

にも肝硬変に至らないPBCにもかかわらず、門脈圧亢進症を呈した報告があり、特発性門脈圧亢進症類似の病態が関与している可能性もあると考えられる。本症例には門脈圧亢進症類似の所見はみられなかったが、非硬変肝の1例では強いinterface hepatitisとlobular hepatitisがみられた。

これまでPBCの硬変パターンについては一定の見解は得られていなかったが、今回の移植肝での検討では多様な線維化像を形成することが示されたが、門脈域を中心とした架橋形成を成す点では共通した所見であった。硬変パターンとの比較において、非硬変例ではいずれも肝は腫大傾向で初発時から移植までの平均期間は4年であったのに対して、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。各々の症例において移植に至るまでは異なる進展様式をとると思われ、進行速度にも差がある可能性が示唆される。

PBCにおける小型小葉間胆管はいずれの症例でも著明に減少しており、その発症メカニズムの中心的な役割を果たしていることは明らかであるが、各症例間や、同一症例内でも場所により多少の差が認められた。

E. 結論

進行したPBCの究極治療は現在のところ生体肝移植であるが、進展メカニズムの解明のためにはこれら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。今後は現在考えられている、予後予測因子、進展因子の発現の検討を中心に研究を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

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

分担研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変材料を用いて、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。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族領域を選択に採取し、包括的な発現遺伝子解析を行った。原発性胆汁性肝硬変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。原発性胆汁性肝硬変のCNSDCにおける遺伝子発現は、C型慢性肝炎のリンパ球集族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。こうした初期における遺伝子発現が原発性胆汁性肝硬変の成立に重要な役割を演じているものと予想された。

A. 研究目的

難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変および自己免疫性肝炎の病態解析に包括的な遺伝子解析（ゲノミクス）の手法を導入する。その結果にもとづいて、自己免疫性肝疾患の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う。

これまでに肝組織を用いた解析を行い、原発性胆汁性肝硬変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報告した。今年度は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する。

B. 研究方法

原発性胆汁性肝硬変のStage I期6例と自己免疫性肝炎のF1の6例、F2の1例、およびC型慢性肝炎のF1の2例、F2の6例、さらに正常肝臓8例を対象にした。DNAチップによる包括的な発現遺伝子解析を行い、その発現のプロファイルを明らかにした。レーザーキャプチャーダイセクション（LCM）法を用いて、浸潤あるいは集族したリンパ球および周辺の肝細胞における遺伝子の発現を明らかにした。

C. 研究結果

比較的早期の症例における発現遺伝子プロファイルを解析した。Hierarchical clusteringにおいて、原発性胆汁性肝硬変と自己免疫性肝炎および正常肝臓の発現遺伝子プロファイルは有意に

分離された。発現が亢進あるいは現弱している遺伝子を解析したところ、リンパ球から発現が変動しているもの、あるいは肝細胞から変動しているものが得られた。

そこでLCMを用いて、CNSDC領域あるいはリンパ球の集族領域を選択的に採取した。得られたサンプルからは、細胞特異的な発現が確認され、手法による他細胞集団の混入はないと考えられた。Hierarchical clusteringを行ったところ、原発性胆汁性肝硬変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。原発性胆汁性肝硬変のCNSDCにおける遺伝子発現は、C型慢性肝炎のリンパ球集族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。

D. 考察

自己免疫性肝炎における病期の進行に関与する遺伝子は初期から後期にかけて同様の遺伝子発現が関与していたのに比して、原発性胆汁性肝硬変においては初期と後期では、変動する遺伝子が異なっていることを昨年報告した。これは原発性胆汁性肝硬変の病期の進展を考える上で重要な成果であった。そこで本年はStage Iの症例を中心に解析した。自己免疫性肝炎やC型慢性肝炎の初期の組織像と比較したが、原発性胆汁性肝硬変の初期における発現遺伝子プロファイルは明らかに異なるものであった。

次に初期において発現が亢進している遺伝子は CNSDC などの病理像に代表されるようにリンパ球の集族とそれに対応する実質細胞の変化が重要であると考え、LCM による細胞集団の分離によって、その発現プロファイルを解析した。CNSDC における発現遺伝子のプロファイルは C 型慢性肝炎のリンパ球集族領域と大きく異なり、interferon-gamma, 7, 11 の発現が亢進していた。またこの亢進は Stage が進行すると低下していた。こうした初期における遺伝子発現が原発性胆汁性肝硬変の成立に重要な役割を演じているものと予想された。

E. 結論

原発性胆汁性肝硬変においては初期と後期で発現している遺伝子のプロファイルが異なっており、とくに CNSDC における発現遺伝子は特徴的であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M Honda, T Shimazaki and S Kaneko: La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site (IRES) directed translation. Gastroenterology (in press)
- 2) T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, N Hoshino, and S Kaneko. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. Genomics 2004;84(5):867-875
- 3) Y Nakamoto, T Suda, T Momoi and S Kaneko. Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. Cancer Res 2004;64(9):3326-3333
- 4) T Shimakami, M Hijikata, H Luo, Y Y Ma, S Kaneko, K Shimotohno and S Murakami: Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. J Virol 2004;78(6):2738-2748

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

PBCにおけるPPAR α と酸化酵素の発現

分担研究者 伊東 正博 長崎医療センター 研究検査部長

研究要旨：PPAR α 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。ウルソ抵抗性PBC症例にはPPAR α 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 α と肝細胞内酸化酵素の発現を検討した。結果：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見られ、炎症要素が強いほど進行することが予測された。②PPAR α 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 α の発現は亢進していた。④肝細胞培養実験で、PPAR α は分裂、増殖する細胞の核内発現のみが見られ、48時間培養で核、細胞質に発現が見られた。Bezafibrate添加群でPPAR α の発現は亢進、細胞増殖効果、catalase発現亢進が観察された。考察：Fibrateの受容体であるPPAR α の発現は進行したPBC症例で蛋白レベル、mRNAレベルで亢進していたが、PPAR α の核内発現を伴っていなかった。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 α リガンドの開発が期待される。

A. 研究目的

PBCには無症候性症例と進行性症例が存在し、多くのPBC症例ではウルソ投与で無症候性に留まっている。しかし進行性症例にはウルソ抵抗性で肝不全や肝移植が必要になる症例も散見される。病理組織学的検討から進行性症例ではinterface hepatitisやlobulitisの存在が重要な形態学的因子であることを明らかにしてきた。ウルソ抵抗性症例にはPPAR α 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。PPAR α には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用などが知られている。しかし、PBCにおけるPPAR α の発現に関する報告はない。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 α と肝細胞内酸化酵素の発現を検討した。

B. 研究方法

1. 組織学的解析

本院において過去生検がなされたPBC 122症例の形態学的な再評価を行い、進行例、非進行例に分けて各群での病理学的な特徴を解析した。進行度分類はScheuer分類を採用し、実質炎、piecemeal necrosis (interface hepatitis)、線維化、銅沈着、肉芽腫形成、胆管消失などをスコ

