

ある。診断困難例が多い中でDIC-CTを含むMDCTやMRCPなど高次元画像解析装置を用いて正確な病態の把握が必要不可欠である。肝切除で根治できない場合や結石再発例の治療はPTCSLやESWLなど低侵襲的でかつ繰り返しおこなえる治療法を選択していくべきである。胆道拡張症術後の肝内結石発症は比較的若年者で、かつ胆道再建後10年以上経過例が多く、より長期的な経過観察と患者指導が必要である。肝内結石症は胆道癌、とくに進行癌の合併が多く、早期診断と定期的な経過観察を要する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 甲斐真弘、千々岩一男、土屋和代、大内田次郎、江藤忠明、牧野一郎、近藤千博、内山周一郎、片岡寛章：腔内超音波検査 (IDUS) が肝門部胆管癌の skip lesion 診断に有用であった 1 例。
胆道 18 (4) : 531-539, 2004.
- 2) 甲斐真弘、千々岩一男、大内田次郎、近藤千博、牧野一郎、旭吉雅秀、永野元章：特集 胆道疾患診療の新しい展開。新しい治療の展開 胆道癌：胆嚢癌。
肝胆膵 49 (3) : 369-374, 2004.
- 3) Tanaka, S-I, Kinowaki, M., Maeda, Y., Nagatomo, J., Kai, M.-H., Kondo, K.-H. and Chijiwa, K. : Species difference in cholesterol 7 α -hydroxylase expression of rabbit and rat liver microsomes after bile duct ligation.
Journal of Surgical Research 119 : 36-40, 2004.
- 4) 千々岩一男：先天性胆道拡張症と肝内結石症に対する胆道再建術後の予後。
厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業肝内結石症調査に関する調査研究平成15年度

総括・分担研究報告書：48-53, 2004.

- 5) 甲斐真弘、千々岩一男：特集 肝内結石症の成因をめぐって：胆道再建術後の肝内結石症。胆と膵 24 : 763-768, 2003.
- 6) 千々岩一男：肝内結石症における結石再発および結石種類別の胆管癌合併についての検討。厚生労働省科学研究費補助金特定疾患対策研究事業肝内結石症調査に関する調査研究平成14年度総括・分担研究報告書：27-31, 2003.

2. 学会発表

- 1) 甲斐真弘、千々岩一男、大内田次郎、近藤千博、牧野一郎、前原直樹：要望演題 4 胆道癌診療の現状と今後の展望：胆嚢癌の予後因子の検討と新旧取扱い規約の比較。第40回日本胆道学会学術集会。2004.
- 2) 甲斐真弘、千々岩一男、大内田次郎、近藤千博、牧野一郎、前原直樹：ワークショップ 1 肝内結石症の疫学、成因および治療に関する update：肝内結石症97例の長期予後の検討。第40回日本胆道学会学術集会。2004.
- 3) 田中俊一、千々岩一男、前田資雄、牧野一郎、上田純二、太田嘉一、末田秀人、塩月裕範、甲斐真弘：70%および90%肝切除ラットにおける胆汁酸代謝の比較検討。第40回日本胆道学会学術集会。2004.
- 4) 大内田次郎、千々岩一男、甲斐真弘、旭吉雅秀、前原直樹、牧野一郎、近藤千博、田中雅夫：ワークショップ 2 膵・胆管合流異常の controversy：胆管拡張を伴わない膵・胆管合流異常の長期予後。第40回日本胆道学会学術集会。2004.
- 5) 日高淑晶、自見政一郎、佐野浩一郎、内山周一郎、甲斐真弘、千々岩一男：閉塞性黄疸期間によるラット肝臓の mrp2, mrp 3 の発現変化について。第40回日本胆道学会学術集会。2004.
- 6) 甲斐真弘、千々岩一男、日高秀樹、江藤忠明、大内田次郎、上田純二、牧野一郎、近藤千博：ビデオセッション 6 良性肝疾患に対する外科治療、その他：肝内結石症に対する肝切除術。第58回日本消化器外科学会総会。2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

胆汁酸と肝内結石症における胆管癌併発に関する基礎的検討

研究協力者 田妻 進

広島大学病院総合診療科大学院病態薬物治療学講座

研究要旨

胆汁酸と胆管癌との因果関係を解明するため、マウス不死化胆管上皮細胞に胆汁酸を添加し、種々の検討を行った。結果として、グリコケノデオキシコール酸 (GCDC) によってのみ、アポトーシス誘導、cyclooxygenase 2 (COX-2) 発現増強、および酸化DNA障害を認めた。結論として、GCDCの胆汁中濃度上昇が、肝内結石症における胆管上皮傷害、発癌に大きく関わる事が示唆された。

A. 研究目的

近年、肝内結石症を含む胆汁うっ滞性肝疾患における胆管癌併発のリスクから胆汁酸と胆管癌との因果関係が示唆されている。特にケノデオキシコール酸、デオキシコール酸は細胞毒性が強く、発癌に寄与することが示唆されているが、その詳細が明らかになったとはいえない。以上のことから、我々は正常胆管に近いマウス不死化胆管上皮細胞に胆汁酸を添加し、アポトーシス、COX-2発現、および酸化ストレスに関する検討を行った。さらに最近、報告が相次いでいるfarnesoid X receptor (FXR) の胆汁酸に対する細胞保護効果に関しても検討を行った。胆管癌発癌機構およびその抑制機構の解明は、その早期発見や新しい治療法を考案する上で非常に重要であると考えられる。

B. 研究方法

細胞はBALB/cマウス胆管上皮初代培養細胞にSV40 T antigen geneを導入して樹立された不死化胆管上皮細胞株を用いた。

(1) 胆汁酸による細胞傷害性の検討として、アポトーシス誘導を指標とした。胆管上皮細胞を10% FBS添加Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM)にて培養後、無血清条件で各種胆汁酸を各種濃度 (0, 50, 100, 200 μ M) 添加し、8時間まで培養し、アポトーシス誘導の有無をAnnexinV-FITC/PI染色によるフローサイトメトリー法を用いて検討した。胆汁酸として、細胞傷害性胆汁酸として知られるGCDCのほか、タウロコール酸 (TC)、タウロケノデオキシコール酸 (TCDC)、タウロウルソデオキシコール酸 (TUDC)、タウロデオキシコール酸 (TDC) を用いた。さらに胆汁酸誘導アポトーシスにおけるCaspase (3, 8, 9) 活性も測定した。

(2) 胆汁酸誘導アポトーシスの抑制機構に関する検討として、人胆管胆汁中のリン脂質分子構成に近いことで知られる卵黄レシチン (EYPC 50 μ M) の共存による、細胞傷害性胆汁酸 (GCDC 200 μ M, 8時間) 誘導アポトーシスへの影響をフローサイトメトリー法にて検討した。さらに実際の胆汁酸輸送を評価するため、胆管上皮細胞の胆汁酸取り込みを¹⁴C標識TCを用いて測定した。

(3) 発癌に関する検討として、胆管上皮細胞に各種胆汁酸を添加後、COX-2発現をWestern blottingとRT-PCRによって分析した。さらにcytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) 発現およびprostaglandin (PG) 産生も検討した。

(4) 胆汁酸核内レセプター farnesoid X receptor

(FXR) の合成リガンドであるGW4064を投与し、COX-2、cPLA₂発現および、PG産生への影響を検討した。

(5) 酸化ストレスの発癌に及ぼす影響を検討するため、胆汁酸添加後のreactive oxygen species (ROS) 産生を測定した。さらにROSの作用による8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の発現をフローサイトメトリー法にて評価した。

(6) 酸化DNA修復酵素である MutM homolog (8-oxo-guanine DNA glycosylase [OGG1]), MutY homolog (MUTYH) 発現の変化をreal-time PCRによって分析した。

C. 研究結果

(1) AnnexinV-FITC/PI染色によるフローサイトメトリーにて、アポトーシス初期の細胞を反映するAnnexinV陽性PI陰性細胞はGCDC200 μ M添加8時間後に約10.5%認め、胆汁酸非添加control (約7%) に比較し増加していた (Figure 1)。アポトーシス誘導は各種胆汁酸のうちGCDCで最も顕著に認めた。Caspaseの活性度に関しては、GCDC 200 μ M添加4時間後、Caspase 3および9活性の上昇を認め、これらのCaspaseの働きによりアポトーシスが誘導されていることが示された。

(2) リン脂質EYPCの共存により、GCDC誘導アポトーシスの抑制を認めた。胆汁酸取り込みに関して、¹⁴C標識TCの胆管上皮細胞への蓄積は時間依存性に増加したが、リン脂質の存在により抑制された。以上の結果から、胆汁リン脂質の存在により、胆汁酸の取り込みが抑制され、その傷害性は軽減されることが示唆された。

