者 田中 直見 筑波大学臨床医学系消化器内科 教授

研究要旨：マウスgraft-versus-host reaction (GVHR) モデルに抗IL-10抗体を投与することで、肝内炎症細胞浸潤は増悪し、その際Th1 (IFN- γ)、Th2(IL-4) サイトカインmRNAの発現とも増加した。IL-10は自己免疫機序の関与した肝病変において免疫調節的働きをする可能性が示唆された。

A. 研究目的

マウスのMHCクラスIIの差に基づく移植片対宿主反応 (GVHR) において自己免疫機序の関与した肝病変が観察され、我々は本モデルにおいて早期からIFN- γ mRNAの発現、遅れてIL-10 mRNAの発現の上昇を認めることを報告した (J. Gastroenterol. Hepatol. 2000; 15: 443-451)。しかし、この病変は進展せず線維化にまで至らなかった。そこで、近年マウスで急性の肝障害をおこす Concanavalin A (Con A) に着目し、GVHRの肝病変にCon Aを投与することで、本モデルの肝病理所見の進展像が確認された (J. Gastroenterol. Hepatol. 2001; 16: 1149-1157)。しかし、これも線維化をおこすには至らなかった。近年IL-10には免疫を調節する働きがあることが報告されており、我々のGVHRモデルにおいてもIL-10が炎症を抑制するために病変が進展しないのではないかと考えた。そこで、本研究では病変進展とIL-10の関わりを解析するためマウスGVHRに抗IL-10抗体を投与し、その肝病変の進展の有無を確認し、肝内サイトカインプロファイルを検討した。

B. 研究方法

(bm12×B6)F1メスマウスに、ナイロンウールカラムを用いて分離したB6 spleen T cellsを 1×10^7 個静注しGVHRを導入。コントロール抗体と抗IL-10抗体はGVHR導入の4時間前に500mgをそれぞれ腹腔内投与した。各群とも炎症細胞浸潤が最大となる14日目に評価した。評価方法としてGVHRの指標のspleen indexを計測し、また肝組織所見の比較、NIH imageを用いて門脈周囲の炎症細胞浸潤域を計測した。さらに、Th1/Th2サイトカインバランスを見るためwhole liverよりRNAを抽出し、cDNAに逆転写してreal time PCR法により各群の肝内IFN- γ 、IL-4 mRNAを定量した。この際内部標準としてGAPDHを用いた。

(倫理面への配慮)

すべてのマウスは筑波大学動物実験取扱規定に基づき飼育管理された。また、実験の際は頸椎脱臼にて安楽死させたため、倫理面に問題がないと判断した。

C. 研究結果

Spleen index :

平均はnormal control群で2.9、GVHR群で15.9、コントロール抗体投与群で15.4に対し、抗IL-10抗体投与群で24.5と有意に増加していた($p < 0.0001$)。

肝組織所見 :

抗IL-10抗体投与群では門脈周囲の炎症細胞浸潤は拡大傾向にあり、GVHR同様胆管上皮細胞間にリンパ球の浸潤を認め、一部にはNSDC様の胆管も観察された。

炎症細胞浸潤域の計測 :

1プレパラートにつき同程度の門脈域5つの炎症細胞浸潤面積をNIH imageを用いて計測した。平均でGVHR群 $74836 \mu\text{m}^2$ 、コントロール抗体投与群 $62550 \mu\text{m}^2$ と差がないのに対して、抗IL-10抗体投与群で $218314 \mu\text{m}^2$ と有意に拡大していた($p < 0.0001$)。

サイトカインプロファイル :

IFN- γ を内部標準のGAPDH mRNAで割った値は、GVHR群では平均1.0に対して、抗IL-10抗体投与群では、2.4と増加していた。また同様にIL-4 mRNAに関してもGVHR群では平均2.6に対して、抗IL-10抗体投与群では、10.5と増加していた($p < 0.0001$)。

D. 考察

IL-10はマクロファージやTh1細胞にたいして抑制活性があるとされる。今回抗IL-10抗体でIL-10の働きを中和することにより炎症の程度は増悪した。この際Th1(IFN- γ)、Th2(IL-4)サイトカインmRNAの発現とも増加していた。IL-4mRNAの発現の増加は代償性の増加の可能性はある。しかしながら炎症は増悪しており、GVHRモデルにおいてIL-10は独特なimmunomodulativeな働きがあるのではないかと考えられさらに検討を要する。今回の実験においてはインターフェイス肝炎や線維化の所見は見られず、これらには、他の機序が関与するものと考えられた。

E. 結論

従来のマウスGVHRモデルに抗IL-10抗体を投与することで、肝内炎症細胞浸潤は増悪した。その際Th1 (IFN- γ)、Th2(IL-4)サイトカインmRNAの発現とも増加した。IL-10は自己免疫機序の関与した肝病変に

において免疫調節的働きをする可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

R. Unno, et al. Novel murine autoimmune-mediated liver disease model induced by graft-versus-host reaction and concanavalin A. J.Gastroenterol. Hepatol. 2001; 16: 1149-1157

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Con Aマウス肝炎モデルを用いた免疫学的肝細胞障害発症機序とその治療法の研究

研究協力者 牧野 勲 旭川医科大学附属病院院長

研究要旨：Con A 誘発マウス肝炎モデルは早期に肝内に CD4+Tリンパ球が浸潤し、その後肝小葉内に広範な肝細胞壊死が生じること、催炎性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β が肝細胞障害に関わっていることから、自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用なモデルとなることが報告されてきた。我々は本モデルにおいて、TNF- α によって誘導されるマウスCXCケモカインであるMacrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)が、多核白血球の肝局所への遊走と活性化を行い、肝障害発症に深く関わっていることを見いだした（論文1、2、3）。今回、抗凝固剤であるAntithrombin III (AT-III)が肝障害発症を阻止し、その作用機序としてTNF- α からのMIP-2産生を抑制すること、この作用はプロスタサイクリン産生を一部介することを明らかにした。

A. 研究目的

セリンプロテアーゼ阻害剤であるAntithrombin III (AT-III)は、抗凝固活性を有し、DICを合併する劇症肝炎などの重症肝疾患の治療に用いられている。また、エンドトキシン肝障害モデルや肝虚血再灌流肝障害モデルにおいて、催炎性サイトカインやCXCケモカイン産生抑制とプロスタサイクリン産生誘導を介し、多核白血球の肝浸潤を抑制し、肝細胞障害を抑制することが報告されている。そこで今回、Con A 肝障害モデルにおけるAT-IIIの投与効果とサイトカイン、ケモカイン、プロスタサイクリン産生に対する効果を検討した。

B. 研究方法

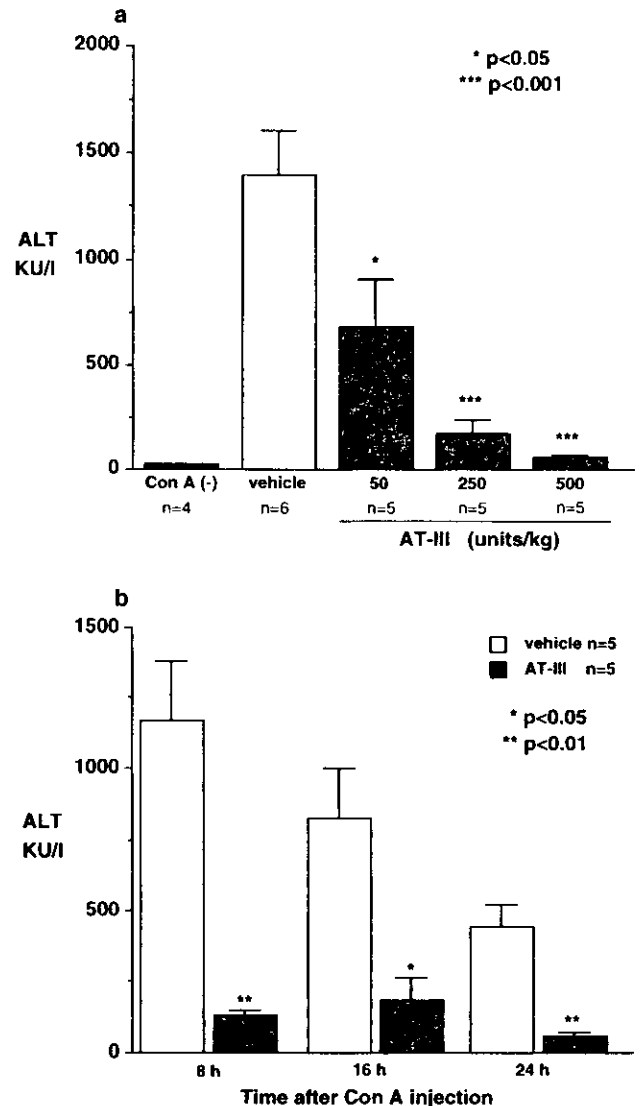
7週令の雌性Balb/cマウスにCon A 15 mg/kg BWを1回静注し、肝障害モデルを作製した。AT-III (50、250、500 units/kgBW、ヘキストマリオンセル社より供与)を0.2mlの蒸留水に溶解し、Con A投与30分前に静脈内投与した。Con A投与8、16、24時間後の血中GPT値と2、4、8時間後の血中TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、MIP-2、プロスタサイクリンの代謝物である6-keto-prostaglandin F1 α (6k-PG-F1 α)濃度を比較検討した。また、プロスタサイクリン産生抑制剤であるIndomethacine (5mg/kgBW)を1% NaHCO₃ 0.5 mlに溶解し、AT-IIIと同時間に腹腔内投与し、AT-IIIの作用機序を検討した。本実験にあたってはあらかじめ旭川医科大学動物実験委員会の承諾を得、さらにNIHの実験動物取り扱い規約に基づいて行った。