ア化し判定量的な解析を2名の病理医、肝臓専門医で施行した。

2. 免疫組織化学

パラフィン包埋切片を用いPPAR α 、catalase、CK7、To14の発現をPBC、CHC、CHB、AIH、正常肝で比較検討した。培養細胞を用いPPAR α 、catalaseの発現を検討した。

3. レーザーマイクロダイセクション (LCM) による mRNA 解析

PBC症例の新鮮凍結検体からレーザーマイクロダイセクション(LCM)で門脈息と実質域に分けて検体を分離採取し、totalRNAを抽出。リアルタイムPCRでPPAR α mRNAを定量化。対象にCHC、AIH症例をおいた。

4. 培養細胞レベルでの機能解析

胎児肝から樹立したPrimary Human Hepatocyte (PHH)、胆管細胞由来のBECを用い、LTB4、Bezafibrate添加による細胞増殖能、PPAR α の発現、catalase発現を検討した。

C. 研究結果

1. 進行例と非進行例で初回生検が同じScheuer stageでもpiecemeal necrosisや炎症スコアが高い症例が進行群に有意に多く見られ、炎症要素が強いほど進行することが予測された。CNSDCや

肉芽腫の程度は病変進行と関連はみられなかった。

2. PPAR α 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。他の慢性肝疾患に比し PBC では PPAR α の膜、細胞質発現は高かった。肝細胞内 catalase 発現は PBC の進行症例で低下していた。

3. LCM の結果、mRNA レベルでも PPAR α の発現は亢進していた。PPAR α 発現は慢性ウイルス性肝炎や AIH に比し亢進していた。

4. PHH の培養実験で、PPAR α は培養早期には分裂、増殖する細胞の核内発現のみが見られた。48 時間培養で索状配列を呈してくると核のみならず細胞質にも発現が見られた。Bezafibrate 添加群で PPAR α の発現は亢進し、細胞増殖効果も有意に認められた。Catalase 発現は Bezafibrate 添加群で有意に亢進していた。

D. 考察

PPAR α 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。Fibrate の受容体である PPAR α の発現は進行した PBC 症例で蛋白レベル、mRNA レベルで亢進していたが、PPAR α の核内発現を伴っていなかった。PPAR α はリガンド刺激や自己リン酸化で核親和性が亢進しレチノイド X 受容体と dimer を形成し、プロモーター領域の PPRE に作用しさまざまな酵素類の転写を調節している。PBC では PPAR α の発現は亢進しているが、核内で転写促進には至っていない。この状態に fibrate を投与すると、PPAR α の核内移行が誘導され、様々な生理作用が誘導され PBC の炎症反応が抑制されることが推察される。肝細胞培養実験で Bezafibrate による PPAR α の核内発現、細胞増殖、catalase 発現亢進が確認された。臨床的に進行した PBC 症例では PPAR α 発現が、膜、細胞質で亢まっており Bezafibrate の効果が得られやすい状態にあると推察される。Catalase は PPAR α により誘導された β 酸化により産生された過剰な過酸化水素を分解する役割を担っている。過酸化水素は脂肪酸やアルコールなどの β 酸化を効率的に行うのに重要な分子であるが、過剰の過酸化水素は細胞毒として存在し、星細胞を活性化し線維化を促進することが知られている。進行した PBC 症例では肝細胞内 catalase が低下しており、Bezafibrate の一つの効果に catalase 発現亢進を介する線維化抑制が挙げられる。さらに Bezafibrate による細胞増殖作用は障害部位の肝細胞再生を誘導していることが推察される。

E. 結論

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。現時点で進行を抑制することは PBC の予後を改善する最も現実的な治療法である。画期的な治療法の一つとして新たな PPAR α リガンドの開発が期待される。

F. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito M, Ishibashi H: Interobserver variation in assessing small bile duct lesions in PBC, CVH, and AIH. *J Gastroenterol* 2005;40:223-224
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H: Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2005, Mar;42(3); 386-92.
- 3) Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Nakao R, Fukuda M, Kusumoto K, Nagaoka S, Yano K, Abiru S, Matsumoto T, Manabu D, Migita K, Yatsushashi H, Harada M, Ishibashi H. (in submission) Enhanced-expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in the liver of primary biliary cirrhosis.

2. 学会発表

- 1) 瀧井 康, 中村 稔, 伊東正博, 横山照史, 吉田由紀, 小森敦正, 右田清志, 植木俊仁, 大黒学, 八橋 弘, 原田実根, 石橋大海: LCM を用いた PBC のサイトカインと Toll-like receptor (TLR) 遺伝子解析. 第 93 回日本病理学総会, 札幌, 2004. 6. 9-11

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

原発性胆汁性肝硬変の病態形成における Wnt/ β -catenin シグナルの関与

分担研究者 田中 篤 帝京大学内科 講師

研究要旨： 以前よりわれわれは 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/ β -catenin シグナル伝達経路の役割について検討してきた。今年度は、まず PBC およびコントロール肝において real-time PCR によって Wnt-2B 分子の発現を検討したところ、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 PBC 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 β -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。 β -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 β -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 β -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結果であると考えられる。来年度は、培養胆管上皮細胞を用いた in vitro の系により、Wnt/ β -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を目的としたい。

A. 研究目的

本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病変の座である胆管に特異的に発現している遺伝子として同定された Wnt によるシグナル伝達、ことにその経路の下流に位置する β -catenin が、PBC の病態生理にどのように関与しているかを明らかにすることを通じ、PBC の画期的治療法を開発することである。今年度はこの一環として、Wnt および β -catenin の発現・局在を、PBC の早期例・進展例において解析することを目標とした。

B. 研究方法

肝移植時に採取した stageIV-PBC 7 例、肝生検により採取した stageII-PBC 4 例、およびコントロールとして C 型肝炎ウイルス感染・原発性硬化性胆管炎による硬変肝それぞれ 4 例・3 例、さまざまな理由によりドナーとして用いられなかった正常肝 3 例、以上の肝を摘出後ただちに -80°C に凍結した。これらから total RNA を採取し、cDNA に変換後、ライトサイクラーシステムにより Wnt-2B 遺伝子の定量を行った。また内部標準として GAPDH を定量を行い、Wnt-2B と GAPDH の比を計算し、これにより各サンプルの Wnt-2B 量の比較を行った。

また、これらの肝を材料とし、抗 β -catenin 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

1. Wnt-2B の定量

PBC 進行例と正常肝・PSC・HCV 肝硬変との間で Wnt-2B 量を比較すると、いずれとの比較においても有意差は認めなかった（advanced PBC vs. normal, $p=0.1549$; advPBC vs. PSC, $p=0.4339$; advPBC vs. HCV, $p=0.1473$ ）ものの、PBC 進行例で Wnt-2B の発現が増強している症例がいくつかみられた。一方、stageII の PBC では Wnt-2B の発現が増強している症例はみられなかった。

