

## Ⅲ－２．原発性胆汁性肝硬変分科会

13. 原発性胆汁性肝硬変全国調査（第26報）	31
関西医科大学 内科学第三講座 廣原 淳子	
14. ①原発性胆汁性肝硬変における胆管細胞老化の分子機構－酸化ストレスの関与を中心に－	35
②難治性の肝・胆道疾患に関する免疫病理学的研究	37
金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 中沼 安二	
15. 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序に関する研究	39
国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 石橋 大海	
16. PBCにおける慢性胆汁うっ滞が自然免疫や獲得免疫系に与える影響の解析	41
自治医科大学内科学講座 消化器内科学部門 喜多 宏人	
17. 自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病変と制御性T細胞との関連性－病理組織学的検討－	42
筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系 消化器内科 松崎 靖司	
18. PBC患者におけるMRP2とMRP3発現の変化－早期患者と進行した患者肝における検討－	44
福岡大学医学部 第三内科 向坂彰太郎	
19. 原発性胆汁性肝硬変に関わる自然免疫異常の研究	46
帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科 宮川 浩	
20. 微生物由来 CpG DNA による肝炎および胆管炎の誘導	48
福島県立医科大学 内科学第二講座 佐藤由紀夫	
21. 原発性胆汁性肝硬変の分子疫学	50
高知大学医学部 消化器病態学 大西 三朗	
22. 静脈瘤が他の症候に先行して出現した原発性胆汁性肝硬変の臨床像	52
愛媛大学医学部 第三内科 恩地 森一	
23. 当科におけるPBC移植病例の予後とPBC病態進展に伴う遺伝子変化	54
金沢大学医学部医学系研究科 がん遺伝子治療学 金子 周一	
24. 原発性硬化性胆管炎の全国調査	56
帝京大学医学部 内科 滝川 一	
25. 原発性硬化性胆管炎の予後予測因子に関する検討	58
香川大学医学部 第三内科 栗山 茂樹	
26. 小児期に発症する原発性硬化性胆管炎	60
国際医療福祉大学附属熱海病院 小児科 藤澤 知雄	

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 原発性胆汁性肝硬変全国調査（第26報）

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学 内科学第三講座 講師

**研究要旨：**本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査登録症例における長期追跡例の検討により、本邦におけるPBCの実態を明らかにすることにある。2003年12月末に実施した第12回PBC全国調査で、既登録症例2490例と新規登録630例の報告が得られ、総登録症例は5742例となった。2005年に改訂された診断基準の臨床病期分類による5年生存率はa-PBC97.5%、s-PBC77.6%、10年生存率は各々92.1%、61.7%であった。診断時肝細胞癌合併例は全体の0.8%であり、高齢の男性で組織学的進展例に多い傾向が認められた。

#### 共同研究者

仲野 俊成 関西医科大学 大学情報センター医療情報部  
関 寿人 関西医科大学 内科学第三講座  
岡崎 和一 関西医科大学 内科学第三講座

#### A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis, PBC）の全国調査は当班により1980年から実施され、我々はその集計、解析を継続して行ってきた。今回は、2003年12月末に実施した第12回全国調査の最終集計結果を報告するとともに、近年報告例の増加している肝細胞癌合併例についても解析を加えた。

#### B. 研究方法

##### 1. 研究方法

第11回PBC全国調査は、全国478の既登録施設に対し、2001年12月までの既登録症例の予後調査と2002年1月から2003年12月末までに新たに診断された新規症例についてアンケート調査により報告を求め、これら臨床像と予後について解析した。予後解析の検討では、登録症例5742例のうち解析可能であった4893例を対象とし生存率はKaplan-Meier法により解析し、多変量解析にはSAS JMP Ver.4を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

これまで本邦におけるPBCの診断基準は本研究班により1982年および1992年に示されたものが広く用いられてきた。臨床病期は、肝疾患に関連した自覚症状がみられないものを無症候性PBC（asymptomatic-PBC, a-PBC）とし、症候性PBC（symptomatic-PBC, s-PBC）を皮膚掻痒感のみのs1-PBCと皮膚掻痒感の有無にかかわらず総ビリルビン値が $2.0\text{mg/dl}$ 以上の黄疸を有するs2-PBCに分類してきた。2005年に診断基準が一部改訂（肝臓46：232-233, 2005）されたことから、今回は改訂された臨床病期分類に基づき解析を行った。

##### 2. 個人情報の管理

「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省告示第2号、平成14年6月17日付け）告示以降の本研究にあたっては同告示を遵守し、「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（厚生労働省、平成16年12月24日付け）に則り、研究グループ外に個人情報管理者を設置することを含めた厳格な個人情報管理システムを構築し、研究対象とした登録症例の個人情報漏洩等について十分な配慮を行った。

#### C. 研究結果

1. 第12回PBC全国調査の最終集計結果を以下に示す。

- 1) 各調査回の新規登録症例数および総症例数（表1）：既登録症例2490例（回収率58.0%）と新規登録630例の報告が得られ、登録症例総数は5742例におよぶ。平均観察期間71.5ヶ月である。
- 2) 年次別発生数（図1）および有病者数（図2）と診断時臨床病期；無症候性（asymptomatic PBC：a-PBC）、症候性PBC（symptomatic PBC：s-PBC）の割合：1990年以降年間発生数は250例前後でほぼ横ばいであるが、有病者数は漸増している。
- 3) 年齢構成および性別（図3）：男女比721：4996（1：6.9）、診断時平均年齢55.1歳（男性58.5歳、女性54.7歳）であった。好発年齢層が50-60歳代中心であることや男女比にも大きな変化は認められない。
- 4) 自己抗体陽性頻度：抗ミトコンドリア抗体（蛍光抗体法antimitochondrial antibody：AMA）陽性率は84.3%、抗核抗体（antinuclear antibody：ANA）43.6%、抗平滑筋抗体（antismooth muscle antibody：ASMA）5.1%で、抗ミトコンドリア抗体（ELISA法）（表2、3）陽性率は71.0%であった。
- 5) 自己免疫疾患の合併頻度（表4）に既報と差異はない。
- 6) 診断時に合併する悪性腫瘍の内訳とその頻度