C. 研究結果

1. Con A誘発肝細胞障害に対するAT-IIIの効果

AT-IIIの前投与は Con A投与8時間後の血中GPT値を用量依存性に有意に低下した(図1a)。また、AT-III 500 units/kgの前投与は、Con A投与8、16、24時間後のいずれの時間においても血中GPT値を有意に低下した(図1b)。

図1. Con A誘発肝細胞障害に対するAT-IIIの効果



2. Con A投与後の血中サイトカイン、ケモカイン産生に対するAT-IIIの効果

Con A 投与2、4、8時間後の血中 MIP-2 濃度は、AT-III 500 units/kgの前投与により対照群に比べ有意に抑制された。しかし、血中TNF- α 、IFN- γ 、IL-10値はいずれの時間においても有意な変化は見られなかった(表1)。

表 1. Con A投与後の血中サイトカイン、ケモカイン濃度に対するAT-IIIの効果

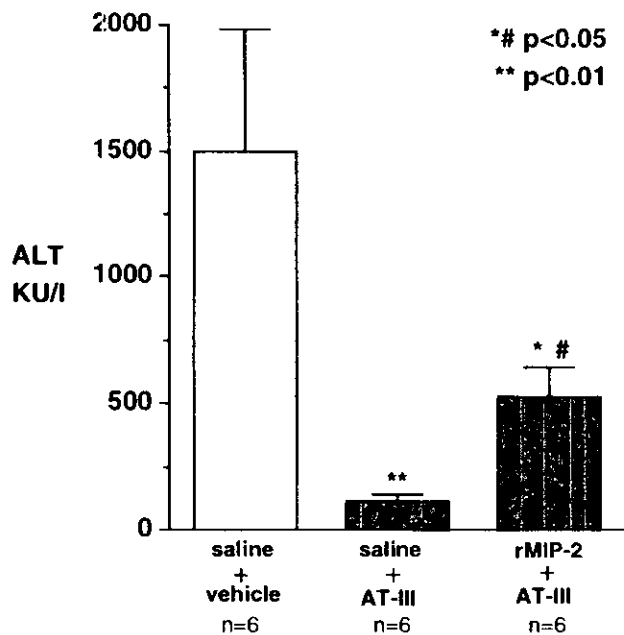
		Time after Con A injection			
		0 h	2 h	4 h	8 h
MIP-2 (pg/ml)	Vehicle (n=4)	< 1.0	397.0 \pm 56.0	336.0 \pm 26.6	124.2 \pm 23.7
	AT-III (n=5)	< 1.0	230.0 \pm 29.9 ***	163.6 \pm 19.9 ***	30.5 \pm 8.2 ***
TNF-α (pg/ml)	Vehicle (n=4)	< 15.0	432.6 \pm 114.7	148.8 \pm 9.2	28.2 \pm 10.3
	AT-III (n=5)	< 15.0	416.6 \pm 58.5	121.7 \pm 6.9	24.4 \pm 4.2
IFN-γ (pg/ml)	Vehicle (n=4)	< 5.0	546.3 \pm 37.0	765.0 \pm 78.5	1160.0 \pm 69.6
	AT-III (n=5)	< 5.0	552.4 \pm 81.3	659.0 \pm 63.5	1216.0 \pm 69.2
IL-10 (pg/ml)	Vehicle (n=5)	< 4.0	95.3 \pm 17.5	150.2 \pm 9.8	246.8 \pm 39.8
	AT-III (n=5)	< 4.0	103.9 \pm 9.2	191.5 \pm 48.8	195.6 \pm 22.4

*** p<0.001 AT-III vs vehicle

3. Con A誘発肝細胞障害に対するAT-IIIと recombinant MIP-2の併用効果

AT-IIIの肝障害抑制効果がMIP-2産生抑制作用によるか否かを検討するため、マウスrecombinant MIP-2 (4 μ g/マウス、IBL社)を生食0.5mlに溶解し、AT-IIIと同時間に腹腔内投与し、AT-IIIとの併用効果を検討した。MIP-2の前投与はAT-IIIの肝障害抑制効果を減弱させたが、その効果は完全ではなく、AT-IIIの肝障害抑制機序は他にも存在することが示唆された(図2)。

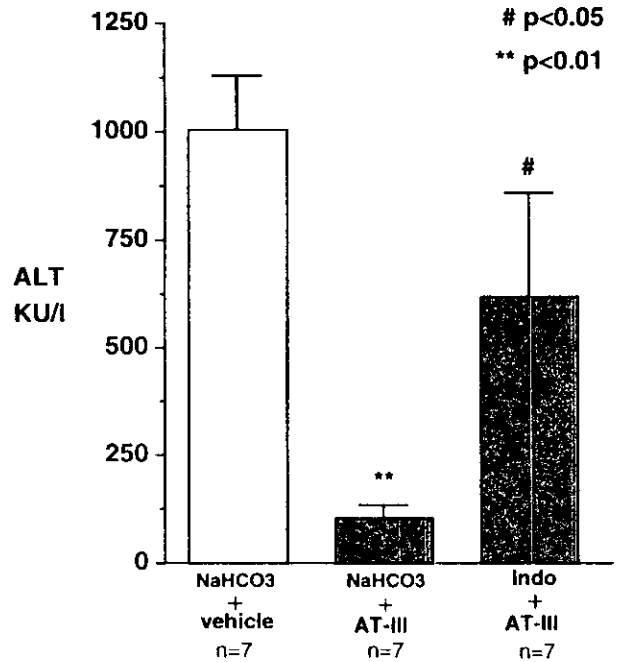
図 2. Con A誘発肝細胞障害に対するAT-IIIと MIP-2の併用効果



4. ConA誘発肝細胞障害に対するAT-IIIと Indomethacineの併用効果

AT-IIIの肝障害抑制効果がプロスタサイクリン産生抑制作用によるか否かを検討するため、プロスタサイクリン産生抑制剤であるIndomethacineをAT-IIIと同時間に腹腔内投与し、AT-IIIとの併用効果を検討した。Indomethacineの前投与はAT-IIIの肝障害抑制効果をほぼ完全に阻止した(図3)。

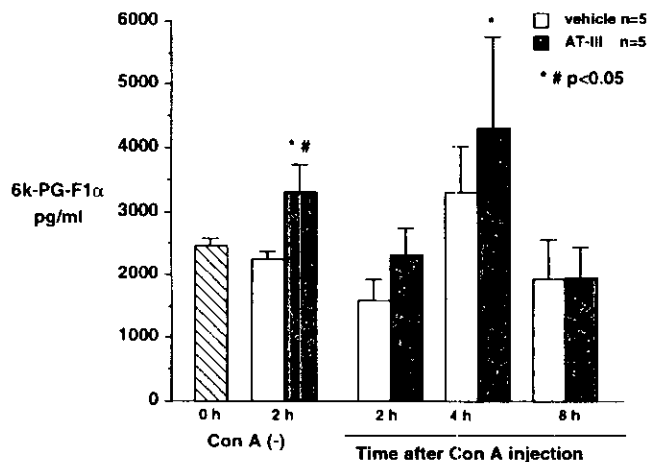
図 3. Con A誘発肝細胞障害に対するAT-IIIと Indomethacinの併用効果