2. β -catenin 免疫組織染色

β -catenin は通常は細胞膜に存在し、細胞質では不安定でありユビキチン化され分解を受けるが、Wnt シグナルが加わると β -catenin は活性化され、細胞質でも安定となり、核内に移行してサイクリン D や c-myc などさまざまな遺伝子の転写を促進する。

PBC 症例で β -catenin の免疫組織染色を行った結果、PBC 進行例では細胞膜に存在がみられたものの細胞質・核内の染色パターンはみられず、Wnt シグナルによって β -catenin が活性化されている所見は得られなかった (0/7)。一方、stageI、II の PBC では細胞質・および核内の染色パターンがみられる症例がいくつか存在した (stage I, 6/12; stage II, 1/4)。コントロールとして用い

たC型慢性肝炎では β -cateninの細胞質・核内の存在はまったく見られなかった(0/14)。

D. 考察

近年、 β -cateninが肝のbipotential cellから胆管上皮細胞への分化に関与しているという報告がみられる(Gastroenterology 2003:202, Exp Cell Res 2004:157)。stageI・IIのPBCでは細胆管の旺盛な増生が観察されることが知られており、今回の結果でみられた早期例のPBCでの β -cateninの活性化は、 β -cateninがこの時期のPBC肝において、bipotential cellから胆管上皮細胞への分化を促し、細胆管の増生に関与している可能性を示唆する。しかし、Wnt-2Bの発現がstageIIのPBCでみられなかったことから、他のWnt分子が β -cateninの活性化をもたらしているのかもしれない。今後、 β -catenin活性化をもたらしているシグナル、および β -cateninによって転写が亢進している遺伝子の同定を進め、最終的には β -cateninの活性化を通じて胆管増殖を制御し、胆汁うっ滞の治療へとつなげたいと考えている。

E. 結論

早期例PBC肝において、Wnt/ β -cateninのシグナル伝達が細胆管の増生に関与している可能性が示唆された。PBCという疾患の本態は胆管の消失であり、消失した胆管を再生させることができればPBCの画期的な治療法となりうると考えられ、来年度はWnt/ β -cateninの活性化によって胆管増殖を制御する可能性を、in vitroの胆管上皮細胞を用いた実験によってさらに検討していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takikawa H, Takamori Y, Tanaka A, et al. Analysis of 388 cases of primary sclerosing cholangitis in Japan; Presence of a subgroup without pancreatic involvement in older patients. Hepatol Res 2004; 29:153-9.
- 2) 田中 篤. ミトコンドリア抗体:最近の展開. 肝胆膵 2004; 49:161-8.

2. 学会発表

- 1) Tanaka A, Tsuneyama K, Shimoda S, Gershwin

E, Takikawa H: Possible involvement of WNT signaling pathway in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2004. 10. 31

- 2) 田中 篤, 常山幸一, 下田慎治, 滝川 一: 原発性胆汁性肝硬変の病態形成におけるWntシグナル伝達への関与の可能性. 第8回日本肝臓学会大会, 福岡, 2004. 10. 21

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

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

研究協力者 小森 敦正 国立病院機構長崎医療センター 室長

研究要旨： 成熟胆管細胞の分化形質・機能は様々な肝転写因子群の発現, 相互作用, 機能調節で制御、維持されている (HNF1 α , β , HNF3, HNF4, HNF6, CEBP α , β , FXR, 等)。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。本研究は、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・発生的な分子レベルで評価することを目的とするものである。今年度は当院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- κ B 依存性発現遊離亢進、LPS および LTA 刺激に対する HIBEC 間での反応性の差を確認した。さらに HIBEC が、Liver enriched transcription factors (LETFs: HNF1 β , 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、*in vitro* で分類可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

成熟胆管細胞の分化形質・機能は様々な肝転写因子群の発現, 相互作用, 機能調節で制御、維持されている (HNF1 α , β , HNF3, HNF4, HNF6, CEBP α , β , FXR, 等)。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。本研究は、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・発生的な分子レベルで評価することを目的とするものである。

B. 研究方法

当院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、培養を行った。同細胞より Total RNA を抽出し RT-PCR 法にて各種ケモカイン、サイトカインならびに TLR family mRNA の発現を確認した。その後、TLR2, TLR4 のリガンドであるリポテイコ酸 (LTA), リポ多糖 (LPS) を用いて同細胞を刺激し、ケモカイン、サイトカインの mRNA 量・分泌量を経時的に測定した。

さらに同一 donor 由来 HIBEC の single cell cloning により得られた複数の subclone より Total RNA を抽出し、RT-PCR 法にて Liver enriched transcription factors (LETFs: HNF1 β ,

P2 promoter 由来 HNF4 α) と cytokeratin 7/19 の mRNA 発現量を比較検討した。

C. 研究結果

1. 肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) におけるヒト Toll like receptors (TLRs) mRNA (TLR1, 2, 3, 4, 6) の発現、LPS および LTA 刺激による IL-8, IL-6, MCP-1 の NF- κ 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。2. Liver enriched transcription factors (LETFs: HNF1 β , 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。

D. 考察

1. 胆管上皮細胞にも TLR を介した自然免疫システムが存在し、TLR2 および TLR4 の刺激で、同細胞で恒常的に発現している各種ケモカイン mRNA 量が増加し、遊離が亢進した。発現誘導が確認されたケモカインに対する受容体は、好中球、好酸球から 樹状細胞, NKT, memory T, CD8+T, 形質細胞に広く分布することが報告されている。このことから、胆汁中および門脈域に存在する可能性のある菌体成分による胆管細胞自然免疫システムの刺激は、胆管周囲への各種炎症細胞浸潤と

その増強を引き起こすと考えられる。2. 培養ヒト肝内胆管上皮細胞は Canal of Hering, bile ductules, intra-interlobular bile ducts が混在した細胞集団であるが、それぞれの質的に異なるトランスクリプトームを分類、記述する際に、Liver enriched transcription factors (LETfs: HNF1 β , P2 promoter 由来 HNF4, FXR) と cytokeratin 7/19 の転写量測定が重要であると考えられた。

E. 結論

1. 胆管上皮細胞をエフェクターとする肝内門脈域炎症病態の修飾が示唆された。

2. Liver enriched transcription factors の発現量の変化に伴い、ヒト肝内胆管上皮細胞におけるトランスクリプトームおよび形質の多様性が生じると示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小森敦正、中村稔、石橋大海：特集Biliary Cell Lineage 3. 獲得免疫の立場から. 肝臓 2004 : 45(12);646-649
- 2) Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura M, Kamihira T, Shimoda S, Migita K, Yatsushashi H, and Ishibashi H: Innate immune responses in human intrahepatic biliary epithelial cells via toll-like receptors. (abstract) Hepatology. 40(4) (Suppl. 1.):423A, 2004
- 3) Komori A and Ishibashi H: Hen and Egg, you Mitochondria! PBC revisits mitochondria again. Hepatology Research 2005;31:1-2