(3) RT-PCRによる分析では、GCDC添加群でのみ有意なCOX-2発現を認めた。しかし、アラキドン酸カスケードにおいてCOX-2の上流にあるcPLA₂は、すべての胆汁酸添加により著明に抑制された (Figure 2)。Western blottingでも同様の傾向を認めた。COX-2によるPGE₂、およびPGF_{2 α} の産生もGCDC添加により最も顕著に産生された。

(4) RT-PCRにて胆管上皮細胞におけるFXRの発現を確認し、GW4064を用い、FXR選択的刺激による影響を検討したところ、RT-PCRにてCOX-2発現は全く変化なく、cPLA₂発現抑制を胆汁酸添加の時と同様に認めた (Figure 3)。Western blottingでも同様の傾向を認めた。さらにGCDC添加群に対し、GW4064を追加投与し、

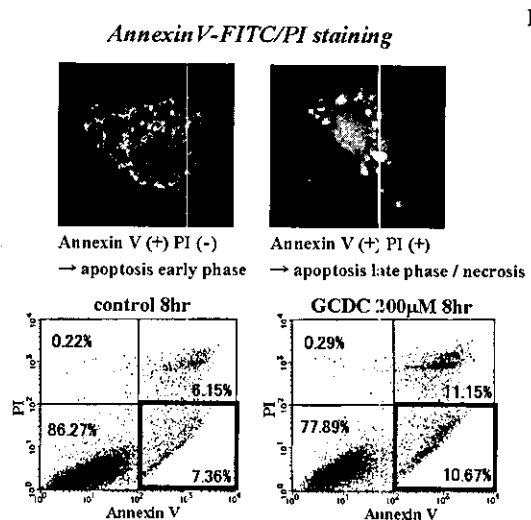


Figure 1

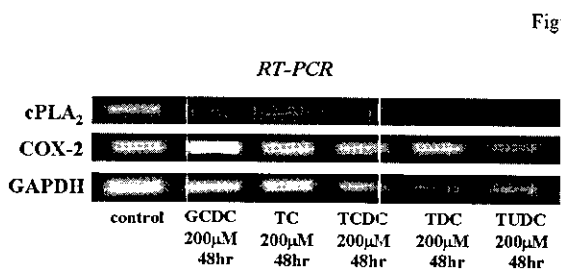


Figure 2

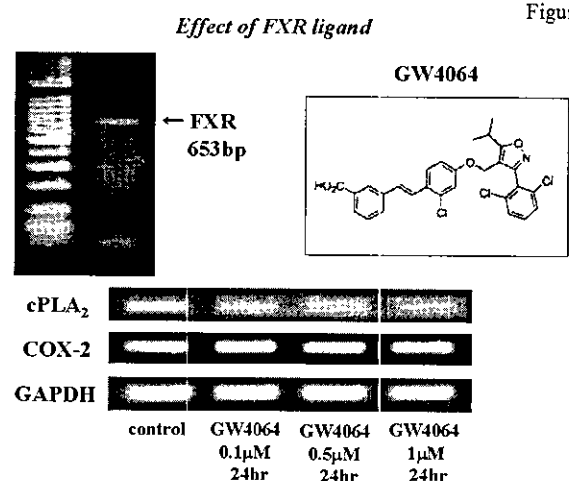


Figure 3

FXRシグナルを増強してprostaglandin産生への影響を検討したところ、PGE₂、およびPGF_{2α}の産生は最大40%抑制された。この結果から、FXRシグナルにより発現抑制されたcPLA₂がCOX-2によるPG産生を抑制し得ることが示された。

(5) ROS産生はGCDC添加群でのみ、有意な増加を認めた (Figure 4)。8-OHdGの発現もGCDC添加群でのみ、有意な増加を認めた (Figure 5)。

(6) GCDC投与によって酸化DNA damageが誘導される際の酸化DNA修復酵素の発現変化をreal-time PCRによって分析したところ、OGG1、MUTYH共に有意な変化は認められなかった。

D. 考察

GCDCが胆管上皮のアポトーシス、COX-2発現

増強、および酸化DNA障害を誘導したことから、この胆汁酸の胆汁中濃度上昇が、肝内結石症における胆管上皮傷害、発癌に大きく関わる事が示唆された。一方、リン脂質の同時添加がそのアポトーシス誘導を抑制したことは、胆汁脂質成分の細胞保護的役割を示唆し、肝内結石症に対する胆汁酸組成および胆汁脂質成分の調整による治療の有効性を示した。さらに、FXR刺激によるcPLA₂発現抑制がPG産生の抑制につながったことは、核内レセプターを標的とした肝内結石症の新たな治療法となる可能性を提示した。

E. 結論

肝内結石症等の胆汁うっ滞性肝疾患において、胆汁中のGCDC濃度上昇は、胆道癌併発に密接な関わりをもつ。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Komichi D, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Une M, Chayama K. Unique inhibition of bile salt-induced apoptosis by lecithins and cytoprotective bile salts in immortalized mouse cholangiocytes. *Dig Dis Sci* 2003;48:2315-2322.
2. Komichi D, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K. A nuclear receptor ligand down-regulates cytosolic phospholipase A2 expression to reduce bile acid-induced cyclooxygenase 2 activity in cholangiocytes: Implications of anti-carcinogenic action of farnesoid X receptor agonists. *Dig Dis Sci* 2005 [in press].

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Figure 4

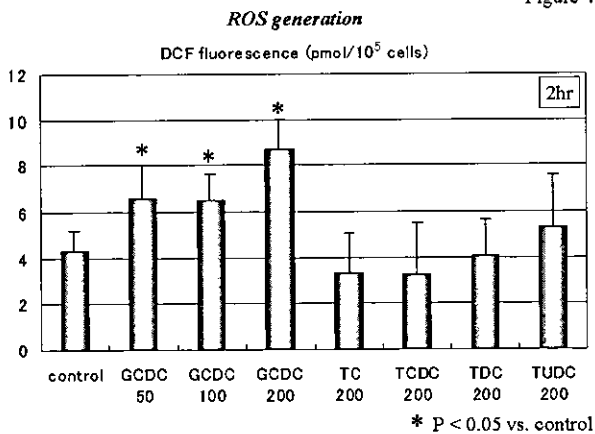
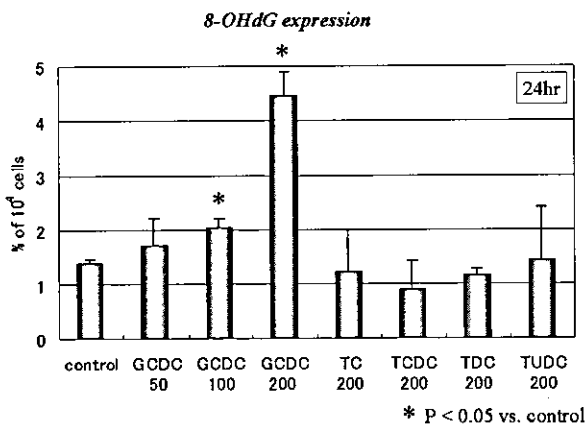


Figure 5



ムチン分解による結石生成の抑制

研究協力者 佐々木睦男

弘前大学医学部第二外科

A. 研究目的

肝内結石症は難治性の疾患であり数次の治療にもかかわらず再発を繰り返す。これまでの研究からその成因として肝内胆汁うっ滞と胆道内細菌感染が重要な位置を占めていることが判明してきている。しかし、これらの成因を根本から解決することは困難であり成因からの治療は難しい。そこで、われわれは肝内結石症の病態の中心をなす慢性増殖性胆管炎に注目しその産物である粘液に焦点を当てた（図1）。実際、肝内結石症患者胆汁中には粘液の主体をなすムチン型酸性糖タンパク質がきわめて多量に存在することが確認されている。この酸性糖タンパク質と肝内結石症患者胆汁およびカルシウムイオン、エンドβグルクロニダーゼ存在下にこれらを混合するとビリルビンカルシウム成分を含む沈殿が生成されることを確認している。したがって、この酸性糖

タンパク質は結石生成にきわめて重要な要素と考えられた。また、酸性糖タンパク質を分解するにはS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素が有効でこれらにより沈殿は著明に抑制された。

今回の目的はこのS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素の作用機序が異なることを利用しこれらを異時性に酸性糖タンパク質に作用させその分解の程度を検証することとした。