5. Con A投与後の血中6k-PG-F1 α 産生に対するAT-IIIの効果

AT-III 500 units/kgの前投与によりプロスタサイクリンの代謝物である6k-PG-F1 α は2時間後対照群に比べ有意に増加した。また、Con A投与4時間後の血中6k-PG-F1 α 濃度はAT-III投与により前値に比べ有意に増加した(図4)。

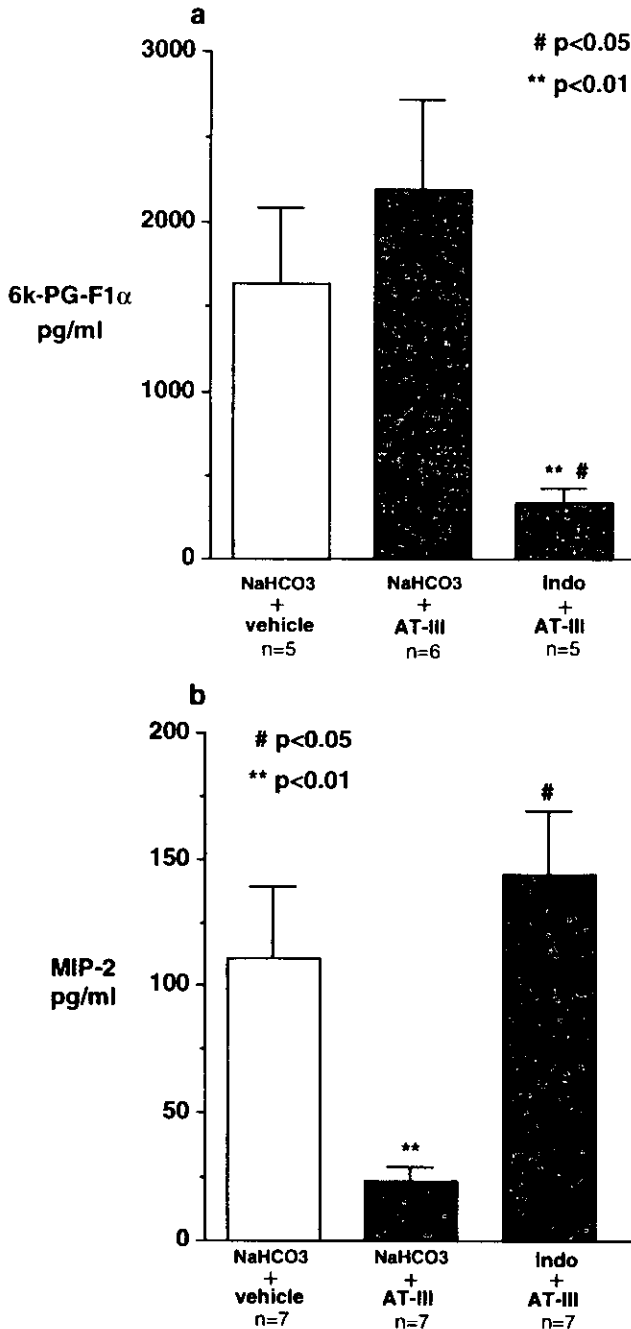
図 4. Con A投与後の血中6K-PGF1 α 濃度と AT-IIIの影響



6. Con A投与後の血中6k-PG-F1 α 、MIP-2産生に対するAT-IIIとIndomethacineの併用効果

Con A投与8時間後の血中6k-PG-F1 α はAT-III 500 units/kgの前投与によりやや増加したが、Indomethacineの併用によりその効果は著明に抑制された(図5a)。また、AT-IIIによるCon A投与8時間後の血中MIP-2産生抑制効果もIndomethacineの併用により完全に阻止された(図5b)。

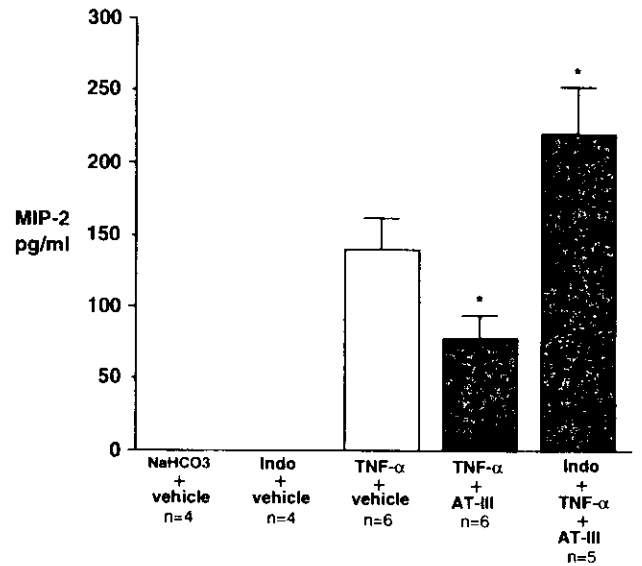
図 5. Con A投与後の血中6K-PGF1 α とMIP-2濃度に対するAT-IIIとIndomethacinの併用効果



7. Recombinant TNF- α によるMIP-2産生に対するAT-IIIとIndomethacineの効果

Con AによるMIP-2産生とAT-IIIのMIP-2抑制機序を検討する目的で、recombinant TNF- α (2 mg/マウス, IBL社)を生食0.2mlに溶解し、静脈投与後、2時間目の血中MIP-2濃度を測定した。血中MIP-2濃度はrecombinant TNF- α により上昇し、AT-III 500 units/kg前投与により、有意に抑制された。しかし、AT-IIIによる血中MIP-2産生抑制効果はIndomethacineの併用により完全に阻止された(図6)。

図 6. TNF- α によるMIP-2の誘導とAT-III、Indomethacinの効果



D. 考察

Con A誘発マウス肝炎モデルは早期に肝内にCD4+ Tリンパ球が浸潤し、その後肝小葉内に広範な肝細胞壊死が生じること、催炎性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β が肝細胞障害に関わっていることから、自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用なモデルとなることが報告されてきた。我々はこれまでの検討により、本モデルではCon A投与後に産生されるTNF- α によって誘導されるマウスCXCケモカイン、Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)が、多核白血球の肝局所への遊走と活性化を行い、肝障害発症に深く関わっていることを見いだした(論文1、2、3)。今回我々は、ラット肝虚血再灌流肝障害モデルやエンドトキシン肝障害モデルでの有効性が報告され、また、劇症肝炎治療に臨床応用されているAT-IIIを用いて、Con A肝細胞障害に対する効果とその作用機序について検討した。AT-IIIはラット肝虚血再灌流肝障害モデルやエンドトキシン肝障害モデルにおいて、TNF- α やCXCケモカインの産生を抑制し、肝細胞障害を軽減することが報告されている。今回の検討では、AT-III前投与はCon A肝細胞障害を用量依存性に抑制した。その作用機序として、TNF- α 、INF- γ 、IL-10などのサイトカイン産生には影響はな

かったが、MIP-2産生を有意に抑制し、また、recombinant TNF- α によるMIP-2誘導も有意に抑制した。しかし、recombinant MIP-2との併用ではAT-IIIの肝障害抑制効果は完全には阻止されず、AT-IIIの肝障害抑制機序はMIP-2産生抑制機序のほかにも存在することが示唆された。従って、今回の検討では血中6k-PG-F1 α 濃度を測定し、AT-IIIのプロスタサイクリン産生作用を検討した。AT-III投与により血中6k-PG-F1 α 濃度は有意に増加した。一方、AT-IIIの6k-PG-F1 α とMIP-2誘導作用はIndomethacineの併用により阻止され、さらに、AT-IIIの肝障害抑制作用もほぼ完全に阻止された。

以上、今回の検討によりAT-IIIはCon Aにより産生されるTNF- α により誘導されるMIP-2産生を抑制するとともに、プロスタサイクリン産生を促進し、Con A肝障害発症を抑制することが示唆された。また、AT-IIIによるMIP-2産生抑制機序にもプロスタサイクリンが関与する可能性が示唆された。最近、AT-IIIは血管内皮細胞からのプロスタサイクリン産生を促進し、サイトカインやケモカイン産生を調節する可能性が示唆されており、Con Aモデルにおいても同様の作用機序の存在が考えられる。

E. 結論

以上より、抗凝固剤であるAT-IIIはTNF- α によるMIP-2産生抑制とプロスタサイクリン産生促進作用を有しCon A肝細胞障害発症を阻止することが示唆された。本研究の結果は、AT-IIIが免疫学的肝細胞障害機序が関与する自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の治療において有用な薬剤となりうることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 免疫学的肝細胞障害におけるCXCケモカインと多核白血球の関与
薬理と治療 29:S 57-61, 2001.