2. 学会発表

- 1) 小森敦正: 自然免疫刺激により発現誘導される胆管上皮細胞由来ケモカイン, サイトカインの解析. 第40回日本肝臓病学会総会
- 2) Innate immune responses in human intrahepatic biliary epithelial cells via Toll-like receptors, in poster presentation of 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

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

分担研究者 上野 義之 東北大学大学院・消化器病態学 講師

研究要旨： PBC の特徴として肝内胆管のうち小葉間胆管のサイズの細胞が選択的に破壊される点があるが、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、われわれは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と考えられる。

そのため、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 μ 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て、平成 16 年度はそのための基礎検討を行った。

今回、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。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。

A. 研究目的

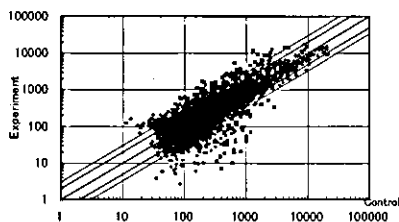
①肝内胆管細胞は、原発性胆汁性肝硬変(PBC)における標的細胞である。この病態は、免疫学的機序によることが想定されており、しかも標的となる肝内胆管細胞も「小葉間」胆管のサイズのものが選択的に破壊されることが明らかとなっている。しかし、なぜこの解剖的分類である「小葉間」胆管が選択的に破壊されるかは不明である。これまで我々は、肝内胆管細胞が、そのサイズや、解剖学的所在により、細胞生物学的な多様性(heterogeneity)を示すことを明らかにしてきた。本研究では、i)我々がこれまで確立した解剖学的・細胞生物学的に異なる特徴を示す大型・小型の肝内胆管細胞株を用いて、胆管細胞の多様性を規定する蛋白発現をプロテオーム法にて解析することを研究の主眼とした。これまでの我々は、正常マウスの胆管細胞について分離培養後にトランスフェクションとクローニングを行うことにより大型、小型胆管細胞を株化した。さらに、この胆管細胞により表出される mRNA を cDNA グラスアレイ法を用いて検討した。その結果大型・小型の胆管細胞間で約 4,800 の遺伝子のうち 230 の遺伝子において発現に差を認めることを明らかにした。大型胆管細胞は、小葉間胆管細胞の特徴を有しているため、この 230 の遺伝子のうち小葉間胆管細胞が免疫学的胆管炎の標的となるこ

とを決定付ける遺伝子が含まれている可能性がある。したがって、小葉間胆管細胞に特異的に発現されている分子を同定することは、PBC に代表される免疫学的機序による胆管炎の画期的治療法開発につながる可能性がある。そのため、本年は、その技術の確立のために小型の胆管細胞(増生胆管に相当)に強く発現がみとみめられた蛋白の一つを同定して、その生理学的意義を調べた。

B. 研究方法

これまでの研究の成果として、大型(小葉間胆管細胞に相当)と小型(細胆管に相当)の肝内胆管細胞の間に約 4.7%の遺伝子発現を認め、これが大型・小型胆管細胞を決定付ける蛋白の表出をつかさどる可能性があることを示した。(図 1) この RNA の発現プロファイルとタンパク質の発現プロファイルは必ずしも一致するわけではなく、その相関は 50%以下であるとも言われている。そこで、RNA の網羅的解析に加え、タンパク質の網羅的解析、すなわちプロテオーム解析を進めた。プロテオーム解析は、生命現象に直接影響を及ぼすタンパク質を直接見ているという点ではすぐれているが、DNA や RNA は増幅することが可能であるのに対しタンパク質は増幅する技術が確立されていないため、現時点ではその感度の低さが欠点となっている。

(図 1)



そのため、平成 16 年度はさらにこの研究を進展させ赤点で示される大型胆管のみで表出が強い、すなわち小葉間胆管としての特徴を決定させる可能性がある蛋白発現を等電点電気泳動によるスポット解析により解析する方法を樹立するための基礎検討を行った。より具体的には、我々が樹立した大型、小型胆管細胞をそれぞれ培養し、蛋白を精製した後、まず等電点の違いによる電気泳動を行う。続いて、分子量の違いによる電気泳動を行い、銀染色による 2 次元蛋白泳動をスキャナーにて取り込んだ。ユニークな蛋白が認められ、それを質量解析することにより同定し、その生理学的意義を解析する。

C. 研究結果

上記の方法により、小型胆管により優位に発現される蛋白の一つとして、EphA5 が見出された。膜蛋白である Eph 受容体 family はリガンドである ephrin 刺激によるチロシンキナーゼの活性化を介する系と、非刺激下で Eph 受容体に結合する RhoGEF 等を介する系による Rho ファミリーの調節を経て、アクチンの構築を制御していると考えられており、神経突起、血管新生、細胞の malignant transformation に関与している。NMC-S、NMC-L 上の EphA member の発現と局在を検討し、細胞運動、形態に与える機能を検討するために、小型、大型肝細胞上の EphA 発現を RT-PCR, direct sequence で確認し、免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡で局在を検討した。EphA の機能の検討にはリガンドである ephrinA5-Fc キメラを用い、糸状仮足の形態を観察した。糸状仮足の形成を膜透過性の cyclic AMP analogue である N6, 2'-O-dibutyryl adenosine 3' : 5'-cyclic (dcAMP) 刺激下で検討した。その結果、EphA8 は大型、小型の胆管細胞双方に認められたが、EphA5 は小型胆管細胞に強く発現が認められた。EphrinA5 は糸状仮足を有意に退縮させた ($p < 0.01$)。EphA5 の発現は主に糸状仮足に局在し、細胞質にも一部認められた。さらに EphA8 は細胞質と葉状仮足に認められた。dcAMP 刺激により、EphA5、EphA8 の membrane 上への translocation

が認められ、小型胆管細胞の糸状仮足の伸展が認められたが、大型胆管細胞には認められなかった。

D. 考察

胆管細胞上の Eph member はその局在の違いから、異なった機構で細胞形態に影響を与えている可能性が示唆された。今後 knock down 等の手法により、cholangiocyte の motility に与える Eph receptor の意義を検討する予定である。

このように、 μ アレイによる情報をもとに、蛋白発現の網羅的検討を行うことにより、未知の胆管細胞独自のユニークな蛋白発現の探索が行える方法を確認したので、今後は新しい創薬につながる新規の蛋白を見出して、その意義の解明を進める予定である。

E. 結論

cDNA μ アレイ法、及びその情報を加味したプロテオーム解析は、胆管細胞にユニークに発現される蛋白の網羅的検討に適しており、この技術を活用しての新たな分子・蛋白標的治療法の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinizy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G: Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005;128:121-37
- 2) Marienfeld C, Yamagiwa Y, Ueno Y, Chiasson V, Brooks L, Meng F, Patel T: Translational regulation of XIAP expression and cell survival during hypoxia in human cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:1787-1797
- 3) LeSage GD, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Marucci L, Roskams T, Phinizy JL, Marzioni M, Benedetti A, Taffetani S, Barbaro B, Fava G, Ueno Y, Alpini G: Alpha-1 adrenergic receptor agonists modulate ductal secretion of BDL rats via Ca^{2+} - and PKC-dependent stimulation of cAMP. *Hepatology* 2004; 40: 1116-1127.
- 4) Gigliozzi A, Alpini G, Baroni GS, Marucci L,

Metalli VD, Glaser SS, Francis H, Mancino MG, Ueno Y, Barbaro B, Benedetti A, Attili AF, Alvaro D: Nerve growth factor modulates the proliferative capacity of the intrahepatic biliary epithelium in experimental cholestasis. *Gastroenterology* 2004;127: 1198-1209.