(図4)を示す。

- 7) Scheuer分類による診断年次別の肝生検組織学的病期(図5)の割合に大きな変化はない。
- 8) ウルソデオキシコール酸治療の有無を表5に示す。
- 9) 予後(表6)と死亡年次別にみた死因(図6): 921例の死亡例が報告され、肝不全と消化管出血が主たる死因であるが、近年その他の死因による死亡数が増加している。なお、経過中を含め64例の肝移植の報告があった(第11回調査時までには肝移植を施行された症例は43例)。
- 10) 診断時臨床病期別生存率: 診断時a-PBC3442例, s-PBC1451例について各々の5年生存率は97.5%, 77.6%, 10年生存率は92.1%, 65.8%であり、各群相互間に $p < 0.0001$ 以下で有意差が認められた(図7)。

2. 診断時に合併した肝細胞癌合併例は44例(0.8%)あったが、その臨床像について検討した。

- 1) 診断時年齢構成および性別(表7): 男女比は1:2.5であり、診断時平均年齢は男性70.3歳、女性65.4歳であった。肝炎ウイルスについては記載のあった症例中、1例のみB型とC型肝炎ウイルス重複感染例であった。
- 2) 診断時組織学的病期(表8): 全症例に比較してScheuer分類Ⅲ期の占める割合が多い傾向にある。
- 3) UDCA治療例の有無を表9に示す。
- 4) 予後: 記載のあった39例のうち、生存15例、死亡24例(癌死15例)の予後が確認された。

#### D. 考 察

本調査における解析ではこれまで症候性PBC(symptomatic-PBC, s-PBC)を皮膚掻痒感のみのs1-PBCと総ビリルビン値が $2.0\text{mg/dl}$ 以上の黄疸を有するs2-PBCに分類してきた。第1~11回PBC全国調査報告における臨床病期a-PBCには、皮膚掻痒感、黄疸が認められないにもかかわらず、腹水、浮腫、肝性脳症、静脈瘤破裂による消化管出血などの肝不全徴候を有する症例群も少数ながら含まれており(a-PBC全体の3%程度)、有意に予後不良な群であることを報告した(第25報)。このような臨床的実態に即する形で2005年に改訂された臨床病期分類では、皮膚掻痒感、黄疸の有無にかかわらず食道静脈瘤、腹水、肝性脳症など肝障害に基づく自覚症状を有する場合s-PBCとして扱うこととなり、今回は改訂された臨床病期分類に則り解析を行った。

最近の疫学的動向としては年間発生数がほぼ一定であるのに対し有病者数の増加が顕著である。診断時a-PBCの占める割合が増加していることに加え、最近の内科的治療により各病期にわたって予後が有意に改善されていることが有病者数の増加に寄与しているものと考えられる(第23報)。患者の長期生存例の増加に伴って、本調査における登録例においても肝細胞癌

合併例の報告が集積されつつある。欧米では、本症における肝細胞癌の合併率は低いとする報告の一方で、ウイルス性肝硬変ほどではないが発癌率が高いとする報告があり、まだ一定の見解は得られていない。そこで、今回は診断時に肝細胞癌を合併した症例について検討した。診断時の年齢および性別の検討では全症例に比べ高齢の男性患者例が多く、組織学的病期の進展した症例に多い傾向が認められた。ウイルス性肝炎からの発癌と同様に年齢と性別が危険因子であり、病期の進展とともに発癌の危険性が高まることが推定される。今回は診断時合併例について検討を行ったが、追跡調査により経過中発症の報告が45例あり、これらをあわせて累積発癌率および危険因子の統計学的解析をすすめる予定である。

#### E. 結 論

第12回PBC全国調査で、既登録例2490と新規登録630例の報告が得られ、総登録症例は5742例となった。5年生存率はa-PBC97.5%, s-PBC77.6%, 10年生存率は各々92.1%, 61.7%であった。診断時肝細胞癌合併例は全体の0.8%程度であり、高齢の男性で組織学的進展例に多い傾向が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 廣原淳子, 仲野俊成, 関寿人, 岡崎和一: 原発性胆汁性肝硬変. 石井裕正, 朝倉均, 税所宏光, 幕内博康編, 臨床消化器病学. 朝倉書店, 東京, 470-475, 2005.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表1 調査回別症例数

	新規登録例数	総調査例数
第1回調査(1980)	166	166
第2回調査(1980)	95	126
第3回調査(1980)	165	238
第4回調査(1980)	420	572
第5回調査(1980)	569	693
第6回調査(1980)	295	987
第7回調査(1980)	487	1310
第8回調査(1980)	711	2060
第9回調査(1980)	765	2526
第10回調査(1980)	707	2666
第11回調査(1980)	769	2539
第12回調査(1980)	630	3127
		5742

図1 年次別発生数

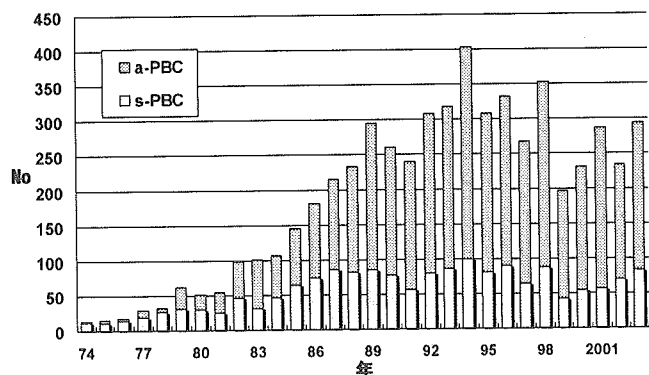


図2 年次別有病者数

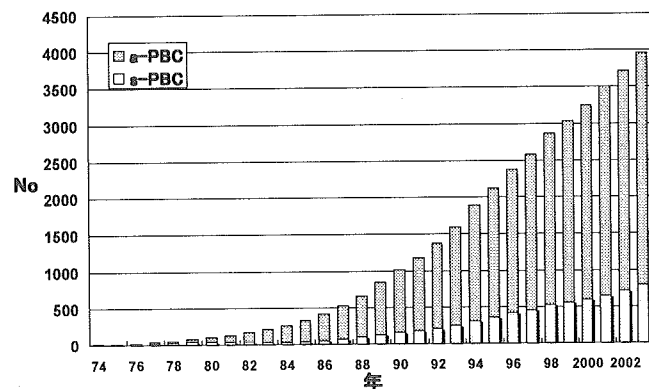


図3 年齢構成および性別

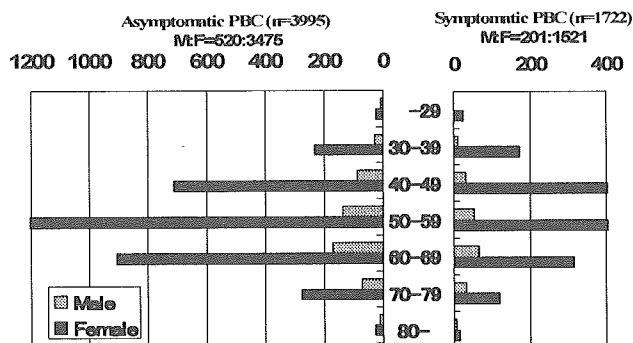


表2 自己抗体の陽性頻度

		抗ミトコンドリア抗体 (蛍光抗体)		Total
		(+)	(-)	
ANA	(+)	1796(35.0)	446( 8.7)	2242(43.6)
	(-)	2537(49.4)	358( 7.0)	2895(56.4)
ASMA	(+)	145( 2.8)	115( 2.2)	260( 5.1)
	(-)	4188(81.5)	689(13.4)	4877(49.9)
Total		4333(84.3)	804(15.7)	5137(100)