またすでに形成された結石に対してもこれらの分解試薬が作用するか検討した。

B. 研究方法

酸性ムチン糖タンパク質としてはその構造が類似するウシ胃ムチン糖タンパク質を用いた。また胆汁は肝内結石症患者の肝胆汁を用いた。胆汁4.5mlに対しムチン糖タンパク質10mgとエンドβグルクロニダーゼを混合、最終カルシウム濃度20mg/1000Uとなるように調整し38℃72時間インキュベートし沈殿、結石の有無を検討した。この際①S-S結合開裂剤としてシステイン系薬剤としてアセチルシステイン溶液（20%）を50μL、②多糖類分解酵素として塩化リゾチームを50mg、③タンパク分解酵素としてセラペプチダーゼを100mg、この順に12時間毎に添加し沈殿生成物の乾燥重量を測定した。ビリルビンカルシウム石、コレステロール石約200mgを5mlのリン酸緩衝液（pH7.4）に添加し、同時にアセチルシステイン溶液（20%）を50μL、セラペプチダーゼを100mg添加し38℃72時間インキュベートし結石の溶解度を観察した。

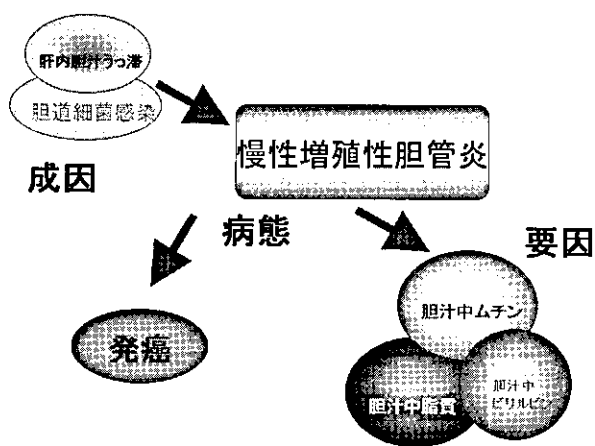
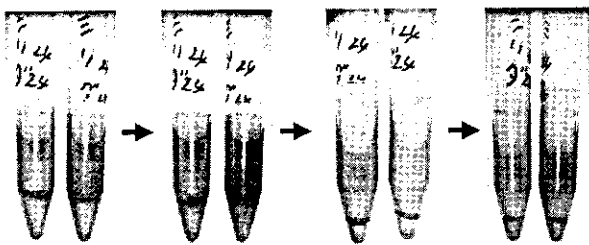


図1

C. 研究結果

S-S結合開裂剤、多糖類分解酵素、タンパク分解酵素の順で経時的に作用させたが添加する毎に沈殿は著明に抑制された。最終的にはその92%が抑制された(図2, 図3)。

3つの薬剤の異時的投与



コントロール → 還元剤 → 多糖類分解酵素 → 蛋白分解酵素

図2

3つの薬剤の異時的投与(定量)

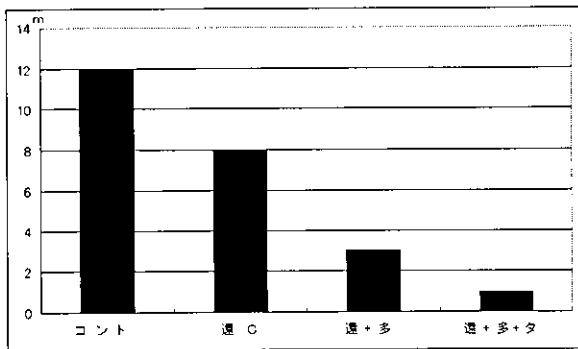
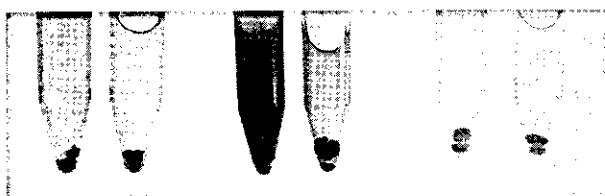


図3

結石に対するムチン分解剤の効果



肝内結石(ビ石) + システイン 肝内結石(ビ石) + 蛋白分解酵素 コレステロール結石 + 蛋白分解酵素

図4

アセチルシステイン、蛋白分解酵素ともビリルビンカルシウム石に対しては溶解効果が認められた。特に蛋白分解酵素では分解が著明であった。コレステロール結石に対しても軽度の溶解効果が認められた(図4)。

D. 考察および結論

今回の研究より酸性糖タンパク質を分解するにはS-S結合開裂剤、タンパク分解酵素、多糖類分解酵素が有効であり、これらにより沈殿は著明に抑制される。これらの薬剤は作用機序が異なることから異時に作用させるとその抑制作用は最大となった。また、これらの薬剤はすでに数十年にわたり臨床応用されておりその安全性は確認済みであり、これらの方法はすぐに臨床応用可能であると考えられる。

しかし、問題点としては、今回確認された結果は胆汁への直接投与に相当するものであり具体的には胆道内直接投与で胆道内遺残結石の洗い出しや胆道内粘液の洗浄効果を想定したものである。しかし肝内結石症患者にとって最も有益なのはこれら薬剤の内服により、肝内結石やその再発が予防できることであるが、これら薬剤の血中及び胆汁中濃度の資料は乏しく、これらが胆汁中で有効血中濃度に達し効果を表すかどうかは今後早急に確認を要する事項となる。

そのほかの有効な治療法としてはムチンそのものの分泌を抑える治療として、抗炎症剤(NSAID)やムチン分泌に関与する多くの分子標的薬が有効な

肝内結石症保存療法のストラテジー

成因:胆汁うっ滞—各種利胆剤
胆道細菌感染—抗生物質

病態:増殖性胆管炎—抗炎症剤(NSAID)

要因:胆汁中ビリルビン—胆汁酸製剤
胆汁中脂質—胆汁酸製剤
胆汁中ムチン分泌抑制—NSAID
分解—システイン製剤
タンパク分解酵素
多糖類分解酵素

図5

可能性がある。また、長期投与は難しいが感染に対しては抗生物質が有効となる可能性がある。その他種々の方法を組み合わせることにより肝内結石症のより有効な治療法の開発が望まれる（図5）。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

- 1) 佐々木睦男. 突発性胆嚢穿孔. 消化器画像 2004; 6 :235-238.

- 2) 新岡丈典, 大久保正, 菅原和信, 十束英志, 豊木嘉一, 鳴海俊治, 袴田健一, 佐々木睦男, 小島佳也, 保嶋実. 生体肝移植症例におけるタクロリムスとラベプラゾールの血中濃度推移に関する検討. TDM研究 2004; 2 :143-144.
- 3) 中澤秀明, 杉山譲, 清野景好, 馬場俊明, 小堀宏康, 佐々木睦男. 先天性胆道拡張症術後20年目に発症した肝内結石症の1例. 日本臨床外科学会雑誌 2004;65:168-171.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

肝内結石症における慢性炎症と粘液産生 －分子病理学的検討－

分担研究者 中沼 安二

金沢大学医学系研究科形態機能病理学

研究要旨

肝内結石症の成因としてゲル形成能をもつMUC2、MUC5ACムチンの発現亢進は重要である。菌体成分であるLPSなどは、急性反応としてTNF- α 、COX2を介して胆管上皮のMUC2、MUC5AC産生を亢進させる。今年度の検討では、慢性反応としてのMUC2ムチン発現の変動を、腸上皮分化制御因子CDX2ホメオボックス遺伝子の関与を中心に検討した。慢性胆管炎モデルであるPCKラットでは加齢に伴って慢性炎症、腸上皮化生とCDX2依存性のMUC2発現が出現し、腸上皮化生と慢性胆管炎の局在には相関が見られた。培養マウス胆管上皮を用いた検討では、慢性炎症性刺激条件（LPS持続投与、酸性培地条件）による長期培養によりCDX2発現が誘導され、MUC2ムチン発現亢進も見られた。これらの結果から、慢性炎症によるCDX2発現の誘導がMUC2ムチン発現をきたし、肝内結石症の成因に重要である可能性が示された。

A. 研究目的

ムチン産生の亢進は肝内結石症の重要な成因のひとつとされる。私どもは肝内結石症の大型胆管粘膜は腸上皮化生や胃粘膜化生を示し、ゲル形成能をもつMUC2、MUC5ACムチン分泌が著明に亢進することを明らかにしてきた。ムチン産生亢進因子としてはLPSなどの菌体成分や炎症性サイトカインの関与が示されている。培養マウス胆管上皮をLPSで刺激すると、急性反応として刺激後8時間でTNF- α 、COX2を介してMUC2、MUC5AC産生が亢進する。しかし、慢性反応として胆管粘膜が腸上皮化生や胃粘膜化生を生じる機序については十分解明されていない。

最近、腸分化を誘導する転写因子であるCDX2ホメオボックス遺伝子が腸上皮化生に深く関与することが明らかになった。また、胃上皮化生、幽門腺化生についてはそれぞれSOX2、PDX11メオボックス遺伝子が関与するという報告がある。以前の検討では、肝内結石症にしばしば出現する胆管粘膜の腸上