- 5) Francis H, Glaser S, Ueno Y, Lesage G, Marucci L, Benedetti A, Taffetani S, Marzioni M, Alvaro D, Venter J, Reichenbach R, Fava G, Lynne Phinizy J, Alpini G: cAMP stimulates the secretory and proliferative capacity of the rat intrahepatic biliary epithelium through changes in the PKA/Src/MEK/ERK1/2 pathway. *J Hepatol* 2004;41:528-537.

2. 学会発表

- 1) 山極洋子, 上野義之, 下瀬川徹, トウシャーパテル 胆管細胞癌におけるIL-6によるXIAPの転写制御の機構. 第40回日本肝臓学会総会, 2004
- 2) 福島耕治, 上野義之, 井上淳, 守時由起, 菅野記豊, 下瀬川徹: マウス不死化胆管細胞におけるEph memberの発現と機能. 第40回日本肝臓学会総会, 2004
- 3) 上野義之, 菅野記豊, 福島耕治, 山極洋子, 守時由起, ALPINI Gianfranco, 下瀬川徹: 胆管上皮細胞によるVEGFおよびレセプター蛋白の発現と、その増殖に関する細胞内伝達系の検討. 第40回日本肝臓学会総会, 2004
- 4) 守時由起, 上野義之, 菅野記豊, 福島耕治, 下瀬川徹: マウス実験的胆汁うっ滞胆管増殖モデルにおける羊膜細胞由来胆管上皮細胞の可能性. 第40回日本肝臓学会総会, 2004
- 5) 上野義之, ALPINI Gianfranco, 下瀬川徹: タウロコール酸による肝内胆管上皮細胞に対する抗アポトーシス作用について. ワークショップ4, 第90回日本消化器病学会総会, 2004
- 6) Fukushima K, Ueno Y, Kanno N, Moritoki Y, Inoue J, Shimosegawa T: Susceptible role and distinct distribution of Eph members in cholangiocyte DDW 105th annual meeting of American Gastroenterological Association, 2004
- 7) Moritoki M, Ueno Y, Kanno N, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shimosegawa T: Capability of amniotic epithelial cells differentiating into cholangiocytes in cholestatic ductal hyperplasia model. 55th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

PBC と関節リウマチとの共通の因子の検討

分担研究者 右田 清志 国立病院機構長崎医療センター 免疫研究部長

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変（PBC）と関節リウマチ（RA）の合併頻度を検討する目的で、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。その結果、73 名の PBC 患者中 11 名が RF 陽性で、内 2 名は抗 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。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は臓器特異的的自己免疫疾患であるが、他の自己免疫疾患と合併することも少なくない。リウマチ性疾患との合併は高頻度にみられ、関節リウマチとの合併が 20%以上にみられたとの報告もみられる。今回、PBC と関節リウマチとの合併を検討する目的で、PBC 患者血清を用い、RA 特異的自己抗体である抗環状シトルリン抗体(抗 CCP 抗体)を測定した。

B. 研究方法

72名のPBC患者血清を用い、リウマチ因子(RF)、抗環状シトルリン (CCP) 抗体、マトリックスメタロプロテアーゼー3 (MMP-3) を測定した。RF はラテックス凝集反応で、抗 CCP 抗体は第 2 世代抗 CCP 抗体 ELISA キット(Axis-Shield Diagnostic 社)、MMP-3 は ELISA キット(MBL 社)で測定した。

C. 研究結果

73 名の PBC 患者において、11 名は RF 陽性であり、11 名の RF 陽性患者の 2 名において抗 CCP 抗体が検出された。残りの 62 名の患者は、RF、抗 CCP 抗体共に陰性であった。RF、抗 CCP 抗体両者陽性の患者を除いた PBC 患者で血清 MMP-3 を測定したところ、健常人に比べ PBC 患者では有意に MMP-3 が上昇していた。(健常人 11.056 ± 9.452 ng/ml: PBC 24.132 ± 27.568 ng/ml)。さらに PBC 患者では、病期の進行と共に血清 MMP-3 濃度は上昇する傾向にあった。

D. 考察

今回の検討の結果、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、抗 CCP 抗体の特異性、感度を考慮すると、当院における 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 症例では、滑膜炎を反映して血清 MMP-3 は上昇することが知られており、RA の

合併が強く疑われる 2 名を除いた PBC 患者の血清 MMP-3 を測定したところ、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。

E. 結論

PBC の病態進展に対する MMP-3 の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kogawa H, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Nakao M, Kimura H, Hamada H, Miyashita T, Ezaki H, Nakamura M, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H: Idiopathic portal hypertension associated with systemic sclerosis and Sjögren's syndrome. Clin Rheumatology (in press)
- 2) Migita K, Abiru S, Nakamura M, Ishibashi H: Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. FEBS Lett 2;569 (1-3):235-9, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

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

分担研究者 若月 芳雄 京都大学医学研究科 講師

研究要旨： 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 CD4 T 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。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、原発性胆汁性肝硬変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。肝臓で、腸管腔内に存在する抗原に対して成立する抑制性の免疫応答を治療目的で応用するためにその基礎的検討を行うとともに、その臨床的意義を検討した。その結果、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 CD4T 細胞を活性化すること、活性化に伴い、肝臓では FasL/Fas 二重陽性が出現し、不完全なアポトーシスが起ることが判明した。

A. 研究目的

経口的に投与された抗原に対して特異的な Th2 様細胞が肝臓に出現する。投与抗原の用量依存性、時間依存性は不明のためこれを検討した。また肝臓に経口的に体内に入った抗原に特異的な Th2 様細胞が出現することの臨床的意義を検討した。

B. 研究方法

マウスに経口から卵白アルブミン (OVA) を 1mg と 100mg の用量で、隔日投与し、経時的に OVA 特異的 CD4T 細胞の肝臓、パイエル板、脾臓における動態を Flow cytometry 観察した。またこれらの臓器由来抗原特異的 CD4T 細胞の in vitro, in vivo におけるサイトカイン産生能、増殖反応と制御する抗体のサブクラスを評価した。