表3 抗ミトコンドリア抗体の陽性頻度 (第7~12回調査例で両者が測定されている1637例)

		蛍光抗体法		Total
		(+)	(-)	
ELISA	(+)	1067(65.2)	96( 5.9)	1163(71.0)
	(-)	256(15.6)	218(13.3)	474(29.0)
Total		1323(80.8)	314(19.2)	1637(100)

表4 自己免疫疾患の合併 (記載のあった5319例中)

Sjogren症候群	710例 (15.0%)
橋本症	342例 ( 7.2%)
リウマチ性関節炎	215例 ( 4.5%)
Raynaud現象	163例 ( 3.4%)
強皮症	113例 ( 2.4%)
潰瘍性大腸炎	12例 ( 0.3%)

図4 悪性腫瘍の内訳 (169/5319例, 3.2%)

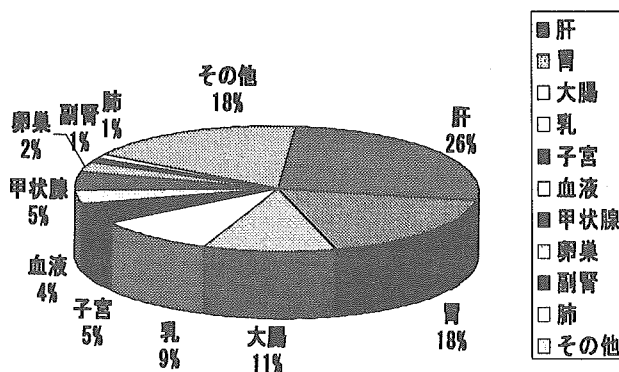


図5 診断時肝生検組織分類 (Scheuer分類)

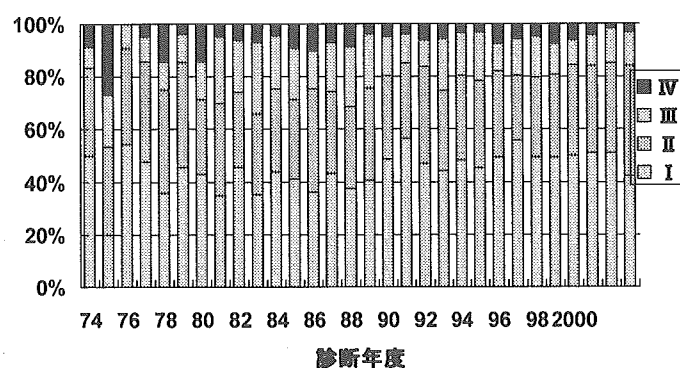


表5 ウルソデオキシコール酸 (UDCA) 治療の有無

	a-PBC	s-PBC	Total
非使用	754 (15.4)	429 ( 8.8)	1183 (24.1)
使用	2641 (53.9)	1076 (22.0)	3717 (75.9)
Total	3395 (69.3)	1505 (30.7)	4900 (100)

( ): %

表6 予後（不明を除く4463例）

生存中	3478例
死亡	921例
肺不全	499例
消化管出血	132例
肝不全+消化管出血	12例
その他	278例
肝移植	64例

図6 死亡年次別にみた死因

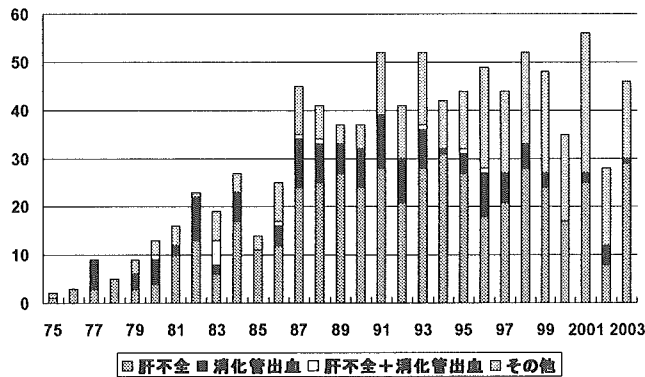


図7 診断時臨床病期別生存率

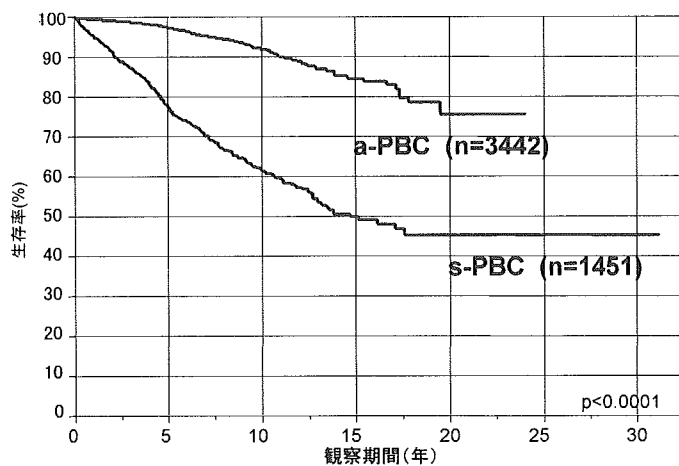


表7 肝細胞癌合併例の診断時年齢

	PBC with HCC	PBC
Male	70.3±12.3 (n=12)	58.5±11.8 (n=721)
Female	65.4±9.6 (n=30)	54.7±11.1 (n=4996)
Total	66.8±10.8 (n=42)	55.1±11.2 (n=5717)

(歳)

表8 肝細胞癌合併例の診断時組織学的病期分類

Scheuer分類	PBC with HCC	PBC
I	14 (34.1)	2039 (46.5)
II	12 (29.3)	1437 (32.7)
III	15 (36.6)	675 (15.4)
IV	0 (0)	238 (5.4)
Total	41	4389