皮化生においてもMUC2ムチン発現にほぼ一致したCDX2ホメオボックス遺伝子の発現がみられた。従って、胆管粘膜上皮の腸上皮化生もCDX2依存性に生じていると考えられる。

そこで今年度は、CDX2ホメオボックス遺伝子の関与を中心に、慢性炎症性条件におけるMUC2ムチン発現の変動を検討した。

B. 研究方法

慢性胆管炎モデル：Polycystic kidney (PCK) ラット胆管における腸上皮化生の検討

ヒトカロリ病のモデル動物PCKラットは肝内胆管の拡張を示し、生後2ヶ月頃から慢性胆管炎を併発する。胎生18日～10ヶ月齢のPCKラット肝を用いて慢性胆管炎と腸上皮化生の出現状況の病理組織学的検討、粘液組織化学とMUC2、CDX2の免疫組織化学的検討を行った。

慢性炎症性刺激下長期培養マウス、ラット胆管細胞におけるCDX2、MUC2発現の検討

表1 PCKラットにおける慢性胆管炎と腸上皮化生

周齢 (n)	F18 d (3)	F21 d (7)	10W (3)	7 M (3)	10M (4)
胆内胆管拡張	—	+	++	+++	+++
胆管周囲リンパ球浸潤 (慢性胆管炎)	—	—	+	++	+++
腸上皮化生	—	—	+	++	+++

正常マウス由来、あるいは正常およびPCKラット由来の胆管細胞株を検討に用いた。胆管細胞をdouble chamberを用いて長期培養し、持続的LPS刺激 (100 μ g/ml) あるいは酸性 (pH3.5) 培地条件にしてMUC2, CDX2の発現を検討した。刺激後8hr、48hr、7日、30日後に細胞を回収してmRNAの発現を検討した。また、免疫染色にてMUC2とCDX2蛋白の発現を検討した。

C. 研究結果

慢性胆管炎モデル：Polycystic kidney (PCK) ラット胆管における腸上皮化生

PCKラット6週齢の拡張胆管のまわりに炎症は見られないが、10ヶ月齢では拡張した胆管の周りに、一部はリンパ濾胞形成も伴う慢性炎症がみられた。同部の胆管上皮はgoblet cellを伴う腸上皮化生を示した (図1A)。PCKラットにおける慢性胆管炎と腸上皮化生の出現状況を見ると、10週齢頃より慢性胆管炎が出現し、ほぼこれに並行して腸上皮化生が見られた (表1)。

腸上皮化生と慢性胆管炎の局在を検討すると、腸上皮化生を示す胆管を含む門脈域ではほぼ全てに慢性胆管炎が見られ、両者の局在は正の相関を示した。免疫組織化学的検討では、腸上皮化生の箇所ではMUC2発現とCDX2の発現が同様の局在で認められた (図1B、C)。PCKラット胆管においてもヒトと同様にCDX2依存性にMUC2発現を伴う腸上皮化生が生じると考えられた。

慢性炎症性刺激下長期培養マウス胆管細胞におけるCDX2、MUC2発現

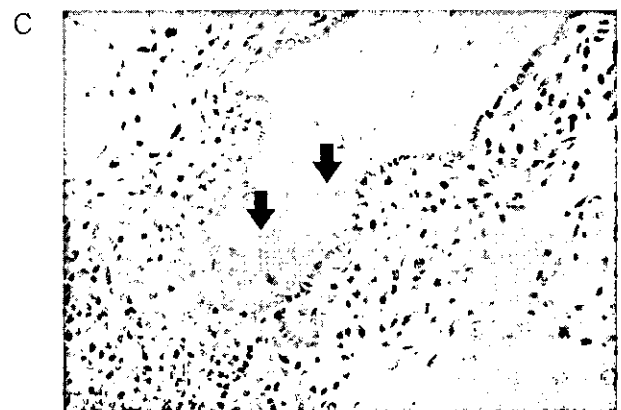
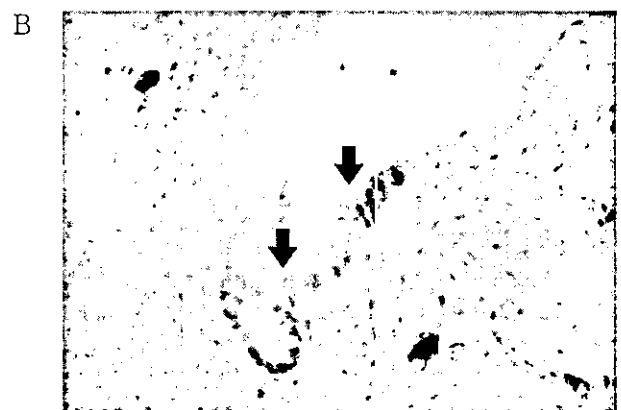
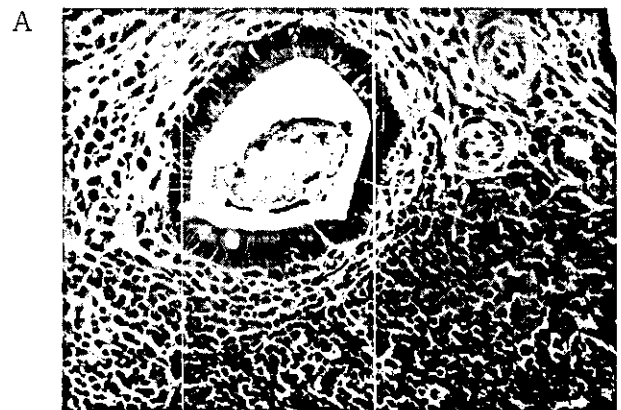


図1

図2

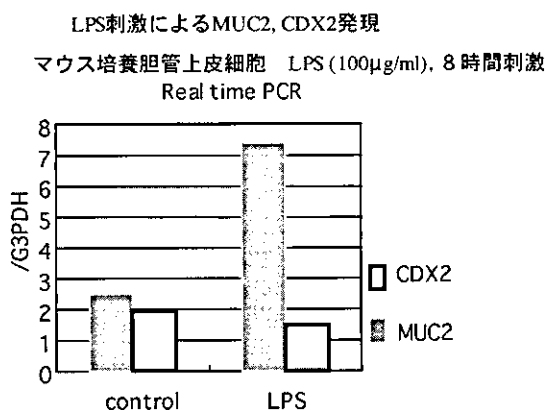


図3

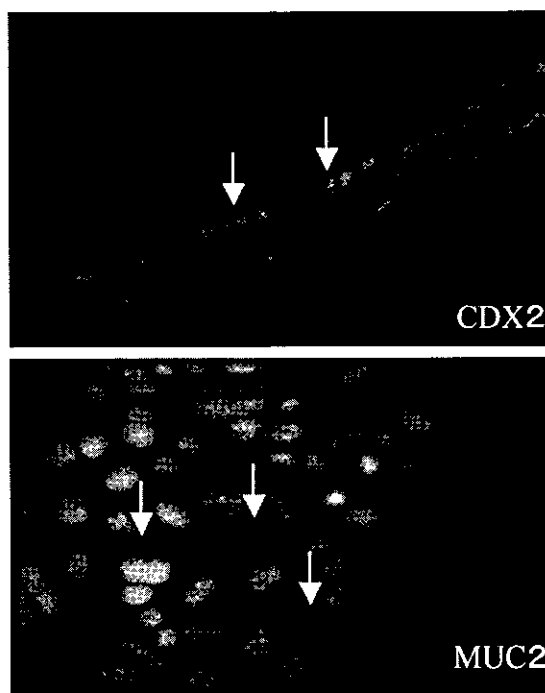
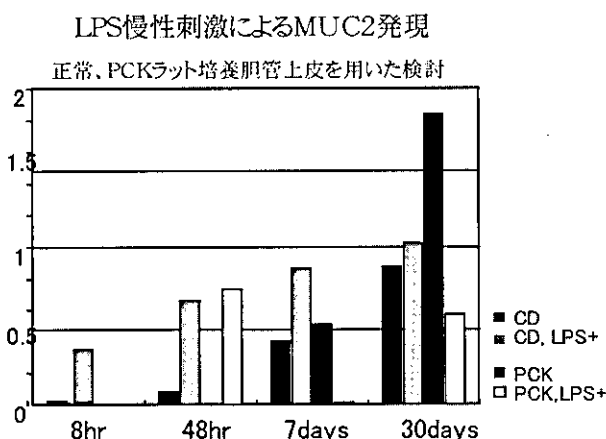