C. 研究結果

経口からの抗原投与により肝臓およびパイエル板で用量依存的に OVA 特異的 CD4T 細胞の生細胞数比率の減少と死細胞数比率の増加を認めた。抗原 5 回投与 3 日後の検討では肝臓で OVA 特異的 CD4T 細胞の約 50% が FasL/Fas 二重陽性であった。投与抗原の用量依存的に FasL の発現は増強していた。この Fas/FasL 二重陽性細胞の出現は肝臓に特異的であった。抗原投与により誘導される抗原特異的 CD4T 細胞の細胞死を経時的に検討すると、肝臓ではパイエル板と比較して、OVA 特異的 CD4T 細胞数比率の低下は緩徐に起こり、死細胞の出現ピークも遅れることが判明した。即ち、経口からの抗原投与で起こる抗原特異的細胞のアポトーシスは肝臓では不完全に起こること

が示唆された。アポトーシスをまぬがれた CD4T 細胞の OVA 特異的な機能を検討すると、肝臓由来 CD4T 細胞は増殖反応、IL-2 産生は抗原の用量依存的に低下し、逆に IL-4, IL-10, TGF-beta の産生は用量依存的に増加した。特に IL-4 産生の増強は著明であった。経時的変化を検討すると、肝臓由来 CD4 T 細胞は初回 OVA 投与後 IL-2, IFN-gamma 産生能は増強するが、3 回、5 回投与では著明に減少し、逆に IL-4 産生は投与回数に比例して増強した。前者の変化は脾 CD4T 細胞、パイエル板 CD4T 細胞でも認められたが IL-4 産生の増強は肝臓 CD4T 細胞に特異的であった。抗原の経口投与マウスの各々の臓器由来の CD4T 細胞を移入したマウスの OVA に対する遅延型過敏反応 (DTH) と抗体反応を検討すると肝臓 CD4T 細胞を移入したマウスで著明な DTH の抑制、OVA 特異的 IgG1, IgG2a, 産生の抑制と IgE 産生の増強を認めた。このような効果はパイエル板 CD4T 細胞、脾臓 CD4T 細胞を移入したマウスでは認めなかった。ドナーとして FasL 欠失マウスを用いるあるいは IL-4 中和抗体を用いるなどして、肝臓由来 CD4T 細胞に誘導される IL-4 と FasL の発現増強の上記結果における役割を検討した。DTH の抑制と IgG1 反応の抑制には FasL が、IgE の産生誘導には IL-4 が大きな役割を担っていることが判明した。

D. 考察

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 二重陽性が出現し、不完全なアポトーシスが起ることが判明した。肝臓でおこる不完全なアポトーシスを回避しえた CD4T 細胞は大量な IL-4 を産生するとともに、IL-2 産生能は低下し、IL-10, TGF-beta 産生能を獲得した細胞である。この細胞は移入により、in vivo において、Th1 型の免疫反応を抑制する細胞であることが判明した。また抗原の用量、投与回数に依存して誘導され、少なくとも最終投与 2 週間後迄肝臓に存在していることが明らかとなった。

今回明らかになった現象の臨床的な意義づけは以下のように考えられる。即ち、これまで肝臓は移植に際して拒絶反応を受けにくく、また肝臓と並行して移植された臓器も拒絶反応を受けにくいこと、また

経門脈的に肝臓に移植されたラ氏島細胞も拒絶反応を受けにくいことから、肝臓には免疫反応を抑制的に制御する固有のメカニズムが存在することが示唆されてきた。今回の研究結果から検討すると、日常的に遭遇する様々な食餌性抗原に対して、多クローン性に、FasL 陽性 IL-4, IL-10, TGF-beta 産生細胞が肝臓で誘導され、全体として、抑制性免疫反応の一翼を担っている機序が想定される。このことは一方で特定の食餌性抗原特異的な CD4 T 細胞の出現頻度が遺伝的に高い個体では抗原特異的な Th2 型 CD4 T 細胞が肝臓に蓄積し、食物アレルギーを引き起こす可能性も示唆している。実際に肝臓移植によりドナーのピーナッツアレルギーがレシピエントに出現したこと (NEJM 1997, 337:822) から、食物性抗原に対して成立する Th2 反応 (食物アレルギー) を誘導するヘルパー T 細胞は一部肝臓に局在することが考えられる。

E. 結論

経口からの抗原投与により、肝臓で新たな免疫抑制性の CD4T 細胞を誘導する為の、抗原用量・投与回数依存性を明らかにした。原発性胆汁鬱滞性肝硬変患者の慢性炎症の維持機構の解明、治療応用の為の基礎的データが得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomohiro Watanabe, Hiroaki Katsukura, Yasuhiko Shirai, Masashi Yamori, Tsutomu Chiba, Toru Kita, Yoshio Wakatsuki: Helper

CD4+ T cells for IgE response to a dietary antigen develop in the liver. J Allergy Clin Immunology 2003;111(6)1375-1385

- 2) Tomohiro Watanabe, Tsutomu Chiba and Yoshio Wakatsuki: Portal Vein Tolerance and Development of Regulatory CD4 T cells in the liver. Mucosal Immunology Update 2004;14:3-7

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願中 特願 2004-307885

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

分担研究者 市田 隆文 順天堂大学医学部・消化器内科 教授

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因として、ヒト PDC-E2 と類似した外来性抗原、特に微生物由来ペプチドとの分子相同性による自己免疫機序が有力である。微生物病原体の構成成分は自然免疫系において Toll 様レセプター（TLR）により認識されるが、PBC 病態における自然免疫系の関与は十分に明らかにされていない。本研究では 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。その結果、(1)PBC 症例では刺激前の CD3⁺CD56⁺NKT および CD56⁺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- κ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられた。(2)aPBC 症例では PGN、LPS 刺激により TNF- α 、IL-1 β 、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。(3)sPBC 症例では刺激後も NF- κ B p65 が増加せず、サイトカイン産生もわずかで、エンドトキシントレ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。PBC では aPBC 症例でもエンドトキシン血症が認められるという報告もあり、TLR を介した自然免疫系の活性化を抑制することが、PBC 進行を抑制する治療になりうるかどうか更に検討したいと考えている。

共同研究者：

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科
山際 訓，本田 穰

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因として、ヒト PDC-E2 と類似した外来性抗原、特に微生物由来ペプチドとの分子相同性による自己免疫機序が有力である。微生物病原体の構成成分は自然免疫系において Toll 様レセプター（TLR）により認識され、TLR 活性化の結果、炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL-6、IL-12 など）や補助機能分子（CD40、CD80、CD86 など）の発現が誘導される。しかしながら、PBC 病態における TLR を介した自然免疫系活性化の関与は不明である。

昨年度までの我々の研究からは PBC の進行に活性化した NKT 細胞など自然免疫の関与が示唆される結果が得られており、本年度は特に 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ことを目的として各種解析を行った。最終的には自然免疫応答の制御が PBC 進展を抑制する治療法となりうるかどうか検討することを目的としている。

B. 研究方法

1. 対象

2004 年 4 月より 2005 年 1 月の間に新潟大学医歯学総合病院を受診された無症候性 PBC（aPBC）5 例、症候性 PBC（sPBC）3 例と健常人 5 例を対象とした。