- 2) Concanavalin A(Con A)肝障害モデルにおけるケモカインとサイトカインの関与
肝の生化学=箱根シンポジウム
9、箱根シンポジウム記録刊行会編 126-135,2001.
- 3) Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF-a plays a pivotal role in concanavalin A-induced liver injury in mice. J Hepatol 35:217-224, 2001.

2. 学会発表

- 1) 第86回日本消化器病学会総会
Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルにおけるヒアルロン酸 (HA) の投与効果.
日消誌98: A151, 2001.
- 2) Annual meeting of the American Gastroenterological Association
High molecular but not low molecular hyaluronan prevents concanavalin A-induced liver injury by reducing proinflammatory cytokines production in mice. Gastroenterology 120:A920, 2001.
- 3) 第37回日本肝臓学会総会
未成熟マウスにおけるConcanavalin A (Con A)誘発肝細胞障害とTh 1/Th 2サイトカイン動態. 肝臓42:Suppl(1) A288, 2001.
- 4) 第5回日本肝臓学会大会
Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルを用いた広範肝細壊死の発症機序とその治療法の検討. 肝臓42:Suppl(2) A435, 2001.

G. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許所得
なし

厚生科学研究費補助金（肝 研究事業）

分担研究報告書

肝内胆管系における自然免疫機構

—PBCの病態形成における*P. acnes*の関与について—

研究協力者 中沼 安二 金沢大学医学部病理学講座第二 教授

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の肉芽腫形成における菌体成分の関与を検討するため、肝組織内から細菌遺伝子の分子生物学的検出を行った。その結果、肝組織内から種々の腸内細菌が検出され、特に *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) が PBC の肉芽腫から高頻度に検出された。次に、*P. acnes* を選択的に検出した結果、PBC の肉芽腫からは全例で検出されたが、PBC の肝実質や対照疾患では低頻度であった。肝組織内から検出された細菌種の多くは腸内細菌を主とする常在菌であり、経門脈的または経胆管的に種々の細菌成分が、肝内に流入していると推測された。また、PBC の肉芽腫部では *P. acnes* の菌体成分が集簇しており、肉芽腫反応の原因 (抗原) になっているものと考えられ、*P. acnes* が PBC の病態形成に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は、慢性非化膿性破壊性胆管炎と呼ばれる肝内小型胆管の進行性破壊と消失や類上皮肉芽腫の形成を組織学的特徴とする。特に障害胆管が肉芽腫内に埋もれている像 (肉芽腫性胆管炎) は、PBC に特異的な所見であり診断価値も高い。通常、肉芽腫は細菌感染症やある種の真菌症、異物の進入などに際して好発すると考えられている。現在まで、細菌感染症と PBC との関連性を検討した報告があるものの、細菌が直接 PBC の病態発症に関与しているのかどうかは不明である。今回、我々は PBC の肉芽腫性病変に注目し、細菌の分子生物学的検出、同定を行い、PBC の病態形成における細菌菌体成分の関与について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

肉芽腫が見られた PBC 9 例のホルマリン固定パラフィン包埋肝組織切片を対象に、マイクロダイセクションシステム (オリンパス) を用いて肉芽腫部および門脈域周囲の肝実質のみを選択的に採取後、DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。また、対照群として原発性硬化性胆管炎 3 例、肝外閉塞性黄疸 2 例、ウイルス性慢性肝炎 4 例、組織学的正常肝 4 例を用い、門脈域と肝実質から DNA サンプルを得た。

2. 細菌遺伝子の分子生物学的検出

細菌 16S rRNA 遺伝子は約 1500 塩基対からなり、その中に菌種を越えて保存されている conserved region と種特異的な配列からなる divergent region がそれぞれ 10 箇所存在する。今回、conserved region から 1100F (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3')、1400R (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') のプライマー対 (PCR 産物約 310bp) を用い、PCR 増幅を行った。その PCR 産物を subcloning 後、10 個のコロニーから PCR 産物の塩基配列を解読し、菌種を同定した。

2. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 遺伝子の検出

選択的に *P. acnes* を検出するため、16S rRNA 遺伝子内で *P. acnes* に特異的なプライマー (5'-GGGTTGTAA(A/T)CCGCTTTCGCCTG-3'; 5'-GGG ACACC CATCTCTGAGCA-3') を設定し、PCR を行った。

C. 研究結果

1. 細菌遺伝子の検出と同定

PBC 5 例と対照群 6 例 (原発性硬化性胆管炎 2 例、ウイルス性慢性肝炎 2 例、正常肝 2 例) を用い、本検討を施行した。その結果、すべての DNA サンプルから細菌 16S rRNA 遺伝子由来の PCR 増幅産物が得られた。

塩基配列の解読の結果、肉芽腫、門脈域および肝実質からあらゆる常在菌由来の DNA が検出された。主に *P. acnes*、*Bacillus*、*Pseudomonas* などの腸内細菌が多く検出された。特に *P. acnes* は、PBC の肉芽腫から 50 クローン中 20 クローン (40%) と最も高頻度に検出された。

2. *P. acnes* 遺伝子の検出

P. acnes を選択的に検出したところ、PBC の肉芽腫からは全例、肝実質からは 56% 検出された。対照群からも検出されたが、50% 以下と低頻度であった。

D. 考察

我々は平成 12 年度本研究班報告で、PBC の肉芽腫内および周囲に樹状細胞類似の S-100 陽性細胞が多く見られ、肉芽腫形成に抗原提示を介した活発な免疫応答が関与していることを報告した。また、肉芽腫を形成する類上皮細胞に HLA-DR および CD1d の発現を認めたことより、類上皮細胞は MHC-class II/ペプチド複合体のみならず CD1d/糖脂質複合体をも表出していると考えられ、菌体構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) やリポテイコ酸 (LTA) などの脂質成分が肉芽腫反応の抗原となっている可能性を報告した。

PBCの病態発生と細菌感染症との関連性は多数報告されているものの、賛否両論で統一した見解は得られていない。しかし、PBC患者血清中に特異的に出現するミトコンドリア抗体 (AMA) が大腸菌など細菌由来のミトコンドリアと交差反応を示すことやAMAの対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素のE2成分(PDC-E2)は種を越えてよく保存されていることから、自己反応性T細胞の活性化機序として分子相同性の可能性が想定されている。

今回、我々は肝組織中から分子生物学的手法により細菌遺伝子を検出し、何らかの細菌成分がPBCの病態形成に関与している可能性を検討した。その結果、肝組織から検出、同定された細菌種の多くは腸内細菌を主とする常在菌であり、経門脈的あるいは経胆管的に種々の細菌成分が、肝内に流入していると推測された。しかし、このような菌体が生菌の状態で流入しているとは考えにくく、分断化した菌体成分であると推測される。また、全例のPBC肉芽腫部から*P.acnes*由来の遺伝子が検出された。*P.acnes*はグラム陽性の嫌気性菌で、リパーゼ産生によるニキビの病原菌として有名である。また、*P. acnes*は、アジュバント活性を有し、動物実験にて肉芽腫を形成することが知られている。従って、PBCの肉芽腫から*P. acnes*が検出されたことは非常に興味深い所見であり、*P. acnes*に対する異常な免疫応答がPBCの肉芽腫形成、さらにはPBCの病態形成に拘わっていることが示唆された。その上、近年、*P. acnes*は全身性肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスの病原菌としても注目されており、*P. acnes*に対する宿主の異常な免疫応答が、種々の疾患の病態形成に関与しているのかもしれない。今後、PBCの疾患特異性さらに胆管特異性を検討するため、細菌成分に対する宿主の免疫機構の解明が必要である。

E. 結論

PBCの肉芽腫部では *P. acnes* の菌体成分が集簇しており、肉芽腫形成の原因（抗原）になっているものと考えられ、*P. acnes*がPBCの病態形成に関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Harada K, et al. Molecular Identification of Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene in Liver Tissue of Primary Biliary Cirrhosis: Is *Propionibacterium Acnes* Involved in Granuloma Formation? Hepatology (in press)
- Hiramatsu K, et al. Amplification and Sequence Analysis of Partial Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene in Gallbladder Bile from Patients with Primary Biliary Cirrhosis. J Hepatol. 2000;33:9-18.

2. 学会発表

- 原田憲一ら, 原発性胆汁性肝硬変の肉芽腫病変におけるBacterial 16S rRNA geneの検出. 第4回日本肝臓学会大会
- Harada K, et al. Molecular identification of bacterial 16S ribosomal RNA gene in liver tissue of primary biliary cirrhosis: *Propionibacterium acnes* is mostly detectable in granulomatous lesion. 51st Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)
- 平松活志ら, 原発性胆汁性肝硬変患者の胆汁中Bacterial 16S rRNA geneの検討. 第二回日本肝臓学会大会

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の病因解析

研究協力者 石橋 大海 国立病院長崎医療センター 消化器科医長

研究要旨：本研究の目的は原発性胆汁性肝硬変（PBC）の発症、進展の主因とされる免疫反応の根幹となる病因抗原を、分子相同性の面より検討して同定し、エピトープ解析に基づいて自己免疫応答機構を明らかにし、最終的には抗原特異的な免疫療法を開発することである。

本年度は、1) 外来抗原である大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンの多くは、抗ミトコンドリア抗体（AMA）の各対応抗原に相当する自己抗原ペプチド（PDEC-E2, E3BP, OGDC-E2, BCOADC-E2）に対して交差反応性を有する。2) ミトコンドリア抗原（PDC-E2 163-176）反応性T細胞クローンの一部は抗核抗体の代表的な対応抗原であるgp210、Nucleoporin NUP 214、SP 100、Centromere protein C由来自己ペプチドと交差反応性を有する、ことを明らかにした。

これらの結果より、PBCの発症要因として、大腸菌による自己反応性T細胞の活性化機構の可能性が推察されるとともに、内在性自己抗原間において分子相同性の機序働いている可能性が示唆された。

共同研究者

下田慎治、中村稔、谷本博徳、林田一洋
九州大学大学院病態修復内科学

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）に特異的に出現する抗ミトコンドリア抗体（AMA）の主要対応抗原はPDC-E2, E3 binding protein (E3BP), OGDC-E2, 分子枝鎖2-オキソ酸脱水素酵素(BCOADC)-E2であることが明らかになっている。我々は先に、PBC患者のHLADR 53 拘束性T細胞エピトープはヒト PDC-E2 163-176 (GDLLAEIETDKATI) であることを同定し、ヒトE3BP 34-47 (GDALCEIETDKAVV) や、ヒトOGDC-E2 100-113 (DEVVCEIETDKTSV) や、ヒトBCOADC-E2 90-103 (FDSICEVQSDKASV) と分子相同性があることを明らかにしてきた。さらに外来抗原との分子相同性を検討した結果、大腸菌OGDC-E2 34-47 (DEVLVEIETDKVVL)と高頻度に交差反応性を示すことが明らかになった。またPDC-E2 163-176の認識には170番のグルタミン酸(E)、172番のアスパラギン酸(D)、173番のリジン(K)の配列(ExDK配列)を重要とする一群と168番のグルタミン酸(E)、169番のイソロイシン (I)、170番のグルタミン酸(E)、172番のアスパラギン酸 (D) の配列 (EIExD) 配列を重要とする一群が存在し、反応パターンから2群に分けられることを明らかにしてきた。

分子相同性の概念は自己免疫疾患における自己抗原特異的T細胞活性化の重要な機序として提唱されている。胸線でのネガティブセレクションを逃れた少数の自己抗原特異的T細胞は末梢においてトレラスやイグノランスの状態に陥っていると考えられるが、ウイルスや細菌のような外来抗原を認識することによりこれらのT細胞は活性化・増殖し、それらの外来抗原と分

子相同性のある自己抗原を認識するようになり、自己免疫疾患の発症や病態形成に関与してくると考えられている。

本研究の目的は、の病態形成に深く関わっていると考えられる免疫応答の対応抗原のエピトープを同定し、抗原特異的T細胞による抗原認識様式を解析することより病因分子を明らかにし、最終的にはこの情報をもとに抗原特異的な免疫療法を開発することを目的とする。

平成13年度は、以下の2点について検討を行った。すなわち、

1) PBC発症のトリガーとなる自己へのトレランスの破綻による自己反応性T細胞の活性化機序を、自己抗原と外来抗原との分子相同性の機序から検討する。昨年度我々は、ヒトPDC-E2 163-173ペプチド反応性T細胞クローンの多くが大腸菌OGDC-E2 34-47ペプチド抗原と交差反応性を有することを示した。そこで更に分子相同性の概念を検証するために、大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンを樹立して自己抗原との交差反応性を解析した。

2) PBC患者では抗ミトコンドリア抗体のみならず、30～40%の患者では抗核抗体も同時に陽性となることが知られている。抗核抗体の産生においてもミトコンドリア抗原と核抗原の間で成り立つ分子相同性の機序により、抗核抗体産生という免疫反応が誘発されている可能性がある。そこで内在性自己抗原との分子相同性を検討するために、ミトコンドリア抗原と分子相同性を有する核抗原をプロテインデータベースより検索して合成ペプチドを作成し、PDC-E2 163-176反応性T細胞クローンとの交差反応を検討した。

B. 研究方法

1. 大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンの

解析

4人のPBC患者末梢血より11株の大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンを樹立した。これらのT細胞クローンを抗ミトコンドリア抗体主要対応抗原であるヒトPDC-E2 163-176、ヒトE3BP 34-47、ヒトOGDC-E2 100-113、ヒトBCOADC-E2 90-103との交差反応性を検討した。なお、T細胞の採取は本人の了解を得て行った。

2. ヒトPDC-E2 163-176ペプチド反応性T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性の解析

PDC-E2 163-176上のT細胞に反応に重要なアミノ酸モチーフExDK配列あるいはEIExD配列の各アミノ酸を、それぞれ類似の性質を有するアミノ酸に置換した配列、(D,E,N,Q)x(D,E,N,Q)(K,R)、あるいは(D,E,N,Q)(A,I,L,V)(D,E,N,Q)x(D,E,N,Q)で検索した結果、今までにPBC患者で出現することが報告されている抗核抗体に対応する様々なヒト核タンパク(NUP 214, sp100, Centromere Protein C, gp210, Lamin B receptor, Major centromere autoantigen B, Nuclear pore glycoprotein p62)由来のペプチドが見出され、最終的に41種のペプチドを合成した。2名のPBC患者より計5株のヒトPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンを樹立し、これらの核抗原由来ペプチドとの交差反応性を検討した。

C. 研究結果

1. 大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンの解析

11株の大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンのサイトカイン産生パターンは全てTh0タイプであった。またこれらのT細胞クローンの4株は大腸菌OGDC-E2 34-47のみに反応し、他の抗原とは交差反応性を示さなかった。しかし、残りの7株はヒトPDC-E2 163-176、ヒトE3BP 34-47、ヒトOGDC-E2 100-113、ヒトBCOADC-E2 90-103の全てとフルアゴニストとして交差反応性を示した。またヒトPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンがHLA DR拘束性を有していたのとは異なり、大腸菌OGDC-E2 34-47反応性T細胞クローンはHLA DP拘束性であった。

2. ヒトPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性の解析

抗核抗体に対応する様々なヒト核抗原(NUP 214, sp100, Centromere Protein C, gp 210, Lamin B receptor, Major centromere autoantigen B, Nuclear pore glycoprotein p62)のうち、ヒトPDC-E2 163-176と分子相同性を有する配列はNUP 214に6種類、sp100に7種類、Centromere Protein Cに9種類、gp 210に8種類、Lamin B receptorに1種類、Major centromere autoantigen Bに3種類、Nuclear pore glycoprotein p62に7種類存在した。この中で少なくとも1株のヒトPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンを活性化しうる8種類のペプチド抗原を同定し得た。5種類はgp 210由来、1種類はNucleoporin NUP214由来、1種類はsp100由来そして1種類は

Centromere protein C由来であった。それぞれのT細胞クローンで反応するペプチド抗原のパターンや程度はすべて異なっていた。また、Lamin B receptor, Nuclear pore glycoprotein p62 あるいは Major centromere autoantigen Bに反応するT細胞クローンは1株もなかった。

D. 考察

大腸菌OGDC-E2反応性T細胞クローンの抗ミトコンドリア抗体対応抗原との交差反応性において、大腸菌OGDC-E2反応性T細胞クローンは、ヒトPDC-E2、ヒトE3BP、ヒトOGDC-E2、ヒトBCOADC-E2抗原に交差反応性を示さないクローンとこれら全ての抗原に交差反応性を示すクローンに分けられた。しかも大腸菌OGDC-E2反応性T細胞クローンの多くが全てのヒト抗原に交差反応性を示すものであった。このことは、分子相同性の機序による自己免疫疾患発症の示唆する根拠となるものと考えられた。

PBCに出現する代表的な抗核抗体対応抗原(NUP 214, sp100, Centromere Protein C, gp 210, Lamin B receptor, Major centromere autoantigen B, or Nuclear pore glycoprotein p62)のうちPDC-E2 163-176と分子相同性を有する領域の合成ペプチドを作成し、ヒトPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンとの交差反応性を検討した結果、交差反応性のあるタンパク(gp210, Nucleoporin NUP214, sp100, Centromere protein C)とないタンパク(Lamin B receptor, Nuclear pore glycoprotein p62, Major centromere autoantigen B)に分けることができた。なかでもgp210由来の8種類のペプチド抗原に対しては、樹立した5株のT細胞クローンのうち4株が交差反応性を示した。このことから、PBC患者の10-25%に出現する抗gp210抗体の出現機序として、gp210抗原とPDC-E2抗原との分子相同性が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

大腸菌OGDC-E2反応性T細胞クローンをを用いた研究より、分子相同性の機序にて、PBCの発症に大腸菌感染が関与している可能性を明らかにした。

また、自己抗体の出現を認めるとき、一般的にはその自己抗原に特異的な免疫応答が生体内で惹起されていることが考えられる。しかし、PBCにおける免疫応答を分子相同性の概念からみた場合、生体内でのミトコンドリア抗原認識がトリガーとなって核成分に対する抗体が産生されるような免疫反応が誘発されている可能性が考えられた。

F. 研究発表(学会発表)

- 1) 下田慎治、谷本博徳、重松宏尚、中村稔、林田一洋、石橋大海、＜PBCの病態と治療＞原発性胆汁性肝硬変(PBC)における大腸菌2-オキシグルタル酸脱水素酵素(OGDC)抗原特異的T細胞の関与。第37回日本肝臓学会総会、2001.5.17-18.横

- 浜
- 2) 谷本博徳、下田慎治、重松宏尚、中村稔、林田一洋、石橋大海。原発性胆汁性肝硬変(PBC)における大腸菌抗原特異的T細胞の樹立と自己抗原との交差反応性。第37回日本肝臓学会総会、2001.5.17-18.横浜
 - 3) Shimoda, S., Gershwin, M.E., Ishibashi, H. Molecular mimicry between nuclear autoantigens and PDC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis. 52nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 2001.11.9-13, Dallas
 - 4) Tanimoto, H., Shimoda, S., Kawano, S., Nakamura M., Hayashida, K., M.E. Gershwin, Ishibashi, H. Autoreactive T cell clones in patients with primary biliary cirrhosis: evidence of cross-reactivity with *E.coli* OGDC-E2 and human mitochondrial autoantigens. 52nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 2001.11.9-13, Dallas
 - 5) 下田慎治、中村稔、河野聡、上平幸史、林田一洋、原田実根、石橋大海。原発性胆汁性肝硬変患者より樹立したPDC-E2特異的T細胞クローンの核抗原との交差反応性。第31回日本免疫学会総会、2001, 12.11-13,大阪
 - 6) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、松下祥、林田一洋、石橋大海、原田実根。PBCにおける自己抗原特異的CD4陽性T cell cloneと胆管上皮細胞との関係。第31回日本免疫学会総会、2001, 12.11-13,大阪
 - 7) Ishibashi H, Kamihira T, Shimoda S. Bile duct cell apoptosis: a rare event in primary biliary cirrhosis? *Digest Liver Dis* 2001; 33(2): 122-124.
 - 8) Gershwin, ME, Shimoda S, Ishibashi H, Coppel RL. Primary biliary cirrhosis: a model cholestatic disease of adults. In: Falk Symposium 117: Hepatology 2000 - Symposium in honour of Gustav Paumgartner, Gerbes AL, Beuers U, J_gst D, Pape GR, Sackmann M (eds), London: Kluwer Academic Publishers; 2001, 37-56.
 - 9) 下田慎治、重松宏尚、石橋大海。原発性胆汁性肝硬変における自己抗原反応性T細胞の交差反応性による外来抗原の認識. 消化器と免疫 No.37, 日比紀文, 名倉 宏, 淀井淳司, 茂呂 周, 西岡幹夫, 銭谷幹男, 高橋宏樹 (編), 東京: マイライフ社; 2001, 122-124.
 - 10) Ishibashi H, Shimoda S, Shigematsu H, Nakamura M. Induction of T cell Anergy by Antigen Peptide Analogue in Primary Biliary Cirrhosis. In: General Aspects of Molecular Biology and Immunology for the treatment of Intractable Liver Diseases, Tsuji T, Meyer zum B_chenfelde KH (eds), Tokyo: Elsevier Science BV, 2002, in press.
 - 11) Gershwin ME, Nishio A, Ishibashi H, Lindor, KD. Primary biliary cirrhosis. Immunology and the Liver, Gershwin ME, Vierling JM, Manns MP (eds), 2002, in press.
- G. 研究発表 (誌上発表)**
- 1) Tanaka A, Borchers AT, Ishibashi H, Ansarif AA, Gershwin ME. Genetic and familial considerations of primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(1): 8-15.
 - 2) Ishibashi H. Are primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis reflective of the pendulum of a clock and therefore represent a 'phase' of the same disease? *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(2): 121-123.
 - 3) Van de Water J, Ishibashi H, Coppel RL, Gershwin ME. Molecular mimicry and primary biliary cirrhosis: Premises not promises. *Hepatology* 2001; 33(4): 771-775.
 - 4) 中村 稔, 下田慎治, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変におけるPDC-E2 163-176エピトープ. *臨床免疫* 2001; 35(4): 412-419.
 - 5) 石橋大海, 下田慎治. 消化器疾患の臨床と分子医学の接点 原発性胆汁性肝硬変. *臨床消化器内科* 2001; 16(7): 1056-1064.
 - 6) 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変とHLA. *肝臓* 2001;

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

PDC-E2発現とPBCに関する実験病理学的検討

研究協力者 小林 健一 金沢大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）の発症に抗ミトコンドリア抗体（AMA）、およびその対応抗原がどのように関与しているのか、未だ明らかにされていない。本研究ではAMAの対応抗原の一つであるpyruvate dehydrogenase complex E2 component(PDC-E2) 遺伝子を胆管上皮細胞に強発現する実験モデルの作製を試みた。胆管細胞特異的遺伝子の一つであるマウスcytokeratin 19のプロモーター領域の下流にマウス PDC-E2 遺伝子を挿入し、発現プラスミドを構築した。プラスミドをマウス培養胆管上皮細胞に導入し、一過性発現モデルを作製した。またC57/BL6マウスの卵細胞に導入し、PDC-E2トランスジェニックマウスを作製した。さらにレトロウイルスを用いて、ヒト胆管癌細胞株でのPDC-E2恒常発現系を作製した。いずれのモデルにおいても、導入した遺伝子の発現が認められた。これらの系はPBCの基礎研究の一助となると考えられた。

A. 研究目的

抗ミトコンドリア抗体（AMA）の対応抗原がpyruvate dehydrogenase complex(PDC)であることが判明して以来、それらがPBCの病態にどのように関与しているのか議論されてきた。また、Gershwinら、Joplinらがこの抗原がPBC特異的に胆管上皮細胞のapical membrane にすることを報告している。そこで本研究では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を強発現する実験モデルの作製を試みた。

B. 研究方法

(1) マウスPDC-E2 cDNA：マウス肝臓からmRNAを調整し、RT-nested PCR法にてマウスPDC-E2 ORFを含むcDNAをクローニングした。(2) 胆管細胞特異的プロモーター：マウス肝臓から調整したゲノムDNAより、nested PCR法にて cytokeratin 19 (以下CK19) プロモーター領域をクローニングした。(3) 発現ベクター：CK19プロモーター領域の下流にマウスPDC-E2 cDNAおよびFLAG-Tagを挿入し、pCKE2FLAGを作製した。(4) マウス胆管細胞：マウスの肝内末梢胆管細胞をKatayanagiらの方法によって単離し、樹立した培養胆管細胞株を用いた。これらの細胞はコラーゲンゲル上で単層、シート状に発育した。(5) 胆管上皮への遺伝子導入：リポフェクション法にて、コラーゲンゲル上に培養したマウス胆管上皮細胞に遺伝子を導入した。(6) トランスジェニックマウス：作製したpCKE2FLAGよりプロモーター、PDC-E2、poly Aを含むDNA断片を切り出し、C57/BL6マウスの卵細胞にinjectionし、PDC-E2トランスジェニックマウスを作製した。(7) 発現の確認：抗FLAG M2モノクローナル抗体 (Sigma)を用いて、免疫組織染色およびWestern blottingを行い、融合蛋白の発現を確認した。(8) レトロウイルスベクターにマウスPDC-E2遺伝子を組み込み、型のごとくproducer細胞にtransfectionし、ウイルスを産生させた。生じたウイ

ルスをヒト胆管癌細胞株KMBCに感染させ、ネオマイシン耐性クローンを選択した。(9) 発現の確認：Northern blotting, Western blottingにてPDC-E2の発現を確認した。

C. 研究結果

(1) マウスmature PDC-E2 cDNAのORFを含む1713bpをクローニングし、塩基配列を決定した。ヒト PDC-E2 cDNA 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lipoil-binding region (LBR)であるVETDKATVGFESLEEC (42-57 aa)とIETDKATIGFEVQEEG (169-184 aa) を2カ所に認めた。(2)胆管細胞特異的プロモーターとしてマウスCK 19 5'-上流領域2691bpをクローニングした。(3) 初代培養胆管細胞を用いた一過性発現系：pCKE2FLAGをマウス胆管上皮に導入し、抗FLAG抗体を用いた免疫染色にて蛋白の発現を検討した。遺伝子を導入したサンプルは抗FLAG抗体で染色され、PDC-E2とFLAGの融合蛋白が発現していると考えられた。(4)PDC-E2トランスジェニックマウス：PDC-E2トランスジェニックマウスの肝組織に対し、抗FLAG抗体を用いた免疫染色を行ったところ、胆管上皮が染色された。また胆管樹からwhole cell lysateを調整し、SDS-PAGEにて展開後、抗FLAG抗体を用いてWestern blottingを行ったところ、PDC-E2とFLAGの融合蛋白として予想される分子量のバンドを認めた。コントロールのマウスでは免疫染色、Western blottingいずれも陰性であった。PDC-E2トランスジェニックマウスの13ヶ月後の観察では、胆管炎の所見は認めなかった。(5)レトロウイルスによりPDC-E2を導入したヒト胆管癌細胞株KMBCではNorthern blotting にて 4.8kb の位置に組み込んだPDC-E2 のバンドを認めた。Western blottingではPDC-E2の発現量は約2.5倍に増加していた。Southern blotting にて PDC-E2遺伝子の組み込みを

確認したところ、1 copy組み込まれていることが判明した。

D. 考察

PBC患者の肝臓では胆管上皮へのAMAの結合が観察され、AMAの対応抗原について多くの研究が行われてきた。また免疫組織染色による検討にて、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。しかし、AMAやその対応抗原がPBCの病態にどのように関与しているのか、明らかにされていない。これまでいくつかのグループがPBC動物モデルの作製を試みているが、その多くは精製したPDCあるいはPDC-E2蛋白にてマウスを免疫する方法である。免疫後、マウス末梢血中に抗PDC抗体をほぼ全例で認めるものの、PBCに特徴的とされる非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)の頻度は報告者によって様々である。また、蛋白接種の際に用いられる Freund's complete adjuvantやlipopolysaccharideが門脈域の炎症性変化を引き起こす可能性が指摘されており、結果の解釈には慎重を要する。今回我々は、胆管上皮でPDC-E2遺伝子を強制発現する実験モデルの作製を試みた。PDC-E2トランスジェニックマウスの13ヶ月後の観察では胆管炎の所見は認めなかった。今後、これらのマウスに様々な刺激を与え、胆管炎が誘導されるか検討する予定である。

また今回我々は正常9例、PBC14例、自己免疫性肝炎(AIH)12例の肝生検組織よりmRNAを抽出し、DNA microarrayの手法を用いて、それぞれの疾患で発現している遺伝子を検討した。クラスター解析の結果、PBCとAIHの大きく2群にわけられるが、PBCのうち3例がAIHの症例に近い遺伝子発現パターンを示した。これらPBC3例はALP低値、ALT高値の傾向を示していた。PBC患者の肝臓で発現している遺伝子群について、今後さらに症例数を増やし、詳細に検討する必要があると思われる。

E. 結語

胆管上皮にてPDC-E2蛋白を過剰発現する実験モデルを作製した。PDC-E2トランスジェニックマウスの13ヶ月後の観察では、胆管炎の所見は認めなかった。今後、これらのマウスに様々な刺激を与え、胆管炎が誘導されるか検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表：(1) Liqun Wang, Shuichi Kaneko et al. Molecular cloning characterization and expression of dihydrolipoamide acetyltransferase component of murine pyruvate dehydrogenase complex in bile duct cancer cells. *J Gastroenterol* 2002, 36(6)
(2) Makiko Kagaya, Shuichi Kaneko et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of human cytokeratin 19 gene in human cholangiocarcinoma cell line. *J Hepatol* 2001, 35(4) 504-11. 2. 学会発表：当該研究に関するものはなし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

炎症性サイトカインの胆管上皮の透過性に及ぼす影響に関する研究

研究協力者 向坂彰太郎 福岡大学医学部内科学第三講座 教授

研究要旨：胆管上皮のタイトジャンクション透過性に対するサイトカインの関与を明らかにする。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)では、胆管上皮に対する自己免疫機序による胆管細胞傷害が発症に関与すると想定されている。最近、本疾患患者では胆管上皮細胞の傷害が軽微な時期より、胆管上皮細胞の胆汁の逆流を防止するバリア機能に関与するタイトジャンクション(TJ)が障害されることを我々は報告した(Sakisaka S et al. Hepatology 2001;33:1460-1468)。一方、本疾患患者の胆管上皮細胞は、胆管周囲に浸潤した炎症細胞より放出された様々なサイトカインに暴露されていると推測される。この観点から、今回我々は培養マウス不死化胆管上皮細胞を用い、種々のサイトカインがTJのバリア機能に及ぼす影響を*in vitro*で検討した。

B. 研究方法

マウス不死化胆管上皮細胞を有孔性フィルターに培養し、apical側或いはbasolateral側にTNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4を投与した。TJのバリア機能を評価するため、微小電極を用いた細胞モノレイヤーの電気抵抗 (transepithelial electrical resistance; TER) 測定とトレーサー (^3H -inulin) の細胞間の透過量測定を行った。また、間接蛍光抗体法にてTJ関連タンパクであるclaudin-1、3、occludin、ZO-1、7H6を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

TNF- α を培養胆管上皮のbasolateral側に投与すると、コントロール群と比較し濃度および時間依存的にTERが有意に低下したが、apical側への投与では変化がみられなかった。IFN- γ も全く同様の結果であった。しかし、IL-2、IL-4では、apical、basolateral側投与ともにTERに変化はみられなかった。また、トレーサーを用いた実験では、TNF- α 或いはIFN- γ をbasolateral側に投与すると有意に透過量の増加がみられ、tight junction透過性の亢進が示された。間接蛍光抗体法による観察では、コントロール群とTNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4投与群のいずれにおいても、TJ関連タンパクの発現ならびに分布に変化はみられなかった。

D. 考察

マウス不死化胆管上皮細胞において、TNF- α 、IFN- γ はTJのバリア機能に変化を及ぼし、その透過

性を濃度依存性に亢進することが示された。しかし、今回の条件では既知のTJ関連タンパクの発現、分布に変化はみられなかった。昨年、我々はPBCでは胆管上皮のTJ蛋白の変化を示した。PBC患者肝では、サイトカインおよび種々の細胞障害性胆汁酸が長期にわたり作用する病態であり、今回の実験条件にさらに多くの因子が関与している可能性が考えられる。今回用いた不死化培養胆管上皮を用いた、*in vitro*における胆管障害の検討は、PBCの病態を研究する上できわめて有用な実験系と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
 - a. Sakisaka S et al. Hepatology 2001; 33: 1460-1468.
2. 学会発表
 - a. Digestive Disease Week (米国 アトランタ 2001. 05. 20~23)
 - b. The American Association for the Study of Liver Diseases: Basic Research Single Topic Conference (米国 バージニア州 エアリー 2001. 06. 07~10)
 - c. 第37回 日本肝臓学会総会(横浜 2001. 05. 17~18)
 - d. 第33回 日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎 2001. 09. 27~29)

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

PBCにおける胆管上皮細胞特異的に発現する遺伝子の検索

研究協力者 辻 孝夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：1) laser captured microdissection (LCM) と polymerase chain reaction (PCR) や DNA microarray を用い、PBC 胆管上皮細胞に特異的に発現されている遺伝子を解析した。約 1000個の胆管上皮細胞から RNA を抽出し、DNA microarrayで遺伝子発現を解析したところ、LCMによる胆管上皮細胞からcDNAの増幅及びDNA microarrayによる解析が可能であった。2) 胆管上皮細胞に特異的に発現する分子として、stromal derived factor-1 (SDF-1) を同定した。SDF-1は胆管上皮細胞特異的に発現されており、また肝内浸潤リンパ球はレセプターである CXCR4を高発現していた。SDF-1/CXCR4は門脈域への炎症細胞の遊走及び胆管上皮細胞障害に関与する可能性が示唆された。

共同研究者 山本和秀、坂口孝作、下村宏之

A. 研究目的

1) laser capture microdissection (LCM)/DNA microarrayによる解析

PBCの胆管上皮細胞における標的抗原の解析の目的で、胆管上皮細胞特異的遺伝子発現を検討する。ヒトの肝組織より胆管上皮細胞を純粋に集め解析することは従来困難であったが、LCMが開発され、単一の細胞レベルで細胞を回収することが可能となった¹⁾³⁾。またPCRやRNA amplificationとDNA microarrayを用いることで、微量なRNAの発現を解析することが可能となっている。そこで、正常およびPBCの胆管上皮細胞を選択的に集め、胆管細胞に特異的に発現されている遺伝子を解析することにより、標的分子の同定を試みる。

2) Stromal derived factor-1 (SDF-1)/ CXCR4発現の検討

SDF-1は造血、B細胞分化、リンパ球の遊走に重要なケモカインであるが⁴⁾⁵⁾、肝組織における発現について知られていない。またSDF-1に対するレセプターはCXCR4であり、末梢血リンパ球及び肝組織中リンパ球における発現を検討する。

B. 対象と方法

1) LCM/DNA microarrayによる解析

正常肝 1例およびPBC 1例を対象にした。凍結切片を作成し、70%エタノール固定後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、胆管細胞を選択的にLCM (Arcturus Engineering, Inc.) により収集した。採取組織よりtotal RNAをtotal RNA Microprep kit (Stratagene) を用いて抽出し、oligo dT primer (SuperScript, Life Technologies) を用いてcDNAに変換した。³²P標識し、Atlas Human Array (Clontech) を用いて hybridization し、解析した。genomic DNAはDNaseにより消化した。

2) SDF-1/CXCR4発現の検討

正常肝及びPBCのパラフィン包埋肝生検組織から切片を作成し、抗原賦活化後、抗SDF-1, 抗CD4, 抗CD8, 抗CD79a抗体と反応後、Envision (DAKO) を用いて免疫染色した。またPBC 1症例の末梢血(PBL) 及び肝生検組織 (LIL) よりリンパ球分画を分離し、flow cytometryによりCD⁴⁵細胞、CD4及びCD8 T細胞におけるCXCR4の発現を解析した。

C. 研究結果

1) LCM/DNA microarrayによる解析

LCMにより胆管細胞のみを採取することが可能であった。この方法によりPBC肝よりも胆管細胞のみを純粋に収集することが可能と考えられた。

採取された組織からtotal RNAを抽出、cDNA増幅後、hybridizationに使用するprobeの作成が可能であった。正常肝の胆管上皮細胞とPBCの胆管上皮細胞において遺伝子発現の差を認めた。

今後、症例数を増やして、PBC及び正常肝の胆管上皮細胞を比較検討し、胆管細胞特異的に発現している遺伝子を解析する予定である。

2) SDF-1/CXCR4発現の検討

SDF-1はPBC肝において胆管上皮細胞特異的に発現されていた。胆管上皮細胞周囲にはB細胞、CD4及びCD8 T細胞が集簇していた。SDF-1は正常肝の胆管上皮細胞においても弱く発現していた。

一方、PBLおよびLILにおけるCXCR4の発現を解析すると、ほとんどのB細胞及びT細胞に発現されていた。しかし、発現強度を比較すると、B細胞及びT細胞ともに、LILにおいて発現が増強されていた。

D. 考案

1) LCM/DNA microarrayによる解析

PBCは胆管上皮細胞に特異的に発現されている抗原に対して、自己免疫反応が惹起されていると推察されているが、胆管細胞に特異的に発現されている抗原およびその発症機序は不明である。近年開発された

LCMにより、顕微鏡下に特定の細胞のみを回収することが可能であり、その細胞における特異的遺伝子発現を解析することを試みた。

本研究において、正常肝及びPBC肝から胆管細胞の採取し、cDNAを作成、増幅後、DNA microarrayによる解析を試みたところ、胆管細胞を特異的に採取でき、またmicroarrayでの検討に使用できるprobeを作成可能であった。今後、症例を増やして、正常胆管細胞とPBCの胆管細胞における発現の差を検討する予定である。

2) SDF-1/CXCR4発現の検討

我々はSDF-1が胆管上皮細胞に特異的に発現されていることを始めて明らかにした。SDF-1は胎生期における造血に重要な役割を果たしている。肝臓は骨髄での造血が始まる以前の造血に関与しており、SDF-1は肝臓での造血に必須である⁹⁾。胎生期におけるSDF-1の産生細胞はductal plate cellであることが示されている¹⁰⁾が、この細胞が胆管上皮細胞のpro-genitor cellであることから、胆管上皮細胞がSDF-1を産生することは十分考えられる。胎生期から生後にかけての発生の過程で、SDF-1の発現がどのように調節されているか今後検討する必要がある。

一方、SDF-1は造血、特にB細胞の成熟・分化に必須であるが、同時にCXCR4陽性細胞の遊走や活性化にも関与していることが知られている¹¹⁾。PBL、LILともにCXCR4は高率に発現されていたが、LILの発現強度が強かったことは、CXCR4発現の強い細胞がSDF-1の影響をうけ肝組織に集簇する可能性を示唆している。PBCの胆管周囲にはT細胞のみならずB細胞が多数集簇しており、胆管上皮細胞が産生するSDF-1がこれらの炎症細胞を遊走させている可能性につき、今後検討する必要がある。

E. 文献

- 1) Emmert-Buck MR, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
- 2) Schutze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 737-42.
- 3) Luo L, et al. Gene expression profile of laser captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 1999; 5: 117-122.
- 4) Ma Q, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4 and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 9448-9453.
- 5) Coulomb-L'Hermine A, et al. Stromal cell derived factor 1(SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 8585-8590.
- 6) Jo DY, et al. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *J Clin Invest* 2000; 105: 101-111.