図4



LPS投与と酸性培地 8 時間後ではCDX2の発現はなかった。LPS投与 8 時間後ではMUC2産生の亢進がみられ、CDX2非依存性の反応と考えられた (図 2)。LPS持続投与と酸性培地では、培養 1 週間後よりいずれの条件でも胆管細胞の核にCDX2 発現が出現した (図 3 A)。LPS持続投与と酸性培地では同時に細胞質にMUC2ムチンの発現亢進も認められた。これに対し対照ではCDX2とMUC2ムチンの発現はなかった。培養35日目においてもLPS持続投与と酸性培地では、CDX2 とMUC2 発現 (図 3 B) が見られた。

CDX2mRNAの発現は培養期間やLPS投与に対し、一定の傾向はみられなかった。一方、PCKラットではLPS投与により、わずかにCDX2の発現が低下する傾向がみられた。MUC2mRNAの発現は正常ラット、PCKラットいずれにおいても培養初期にはほとんどなく、培養期間が長くなるにつれて発現の亢進がみられた (図 4)。対照ラットでは特に培養初期にLPS刺激によってMUC2の発現が亢進したが、慢性刺激によりLPSに対する反応性が乏しくなった。PCKラットではLPS48時間刺激ではMUC2の発現は亢進したが、7または30日間刺激した細胞では逆にMUC2の発現の低下がみられた。

慢性炎症性刺激下長期培養ラット胆管細胞におけるCDX2、MUC2発現

対照ラット、PCKラットとも無刺激状態で核にCDX2の発現が認められた。対照ラットでは

D. 考察

今回の検討から、まず、PCKラットでは慢性胆

管炎に伴ってMUC2ムチン発現を示す腸上皮化生が生じること、PCKラットの腸上皮化生はCDX2ホメオボックス遺伝子依存性であることが明らかとなった。私どもの以前の検討では、肝内結石症にみられる腸上皮化生もCDX2依存性であり、胆管の腸上皮化生はヒトとラットとも共通してCDX2依存性に生じる事が示された。また、今回の検討から、慢性胆管炎と腸上皮化生の局在がほぼ一致しており、何らかの慢性炎症に関与する因子がCDX2発現を誘導して腸上皮化生をおこすと考えられた。

CDX2発現を誘導する因子については不明な点が多い。Marchettiらは酸性条件での長期培養によりCDX2発現が誘導されることを示している。また、butyrateによるCDX2発現誘導も報告されている。LPSなどの細菌の菌体成分やTNF- α などの炎症性サイトカインは急性反応としてMUC2、MUC5AC発現亢進を誘導するが、CDX2発現におけるその役割については報告されていない。そこで今回、培養マウス、ラット胆管細胞を用いて、慢性的なLPS刺激と酸性培地条件によるCDX2発現誘導を検討した。

培養マウス胆管細胞を用いた検討では、慢性的なLPS刺激と酸性 (pH3.5) 培地条件によるCDX2とMUC2発現の誘導が示された。この結果からは、肝内結石症でも感染に伴う胆汁中のLPSや胆汁酸性状態が、CDX2発現誘導を介して腸上皮化生を引き起こす可能性が示唆された。

一方、正常ラット、PCKラット由来の培養ラット胆管細胞を用いた検討では、MUC2のmRNAの発現は対照 (正常) ラット、PCKラットいずれにおいても培養初期にはほとんどみられないが、培養期間が長くなるにつれて発現の亢進がみられた。対照ラットでは特に培養初期にLPS刺激によってMUC2の発現が亢進したが、慢性刺激によりLPSに対する反応性が乏しくなった。PCKラットではLPS48時間刺激ではMUC2の発現は亢進したが、7または30日間刺激した細胞では逆にMUC2の発現の低下がみられた。培養ラット胆管細胞の実験の結果ではCDX2発現にかかわらずMUC2発現のない状態も認められた。これらの結果は、ラット胆管細胞ではCDX2によるMUC2発現誘導に何らかの別の因

子が関与する可能性を示唆している。さらに、今回の検討では、対照ラットとPCKラットの間LPSに対するCDX2とMUC2発現の反応性の差異が認められた。今までの報告では、肝内結石症の発症に遺伝的背景の関与はないとされ、環境因子の関与が優位とされている。今回の対照ラットとPCKラットの差異については、今後さらに慎重に検討していく必要がある。

E. 結論

肝内結石症では、慢性炎症性条件によるCDX2発現の誘導を介してゲル形成能をもつMUC2ムチン発現が亢進して結石形成につながる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishikawa A, Sasaki M, Ohira S, Ohta T, Oda K, Nimura Y, Chen MF, Jan YY, Yeh TS, Nakanuma Y. Aberrant expression of CDX2 is closely related to the intestinal metaplasia and MUC2 expression in intraductal papillary neoplasm of the liver in hepatolithiasis. *Lab Invest* 2004, 84: 629-638.

Sasaki M, Ikeda H, Ohira S, Ishikawa A, Nakanuma Y. Expression of trefoil factor family 1, 2, and 3 peptide is augmented in hepatolithiasis. *Peptides* 2004, 25: 763-770

Ishikawa A, Sasaki M, Sato Y, Ohira S, Chen MF, Huang SF, Oda K, Nimura Y, Nakanuma Y. Frequent p16INK4a inactivation is an early and frequent event of intraductal papillary neoplasm of the liver arising in hepatolithiasis. *Human Pathol*

2004, 35:1505-14

2. 学会発表

佐々木素子、他：ワークショップ1「肝内結石症の疫学、成因および治療に関するupdate」肝内結石症におけるムチン発現亢進と胆管粘膜化生の発生機序第40回日本胆道学会学術集会（2004年9月）

佐々木素子、他：シンポジウム1「ムチン」肝内胆管系におけるMUCムチンコア蛋白の発現-正常分布と疾患に伴う変動-第45回日本組織細胞化学会総会

(2004年10月)

Ohira S, et al. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1) accelerates proliferation and invasion of intrahepatic cholangio-carcinoma (ICC) arising in hepatolithiasis. AASLD 55th Annual meeting (2004, Oct, Boston)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

フィブラートの肝臓における作用と肝内結石症への治療応用

分担研究者 田中 直見

筑波大学臨床医学系消化器内科

A. はじめに

フォスファチジルコリン（PC）は胆汁中の主たるリン脂質であるが、胆汁中においてコレステロール、胆汁酸とミセルを形成することにより、強い界面活性作用を有する疎水性胆汁酸から胆管上皮を保護している役割を演じている。

近年では肝細胞胆管側膜の透過機構を評価する方法論が確立され、肝より胆汁への分泌機構に関する知見が集積されてきた。肝細胞毛細胆管膜上に発現する輸送担体（トランスポーター）のうち多剤耐性P糖蛋白3（MDR3）あるいはATP binding cassette protein B4（ABCB4）はリン脂質の胆汁排泄を担当することが明らかとなっている。PCトランスロケート活性を有するABCB4によるリン脂質の毛細胆管膜の透過は、胆汁中へのリン脂質分泌の律速段階と考えられている。ノックアウトマウスの解析より、ABCB4の発現および機能の低下した病態では胆嚢や肝内胆管におけるコレステロール胆石のリスクが上昇することが報告されている。また最近ではABCB4の発現および機能の低下により引き起こされる疾病として、進行性家族性胆汁うっ滞症3型（PFIC-3）、妊娠性胆汁うっ滞症、低リン脂質排泄量関連胆石症、原発性肝内結石症が報告されている。これら疾患の存在は、リン脂質の胆汁中へのトランスポートの障害と肝胆道疾患の発症・進展との関連性を示す。

ABCB4の発現および機能の異常は胆汁うっ滞症や胆道結石症のリスクファクターとして解釈することが出来る。しかしながら日常臨床において、

ABCB4の発現および機能の賦活化を誘導する薬物治療に関しては未だ有効な治療薬は見出されていない。最近の論文では、胆汁酸製剤のウルソデオキシコール酸、脂質代謝改善剤のフィブラート系薬剤やスタチン系薬剤が肝ABCB4の発現や機能を増加させることが動物実験にて報告されている。また少数例ではあるが、肝内胆管の進行性の非化膿性破壊がみられる原発性胆汁性肝硬変においてフィブラートが血中胆道系酵素値を低下させることが報告され、慢性胆汁うっ滞症に対する本剤の有用性が期待される。

そこで今回は、胆汁うっ滞性の肝胆道疾患に対するフィブラート系薬剤（ベザフィブラート）の有用性について検討を行うために、培養ヒト肝細胞（HepG2）を用いて本剤がABCB4の発現や機能に与える影響、その他リン脂質代謝に与える影響についても解析を行った。

B. 方法

ベザフィブラートのABCB4とphosphatidylcholine transfer protein（PCTP）の発現量に対する効果

最初にVehicleおよびベザフィブラートで処置したHepG2細胞のABCB4と細胞内PCトランスポーターであるPCTP（15）のmRNA発現量についてリアルタイム定量PCRにて測定をおこなった。