2. 方法

十分なインフォームドコンセントにより文書による同意を得た後、末梢血より単核球（PBMC）を Ficoll-Paque による比重遠心法にて分離した。

(1) TLR2、TLR4 発現を FACS により解析した。(2) 活性化マーカーである CD69、CD152、CD154 と細胞傷害性に関与する FasL、TRAIL 発現を FACS により測定した。(3) TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70 を cytometric beads array（CBA）により測定した。(4) 活性化した NF- κ B を測定するため、核抽出分画における NF- κ B p65 を ELISA により測定した。これらを分離直後の単核球および血清中と、TLR2、4 のリガンドである peptidoglycan（PGN）、lipopolysaccharide（LPS）にて刺激後の単核球および培養上清を用いて検討した。

C. 研究結果

1. FACS による TLR および活性化マーカー発現

NK 細胞および NKT 細胞における TLR2、TLR4 発現は、PBC 症例と健常人で有意な違いは認められず、PGN および LPS 刺激によっても発現に有意な変化は認めなかった。

CD3⁺CD56⁺NKT および CD56⁺NK 細胞における CD69、TRAIL の発現は aPBC 症例で有意に高く ($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)、FasL の発現も高い傾向であった。PGN および LPS 刺激により aPBC 症例では健常人より強く活性化され、活性化マーカーとともに TRAIL 発現の増強が認められた。

2. サイトカイン産生

PGN および LPS 刺激 6 時間後と 24 時間後の培養上清を用いて測定を行った結果、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-8 の産生は aPBC 症例で有意に高値を示したが ($p < 0.05$)、sPBC 症例では有意に低下していた。特に、TNF- α 産生は健常人では刺激後 6 時間をピークに 24 時間後にはほとんど産生が認められないのに対し、aPBC 症例では 24 時間後においても産生が認められた (図 1)。

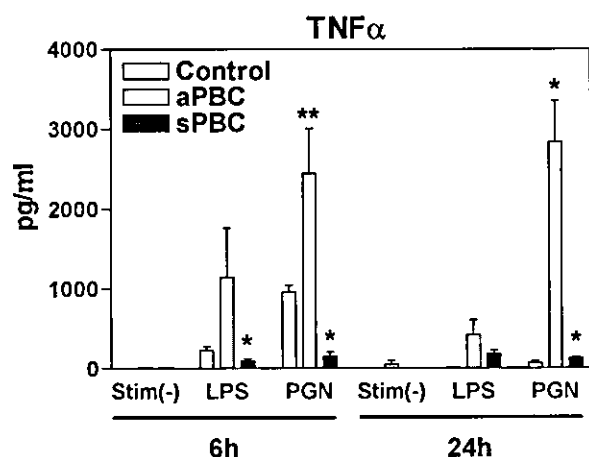


図 1. 末梢血単核球からの LPS、PGN 刺激による TNF- α 産生。* $p < 0.01$ 、** $p < 0.05$

3. 活性化 NF- κ B p65 測定

核抽出分画における活性化 NF- κ B p65 の測定では PBC 症例は分離直後の刺激前値が高く、aPBC 症例では刺激による活性化を認めたのに対し、sPBC 症例では刺激後の活性化が有意に低下していた ($p < 0.03$) (図 2)。以上の結果はサイトカイン産生の結果とも合致し、sPBC 症例では PGN および LPS 刺激に対して TLR を介した活性化が認められず、エンドトキシン耐性に近い状態にある可能性が示唆された。

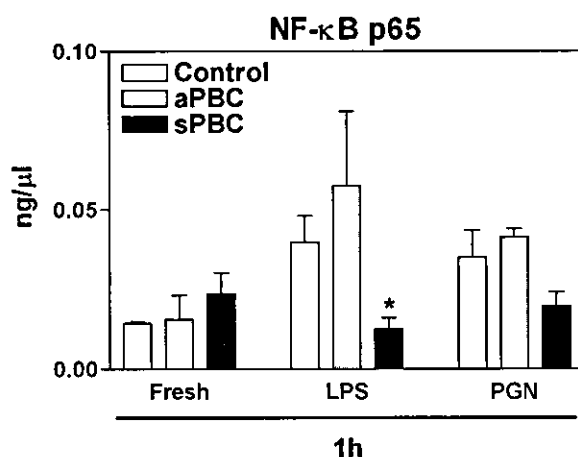


図 2. 末梢血単核球の LPS、PGN 刺激による核抽出分画における NF- κ B p65 測定。* $p < 0.05$

D. 考察

PBC の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別は重要である。PBC の病因としては、ミトコンドリア抗原に対する自己反応性リンパ球の活性化や clonal expansion が何らかの役割を果たしていることが強く示唆されており、これまでに T 細胞応答を中心とした研究が行われてきた。しかしながら無症候性症例が多く存在することを考慮すると、PBC 病態の進展には T 細胞応答以外のさまざまな因子の関与が必要と考えられる。

昨年度におこなった肝臓内のリンパ球解析において、無症候性症例と比較して、肝移植に至った症候性症例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加しており、免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。この結果は PBC 病態の持続・進展因子として、自然免疫による病態修飾の重要性を示唆するものと考えている。本年度の研究においては、そのような自然免疫活性化の機序として、微生物病原体の構成成分の認識に關与する Toll 様レセプター (TLR) に注目した。

TLR はそのリガンドによる活性化の結果、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-12 など) や補助機能分子 (CD40、CD80、CD86 など) の発現が誘導される。aPBC 末梢血単核球は分離直後の無刺激の状態ですでに活性化マーカーの発現や NF- κ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられたが、PGN、LPS 刺激後のサイトカイン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關与している可能性が示唆された。それに対し、sPBC 症例

では分離直後の状態で活性化マーカーの発現やNF- κ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられたが、PGN、LPS 刺激後もNF- κ B p65 が増加せず、炎症性サイトカイン産生もわずかで、aPBC 症例とは明らかな反応性の違いが認められた。

LPS はエンドトキシンショックを引き起こすような強力な炎症誘発作用を有しているが、その一方で全く相反する現象を誘導することも知られている。実験動物に LPS を半致死量投与すると、次に LPS を致死量投与しても、この動物は LPS に対し耐性を示し致死になることがない。この現象はエンドトキシントレランスあるいはLPS トレランスと呼ばれている。発症機構に関しては、炎症反応を誘導するNF- κ B ファミリーの中で、DNA 結合能をもたないp50 サブユニットの発現がLPS 刺激後に上昇し、NF- κ B ファミリーの活性を抑制し、LPS の二次刺激による炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制されるというモデルなどが提唱されているが、誘導機構は完全に理解されていない。

本研究において認められた sPBC 症例におけるPGN、LPS 刺激に対する反応性の欠如は、エンドトキシントレランスの状態に近い可能性も示唆され、今後TLR 刺激後のシグナル伝達におけるaPBC および健常人との相違を含めて検討したいと考えている。また、TLR 以外の自然免疫活性化因子に関しても検討を行ない、自然免疫系の活性化がPBC の進行に関与しているかどうか、また自然免疫系の制御がPBC 進行を抑制する治療になりうるかどうかを更に検討したいと考えている。