( ):%

表9 肝細胞癌合併例のUDCA治療の有無

UDCA	PBC with HCC	PBC
使用	30 (73.2)	3717 (75.9)
非使用	11 (26.8)	1183 (24.1)
Total	41	4900

( ):%

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変における胆管細胞老化の分子機構－酸化ストレスの関与を中心に－

分担研究者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授

**研究要旨：**原発性胆汁性肝硬変（PBC）の障害胆管では高率にp16<sup>INK4a</sup>とp21<sup>WAF1/Cip</sup>の発現亢進を伴う細胞老化とp16<sup>INK4a</sup>発現の抑制因子：polycomb蛋白bmi1の発現低下をみる。今回、培養胆管細胞を用いて酸化ストレスとbmi1発現の関連を中心に胆管細胞老化の分子機構を検討した。その結果、1）過酸化水素投与による酸化ストレスはbmi1発現低下とp16<sup>INK4a</sup>発現亢進、細胞増殖活性低下と細胞老化亢進をきたす事、2）siRNAを用いたbmi1発現抑制はp16<sup>INK4a</sup>発現亢進、増殖活性低下と細胞老化亢進をおこす事、3）酸化ストレスはATM、p53のリン酸化を介して速やかにp21<sup>WAF1/Cip</sup>の発現亢進をきたす事、が明らかになった。酸化ストレスはATM/P53系活性化とbmi1発現低下を介してPBCでの胆管細胞老化の誘導と維持に関与する可能性が示唆された。

### 共同研究者

佐々木素子 金沢大学医学系研究科 形態機能病理学  
池田 博子 金沢大学医学系研究科 形態機能病理学

### A. 研究目的

PBCにおける肝内小型胆管消失の機序は十分に解明されていない。私どもはPBCの障害胆管上皮細胞は老化関連p16<sup>INK4a</sup>とp21<sup>WAF1/Cip</sup>の発現亢進を伴う細胞老化形質を高率に示す事、ミエロペロキシダーゼ陽性細胞の上皮間浸潤に伴う酸化ストレスと胆管細胞老化の関連が示唆される事、過酸化水素添加による酸化ストレスは培養胆管細胞の細胞老化を誘導する事、を示し、PBCでは酸化ストレスによる細胞老化が胆管細胞の再生不良から胆管消失の原因になる可能性を示唆してきた。また、昨年度の報告でPBCの障害胆管細胞ではp16<sup>INK4a</sup>発現の抑制因子polycomb蛋白bmi1の発現低下を認めることを示した。今回、培養胆管細胞を用いて酸化ストレスとbmi1発現の関連を中心に胆管細胞老化の分子機構を検討した。

### B. 研究方法

培養マウス胆管細胞に過酸化水素（100μM, 2hr）添加による酸化ストレスを加え、bmi1, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip</sup>のmRNAと蛋白発現の変化を、real time-PCR法、Western blot法で各々検討した。酸化ストレスによる細胞増殖活性の変化と細胞老化の誘導を、BrdU 標識率とDimri法による senescence associated-β-galactosidase (SA-β-gal) 標識率により検討した。また、short interference RNA (siRNA)を用いて培養胆管細胞におけるbmi1発現を抑制し、p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip</sup>発現、細胞増殖活性、細胞老化の誘導を検討した。さらに、酸化ストレスによるATM(ser1981), p53(ser15)のリン酸化とp21<sup>WAF1/Cip</sup>の発現を免疫蛍光法で比較検討した。

### C. 研究結果

1) 酸化ストレスによるbmi1, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip</sup>の

### 発現変動（図1）

過酸化水素添加2日後に、bmi1mRNA発現は、有意に低下した（対照の約1/2）。p16<sup>INK4a</sup>mRNA発現は過酸化水素添加2日後以降、有意に漸増した。p21<sup>WAF1/Cip</sup>mRNA発現は過酸化水素添加1日後に対照の約3倍に増加し、その後漸減した。蛋白発現もmRNA発現に対応した変動を示した。

2) 酸化ストレスによる細胞増殖活性低下と細胞老化の誘導（図2）

過酸化水素添加により有意なBrdU標識率（増殖活性）の低下とSA-β-gal標識率（細胞老化）の増加を認めた。

3) Bmi1発現抑制によるp16<sup>INK4a</sup>の発現と細胞増殖活性低下と細胞老化の誘導

Bmi1に対するsiRNA導入によりbmi1mRNA発現は約1/4に抑制された。bmi1発現抑制に伴って、有意なp16発現の亢進、増殖活性の低下と細胞老化の亢進を認めた。

4) 酸化ストレスによるATM (ser1981), p53 (ser15) のリン酸化と、p21<sup>WAF1/Cip</sup>発現亢進

過酸化水素添加により、ATM (ser1981), p53 (ser15) のリン酸化と、p21<sup>WAF1/Cip</sup>発現亢進を認めた。これらの変化はATM活性化阻害剤により阻害された。

図1 酸化ストレスによるbmi1, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip</sup>の発現変動（\*p<0.01; \*\*p<0.05）

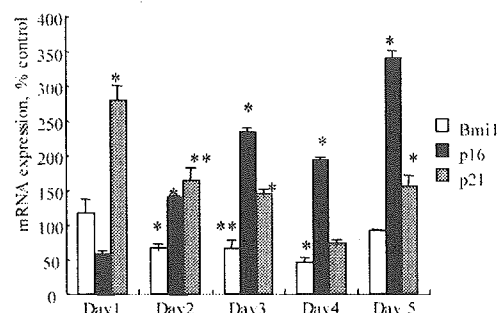
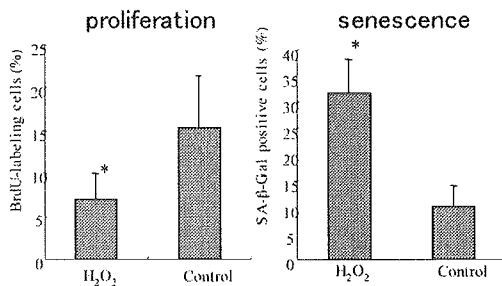


図2 酸化ストレスによる細胞増殖活性低下と細胞老化の誘導 (\*, p<0.01 vs control)