C. 結果

図1 Aに示すとおり、ベザフィブラート100オmol/Lの16および24時間の処置と300オmol/Lの24時間の処置は本細胞のABCB4 mRNA発現量を有意に上昇させた (Vehicle群の最大151%)。しかし、ベザフィブラートはPCTPmRNAの発現量は変化させなかった (図1 B)。また、BFの100および300オmol/Lの処置はABCB4とPCTPのタンパク発現量に対しては有意な変化を生じなかった (図1 C、D)。

ベザフィブラートの100 および300オmol/Lの HepG2 細胞への添加は、ABCB4 mRNAの発現量を増加させたが、タンパク発現量には影響を与えなかった。この結果は明らかにマウス肝臓での報告と異なる。Chianaleらはマウスにベザフィブラートを投与すると、Abcb4のmRNAおよびタンパク発現量を有意に増加させることを報告している。ベザフィブラートは核内受容体の一つであるPPARαのリガンドで、その転写活性を増加させることが知られている (16)。PPARαの発現量およびその活性は齧

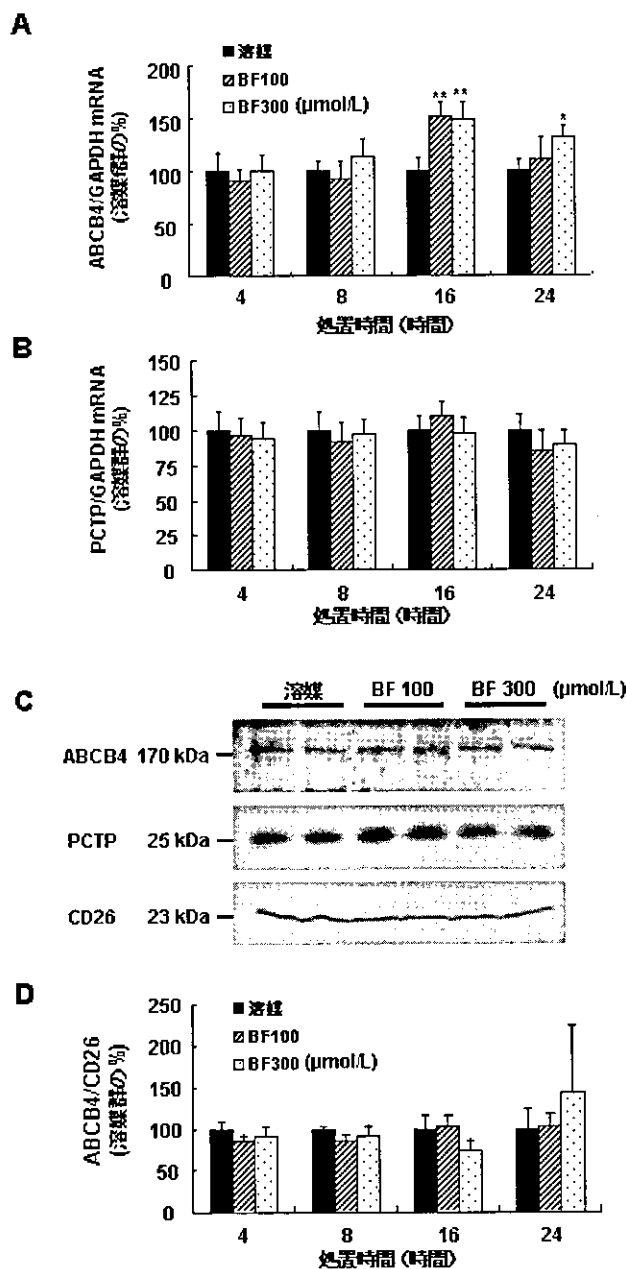


図1
ベザフィブラートによる肝細胞におけるABCB4とPCTPの発現の変化

菌類よりきわめて低いレベルであるので、ヒトでは齧歯類よりベザフィブラートの反応性が低いのかも知れない。また、ヒトとマウスのABCB4のプロモーターの違いにより、それぞれのベザフィブラートの感受性が違うのかも知れない。このいずれかの理由により、ベザフィブラートはヒト肝細胞ではABCB4のmRNAおよびタンパクの発現量をあまり変化させないものと推測された。

HepG2細胞における毛細胆管膜トランスポーターの発現

コンフルエント状態のHepG2細胞は細胞間隙には異なるサイズの偽胆管を形成する(図2A)。ヒトABCB4(リン脂質トランスポーター)、ABCC2(有機陰イオントランスポーター)とABCB11(胆汁酸トランスポーター)に対する特異抗体による免疫染色を施すとHepG2細胞の偽胆管にはこれら毛細胆管膜トランスポーターが明瞭に染色された(図2B)。HepG2細胞ではこれらのトランスポーターは、毛細胆管のマーカータンパクであるCD26と共局在していることが共焦点レーザー顕微鏡による観察にて確認することが出来た(図2B)。HepG2細胞におけるこれら毛細胆管膜トランスポーターの細胞内局在はヒト肝組織におけるトランスポーターの局在に類似していた。

ABCB4の細胞内局在に対するベザフィブラートの効果

HepG2の細胞数に対するABCB4陽性の偽胆管数は少なく、その比は0.024ア0.003(平均±標準誤差、6例)であった。ベザフィブラート300オmol/Lの処置を施しても、その比は変化を認めなかった(0.024ア0.002、6例)。ベザフィブラートの100オmol/Lで処置した細胞では16および24時間で偽胆管におけるABCB4の免疫蛍光量が対照群に比べ最大134%まで増加した(図3B)。同様にベザフィブラート300オmol/Lの処置は8、16および24時間で免疫蛍光量が増加した(図3B)。

ABCトランスポーターの毛細胆管膜へのソーティングとターゲッティングのような翻訳後の制御は

古典的なセカンドメッセンジャーを介している。セカンドメッセンジャーやキナーゼは溶質のトランスポートや小胞交換のような種々の胆汁形成課程に関与している。我々は種々の可能性について検証した。cAMPが細胞内ストアからのABCB4を含む小胞の挿入を刺激することにより、PCトランスポーターの活性化を制御している可能性(22、23)については、HepG2細胞にベザフィブラート処置をしても細胞内cAMPの濃度にはほとんど影響を与えなかったことよりその可能性は低い(未発表データ)。これはベザフィブラートの効果がprotein kinase A(PKA)を介さないということの意味する。また、ABCC2の毛細胆管膜への再分配は一部にCa²⁺やα-PKC-依存のメカニズムを介していることが報告されている(24)が、PKCイソザイムのイムノブロット解析では(未発表データ)、ベザフィブラートはPKCの活性化の鍵となる膜分画へのPKCイソザイムのトランスロケートを引き起こすことは認められなかった。ベザフィブラートがABCB4を偽胆管へ再分配させるメカニズムの詳細は未だ不明である。

C6-NBD-PCの偽胆管への局在変化におけるベザフィブラートの効果

ベザフィブラートによるHepG2細胞のABCB4の機能賦活化を確認するために、蛍光標識リン脂質であるC6-NBD-PCを用いてその偽胆管腔への分泌動態を観察した。細胞の偽胆管腔への強力な蛍光の蓄積は共焦点レーザー顕微鏡により5から20分で確認された。その蛍光PCの局在部位はABCB4の染色部位にはほぼ一致していた(図4A)。共焦点レーザー顕微鏡を用いて偽胆管腔への蛍光PCの局在の経時的变化におけるベザフィブラートの効果について検討した。蛍光PCの添加により蛍光のバックグラウンドが増加することは確認できるが、C6-NBD-PCは偽胆管腔への分配よりも他の細胞膜へ分布し、次に蛍光PCは偽胆管腔へ集積した(図4A)。図4Bに示すように、ベザフィブラートの300オmol/Lの処置はC6-NBD-PCの偽胆管への移動を対照群に比し有意に増加させた(P<0.01、反復測定

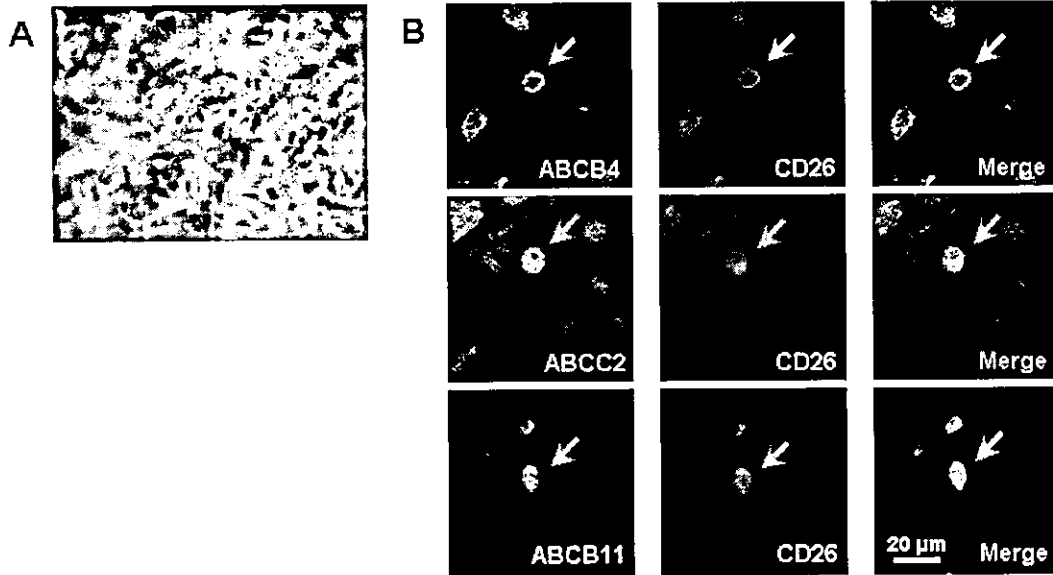


図2
HepG2細胞における毛細胆管膜トランスポーターの発現

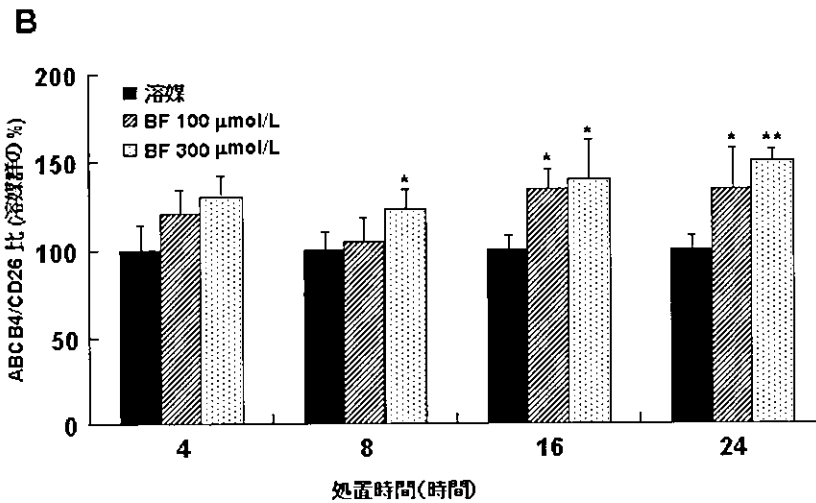
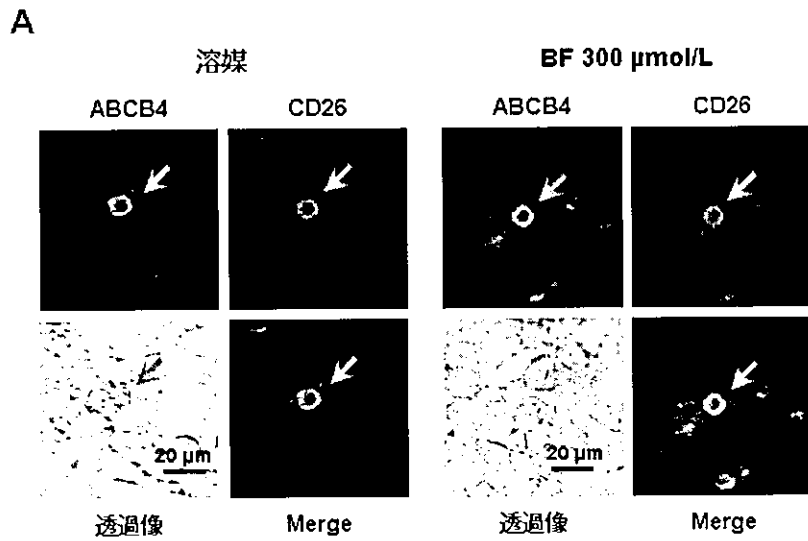
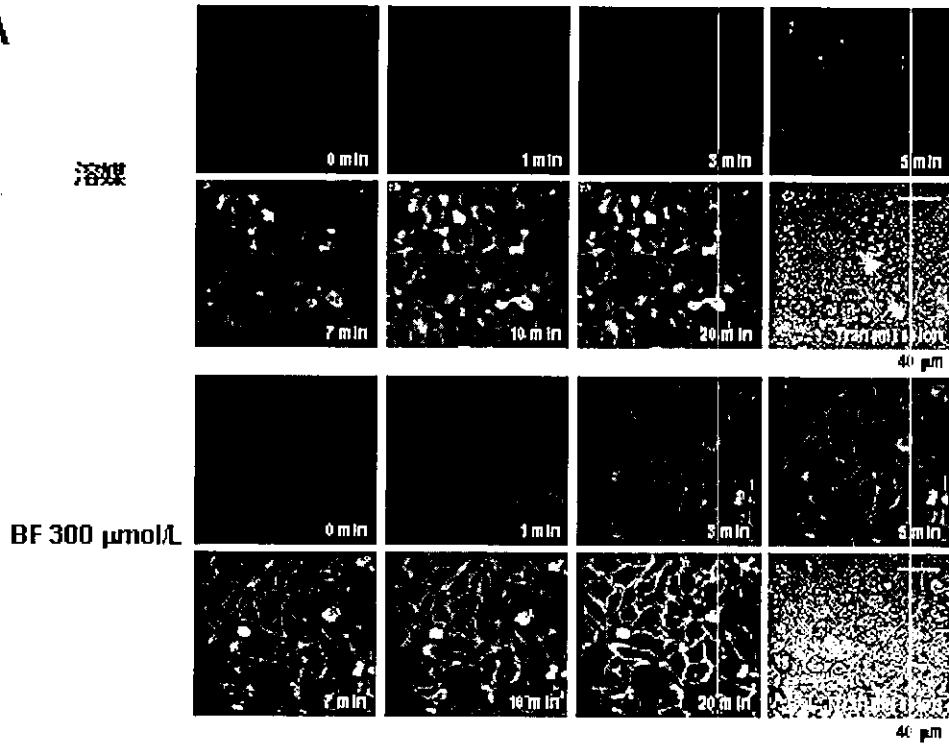
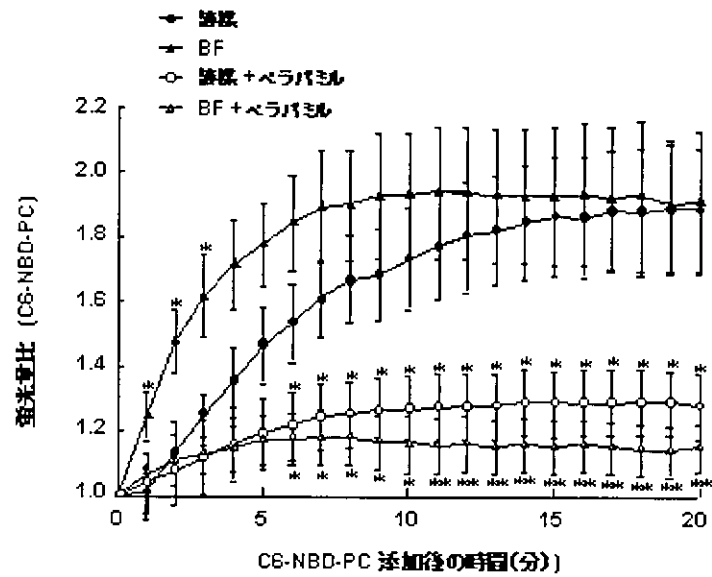


図3
ベザフィブラートによる肝細胞におけるABCB4の細胞内局在の変化

A



B



C

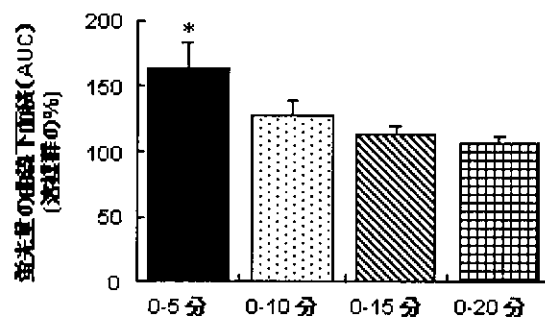


図4
ベザフィブラートによる肝細胞におけるリン脂質輸送と分泌動態の変化

ANOVA)。偽胆管腔のC6-NBD-PCの集積量はベザフィブラートの処置により3分間で対照群に比し有意に上昇した(図4B)。さらに5分間のPCの毛細胆管への流入量に相当する蛍光量の曲線下面積(AUCと略す)はベザフィブラート処置により対照群に比し有意に上昇した(163ア21%; $P < 0.05$)。また、10分間においてもベザフィブラート処置群は上昇傾向を示した。(120ア15%; $P = 0.07$) (図4C)。ABCトランスポーターの阻害薬であるペラパミル(50オmol/L)の処置した細胞では(25、26)、ベザフィブラートにより誘発されるC6-NBD-PCの偽胆管腔への集積作用が抑制された(図4B)。この結果より、ベザフィブラートは偽胆管膜のABCB4を増加させ、その結果として、PCの偽胆管腔へのトランスポートを促進させることが示唆された。

siRNAおよびMorpholinoアンチセンスによるPPAR α の発現抑制とベザフィブラートの効果

KokらはPPAR α を介したメカニズムでフィブラート系薬物がマウスの肝臓におけるmdr2のmRNAおよびタンパクの発現量を増加させることを報告している(27、28)。PPAR α はABCB4の毛細胆管への再分配も制御している可能性が考えられる。最近、各種分子ターゲットをsiRNAおよびmorpholinoアンチセンスによりノックダウンする方法が発展してきた(29、30)。ベザフィブラートにより引き起こされるABCB4の再分配における変化が、PPAR α 活性化を介するものかどうかを確かめるために、我々はPPAR α に特異的なsiRNAおよびmorpholinoアンチセンスを設計し、HepG2細胞内に導入した。

蛍光標識コントロールsiRNAを導入したHepG2細胞を図5Aに示す。この実験ではコントロールsiRNAの導入効率は35ア6%(平均ア標準誤差、4例)であった。反復導入により導入効率は増加し、2回にわたるPPAR α に対するsiRNAの導入により、PPAR α mRNAが未処置の細胞の64%まで抑制された(図5B)。またPPAR α タンパク発現量も64%まで抑制された(図5C、D)。PPAR α に対するmorpholinoアンチセンスもPPAR α タンパクの発

現量を57%まで抑制した(図5C、D)。

ベザフィブラートによるABCB4の再分配におけるPPAR α の関与について検討するために、PPAR α を標的にしたsiRNAまたはmorpholinoアンチセンスを導入した細胞でABCB4の免疫蛍光染色を行った(図6)。イムノブロット分析では、siRNAおよびmorpholinoアンチセンスのHepG2細胞への導入はABCB4のタンパク発現量に対しては何ら影響を与えなかった(未発表データ)。PPAR α -siRNA(94ア4%)およびPPAR α morpholinoアンチセンス(91ア3%)導入細胞とそれぞれのコントロールsiRNA(100ア2%)もしくはコントロールmorpholinoアンチセンス(100ア5%)処置細胞の偽胆管のABCB4/CD26比には差がなかった(図6)。ベザフィブラートの300オmol/Lで24時間処置した細胞の偽胆管のABCB4/CD26比は、対照群に比し有意に上昇した(134ア6%)が、このベザフィブラートによるABCB4/CD26比の上昇は、PPAR α siRNAの前処置により109ア8%まで有意に減少した(図6A、B)。また、ベザフィブラートによる偽胆管へのABCB4の再分配はアンチセンスによっても阻害された(図6B)。このことより、ベザフィブラートによるABCB4の毛細胆管膜への再分配は、少なくともその一部は、PPAR α に依存したメカニズムを介したものであることが示唆された。

ベザフィブラートのABCC2やABCB11に対する効果

ABCB4に加えて、ベザフィブラートはABCC2やABCB11のタンパク発現量に影響を与えず、HepG2細胞の偽胆管への再分配を促進した(図7)その結果はヒトの肝臓における胆管のABCトランスポーターにおけるベザフィブラートの特異的な作用をアドレスするのにきわめて重要である。ABCB4のみならずABCC2やABCB11の機能を高めるようなBFの普遍的な作用が示唆され、胆汁うっ滞性肝疾患の治療にフィブラート系薬物が有用である可能性が示唆された。

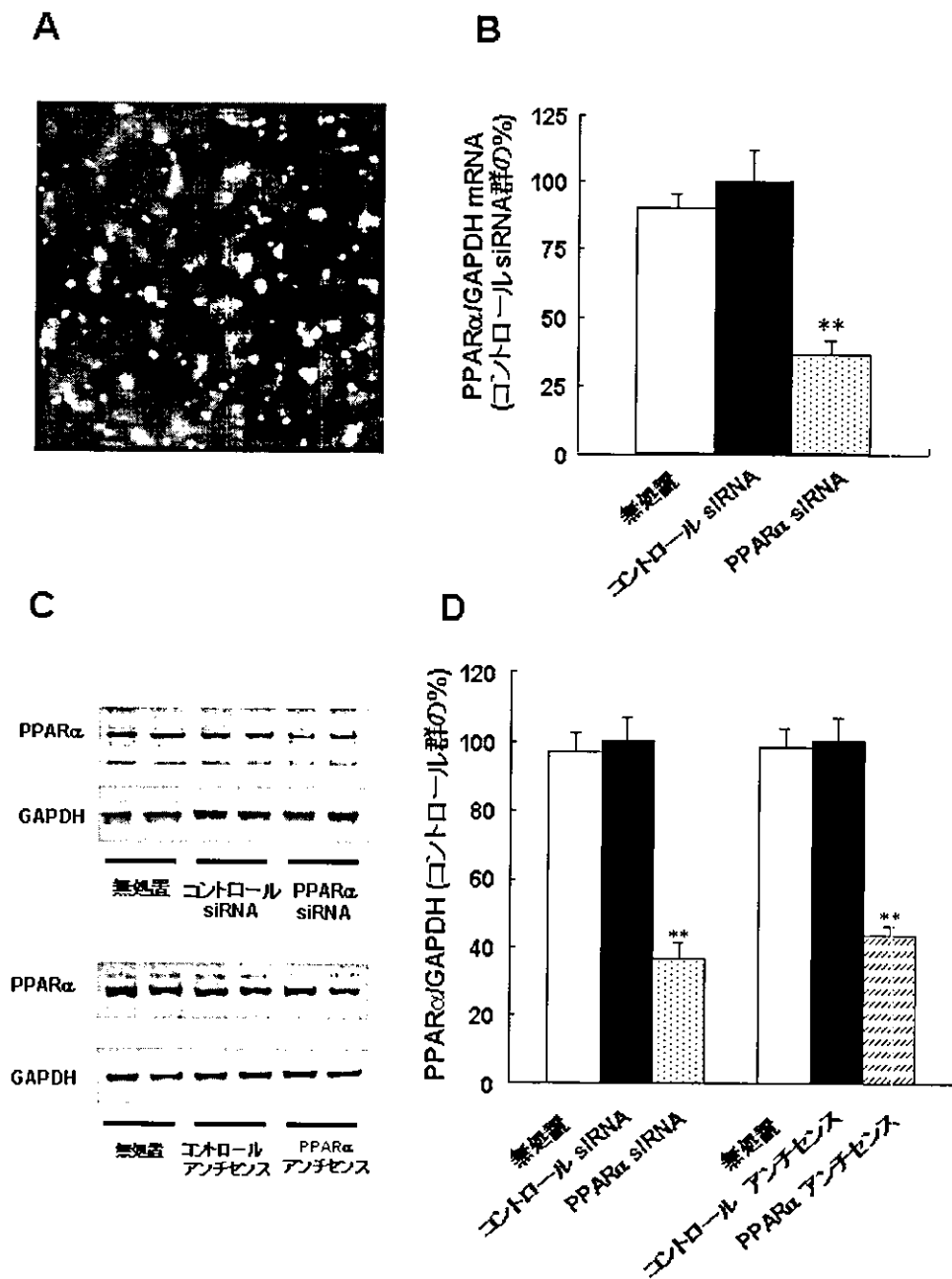


図5 siRNAおよび Morpholino アンチセンスによる PPARα の発現抑制

原発性肝内結石症における ABCB4 の発現異常

図8は本症における ABCB4 遺伝子の変異解析の結果を示したものである。全16例のうち1例においては、エクソン7、10、22-23における膜通過領域に、それぞれ77bp、1bp、241bpの塩基の欠失を認める heterozygous mutations を認め、別の1例ではエクソン7における膜通過領域の77bpの塩基の欠失のみを認めた。しかしながら他の14例では変異は認めなかった (31)。

図9は肝 ABCB4 の転写レベルを本症16例と肝胆道疾患を有しない対照症例を比較したものである。本症における ABCB4 転写レベルは対照に比して有意に低値であった (31)。しかしながら、本症16例のうち、遺伝子変異を認めた2例と変異を認めなかった14例についてはその転写レベルに有意な差を認めなかった。免疫組織化学において、ABCB4 発現は対照肝では胆管側膜に肝全体に diffuse に、また胆管側膜に tight にその発現が認められるのに対して、