E. 結論

sPBC 症例ではPGN、LPS 刺激後もNF- κ B p65 が増加せず、炎症性サイトカイン産生もわずかで、エンドトキシントレ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。PBC ではaPBC 症例でもエンドトキシン血症が認められるという報告もあり、腸管滅菌などによるエンドトキシン血症の改善を含めてTLR を介した自然免疫系の活性化を抑制することが、PBC 進行を抑制する治療になりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Sato Y, Ichida T, Kurosaki I, Nakatsuka H, and Hatakeyama K: Acute renal

failure during the early postoperative period in adult living-related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2004;51(60):1815-1819

- 2) Sato Y, Watanabe H, Ichida T, Yamamoto S, Nakatsuka H, Oya H, Kameyama H, Watanabe T, Shimamura K, Abo T and Hatakeyama K: Wall shear stress and intrahepatic leukocytes of graft in living related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2004;51(56):329-333
- 3) Takeishi T, Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Hirano K, Kobayashi T, Watanabe T and Hatakeyama K: Rapid progressive hepatitis C after liver transplantation: a case report. *Transplant Proc* 2004;36(8):2304
- 4) Ikai T, Arii S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, Nakanuma T, Okita K, Omata M, Takayasu K and Yamaoka Y: Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 2004;101(4):796-802
- 5) Sato Y, Ichida T, Watanabe H, Yamamoto S, Abo T and Hatakeyama K: Macrochimerism of donor type CD56+CD3+ T cells in donor specific transfusion via portal vein following living related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2003;50(54):2161-2165
- 6) Ichida T: Artificial liver support system for fulminant hepatic failure as bridge-use to living donor liver transplantation. *Intern Med* 2003;42(10):920-921
- 7) 山際訓, 市田隆文: インターフェロン抵抗性に関与する宿主免疫関連因子. *肝胆膵* 2004;49(6):1039-1046

2. 学会発表

- 1) Ishimoto Y, Ichida T, Yamagiwa S, et al: FAS-L⁺CD56⁺CD3⁺ cells significantly increase in the liver of patients with late stage primary biliary cirrhosis (PBC) compared with early stage PBC: possible involvement in the disease progression. PBC フォーラム, 大村, 2004. 9. 18

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析

分担研究者 下田 慎治 九州大学大学院・病態修復内科学 助手

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変（PBC）では、抗ミトコンドリア抗体の出現や小葉間細胆管の慢性非化膿性破壊性胆管炎が病変の首座となる。抗ミトコンドリア抗体の主要対応抗原はピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント（PDC-E2）であり、CD4⁺ T細胞の最小主要対応抗原も PDC-E2 163-176 アミノ酸残基であり、PDC-E2 163-176 アミノ酸残基を抗原提示した胆管上皮細胞をこの抗原反応性 T細胞が障害することなどが我々の今までの研究より明らかとなった。今回、胆管上皮細胞にこの自己抗原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して、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を検討した。その結果、胆管上皮細胞に抗原提示細胞としての機能はなく、さらには、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ることが明らかとなった。この抑制因子は主に、胆管上皮細胞が産生するプロスタグランジン E2 (PG-E2) であることが明らかとなった。以上、胆管上皮細胞は抗原が提示された場合にでも、また近傍に他の種類の抗原提示細胞が存在した場合にでも、積極的に細胞免疫を制御する機能があることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、上皮細胞が抗原提示細胞となりえるか否かについての検討が進んでいる。以前は、抗原提示しない上皮細胞が炎症を引き金として MHC class II 分子を細胞表面上に提出した場合、この class II 分子に拘束された抗原を認識できる T細胞が活性化されるのではないかと考えていた。しかし T細胞活性化の機序が詳細に解明された結果、T細胞活性化には、class II 分子を介した T細胞レセプター分子 (TCR) からの刺激以外に側副刺激分子からの刺激が必要であることが明らかとなった。この側副刺激分子からの刺激がない場合、一般に T細胞はアナジー状態に誘導されると言われている。以上の点から一般的な上皮細胞は抗原提示細胞となりえないという概念が提唱されてきた。その一方で炎症性腸疾患などでは局所の上皮系細胞に炎症に伴って class II 分子のみならず、側副刺激分子も誘導されるため、炎症性腸疾患における局所の上皮系細胞は抗原提示細胞となりえるという報告もされるようになった。

原発性胆汁性肝硬変での病変の首座である肝内胆管上皮細胞の病理学的解析では、胆管上皮細胞が炎症に伴って MHC class II の発現が誘導されることは確認されているが、側副刺激分子の誘導については、相反する報告が見受けられる。そこで今回、in vitro の系において、胆管上皮細胞

にこの自己抗原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を検討した。

B. 研究方法

胆管上皮細胞株を複数の PBC 患者あるいは対照群の移植時摘出肝臓より樹立した。すなわち摘出肝を無菌的に細断シコラゲナーゼ処理をした後、比重勾配法で胆管上皮細胞を含む単核球分画を採取した。採取した細胞から上皮細胞系の抗体を付加したイムノビーズを用いて磁氣的に胆管上皮細胞分画を採取した。採取した細胞群が胆管上皮細胞であることを、サイトケラチン 7、およびサイトケラチン 19 の免疫染色陽性かつアルブミン、AFP 産生陰性であることで確認した。

PDC-E2 163-176 反応性 T細胞クローンは、PDC-E2 163-176 (GDLLAEIETDKATI) 抗原を合成ペプチドとして作成後、このペプチド抗原で複数の PBC 患者あるいは対照群由来の末梢 T細胞を繰り返し刺激することで、最終的には限界希釈法を用いて樹立された。

胆管上皮細胞株あるいは末梢単核球を抗原提示細胞としてこの抗原ペプチドをパルスした場合の、抗原反応性 T細胞の増殖反応を³H-TdR の取り込みで検討した。

胆管上皮細胞の産生する液性因子としてPG-E2以外にIL-10、TGF- β などをELISAを用いて検討した。

C. 研究結果

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、液性因子の関与が明らかになった。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 β やTNF α などによって制御されていることも明らかとなった。

B. 考察

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、一般的には抗原が提示された場合にでも、抗原提示細胞としての機能は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。

C. 結論

PBCを特徴づける慢性非化膿性破壊性胆管炎は、単純な胆管の抗原提示とそれに呼応する抗原反応性T細胞との免疫応答だけでは起こらず、PG-E2をはじめとする他の因子の関与が重要であると結論づけられた。したがって、本研究の趣旨である画期的治療法の開発として、PBCの病変胆管でのPG-E2の発現を増強させるような環境を人工的に作成することが可能となれば、画期的治療法の開発につながるものと考えられる。そこで現在PBC障害胆管でのPG-E2発現の多寡を検討している最中である。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, Handa M, Ishibashi H, Gershwin ME, Harada M. Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: implications for biliary-specific diseases. *Hepatology*, 2005, Jan;41(1):151-9

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし