

Keyword

## 2 MHC クラス II による抗原提示

イラストマップは

p.73



クラス II 分子は MHC のクラス II 領域によってコードされる  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロ二量体である (図 1 参照)。ヒトでは HLA-DR, DQ, DP が、マウスでは I-A, I-E がこれに相当する。抗原提示能のある細胞 (B 細胞, マクロファージ, 樹状細胞, 内皮細胞, ミクログリアなど), 精子などに発現している (memo 2 参照)。ヒトやほとんどの齧歯類では活性化 T 細胞にも発現するが、マウスの活性化 T 細胞には発現しない。自己免疫病では標的臓器 (甲状腺の濾胞細胞, 膵臓の  $\beta$  細胞など) にも発現していることが多い。細胞膜から遠い側の  $\alpha 1$  と  $\beta 1$  ドメインが溝状の構造を形成して、この中に 9~30 数 mer のペプチド (多くは 15 mer 前後) を収容する。

### memo 2 プロフェッショナル抗原提示細胞

ナイーブ T 細胞 (分裂増殖を誘導できるアゴニスト抗原と遭遇したことがない T 細胞) を効率よく活性化できる樹状細胞やランゲルハンス細胞などを、特にプロフェッショナル抗原提示細胞 (professional APC) とよぶ。それに対して、活性化された T 細胞に抗原を提示しうる細胞はノンプロフェッショナル抗原提示細胞 (non-professional APC) とよばれる。濾胞樹状細胞は抗原そのものを免疫複合体として細胞表面に結合して B 細胞に提示するため、B 細胞応答における抗原提示細胞として扱われる。

ここで重要な点は MHC の多型性 (memo 3 参照) は溝の内部に集中しているということである (図 2)。すなわち、異なる型の MHC 分子は溝の物理化学的性質 (電荷の位置, 疎水性, 表面の形など) が異なっている。このために異なる型の MHC は異なる抗原ペプチドを結合して T 細胞に提示するのである。これによって、「T 細胞に抗原提示されやすいペプチドの種類」に個体差が生じる。これは古くから免疫応答遺伝子現象として知られてきた。実際、HLA の個体差に起因する免疫応答性の個体差が病気の感受性を決定する例が知られている。当然、この原理はクラス II のみならず、クラス I にも通用する。

### memo 3 HLA の多型

塩基配列が決定された HLA 遺伝子だけについて恒久的な命名がなされている。クラス I の場合、HLA-A を例にとれば、個々の対立遺伝子は HLA-A\*0203 などと表記される。これは血清学的には HLA-A2 (HLA-A の 2 番目の抗原の意) とタイプされていたもので、DNA レベルではその 3 番目のサブタイプであることを意味している。ちなみに HLA-A2 には HLA-A\*0201 から HLA-A\*0219 まで 19 種類のサブタイプが存在する。ヒトとマウスの MHC ハプロタイプの記載法は全く異なる。ヒト MHC の研究とは異なり、マウス MHC の研究は野生マウスではなく純系マウス (MHC はホモ接合) を用いた研究からはじまったため、ハプロタイプに記号をつけたほうが手取り早かった。たとえば BALB/c という純系マウスの H-2 ハプロタイプは d, C57BL/6 のハプロタイプは  $\text{b}^{\text{b}}$  という肩文字で H-2d のように表す。BALB/c の H-2 は d/d のホモ接合である。個々の対立遺伝子 (タンパク質) は I-Ad のように表す。これに対して HLA の研究はいわば「野生型のヒト」を対象に進められてきたため対立遺伝子に番号がつけられている。したがって、ハプロタイプは HLA-A24-B52-DR2-DQ1 のように表す。

イラストマップに示すように、APC は細胞外液中より抗原を取り込み、エンドソームに封じ込める。B 細胞においては細胞表面の免疫グロブリン分子が抗原を捕らえ、これが細胞内のエンドソームに取り込まれる。マクロファージにおいてはマンノースレセプター、シアル酸をもつリガンドに結合するスカベンジャーレセプター、CD14 や補体レセプターの CR3 (CD11b/CD18) や CR4 (CD11c/CD18) を介して細菌などを捕らえ貪食する。エンドソーム

免疫系による抗原認識と抗原処理

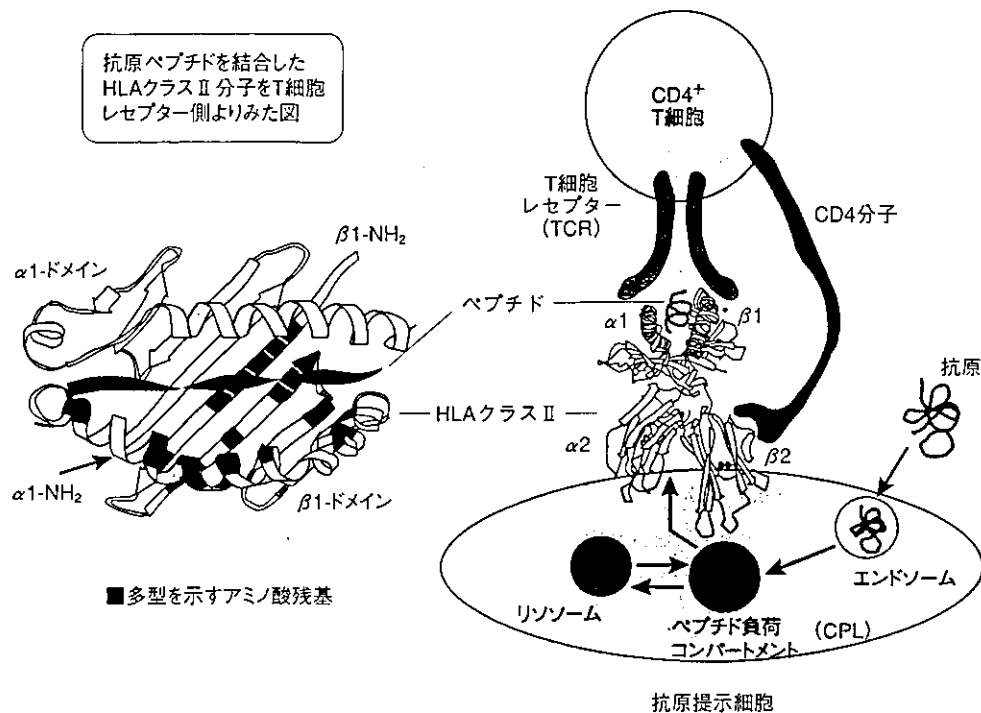


図2 ● HLA クラスII分子によるCD4 T細胞への抗原ペプチドの提示

においてこれらの抗原は、カテプシンB、DおよびEをはじめとするタンパク質分解酵素によりペプチドへと分解され、MIIc (MHC class II compartments) やCIIv (class II vesicles) とよばれる別の細胞内コンパートメントへ運ばれる。MIIcはエンドソーム系の後期の特殊な小胞性分画である。

クラスII分子の生合成の経路も小胞体内に輸送されることから始まるため、小胞体内へと入ってくるペプチドや細胞自身が新たに産生したペプチドがクラスII分子に結合するのを防がなければならない。インバリアント鎖 (Ii鎖) がこの役割を担っており、クラスII分子の抗原ペプチド収容溝はIi鎖でマスクされている。Ii鎖は三量体を形成し、それぞれのサブユニットは1個のクラスII分子と結合している。Ii鎖の第81～104アミノ酸残基にまたがるCLIP (class II associated Ii chain peptide) 配列のとくに第87～101残基がクラスIIのペプチド収容溝を覆っている。

クラスIIとIi鎖の複合体はMIIcに移動したのち、カテプシンSにより分解され、CLIPを除いてクラスIIから離れる。HLA-DM分子はCLIPの解離と抗原ペプチドの結合を促進する。MIIcは形態的に多層性小胞と多小胞体に分類される。前者ではIi鎖は切断されていないが、後者ではCLIPのみがクラスIIと結合して残っている。

クラスII分子様の構造をもつDO分子は、胸腺皮質上皮細胞とB細胞にのみ発現している。この機能は完全に解明されたわけではないが、細胞内ではDM分子と会合しており、DM分子がCLIPを抗原ペプチドに置換する反応を、pH依存性かつクラスII、DMおよびDO分子の量的比率に依存して促進したり抑制したりすることにより、抗原提示の調節に関与しているらしい。

細胞表面に発現したクラス II はリサイクリング経路により再びエンドソーム系に取り込まれ再利用される。これにはクラス II  $\beta$  鎖の細胞内ドメインのロイシンが関与している。リサイクリングクラス II は CLIP でマスクされておらず、pH の高い初期エンドソームでもペプチドを結合できるため、初期エンドソームに存在する分解されやすいタンパク質由来のペプチドを結合して細胞表面に提示する。抗原のなかにはおもにこのリサイクリングクラス II を介して T 細胞に提示されるものがあることが知られている。

また、MHC-ペプチド-TCR 複合体が形成されると、TCR 側から T 細胞内にシグナルが伝達されるだけでなく、MHC 側から APC 内にもシグナルが伝達されることが明らかになりつつある。



Keyword

### 3 MHC クラス I による抗原提示

イラストマップは

p.73



クラス I 分子は  $\beta_2$  ミクログロブリンと MHC のクラス I 領域によってコードされる  $\alpha$  鎖からなるヘテロ二量体である (図 1 参照)。  $\alpha$  鎖の違いによって HLA-A, B, C, E, F, G が区別される。分子の先端部分に  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメインからなる溝状の構造を形成し、このなかに 8 ないし 11 アミノ酸残基からなるペプチド (多くは 9 残基からなるペプチド = 9 mer) を収容する。HLA-A, B, C はほとんどすべての有核細胞と血小板に発現している。これに対し HLA-E, F, G は、限られた組織、細胞に発現している。たとえば、HLA-E は休止期 T 細胞、皮膚などに、HLA-F 抗原は休止期 T 細胞、胎児肝などに、HLA-G 抗原は胎盤トロホプラストにおもに発現している。

細胞にウイルスやある種の細胞内寄生性細菌などが感染すると、その遺伝子は宿主細胞のなかで転写および翻訳され、微生物由来のタンパク質が産生されて細胞質中に放出される。また腫瘍細胞ではこれらの細胞にユニークなタンパク質、あるいは正常な細胞では少量しか産生されないタンパク質が大量に産生される場合がある。このようなタンパク質の多くは細胞質内でプロセッシングを受けてペプチドへと分解される。すなわち、細胞質内で過剰に産生されたか、あるいは変性したタンパク質にはユビキチンが複数結合し、プロテアソーム (proteasome) あるいは LMP (large multifunctional protease) とよばれるタンパク質分解酵素の複合体が、おもにユビキチン化されたタンパク質を特異的に認識して、これをエネルギー (ATP) 依存性にペプチドへと分解する。ペプチドは小胞体 (ER) 内に輸送された後にすべての有核細胞が発現するクラス I 分子に結合して細胞の表面に発現する (イラストマップ)。

CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T 細胞は、自己のクラス I 分子に結合した非自己抗原ペプチドを識別して活性化される。この際に CD8 分子はクラス I 分子の  $\alpha 3$  ドメイン上の第 222 ~ 229 アミノ酸残基が形成するループに結合することにより標的細胞と T 細胞との間の細胞間接着を増強するとともに、細胞質部分を介して Lck チロキシンキナーゼを活性化することにより T 細胞の活性化を促進する。

ナチュラルキラー (NK) 細胞のレセプターに結合することにより NK 細胞の細胞傷害活性を抑制することも、クラス I 分子の重要な機能の 1 つである。TCR が MHC クラス I およびクラス II 分子とどのように結合するかを図 3 に示した。

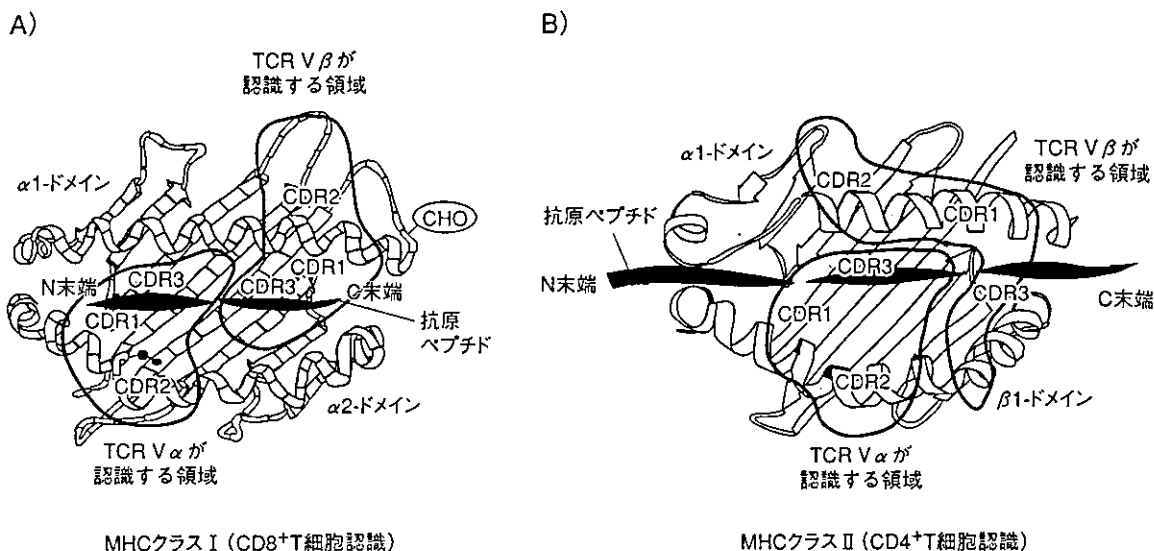


図3 ● TCRによるMHCクラスIあるいはMHCクラスII分子・ペプチド複合体の認識

ペプチドの主鎖の方向と、 $V\alpha$ 、 $V\beta$ 鎖それぞれのドメイン中央部を結んだ線とのなす角度が $CD8^+$ T細胞のTCRでは斜め(45~70°)になっているのに対して(diagonal mode)、 $CD4^+$ T細胞のTCRはより直角に近い(約70~80°)状態で結合して認識している

Keyword

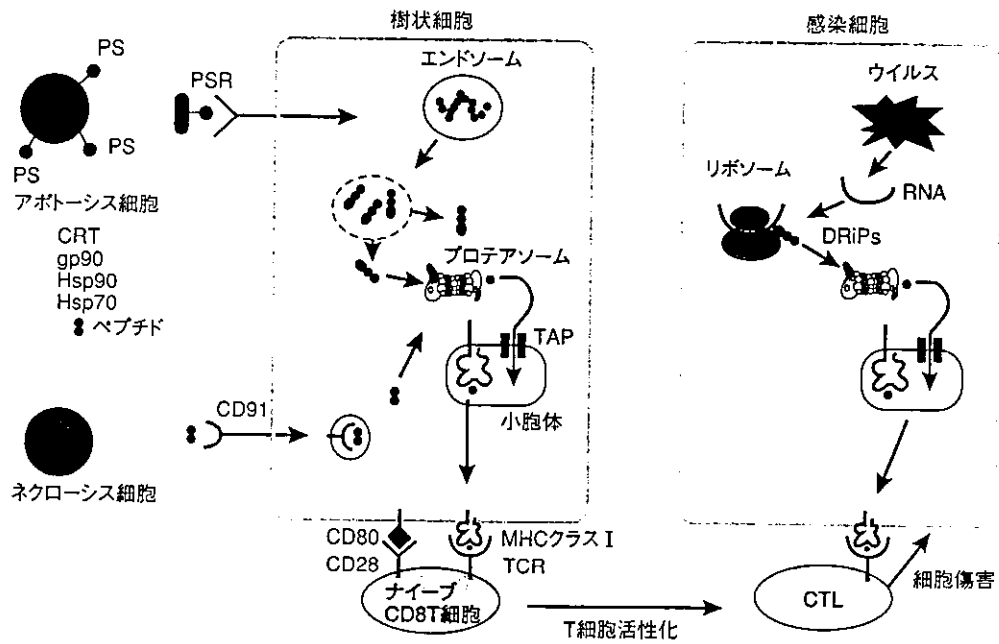
4 クロスプレゼンテーション

イラストマップは

p.73



樹状細胞(dendritic cells: DC)はナイーブT細胞を活性化することができるもっとも強力な抗原提示細胞である。MHCクラスIIを多量に発現している。マクロファージはGM-CSF + IL-4の刺激により未熟樹状細胞(imature myeloid dendritic cells)へと分化し、この際に接着分子の発現低下が起こる。この結果、培養プレートからはがれやすくなり、生体内では組織間の移行が起きやすくなる。未熟樹状細胞はさらにTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PGE2、LPSなどの刺激を受けて、成熟樹状細胞へ最終的に分化する。成熟樹状細胞はほとんど食作用能をもたないが、非リンパ系組織に存在する未熟樹状細胞は外来物質を取り込み、プロセッシングを行いつつリンパ組織へ移動し抗原をT細胞に提示する。未熟樹状細胞はアポトーシスによる死細胞を捕食し、これらの細胞中の抗原のプロセッシングと自己MHCクラスI、クラスII分子への抗原ペプチドの結合、および $CD8^+$ 、 $CD4^+$ T細胞への提示を行うことができる(クロスプレゼンテーション、図4)。実はこのようなクロスプレゼンテーションはいわゆるミエロイド(myeloid)DCよりもリンパ性(lymphoid)DC〔ヒトでは形質細胞様(plasmacytoid)DC〕でより効率的に起こることが知られるようになった。lymphoid DCはIL-3で誘導することができる。



免疫系による抗原認識と抗原処理

図4 ● クロスプレゼンテーションの経路

APCにより外来性に取り込まれた抗原が、通常のクラス I 抗原提示経路に乗ることによりクロスプレゼンテーションが遂行される。PS：ホスファチジルセリン、DRiPs：defective ribosomal products (折りたたみに支障をきたした新生タンパク質)、TAP：transporter associated with antigen processing、CTL：キラーT細胞

Keyword

5 非典型的 MHC

イラストマップは p.73

前述した典型的 MHC クラス I 分子とは異なる分子群 (非典型的 MHC クラス I 分子: クラス Ib) の存在がクローズアップされるようになった。典型的 MHC クラス I 分子はクラス Ia とよばれているが、マウス I-A や I-E 分子の血清学的総称として用いられる Ia 抗原分子 (I-associated の略) との区別には注意を要する。その後、同じような分子が抗原レベルや遺伝子レベルで次々に発見された。その過程で、非典型的 MHC クラス I 分子は、その遺伝子が MHC 領域内 (ヒト第 6 染色体、マウス第 17 染色体) に存在するものと MHC 領域外に存在するものとに区別されることがわかってきた。前者を狭義のクラス Ib、後者をクラス Ic とよぶ新しい命名法も提唱されている。

MHC クラス Ib 分子は、クラス Ia 分子によく似た遺伝子構造とタンパク質構造をもつ。クラス Ia 分子には高度の多型 (個体差) が存在するのに対して、クラス Ib 分子の多型の程度は小さい。クラス Ia 分子が広範な組織に発現するのに対して、クラス Ib 分子はクラス Ia 分子と同じように広範な組織発現を示すもの、限られた組織でしか発現していないもの、またそれらの中間的な発現様式をとるものが存在する。表 1 にクラス Ib、Ic 遺伝子のマップを示し

表1 ● MHC およびMHC 様遺伝子座の分類

クラス分類	マウス	ヒト
クラス Ia	H-2K (17) H-2D (17) H-2L (17)	HLA-A (6) HLA-B (6) HLA-C (6)
広義のクラス Ib		
狭義のクラス Ib	H-2Q1~H-2Q10 (17) H-2T1~H-2T24 (17) H-2M1~H-2M10 (17)	HLA-E (6) HLA-F (6) HLA-G (6)
狭義のクラス Ic	CD1 (3) FcRn (7)	CD1 (1) FcRn ZAG (7) MR1 (1)
クラス II	I-A (17) I-E (17)	HLA-DR (6) HLA-DQ (6) HLA-DP (6)

かっこ内には、その遺伝子が存在する染色体番号を示した。同じ列に並んだマウスとヒトの遺伝子に対応性があるわけではない

た。

Mta は典型的 MHC 分子に拘束されずに CTL (キラー T 細胞) に提示される母親由来の抗原であり、MTF (maternally transmitted factor) ともよばれる。Mta の本態は、ミトコンドリア DNA がコードする NADH デヒドロゲナーゼのサブユニット 1 (ND1) の N 末端領域のペプチドであり、N 末端のメチオニンがホルミル化されていることが特徴である。N 末端がホルミル化されたペプチドは、ホルミル化されていないものに比べて 1 万倍も強い親和性で Hmt (マウス H-2M3 遺伝子産物) に結合することが知られている。高等動物にとって、ミトコンドリア起源のペプチド以外は、N 末端がホルミル化されたペプチドのすべてが“非自己”(原核生物) であり、自己と非自己を識別するための単純でエラーの少ない機構であるということができよう。

MR1 は最近、mucosal-associated invariant T cells (MAIT 細胞: マウスでは Va19Ja33, ヒトでは Va7.2Ja33 であり、腸粘膜固有層に優位に存在する) が認識する MHC であることが確認されて話題をよんでいる。

ヒトの CD1 遺伝子群は CD1A から CD1E までの 5 つの遺伝子より構成され、第 1 染色体上に位置する。このうち CD1A ~ CD1D の 4 つの遺伝子によってコードされるタンパク質 (それぞれ CD1a, CD1b, CD1c, CD1d と表記される) が、 $\beta_2$  ミクログロブリンと会合した脂質抗原提示分子として細胞表面に発現する。CD1 分子と MHC クラス I 分子の細胞外領域は共通のドメイン構造 ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ドメイン) を有し、 $\alpha_1$  と  $\alpha_2$  ドメインは疎水性の強い抗原収容溝を形成しているため脂質の結合に適している。

ヒト CD1 分子は相同性の程度によりグループ 1 CD1 (CD1a, CD1b, CD1c) とグループ 2 CD1 (CD1d) に分類される。マウスやラットではグループ 2 のみが存在している。グループ 2 は血球系細胞に広く分布し、海綿動物由来の糖脂質である  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) を結合してナチュラルキラー細胞の表面マーカーを発現した T 細胞 (ナチュラルキラー T 細胞: NKT 細胞) を活性化する。NKT 細胞はごく限られた種類の TCR しか発現して

表 2 ● CD1 分子に結合するリガンド

抗原	由来	CD1分子	T細胞
<b>菌由来抗原</b>			
ミコール酸	結核菌	CD1b	$\alpha\beta$ T細胞
リポアラビノマンナン	ライ菌	CD1b	$\alpha\beta$ T細胞
グルコースモイマイコレート	<i>M.phlei</i>	CD1b	$\alpha\beta$ T細胞
ホスファチジルイノシトールマンノシド	合成リン脂質	CD1b	$\alpha\beta$ T細胞
ヘキソシル-1-ホスホイソプレノイド	結核菌	CD1c	$\alpha\beta$ T細胞
未同定菌由来脂質	ND	CD1a	$\alpha\beta$ T細胞
<b>自己由来抗原</b>			
ガングリオシドサルファチド	神経・脳細胞	CD1b	$\alpha\beta$ T細胞
グリコシルホスファチジルイノシトール	哺乳類細胞	CD1d	NKT細胞
未同定自己由来脂質	ND	CD1a	$\alpha\beta$ T細胞
	ND	CD1c	$\alpha\beta$ & $\gamma\delta$ T細胞
	ND	CD1d	NK(?)T細胞
<b>その他</b>			
疎水性ペプチド	合成ペプチド	CD1d	$\alpha\beta$ T細胞
$\alpha$ -ガラクトシルセラミド	合成糖脂質	CD1d	NKT細胞

ND：未同定

免疫系による抗原認識と抗原処理

いないことから、限られた種類の脂質抗原しか認識できないと考えられる。むしろ Th1/Th2 のバランスや NK 細胞の機能をコントロールする役割を担っているらしい。それに対して、グループ 1 は胸腺外ではおもに樹状細胞に発現しており、自己由来の脂質や結核菌など細菌由来の脂質・糖脂質 (memo 4 参照) を効率よく T 細胞に提示する (表 2)。 $\alpha\beta$  型 T 細胞 (おもに CD8<sup>+</sup> T 細胞だが CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> や CD4<sup>+</sup> T 細胞の報告もある。3 章-1 参照) だけでなく、 $\gamma\delta$  T 細胞 (腸管に存在し、おもに V $\delta$ 1 型の TCR を発現した  $\gamma\delta$  T 細胞) のなかにもグループ 1 CD1 分子によって活性化される T 細胞がある。

#### memo 4 糖脂質抗原

1994 年に結核菌の細胞壁構成脂質の 1 つであるミコール酸が CD1 分子によって抗原提示されることが報告された。ミコール酸やリポアラビノマンナンは、結核菌の生存に必須の脂質・糖脂質であり、病原性とも深く関連している。このような脂質は Toll-like receptors を介してマクロファージを活性化し、肉芽腫の形成などにも関与している。このような脂質抗原の提示を担っているのが CD1 タンパク質である。CD1d によって提示される  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドは人工的なアゴニストである。ヒトの生体内にリガンドが存在することが推測されているが、明らかにはなっていない。

TCR 遺伝子の再構成を伴う多様な抗原認識機構を支えている抗原提示分子は典型的 (古典的) MHC 分子とグループ 1 CD1 分子 (CD1a, CD1b, CD1c) であるといえよう。

## キーポイント

- 抗原提示細胞は MHC と抗原ペプチドの複合体を T 細胞に提示する。
- MHC はその分子構造によってクラス I とクラス II に分類され、それぞれ異なった細胞区画の抗原ペプチドを提示する。
- MHC 分子の個体差は抗原ペプチド収容溝に集中しているため、T 細胞応答の抗原特異性にかかわる個体差は MHC が支配する (免疫応答遺伝子)。
- クラス II 経路には小胞体、インバリアント鎖、CLIP、DO、DM 分子などが関与している。
- クラス I 経路にはプロテアソーム、LMP、TAP などが関与している。
- 樹状細胞は外来抗原をクラス I 分子で提示する機能も有している。
- クラス I 分子に似ている多くの「非典型的 MHC」が知られており、機能的にも多様である。

## 参考文献

- 1) Bjorkman, P. J. et al. : Nature, 329 : 506-509, 1987  
→ HLA 分子の基本的分子構造 (三次元) をはじめて明らかにした。
- 2) Mandelboim, O. et al. : J. Exp. Med., 184 : 913-922, 1996  
→ NK 細胞と標的細胞の相互作用に HLA がどのように関与しているかを明らかにした。
- 3) Albert, M. L. et al. : Nature, 392 : 86-89, 1998  
→ 樹状細胞がアポトーシスに陥った細胞の抗原をクラス I 分子で提示できることを示した。
- 4) Matsushita, S. et al. : J. Exp. Med., 180 : 873-883, 1994  
→ 疾患と特定の型の HLA との相関を分子レベル (HLA 分子と抗原ペプチドの相互作用) で証明したはじめての例。
- 5) Romagnoli, P. & Germain, R. N. : J. Exp. Med., 180 : 1107-1113, 1994  
→ CLIP が MHC 分子の構造保持、輸送、ペプチドとの結合に重要な役割を担っていることを示した。
- 6) Denzin, L. K. et al. : Science, 278 : 106-109, 1997  
→ 抗原提示における HLA-DO 分子の役割を明らかにした。
- 7) Lang, P. et al. : Science, 291 : 1537-1540, 2001  
→ HLA 分子がシグナルを伝える分子基盤について明らかにした。
- 8) Matsuoka, T. et al. : J. Immunol., 166 : 2202-2208, 2001  
→ クラス II 分子を介したシグナル伝達において、HLA-DR, -DQ, -DP 分子が異なる役割を担っていることを示した。



厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

**難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の  
開発に関する臨床研究**

平成 16 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者

**石橋 大海**

平成 17 (2005) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する臨床研究 ..... 1  
主任研究者 石橋大海

## II. 分担・協力研究報告

1. 原発性胆汁性肝硬変に対する治療方針の現状把握のための調査  
-肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査のまとめ- ..... 13  
研究協力者 酒井浩徳
2. 複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果 ..... 18  
分担研究者 渡部幸夫
3. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測マーカーの同定 ..... 21  
分担研究者 中村 稔
4. PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究 ... 24  
分担研究者 大曲勝久
5. PBCにおける生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討 ..... 26  
研究協力者 恒吉正澄
6. ゲノミクスに基づく難治性自己免疫性肝疾患の病態解析と診断・治療への応用に  
関する研究 ..... 28  
分担研究者 金子周一
7. PBCにおけるPPAR $\alpha$ と酸化酵素の発現 ..... 30  
分担研究者 伊東正博
8. 原発性胆汁性肝硬変の病態形成におけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナルの関与 ..... 32  
分担研究者 田中 篤
9. PBCにおける胆管・肝細胞障害/再生を特徴づける、各種肝転写因子および  
増殖因子の発現/機能変化について ..... 34  
研究協力者 小森教正
10. 分子生物学的手法による肝内胆管細胞のheterogeneity(多様性)についての解析 ... 36  
分担研究者 上野義之
11. PBCと関節リウマチとの共通の因子の検討 ..... 39  
分担研究者 右田清志

12. 抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性T細胞の同定と その誘導機序・臨床応用に関する研究 .....	40
分担研究者 若月芳雄	
13. 原発性胆汁性肝硬変における Toll 様レセプターを介した単核球活性化の研究 ...	42
分担研究者 市田隆文	
14. 胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析 .....	45
分担研究者 下田慎治	
15. 自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析と治療応用に関する研究 .....	47
分担研究者 喜多宏人	
16. Th1/Th2 バランス制御法の開発：インバリアント NKT 細胞亜分画による制御 .....	49
分担研究者 松下 祥	
17. ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける PPAR $\gamma$ リガンドによる抗炎症効果の検討 .....	56
分担研究者 原田憲一	
18. 難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する研究 .....	60
分担研究者 西原利治	
19. PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道傷害機序の解析・治療法開発に関する研究 .....	62
分担研究者 松口徹也	
20. 生体肝移植を施行した原発性胆汁性肝硬変症例の臨床経過 .....	64
分担研究者 兼松隆之	
21. 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用 .....	66
分担研究者 坪内博仁	
22. ヒト幹細胞を用いた肝再生 .....	69
分担研究者 石川文彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	71
IV. 参考資料	
・平成16年度 班員名簿 .....	77
・平成16年度 第1回班会議プログラム .....	78
・平成16年度 第2回班会議プログラム .....	81
・PBCフォーラム プログラム・抄録集 .....	84

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する臨床研究

主任研究者 石橋 大海 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：本研究の目的は、難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自己免疫性肝炎（AIH）を根治的に治療する治療法や進展を阻止し改善する治療法、あるいは発症を予防する画期的な方法を開発することである。

本年度の研究成果として以下の新知見を得た。

- 1) PBC患者の予後不良群を同定するために極めて有用な抗 gp210 抗体の測定系を開発した。
- 2) 治療標的分子の候補として、interferon- $\gamma$ 、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、Wnt-2B、 $\beta$ -catenin、MMP-3 遺伝子を同定した。
- 3) 胆管上皮の治療標的細胞を同定する目的で、胆管上皮細胞間での遺伝子発現の相異を明らかにし、小型胆管細胞に選択的に発現されている蛋白 EphA5 を同定した。
- 4) 抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性 T 細胞を同定した。
- 5) PBC の病態初期には TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している。
- 6) 胆管上皮細胞は抗原提示細胞としての機能はなく、胆管上皮細胞が産生するプロスタグランジン E2 (PG-E2) の産生によって T 細胞の増殖を制御する機能を有する。
- 7) 自己反応性 T 細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる。
- 8) ヒト iNKT 細胞サブセットのバランス制御による人為的 Th1/Th2 応答制御の可能性を示した。
- 9) PBC 治療薬のターゲットである PPAR $\alpha$  の活性化の程度を非侵襲的に検討する目的で、肝臓における脂肪酸の  $\beta$  酸化能を in vivo で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。
- 10) PPAR $\gamma$  の内因性リガンドである 15d-deoxy-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) は細胞毒性が低く、PPAR $\gamma$  発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示し得る結果を得た。
- 11) 動物モデルとして T 細胞特異的なドミナントネガティブ型 MKP-M トランスジェニックマウスを作製した。
- 12) 肝移植後の組織学的再発防止には適切な免疫抑制剤使用が重要である結果を得た。
- 13) 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の非臨床試験（安全性試験）を行い、臨床応用実現化の可能性を得た。
- 14) 純化したヒト臍帯血、骨髄由来幹細胞から肝細胞が再生することを明らかにした。
- 15) ヒト疾患モデルとして、新規免疫不全動物を作成し、それをレシピエントとしてヒト幹細胞を移植する異種移植アッセイ系の開発に成功した。

分担研究者	渡部 幸夫	国立相模原病院・消化器科	
中村 稔	長崎医療センター・臨床研究センター	上野 義之	東北大学大学院 消化器病態学
右田 清志	長崎医療センター・臨床研究センター	原田 憲一	金沢大学大学院・形態機能病理学
伊東 正博	長崎医療センター・臨床研究センター	石川 文彦	九州大学大学院・病態修復内科学
兼松 隆之	長崎大学大学院・移植・消化器外科	研究協力者	
坪内 博仁	宮崎大学医学部・第二内科	八橋 弘	長崎医療センター・臨床研究センター
松下 祥	埼玉医科大学医学部・免疫学	藤岡ひかる	長崎医療センター・臨床研究センター
松口 徹也	鹿児島大学大学院・歯学総合研究科	大黒 学	長崎医療センター・臨床研究センター
市田 隆文	順天堂大学医学部・消化器内科	小森 敦正	長崎医療センター・臨床研究センター
西原 利治	高知大学医学部・消化器病態学	松本 武浩	長崎医療センター・臨床研究センター
金子 周一	金沢大学大学院・がん遺伝子治療学	酒井 浩徳	九州医療センター・消化器科
若月 芳雄	京都大学大学院・医学研究科内科学	中村 陽子	国立相模原病院・消化器科
田中 篤	帝京大学医学部・内科学講座	恒吉 正澄	九州大学大学院・形態機能病理学
喜多 宏人	自治医科大学・消化器内科	松浦 栄次	岡山大学大学院・病態機構学
下田 慎治	九州大学大学院・病態修復内科学	井戸 章雄	京都大学医学部・探索医療センター
大曲 勝久	長崎大学大学院・消化器病態制御学	蒲原 行雄	長崎大学大学院・移植消化器外科

## A. 研究目的

本研究の目的は、難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)と自己免疫性肝炎(AIH)の画期的治療法を開発することである。そのために、今年度は以下の項目に関して研究を進めた。

1. 現状の治療の解析
2. 予後予測マーカーの開発と予後不良患者の判別
3. 治療標的分子の探索
4. 免疫機構とその制御および制御法の開発
5. 治療薬の開発および治療効果の評価法
6. 治療法開発のための動物モデルの開発
7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発

## B. 研究方法

### 1. 現状の治療の解析

1) PBCに対する治療の現況：肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査の報告（酒井浩徳）

PBCの多くの症例は安定した経過をたどるものの、一部の症例は進行し予後不良の経過をたどることがわかっている。しかし、現時点では経過や予後を予測することは困難であり、両者を区別することなく治療を行っているのが現状である。本研究は、PBCの治療に対する基本的方針（治療者各人の治療方針）の現状把握と検証を目的として、肝臓学会西部会評議員を対象に治療方針に関するアンケート調査を行った。

2) 複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果（渡部幸夫）

1998年以後国立病院機構政策医療肝疾患ネットワーク参加施設で自己免疫性肝炎(AIH)新規症例を登録してきた。登録症例391例のうち肝炎ウイルス合併例を除いた265例を調査対象として予後調査を施行した。

また、AIH症例の中でどのような症例が肝硬変へ進展するのか、その要因を検討し、どのような治療によりAIHの予後が改善されるのかを検討するため、治療前後に複数回肝生検を施行している4施設より肝組織標本を検討し得た39例について肝組織変化と臨床経過を比較した。

2. 予後予測、予後不良患者の判別

3) PBCの長期予後予測マーカー（中村 稔）

PBCには、長期間の経過観察でもほとんど進行しない予後良好な症例と、進行して肝不

全に至る予後不良な症例とが混在することが知られていたが、両者を鑑別するために有用な血清マーカーは知られていなかった。当長崎医療センターで過去22年間に長期経過を観察したPBC患者71症例の経過血清を用いて、核膜孔蛋白の一つであるgp210蛋白に対する自己抗体がPBCの長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることを明らかにした。また、全国の国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期経過観察されたPBC患者80症例の解析して、その有用性について確認した。

4) PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究（大曲勝久）

免疫グロブリンサブクラス別の抗M2抗体がPBCの経過中にどの程度変動するのか、また、IgAクラス抗M2抗体はPBCの進展予測因子となりうるかについて検討した。

5) PBCにおける生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討（恒吉正澄）

移植に至った22例の臨床的背景とともに摘出肝を病理形態学的に検討した。対象は1999年6月～2004年7月までに当教室において診断したPBC22例（男：1、女：21）で、平均年齢50.3歳、初発時年齢41.1歳、AMAは19例で陽性、初発時から手術までの期間は平均9.2年である。術後5例が死亡したが、現在まで再発例は認めていない。

3. 治療標的分子の探索

6) ゲノミクスに基づく難治性自己免疫性肝疾患の病態解析と診断・治療への応用（金子周一）

PBC肝生検材料を用いて、DNAチップによる病態診断や治療の選択に寄与する診断法の開発を行う基盤研究を行った。

7) PBCにおけるperoxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )の発現（伊東正博）

PPAR $\alpha$ には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、抗アポトーシス作用があることが知られている。UDCA抵抗性PBC症例にはPPAR $\alpha$ のリガンドであるフィブレート系の薬剤が選択される場合が多い。本研究ではフィブレート系の薬剤選択の理論的根拠を検討する目的で、PBCにおけるPPAR $\alpha$ と肝細胞内酸化酵素の発現を検討した。

8) 胆管結紮ラットにおける肝内発現遺伝子の包括的検索（田中 篤）

PBCの胆管上皮細胞に特異的に発現している分子としてWnt分子を同定し、PBCの病態生理におけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達経路の役割について検討してきた。今回、PBCおよび対照肝においてreal-time PCRによってWnt-2B分子の発現を検討した。

#### 9) 遺伝子発現からみたヒト培養肝内胆管細胞の多様性 (小森敦正)

外科手術摘出肝組織より抗上皮細胞抗体マイクロビーズを用いて肝内胆管上皮細胞(HIBEC)の分離を行い、同上皮細胞におけるヒトToll like receptors (TLRs) mRNAの発現、LPSおよびLTA刺激によるIL-8, IL-6, MCP-1のNF- $\kappa$ B依存性発現遊離亢進、LPSおよびLTA刺激に対するHIBEC間での反応性の差の有無を検討した。

#### 10) 肝内胆管細胞のheterogeneity (多様性) についてのプロテオーム解析 (上野義之)

小葉間胆管に特異的に発現される分子・蛋白の解明を進めるために、従来行ってきたcDNAマイクロアレイ法に加えて、2Dゲルを用いた蛋白質の網羅的検討を行うことを目指し基礎検討を行った。

#### 11) PBCと関節リウマチとの共通の因子の検討 (右田清志)

PBCと関節リウマチ(RA)の合併が多いことから、病因・病態に関連する共通の因子を検討する目的で、PBC患者各73名の血清を用い、リウマトイド因子(RF)とRAに特異的な自己抗体である抗CCP抗体を測定した。

#### 4. 免疫機構とその制御および制御法の開発

#### 12) 肝類洞の抗原提示細胞の機能について (若月芳雄)

免疫調節性肝CD4T細胞が、肝類洞に存在する肝樹状細胞により抗原提示をうけて、抗原非特異的に肝内での炎症反応を抑制することを見出したので、これを治療に応用することを目的に、その基礎的検討を行うとともに、その臨床的意義を肝炎モデルで検討した。

#### 13) PBCにおけるToll-like receptorを介した単核球活性化の検討 (市田隆文)

PBCにおけるTLRを介した自然免疫系活性化の病態への関与について検討するため、無症候性PBC(aPBC)5例、症候性PBC(sPBC)3例と健常人5例より末梢血単核球(PBMC)を分離し、細菌認識にかかわるTLR2, TLR4のリガンドであるpeptidoglycan (PGN)、lipopolysaccharide (LPS)で刺激後各種解析を行った。

#### 14) 胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析 (下田慎治)

胆管上皮細胞に自己抗原であるPDC-E2 163-176ペプチドを表出させた場合に、この自己抗原反応性T細胞が抗原反応性に増殖するなど、胆管上皮細胞に抗原提示細胞としての役割があるかを検討することで、胆管上皮細胞が積極的に自己免疫反応に関与しているかどうかについて検討した。

#### 15) CD8 T細胞による免疫制御機構の解析 (喜多宏人)

抗ミトコンドリア抗体(AMA)陰性患者においてもCD8陽性自己反応性T細胞が活性化されているかどうかを明らかにするために、AMA陰性患者におけるCD8陽性自己反応性T細胞応答を解析した。

#### 16) Th1/Th2 バランス制御法の開発 (松下 祥)

ヒトにおいてiNKTサブセットが、DCを介してTh1/Th2 バランスを支配し、免疫応答性をいかにして制御しているのか検討した。

#### 5. 治療薬の評価および治療効果の評価法

#### 17) ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデルMRL/lprマウスにおけるPPAR $\gamma$ リガンドによる抗炎症効果の検討 (原田憲一)

① 培養胆管細胞を用いた検討: PPAR $\gamma$ リガンドとして、内因性リガンドである15d-deoxy-prostaglandin J2 (15d-PGJ2)と3種のチアゾリジン誘導体を用いて、培養胆管細胞に対する細胞障害性およびLPS誘導性NF- $\kappa$ B活性の抑制効果について検討した。

② 動物モデルを用いた検討: MRL/lprマウスは糸球体腎炎や唾液腺炎などの種々の自己免疫疾患を自然発症する遺伝子変異動物であり、またPBC類似の胆管炎も発症する。このMRL/lprマウスを用いて15d-PGJ2の抗炎症効果について検討した。

#### 18) 肝臓における脂肪酸の $\beta$ 酸化能の生体内測定法の開発 (西原利治)

新しい治療薬bezafibrateのレセプターであるPPAR- $\alpha$ の活性化の程度を非侵襲的に検討する目的で、肝臓における脂肪酸の $\beta$ 酸化能をin vivoで半定量化する分子イメージングシステムを開発した。

#### 6. 治療法開発のための動物モデルの開発

#### 19) PBC動物モデルの開発とそれを用いた胆道障害機序の解析・治療法の開発 (松口徹也)

新たに作製したT細胞特異的なドミナントネガティブ型MKP-Mトランスジェニックマウ

スは、Th1 タイプに偏位した抗原特異的免疫反応を示し、PBC 治療の研究のためのマウスモデルとして有用であるか検討した。

#### 7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発 20) 生体肝移植をうけたPBC症例の中期的状況 (兼松隆之)

PBC に対し生体肝移植を施行した PBC 症例の移植後の中期的状況を解析した。

#### 21) 末期肝硬変に対する組み換え型ヒトHGFの臨床応用 (坪内博仁)

末期肝硬変に対する組み換え型ヒトHGFの非臨床試験(安全性試験)として、毒性試験および肝前癌病変および肝発癌に及ぼす影響を検討した。

#### 22) ヒト幹細胞を用いた肝再生 (石川文彦)

PBCおよびAIHにおける画期的治療法の開発のため、ヒト幹細胞の多能性の評価およびヒト疾患モデルの作製を行った。幹細胞は、倫理的に国内外で未だ受容されにくい胚性幹細胞(ES細胞)ではなく体性幹細胞、中でも、骨髄、末梢血、臍帯血の3つの幹細胞源を用いた。一方、造血細胞だけでなく、非造血細胞の含めたprimary cellの生体内での動態を解析するため、獲得免疫系と自然免疫系の両者のシステムを障害したマウスの作製を行った。

\*倫理面への配慮:研究の遂行にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」に則り、当センターおよび各実施施設の倫理委員会で厳正な審査を経た後に準備をすすめ、患者から十分なインフォームドコンセントを得るとともに、登録においては匿名化する。症例登録は肝ネットを利用した。肝ネットは政策医療肝疾患診療・臨床研究ネットワークシステムであり、患者の登録に際しては、施設ごとにその内容を患者に説明した上で同意書を得た。登録された情報に関しては、匿名化して、個人が特定できないような仕組みとした。遺伝子解析に関しては、文部科学省、厚生労働省および科学技術省が共同して策定した「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」(2001年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守し、患者より遺伝子情報を得るための検体を得る施設においては各施設で倫理委員会に諮り許可を得た。動物実験を行なう場合は、動物愛護に配慮した。

## C. 研究成績

### 1. 現状の治療の解析

#### 1) PBC に対する治療の現況: 肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査の報告

診断初期よりUDCAを開始し、UDCAによる効果が不十分の場合ベザフィブラートの追加投与が最も採用されている治療方針であった。しかし、治療開始時期、治療開始時の選択薬やその投与量、第一選択薬が効果不十分の時の対応などに方針の違いがあることも明らかとなった。

#### 2) 複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果

初期診断が慢性肝炎であった225例中予後調査時に臨床的に肝硬変へ進展していた症例は12例(5.3%)であった。肝硬変への進展要因の検討では、副腎皮質ステロイド薬(PSL)治療で完全寛解を維持している症例では肝組織4項目(線維化、グ鞘炎、interface hepatitis、小葉炎)ともすべて改善したが、炎症所見に比して線維化の改善は遅れる傾向があった。

複数回生検症例のうち生検間隔が0.5年以下および生検間未治療例を除いて、最終生検時の肝線維化別にF0-1(軽度)、F2(中等度)、F3-4(高度)の3群に分けて検討した。最終生検時にF2群、F3-4群ではinterface hepatitisとグ鞘炎の改善がF0-1群と比べて乏しかった。

### 2. 予後予測、予後不良患者の判別

#### 3) PBCの長期予後予測マーカー

核膜孔蛋白の一つであるgp210蛋白に対する自己抗体の測定系を開発し、抗gp210抗体が、PBCの長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることを明らかにした。validation studyとして全国の国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期経過観察されたPBC患者80症例の検体を解析した。その結果、抗gp210蛋白抗体がPBCの長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることが確認された。

#### 4) PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究

IgGクラス抗M2抗体は32例中25例(78%)が経過中持続陽性、4例(13%)が持続陰性、3例(9%)では判定が変動した。IgMクラス抗M2抗体は15例(47%)が経過中持続陽性、8例(25%)が持続陰性、9例(28%)では判定が変動した。IgAクラス抗M2抗体は10例(31%)が経過中持



続陽性、13例(41%)が持続陰性、9例(28%)では判定が変動した。また、Scheuer's stageとIgAクラス抗M2抗体との関係を検討では、I期では陽性7例、陰性8例、II期では陽性3例、陰性3例、III期では陽性9例、陰性1例、IV期では陽性2例、陰性0例となり、有意差は認められないものの、ステージが進む程IgAクラス抗M2抗体の陽性率が高い傾向にあった。組織進展例5例では持続陽性が2例、持続陰性が2例、陰性から陽転化した例が1例であった。非進展例11例では持続陽性が8例、持続陰性が3例であった。結論として、IgAクラス抗M2抗体はPBCの進展予測因子として有用ではなかったものの、IgGクラス抗M2抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあった。

### 3. 治療標的分子の探索

#### 5) PBCにおける生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討

移植に至った22例のうち、移植肝3例は組織学的にStage II-IIIの非硬変肝で、いずれも肝は腫大傾向で移植までの平均期間は4年であった。大結節性の肝硬変4例では肝は萎縮傾向で、移植までの平均期間は15年であった。PBCの症例では他の原因による肝硬変症に比し小葉間胆管(100 $\mu$ m以下)数は著明に減少していたが、線維化の程度や胆汁うっ滞との相関はみられなかった。

#### 6) ゲノミクスに基づく難治性自己免疫性肝疾患の病態解析と診断・治療への応用

比較的早期の症例を用いてレーザーマイクロダイセクションにてリンパ球の集簇領域を選択に採取し、包括的な発現遺伝子解析を行った。PBCのリンパ球細胞集団から得られるプロファイルはStage IとStage IIIの相同性が、C型慢性肝炎から得られる相同性よりも高かった。PBCのCNSDCにおける遺伝子発現は、C型慢性肝炎のリンパ球集簇領域における遺伝子発現と比較すると、interferon- $\gamma$ , 7, 11などの発現が亢進していた。これらの遺伝子はStage IIIでは低下していた。またこの亢進はStageが進行すると低下していた。

#### 7) PBCにおける peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )の発現

①進行例と非進行例で初回生検が同じScheuer stageでも interface hepatitisや炎症スコアが高い症例が進行群に有意に

多くみられ、炎症要素が強いほど進行することが予測された。②PPAR $\alpha$ は病変が進行するに従って肝細胞の細胞質・膜発現が亢進していたが、核内移行は少数例にしか見られなかった。肝細胞内 catalase 発現はPBCの進行症例で低下していた。③mRNAレベルでもPPAR $\alpha$ の発現は亢進していた。④肝細胞培養実験で、PPAR $\alpha$ は分裂、増殖する細胞の核内発現がみられ、48時間培養で核、細胞質に発現がみられた。Bezafibrate添加群でPPAR $\alpha$ の発現は亢進、細胞増殖効果、catalase発現亢進が観察された。

#### 8) 胆管結紮ラットにおける肝内発現遺伝子の包括的検索

PBC進行例ではコントロールと比べ、有意差はなかったもののWnt-2Bの発現が増強している傾向がみられた。早期例ではWnt-2Bの発現増強はみられなかった。一方、Wnt分子によって活性化され、種々の遺伝子の転写を促進することが知られている $\beta$ -cateninの活性化は、PBC進行例では見られなかったものの、早期例ではコントロールに比べ多数例で認められた。9) 遺伝子発現からみたヒト培養肝内胆管細胞の多様性

①肝内胆管上皮細胞(HIBEC)におけるヒトToll like receptors (TLR1, 2, 3, 4, 6)mRNAの発現、LPSおよびLTA刺激によるIL-8、IL-6、MCP-1のNF- $\kappa$ B依存性発現遊離亢進、LPSおよびLTA刺激に対するドナーの異なるHIBEC間での反応性の差を確認した。②Liver enriched transcription factors (LETfs:HNF1 $\beta$ , P2 promoter 由来HNF4, FXR)とcytokeratin 7/19の転写発現量を指標にすることで、HIBEC由来細胞クローンが*in vitro*で分類可能であることを明らかにした。

#### 10) 肝内胆管細胞の heterogeneity(多様性) についてのプロテオーム解析

マウス大型・小型の胆管細胞間での蛋白発現プロファイルの比較により、細胞の増殖や、遊走に関与する蛋白 Ephrin 関連蛋白が認められその発現の生理学的意義に対する検討を行った。その結果、EphA5が小型の胆管細胞に選択的に発現されていることが認められ、これは再生が旺盛な細胆管レベルでの胆管細胞の特徴を裏付けるものと考えられた。

#### 11) PBCと関節リウマチとの共通の因子の検討

73名のPBC患者中11名がRF陽性であったが、内2名のみが抗CCP抗体も陽性であり、RAの合併が疑われた。またPBC患者では、健常人に比べ血清MMP-3濃度が有意に上昇しており、

病態との関連が示唆された。

#### 4. 免疫機構とその制御および制御法の開発

##### 12) 肝類洞の抗原提示細胞の機能について

経口から投与された蛋白性抗原が抗原活性を失わずに肝臓に到達し、肝臓で抗原特異的な CD4 T 細胞を活性化すること、活性化に伴い、肝臓では FasL/Fas 二重陽性が発現し、不完全なアポトーシスが起り、抗原非特異的に肝炎を抑制する調節性肝 CD4 T 細胞が誘導されることが判明した。

##### 13) PBC における Toll-like receptor を介した単核球活性化の検討

①PBC 症例では刺激前の CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT および CD56<sup>+</sup>NK 細胞における CD69、TRAIL の発現が有意に高く ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )、また活性化 NF- $\kappa$ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられた。②aPBC 症例では PGN、LPS 刺激により TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8 産生が健常人に比べて有意に高値であり、PBC の病態初期には TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している可能性が示唆された。③sPBC 症例では刺激後も NF- $\kappa$ B p65 が増加せず、サイトカイン産生もわずかで、エンドトキシントランスに近い状態にあると考えられ、aPBC 症例とは明らかな反応性の違いが示唆された。

##### 14) 胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析

胆管上皮細胞に抗原提示細胞としての機能は認められなかった。そればかりではなく、末梢単核球を抗原提示細胞とした場合にも、胆管上皮細胞がその系に同時に存在した場合、通常増殖する T 細胞の増殖が抑制された。T 細胞の増殖が抑制される機序として、胆管上皮細胞が直接抗原提示細胞や T 細胞と接触することによる抑制以外に、液性因子が関与しており、この液性の抑制因子は主に、胆管上皮細胞が産生するプロスタグランジン E2 (PG-E2) であった。また胆管上皮細胞が産生する PG-E2 は、抗原提示細胞や T 細胞が産生する IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  などによって制御されていることも明らかとなった。

##### 15) CD8 T 細胞による免疫制御機構の解析

AMA 陽性 PBC と同様に、AMA 陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞が存在しており、AMA 陰性 PBC においても、T 細胞レベルでの自己抗原に対する異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。AMA 陰性 PBC と AMA 陽性 PBC は自己反応性 T 細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反

応性 T 細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる可能性が示された。

##### 16) Th1/Th2 バランス制御法の開発

異なる iNKT 細胞サブセットが、DC 機能の変化に及ぼす影響を比較検討し、iNKT 細胞サブセットのバランスが末梢における Th1/Th2 応答バランスを制御する重要な要因となり得ることが明らかになった。

#### 5. 治療薬の評価および治療効果の評価法

##### 17) ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける PPAR $\gamma$ リガンドによる抗炎症効果の検討

①内因性リガンドである 15d-PGJ2 はチアゾリジン誘導体に比べ細胞毒性が低く、また LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 活性の抑制も示した。さらに PPAR $\gamma$  アンタゴニストを用いた検討にて、胆管細胞に対する 15d-PGJ2 の抑制効果は、PPAR $\gamma$  依存性のみならず非依存性の系も存在することが明らかとなり、15d-PGJ2 は PPAR $\gamma$  発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示しうることが期待された。

②MRL/lpr マウスを用いた実験で、15d-PGJ2 腹腔内投与群では、唾液腺炎、間質性肺炎、脾炎の軽減が見られた。しかし、胆管炎に関しては発生頻度及び炎症の程度に個体差が大きく、15d-PGJ2 の有効性を確認するためには更なる検討を必要とする。

##### 18) 肝臓における脂肪酸の $\beta$ 酸化能の生体内測定法の開発

PBC における PPAR- $\alpha$  の活性化の程度を非侵襲的に評価する方法として、肝臓における脂肪酸の  $\beta$  酸化能を *in vivo* で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。

#### 6. 治療法開発のための動物モデルの開発

##### 19) PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道障害機序の解析・治療法の開発

独自に開発した T 細胞特異的なドミナントネガティブ型 MKP-M トランスジェニックマウスは Th1 タイプに偏位した抗原特異的免疫反応を示し、PBC 治療の研究のためのマウスモデルとして有用な可能性があることが判明した。

#### 7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発

##### 20) 生体肝移植をうけた PBC 症例の中期的状況

PBC 症例に対する肝移植後、中期的には血清学的再発はあるものの肝機能は保持されている。組織学的には明らかな慢性非化膿性破壊性

胆管炎 (CNSDC) と拒絶の判定は困難であった。拒絶や自己免疫性肝炎様の肝障害はステロイドにて改善したが、継続投与が必要であり、肝移植後の組織学的再発防止と免疫抑制薬の関連性が示唆された。

#### 21) 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用

組み換え型ヒト HGF の急性毒性試験では致死量 >40.0 mg/kg で、特に問題となる所見はみられなかった。反復投与毒性試験では、可逆性の蛋白尿が認められたが、尿中微量アルブミン測定でモニタリング可能であり、腎機能障害をきたす個体はみられなかった。また、肝硬変には組み換え型ヒト HGF の長期投与が必要と考えられるため HGF の徐放化を可能とする HGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを用いた薬効薬理試験を行った。一方、増殖因子である HGF の発癌性を検討するために、肝硬変を背景に肝発癌が誘導されるコリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットに組み換え型ヒト HGF を反復投与したが、HGF は肝癌および肝前癌病変の発生を促進しなかった。

#### 22) ヒト幹細胞を用いた肝再生

ヒト臍帯血および骨髄細胞から CD34+細胞を純化した後に移植した結果、肝細胞、消化管上皮細胞が再生することが示された。この再生のメカニズムが、細胞融合と分化の両者が含まれ、その比率は組織によって異なることを示した。

また、common gamma 鎖の complete null 変異を NOD-scid にバッククロスさせた新規免疫不全マウスでは、獲得免疫系の不全状態 (T-B-) だけではなく、NK 細胞、樹状細胞を含めた自然免疫系の不全状態を実現することが確認された。このマウスに異種となるヒト造血幹細胞を移植したところ、これまでのマウスと比較して有意に高率な造血・免疫細胞の再構築が認められ、今後のヒト幹細胞研究に有用であることが示された。

#### D. 考察

PBC の治療に際しては、UDCA が第一選択薬として多くの症例に使用され、副作用もなく良好な治療成績が得られている。しかし、専門医が現場での治療に際して、治療開始時期、UDCA の投与開始量、UDCA で治療効果不良の場合の対策などにどのように対処しているか、実態が明らかでなかった。調査研究の結果、治療に関して明確な指針はないため、具体的な対応については治療者個々人の考えに基づ

いて治療を行っていることが確認された、エビデンスに基づいた治療指針の策定が必要であることが確認された。

AIH では初期の肝生検所見から長期予後を予測することは困難である。肝線維化を進展させる因子としては、初期治療において完全寛解が得られないこと、PSL 治療を中止すること、頻回の肝炎再燃があることがあげられた。経過中に再度の肝生検を施行し、肝組織所見改善の程度が不十分であれば PSL 投与量などを再考し、再燃回数を減らすことで、肝線維化の進展を遅らせ、改善をもたらすことが可能であると考えられた。

PBC の多くの症例は安定した経過をたどるものの、一部の症例は進行し予後不良の経過をたどることがわかっている。しかし、現状では経過や予後を予測することは困難であり、両者を区別することなく治療を行っている。今回、予後予測マーカーとして抗 gp210 抗体が極めて有用であることを明らかにすることができた。今後は、抗 gp210 抗体を血清マーカーとして、予後不良が予測される症例を対象とした新しい治療研究が可能になるものと思われる。一方、肝不全に至った症例のうち約 20%には抗 gp210 抗体が陰性の症例があることから、これらの症例に対しては、新たな予後予測マーカーを同定する必要がある。

IgA クラス抗 M2 抗体の PBC の進展予測因子としての有用に関しては、今回の検討では明らかにすることはできなかったが、IgA クラス抗体は IgG クラス抗 M2 抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあったことを考慮に入れると、反復測定により PBC の進展を経時的にモニターできる可能性があると考えられた。

PBC に対する究極の治療法は生体肝移植であり、PBC の病態解明や治療法の開発のためには、これら PBC 進行症例の病理学的解析は極めて重要である。今回の移植肝の検討により、PBC の進展メカニズムの解明のためには移植症例における詳細な経過観察とともに、摘出肝を用いた病理学的解析が大切であることが明らかとなった。

PBC の発現遺伝子プロファイルは自己免疫性肝炎と異なること、病期の進行とともにプロファイルが異なることをこれまでの肝組織を用いた解析で明らかにした。今回、比較的早期の病期における細胞毎の遺伝子発現に注目し、発現遺伝子プロファイルを解析した結果、interferon- $\gamma$ , 7, 11 などの発現が亢進

し、Stage IIIでは低下していることを明らかにした。こうした初期における遺伝子発現がPBCの成立に重要な役割を演じているものと予想される。

Fibrateの受容体であるPPAR $\alpha$ の発現は、進行したPBC症例で蛋白レベルおよびmRNAレベルの両方で亢進していたがPPAR $\alpha$ の核内発現は伴っていなかった。Bezafibrateは進行したPBC症例で抗炎症作用、線維化抑制、肝細胞再生などの効果を期待できることを示す病理形態学的な結果が得られた。画期的な治療法の一つとして、新たなPPAR $\alpha$ リガンドの開発が期待される。

$\beta$ -cateninは肝内のbipotential cellから胆管上皮細胞への分化に関与している可能性が報告されており、PBCの早期例では細胆管の増生が旺盛に観察されることを考え合わせると、PBCで $\beta$ -cateninが細胆管の増生に関与している可能性が示唆され、将来的に $\beta$ -cateninを通じた胆管再生というPBCの画期的治療法の開発への萌芽となりうる可能性が示唆された。培養胆管上皮細胞を用いたin vitroの系により、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達経路の胆管上皮細胞分化における役割を、より詳細に検討することが望まれる。

成熟胆管細胞の分化形質・機能は様々な肝転写因子群(HNF1 $\alpha$ ,  $\beta$ , HNF3, HNF4, HNF6, CEBP $\alpha$ ,  $\beta$ , FXR, 等)の発現, 相互作用, 機能調節で制御, 維持されている。またこれらの制御における各種増殖因子, サイトカインの関与も報告されている。分離ヒト胆管細胞を用いて, 胆管細胞/肝細胞障害(胆汁うっ滞を中心に), 増殖時における上記転写因子群, 増殖因子の発現・活性化変化の特異性を解析し, PBCでの慢性肝障害/肝再生病態を, 分化・発生学的な分子レベルで評価することは, 胆管上皮細胞の再生医療の基礎的検討として有用であると考えられる。

PBCにおける胆管障害の特徴として, 肝内胆管のうち小葉間胆管サイズの細胞が選択的に破壊されることがあげられるが, その選択性についての詳細は不明である。肝内胆管細胞には多様性が存在することが知られており, この点についての理解を深めることがPBCの治療に不可欠である。小葉間胆管は再生に乏しい細胞と考えられているが, 人為的にEphの発現を調整することにより, 胆管再生のために新規の治療法の標的分子としての可能性が提唱された。今後は, siRNAを使用して, その検討を行うとともに, 今回確立した手法を用いて, さらに新

規のユニークな蛋白の同定とその解析を行う必要がある。

PBCと関節リウマチの合併を検討した今回の成績では, 73名のPBC患者においてRF, 抗CCP抗体共に陽性の患者は2名のみであり, 抗CCP抗体の特異性, 感度を考慮すると, PBC患者のRA合併率は必ずしも高くないことが示唆された。RA症例で血清MMP-3は上昇することが知られているが, PBC患者では有意にMMP-3が上昇しており, 病期の進行と共にMMP-3が上昇する傾向がみられた。MMPは肝臓の線維化との関連が示唆されているが, 血清MMP-3の上昇と肝炎, 肝硬変との因果関係に関しては, まだ報告が少ない。PBCとMMP-3との関連についても報告は少ないが, MMP-3のプロモーター領域の遺伝子多型の解析において, 原発性硬化性胆管炎(PSC)症例では, 転写活性の高いSNPの頻度が, 健常人に比べ高いことが報告されている。今後, PBCの肝組織におけるMMP-3の発現, 他のMMPsの変化についての解析が必要と思われる。

昨年までの研究で, 経門脈的に肝に流入する抗原により抗原特異的なCD4T細胞の選択と機能的な分化がおこること, 選択分化刺激を受けたCD4T細胞の中から, FasL陽性, IL-4, TGF- $\beta$ , IL-10を産生し免疫調節機能を有する細胞が出現することを明らかにしたが, この免疫調節性CD4T細胞は抗原非特異的にTh1型の免疫反応を抑制するため, PBCにおいても慢性炎症を阻止する細胞機序の一翼をになっている可能性があることが示唆された。

胆管上皮細胞は今までの上皮系細胞で指摘されていたことと同様に, 細胞表面に抗原が提示された場合にでも, 抗原提示細胞としては機能しないことが明らかになった。これに加えて, 他の種類の末梢単核球をはじめとするプロフェッショナルな抗原提示細胞が存在した場合にでも, 胆管上皮細胞がその近傍に存在した場合, PG-E2の産生を通じて, 積極的に細胞免疫を制御する機能があることが示唆された。したがって, 自己免疫反応として, PBCでの胆管炎を考えた場合, 一般的な胆管上皮細胞上に自己抗原が提示され, これを自己抗原反応性T細胞が認識するという関係からだけでは, 持続する破壊性胆管の障害は説明しにくいものと考えられた。

自己抗原特異的T細胞やNKT細胞を制御することによりPBCの進行を制御することが可能であるかどうか, 治療法の開発という観点からも興味あるところである。PBCの自己抗原