#### D. 考 察

PBCの肝内小型胆管には胆管障害部を中心に高率に細胞老化形質を認めることから、PBCの障害胆管においても肝移植後慢性拒絶と同様の機序で胆管細胞老化が胆管消失の原因となると考えられる。また、私どもは昨年度の報告で、p16<sup>INK4a</sup>抑制因子であるpolycomb蛋白bmi1の発現低下PBCの胆管細胞老化の局在が一致する事を示した。しかし、bmi1発現制御を含め、PBCの細胞老化誘導因子についてはほとんど解明されていない。酸化ストレスは細胞老化の要因であり、PBCの肝病変との関連も報告されている。そこで今回、bmi1の関与を中心に、酸化ストレスと胆管細胞老化の関連を培養胆管細胞を用いて検討した。今回の検討では、酸化ストレスはbmi1発現低下と引き続いてp16<sup>INK4a</sup>発現亢進をきたした。また、細胞増殖活性の低下、細胞老化の亢進もみられた。これらの変化はsiRNAを用いてbmi1発現を抑制した場合と同様であり、酸化ストレスによる胆管上皮細胞老化の一部はpolycomb蛋白bmi1発現の低下を介して生じると考えられた。また、酸化ストレスを加えた後、早期にp21<sup>WAF1/Cip</sup>発現亢進が認められた。今回の結果から、このp21<sup>WAF1/Cip</sup>発現の誘導はATM、p53のリン酸化を介する事が確認された。細胞老化におけるp16<sup>INK4a</sup>とp21<sup>WAF1/Cip</sup>の役割や相互作用については議論のあるところであるが、p21<sup>WAF1/Cip</sup>は細胞老化の誘導、p16<sup>INK4a</sup>は細胞老化の維持に働くとされる。従って、酸化ストレスによる胆管細胞老化は、まず、ATM/p53/p21<sup>WAF1/Cip</sup>経路を介して誘導され、bmi1低下によって発現亢進するp16<sup>INK4a</sup>により維持されると考えられる。酸化ストレスによるbmi1低下に関与するシグナル伝達経路、細胞老化とアポトーシスの関連については今後の検討課題である。

#### E. 結 論

酸化ストレスはATM-P53系活性化とbmi1発現低下を介してPBCでの胆管細胞老化の誘導と維持に関与すると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sasaki M, Ikeda H, Haga H, et al : Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. J Pathol 205 (4) : 451-459, 2005.

##### 2. 学会発表

- 1) Sasaki M, et al : Decreased expression of bmi1 is closely associated with cellular senescence in damaged small bile ducts in primary biliary. The 56th Annual Meeting of AASLD, San Francisco. 2005.11.
- 2) Sasaki M, et al : Hepatocytes growth factor activator type1(HAI-1) is augmented in intrahepatic small bile ducts in primary biliary cirrhosis. The 56th Annual Meeting of AASLD. San Francisco. 2005.11.
- 3) 佐々木素子, 他 : 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の肝内小型胆管における細胞老化制御機構 : polycomb蛋白bmi-1の関与. 第41回肝臓学会総会, 大阪. 2005.6.
- 4) 佐々木素子, 他 : 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の肝内小型胆管上皮における肝細胞増殖因子(HGF)activator inhibitor-1の発現亢進とその意義. 第41回肝臓学会総会, 大阪. 2005.6.
- 5) 佐々木素子, 他 : 酸化ストレスと肝疾患 : 「原発性胆汁性肝硬変(PBC)における胆管上皮細胞老化の制御機構 : 酸化ストレスとpolycomb蛋白bmi-1の関与を中心に」. 第36回日本肝臓学会西部会, シンポジウム. 鈴鹿. 2005.11.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他            なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 難治性の肝・胆道疾患に関する免疫病理学的研究

分担研究者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授

研究要旨：生体の免疫を負に調節するTリンパ球であるregulatory T cell (Treg) の機能低下がいくつかの自己免疫性疾患の病態形成に関与していると考えられている。今回我々は原発性硬化性胆管炎 (PSC) とIgG4関連硬化性胆管炎 (IgG4-SC) の病態形成におけるCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの関与について免疫染色を用いて検討した。CD4とCD25の2重免疫染色を用いて、病変局所でのCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの浸潤程度を検討したところ、PSCではCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの浸潤はごく少数だったが、IgG4-SCでは多数のCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>細胞の浸潤が見られた。また、CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregに特異的に発現する転写因子であるFoxp3の免疫染色を行ったところ、PSCでは少数のFoxp3陽性細胞しか認められず、陽性細胞数はIgG4-SCや肝内結石症と比較して有意に少なかった。一方、IgG4-SCでは対照疾患に比して、有意に多数のFoxp3陽性細胞が認められた。CD4陽性細胞におけるFoxp3陽性細胞の比率を検討したところ、Foxp3/CD4陽性細胞比はPSCでは対照疾患に比して有意に低く、IgG4-SCでは有意に高かった。今回の研究により、PSCとIgG4-SCの病変局所におけるTregの浸潤程度は全く異なっており、PSCではTregの機能低下が、IgG4-SCではTregの活性化が病態形成に関与していると考えられた。また、IgG4-SCではTregの活性化が、IgG4陽性細胞の浸潤や、血中IgG4の上昇に関与している可能性も示唆された。

共同研究者

全 陽 金沢大学医学系研究科 形態機能病理学

#### A. 研究目的

原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis: PSC) は先行病変のない原因不明の硬化性胆管炎と定義され、その病態形成に自己免疫異常が関与していると考えられている。近年、自己免疫性膵炎 (AIP) に合併する硬化性胆管炎とPSCとの異同が問題となっている。我々はAIPに合併する硬化性胆管炎とPSCは病理学的に異なることを明らかにし、AIPに合併する硬化性胆管炎ではAIPと類似の病変が胆管にも見られ、IgG4陽性形質細胞が多数浸潤することから、IgG4関連硬化性胆管炎 (IgG4-related sclerosing cholangitis: IgG4-SC) と呼ぶことを提唱した。同様の胆管病変は膵炎非合併例にも発生し、さらに類似病変が肺 (炎症性偽腫瘍)、唾液腺 (硬化性唾液腺炎) にも発生することを報告してきた。しかし、これらIgG4関連疾患の病態は依然として不明である。

近年、生体の免疫機構を負に調節するRegulatory T cell (Treg) の機能低下が自己免疫性疾患の発生に関与していることが報告されている。つまり、Tregの機能低下により自己抗体の排除機構が破綻し、自己免疫性疾患が発生するという説である。そこで、今回PSCとIgG4-SCにおけるCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの関与を検討した。

#### B. 研究方法

対象はPSC 9例の肝移植標本とIgG4-SC 9例の外科的切除標本で、対照疾患として他のIgG4関連疾患21例 (AIP 5例、硬化性唾液腺炎 8例、肺偽腫瘍 8例)、

シェーグレン症候群 5例、肝内結石症 5例、唾石症 5例を用いた。免疫染色を用いて、病変内でのIgG4陽性細胞の浸潤を検討した。また、これまで同定されたTregのうち、CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregについて、2重免疫染色にてCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>細胞の浸潤の程度を比較検討した。CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの特異的転写因子であるFoxp3発現細胞を同定し、病変内に浸潤するCD4陽性T細胞におけるFoxp3陽性細胞の比率を検討した。CD4、Foxp3陽性細胞数は各症例で強拡大10視野で計測し、その平均値を算出した。

#### C. 研究結果

IgG4-SCと他臓器のIgG4関連疾患 (AIP、硬化性唾液腺炎、肺偽腫瘍) では、多数のIgG4陽性細胞の浸潤が病変内にびまん性に見られた。IgG4関連疾患ではCD4陽性細胞は強拡大1視野中に220.5±33.7個見られ、PSC (19.9±5.0個)、シェーグレン症候群 (71.7±72.9個)、肝内結石症 (124.1±40.9個)、唾石症 (152.8±52.1個) に比して有意に多かった ( $p < 0.05$ )。IgG4-SCを含むIgG4関連疾患ではCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>陽性細胞が散見されたが (5-15個/強拡大1視野)、PSCや他の対照疾患ではほとんど認めなかった (0-1個/強拡大1視野)。

各疾患におけるFoxp3陽性細胞数とFoxp3/CD4陽性細胞比を表1に示す。IgG4-SCを含むIgG4関連疾患では病変内に多数のFoxp3陽性細胞が見られ、その数は他のいずれの疾患に比しても有意に多かった ( $p < 0.05$ )。一方、PSCではFoxp3陽性細胞の浸潤はほとんど認められず、非自己免疫性疾患である肝内結石症や唾石症と比較すると、Foxp3陽性細胞の浸潤は有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。また、Foxp3/CD4陽性細胞比も、IgG4-SCを含むIgG4関連疾患では他の疾患



に比して有意に高く、一方PSCは肝内結石症や唾石症に比して有意に低かった（表1）。

#### D. 考 察

これまで潰瘍性大腸炎や自己免疫性肝炎を含むいくつかの自己免疫性疾患で、Tregの機能低下が報告され、Tregの機能低下がこれらの自己免疫性疾患の発症に関与していると考えられている。生体の免疫を負に調節するTregの機能が低下することにより、自己抗体の排除や抑制ができなくなることで、自己免疫性疾患が発症すると考えられている。今回の研究で、PSCの病変部にはFoxp3陽性のCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregはほとんど確認できず、PSCの病変に浸潤するTregはIgG4関連疾患だけでなく、他の自己免疫性疾患である肝内結石症や唾石症と比較しても有意に少なかった。これまで報告されている自己免疫性疾患と同様に、この病変局所でのTregの機能低下がPSCの発症に関与しているのかもしれない。PSCでしばしば合併する潰瘍性大腸炎でもTregの機能低下が病態形成に密接に関与していると考えられており、PSCと潰瘍性大腸炎の病態発生には同様の免疫機序が関与しているのかもしれない。

IgG4-SCでは有意に多数のCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの浸潤が見られた点は非常に興味深い。これまでに多数のTregが浸潤している自己免疫性疾患の報告はなく、Tregの活性化がIgG4-SCの病態に関与していると考えられる。また、CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>TregがIL-10を産生するのか否かはいまだよく分かっていないが、in vivoではCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの免疫抑制機序の一部はIL-10を介しているとも考えられている。IL-10はIgG4産生を誘導するサイトカインであり、病変内に浸潤する多数のCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>TregがIL-10を介してIgG4陽性形質細胞の浸潤や血中IgG4値の上昇に関与しているのかもしれない。また、今回の研究では、IgG4-SCだけでなく、AIPや硬化性唾液腺炎などの他のIgG4関連疾患でも多数のCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの浸潤が見られ、他臓器のIgG4関連疾患でも同様の免疫応答が病態形成に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結 論

PSCとIgG4-SCの病変局所におけるCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>Tregの浸潤の程度は全く異なっており、PSCではTregの機能低下が、IgG4-SCではTregの活性化が病態形成に関与していると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他        なし

表1 各病変に浸潤するFoxp3陽性細胞数とCD4陽性細胞におけるFoxp3陽性細胞の比率

	Foxp3陽性細胞数 (個/強拡大1視野)	Foxp3/CD4陽性細胞比 (%)
IgG4関連硬化性胆管炎	20.7+2.7	8.9+1.0
自己免疫性膵炎	20.3+3.0	9.7+1.8
慢性硬化性唾液腺炎	22.2+3.8	9.9+1.3
肺炎症性偽腫瘍	13.3+2.4	7.8+1.5
原発性硬化性胆管炎	0.02+0.04	0.1+0.2
シェーグレン症候群	1.4+2.1	0.9+1.4
肝内結石症	2.3+1.7	1.8+1.4
唾石症	3.6+3.3	1.9+1.5

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序に関する研究

研究協力者 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：** 原発性胆汁性肝硬変をはじめとした胆管の慢性炎症性疾患において、胆管細胞のToll-like receptor (TLRs) を介したシグナル伝達関連分子、サイトカイン・ケモカイン分子の誘導が胆管障害に関与するかどうかを明らかにするために、培養ヒト肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) を用いて、in vitroでTLRsの発現、TLR2, 4のリガンドであるLTA, LPS刺激によるIL-6, IL-8, MCP-1, TNF $\alpha$ , IFN $\beta$ の誘導を解析した。HIBECにはTLR2, 4をはじめとした多くのfunctional TLRsが発現しており、LPSやLTAなどの菌体成分の刺激によりTLR2/4-NF- $\kappa$ B (p65, p50), SAPK/JNK, p38MAPKシグナル伝達経路を介してIL-6, IL-8, MCP-1の転写、分泌が誘導されることが明らかとなった。また、HIBECではマクロファージや樹状細胞とは異なりTLR2, 4の刺激によるTNF $\alpha$ やIFN $\beta$ の分泌誘導が認められず、HIBECに特有のTLRsシグナル伝達、転写・翻訳調節機構が存在することが示唆された。

#### 共同研究者

中村 稔 国立病院機構 長崎医療センター  
小森 敦正 国立病院機構 長崎医療センター  
横山 照史 国立病院機構 長崎医療センター  
下田 慎治 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) の発症に大腸菌をはじめとする微生物成分 (LPS, LTA etc) の関与が想定されている。近年、これらの菌体成分のレセプター (PRRs: pattern recognition receptor) として、Toll-like receptor (TLRs) が同定されその全容が解明されつつある。

TLRsは、免疫担当細胞だけでなく外界と接する種々の上皮細胞にも発現し、抗菌ペプチドやケモカイン・サイトカインなどの分泌誘導を介して感染防御に重要な役割を果たしている。また、TLRsの刺激により自然免疫と獲得免疫の橋渡しとなる種々のシグナル伝達関連分子が誘導され、TLRsは自己免疫疾患の発症にも深く関わっていることが最近明らかになりつつある。

そこで本年度の研究では、培養ヒト肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) におけるTLRsの発現と機能をin vitroで解析し、TLRsを介した胆管細胞障害機構を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

HIBECは、非PBC患者の摘出肝組織より、コラゲナーゼ処理、抗体ビーズ法 (BerEp4) にて分離し、専用の培養液にて継代したものをを用いた。

HIBECのTLRsおよびその関連分子のmRNAは半定量PCRで、蛋白の発現はウエスタンブロット法にて検出した。LPS, LTA刺激後の培養上清中の各種ケモカイン・サイトカインの測定は、市販のhuman cytokine expression array kit, ELISA kitを用いて、mRNAはreal-time PCR法にて定量した。LPS,

LTA刺激後のシグナル伝達経路の解析は、各種シグナル伝達阻害剤、p38MAPK, SAPK/JNKに対する特異リン酸化抗体を用いて、また、NF- $\kappa$ Bの核内移行は、特異抗体を用いたウエスタンブロット法にて検出した。

#### C. 研究結果

- 1) HIBECには、TLR 1~6, 9, MyD88, MD 2, CD 14のmRNAが恒常的に発現していること確認された。また、蛋白レベルでも、TLR 2とTLR 4の発現が確認された。
- 2) HIBECをLPS (TLR 4 ligand), LTA (TLR 2 ligand)で刺激することによりIL-6, IL-8, MCP-1などのサイトカイン・ケモカインのmRNA誘導、分泌誘導が認められた。
- 3) これらのサイトカイン・ケモカインのmRNA, 分泌誘導に先行して、NF- $\kappa$ B subunit p65, p50の核内移行、p38MAPKおよびSAPK/JNKのリン酸化を認めた。
- 4) LPS, LTA刺激によるIL-6, IL-8, MCP-1 mRNA, 蛋白分泌の誘導は、NF- $\kappa$ B阻害剤であるBAY11-7082により強く抑制された。また、p38MAPK, SAPK/JNKリン酸化阻害剤であるSB 202190, SP600125によってもmRNA, 蛋白分泌の誘導が部分的に阻害された。
- 5) HIBECではLPS, LTA刺激によりTNF- $\alpha$  mRNAの一過性の誘導を認めたが、蛋白レベルでの分泌誘導は認めなかった。また、LPS, LTA刺激によってもIFN- $\beta$ の転写は誘導されなかった。

#### D. 考察

これまでに、胆管上皮細胞にも機能的TLRsが発現していること、TLR 3のligandであるPolyI:Cの投与によりマウスに胆管炎が誘導されることなど、胆管上皮細胞におけるTLRsの役割が報告されているが、ヒト胆管上皮細胞におけるTLRsとシグナル伝達経路、

TLRsを介した胆管障害機序についての詳細は未だ明らかでない。

本年度の研究で、HIBECにはTLR 2, 4をはじめとして様々なfunctional TLRsが発現していること、LPSやLTAなどの菌体成分の刺激によりTLR 2/4-NF- $\kappa$ B (p65, p50), SAPK/JNK, p38MAPKシグナル伝達経路を介してIL-6, IL-8, MCP-1などのケモカイン・サイトカインの分泌が誘導されることが明らかとなった。また、HIBECではTLR 2, 4の刺激によるTNF- $\alpha$ やIFN- $\beta$ の分泌誘導が認められず、マクロファージや樹状細胞とは異なるHIBECに特有のシグナル伝達、調節機構が存在することが示唆された。

この調節機構の破綻が、胆管上皮細胞障害や胆管周囲の慢性炎症、さらには自己免疫現象の誘導に関与している可能性があり、今後さらに検討をすすめる予定である。

## E. 結 論

HIBECには、TLR 2, 4をはじめとした様々なfunctional TLRsが恒常的に発現しており、LPS, LTA刺激によりTLR 2/4-NF- $\kappa$ B (p65, p50), SAPK/JNK, p38MAPKシグナル伝達経路を介してIL-6, IL-8, MCP-1の分泌が誘導される。この調節機構の破綻が、胆管上皮細胞障害や胆管周囲の慢性炎症、さらには自己免疫現象の誘導に関与している可能性が示唆される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, et al : Human intra-hepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF- $\kappa$ B and -MAPK signaling pathways. *Liver International* : In press, 2005.
- 2) Nakamura M, Takii Y, Ito M, et al : Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 26(2) : 138-145, 2006.
- 3) Takii Y, Nakamura M, Ito M, et al : Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 85(7) : 908-920, 2005.
- 4) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, et al : Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 42(3) : 386-392, 2005.
- 5) Wang AP, Migita K, Ito M, et al :

Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25 (1) : 85-91, 2005.

- 6) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, et al : Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases. *Hepatology* 41(1) : 151-159, 2005.
- 7) 中村稔, 瀧井康, 伊東正博, 他 : 原発性胆汁性肝硬変における肝病変の局所遺伝子発現の解析. *消化器と免疫* 42 : In press, 2005.
- 8) 中村稔, 上平幸史, 下田慎治, 他 : 潜在的免疫組織としての肝内胆管系. *肝胆膵* 51 : 517-522, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, et al : Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF- $\kappa$ B and -MAPK signaling pathways. 第28回日本分子生物学会, 福岡. 2005.12.7.
- 2) 中村稔, 瀧井康, 伊東正博, 他 : 原発性胆汁性肝硬変における肝病変の局所遺伝子発現の解析. 第42回日本消化器免疫学会総会, シンポジウム, 東京. 2005.8.4.
- 3) 瀧井康, 中村稔, 伊東正博, 他 : 原発性胆汁性肝硬変におけるToll-like receptorとtype I IFNについての解析. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪. 2005.6.16.
- 4) 小森敦正, 横山照史, 瀧井康, 他 : 培養ヒト肝内胆管細胞における遺伝子発現パターンの多用性. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪. 2005.6.17.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### PBCにおける慢性胆汁うっ滞が自然免疫や獲得免疫系に与える影響の解析

研究協力者 喜多 宏人 自治医科大学内科学講座 消化器内科部門 助手

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）は慢性胆汁うっ滞をきたしている。胆汁うっ滞に伴う免疫異常を解析することにより、PBCに対する新たな治療法を開発することを目的とした。PBCや他の胆汁うっ滞患者の末梢血中のCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、B細胞、単核球、NK細胞、NKT細胞の割合を対象例と比較したが、胆汁うっ滞に伴い有意な変化を示した分画は同定できなかった。

#### A. 研究目的

PBCにおける慢性胆汁うっ滞が免疫系に与える影響を検討することにより、PBCの病態解明や新たな治療法を検討する。

#### B. 研究方法

PBCは慢性胆汁うっ滞性疾患であり、進行期には高度の胆汁うっ滞を起こす。慢性胆汁うっ滞が免疫系に与える影響を検討するため、以下の4群から末梢血単核球を分離した。

1. 健常者
2. PBC（総ビリルビン値2mg/dl未満）
3. PBC（総ビリルビン値2mg/dl以上）
4. 閉塞性黄疸（総ビリルビン値2mg/dl以上）

得られた単核球における、以下の分画の割合をFACs解析した。(1) CD4陽性T細胞、(2) CD8陽性T細胞、(3) B細胞、(4) 単核球、(5) NK細胞、(6) NKT細胞。

#### C. 研究結果

CD4 T細胞、CD8 T細胞、B細胞、単核球、NK細胞、NKT細胞の割合を4群で比較したが、PBC患者中の胆汁うっ滞例と非うっ滞例との比較検討で有意な変動を伴う分画が同定できなかった。また、PBC患者以外で慢性胆汁うっ滞の患者を健常者や、高度胆汁うっ滞を来したPBC患者とも比較検討したが、こちらも有意な変動を伴う分画を同定できなかった。

#### D. 考 察

慢性胆汁うっ滞が免疫系に与える影響を検討するため胆汁うっ滞に伴う細胞分画の変化を検討したが、明らかな変動をとらえることができなかった。今後はより少ない分画に属する細胞群に焦点をあて、詳細な検討を重ねてゆく予定である。

#### E. 結 論

慢性胆汁うっ滞が免疫系に与える影響を検討するため胆汁うっ滞に伴う細胞分画の変化を検討したが、明らかな変動をとらえることができなかった

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kita H: PBC and eosinophilia; New Insight from autoantibody response. *Hepato Res.* 32: In press, 2005.
- 2) Kita H: A role of NKT cells in HCV infection and development of hepatocellular carcinoma; Are they protective or destructive? *Hepato Res.* 32: In press, 2005.
- 3) Kita H: Family study in PBC as a clue to the possible involvement of genetic and environmental factors. *Hepato Res.* 33: In press, 2005.
- 4) 喜多宏人: T細胞・B細胞. 肝疾患と免疫. 医薬ジャーナル社, 52-59, 2005.
- 5) 喜多宏人, 宮川浩, 上野義之, 他: 原発性胆汁性肝硬変における自己反応性T細胞の解析. *消化器と免疫* 41: 36-39, 2005.
- 6) 喜多宏人: PBC. *分子消化器病学* vol12 消化器疾患の分子生物学. 先端医学社, 2005, 49-54.

##### 2. 学会発表

- 1) 喜多宏人, 上野義之, 宮川浩: 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害における自然免疫と獲得免疫の役割. 第91回日本消化器病学会総会, パネルディスカッション. 東京, 2005.4.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病変と制御性T細胞との関連性—病理組織学的検討—

研究協力者 松崎 靖司 筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系 消化器内科 助教授

**研究要旨：**経時炎症細胞浸潤改善を示す graft-versus-host reaction (GVHR) マウスモデルの肝組織において、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞、Tr1細胞、NKT細胞の制御性T細胞の浸潤が組織学的に観察され、免疫自己寛容の誘導による関与し、病態改善に貢献している可能性が示唆された。

#### 共同研究者

宮崎 照雄 茨城県衛生研究所 研究員

土井 幹雄 茨城県衛生研究所 所長

#### A. 研究目的

我々はこれまで、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の動物モデルとして、マウス移植片対宿主反応（GVHR）モデルを用いてきた。このGVHRモデルは、(bm12×B6) F1メスマウスに、B6脾臓より分離したT細胞を $1 \times 10^7$ 個静注することにより作製される。その病態は、胆管上皮細胞に異所性にMHC class IIの発現がみられ、門脈域、中心静脈周囲に炎症性細胞群が浸潤し、さらに自己抗体の産生もあり、自己免疫機序の関与した肝病変が観察される。しかしながら、GVHR導入5日目より2週目まで、門脈域、中心静脈周囲に細胞浸潤の増悪を認めるものの、その後、8週目までの自然経過観察で炎症細胞浸潤は改善し、線維化や肝硬変には至らないという特徴を有する。この一過性の自己免疫性病態の原因は不明であり、このモデルの病態改善の原因を探ることは、PBC及び自己免疫性肝疾患の病態の悪化や改善メカニズムの解明につながると考えられる。

これまで、GVHRモデルの肝組織における網羅的遺伝子発現頻度解析を行ったところ、GVHRの炎症（病態）改善の原因として、自己免疫疾患と深い関連のあるとして近年注目されている制御性T細胞の関与が示唆された。その制御性T細胞には、これまでCD25<sup>+</sup>(IL-2 receptor(R)  $\alpha$ 鎖)CD4<sup>+</sup>-T細胞、CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-NKT細胞、IL-10R<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Tr1細胞などの存在が報告されている。

そこで本研究では、免疫組織化学手法を用いて、GVHRモデル肝組織内の炎症性細胞浸潤領域におけるそれぞれの制御性T細胞の浸潤状態について病理組織学的に検討した。

#### B. 研究方法

GVHR導入直後（コントロール）、導入後2、4、8週目のマウスより肝組織を採取し、10%フォルマリン固定後パラフィン切片を作製した。得られた切片よりH&E染色と浸潤細胞におけるCD4、CD8、CD20、CD25、CD161、IL-10Rに対して、免疫組織化学染色を行った。さらに、それぞれの制御性T細胞の表面マ

ーカーの共発現を蛍光二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

また、網羅的遺伝子発現頻度解析において制御性T細胞関連遺伝子発現（CD25、IL-10R $\alpha$ 、IL-10R $\beta$ ）について追加検討を行った。

#### C. 研究結果

H&E染色切片を用いて、GVHR肝組織内浸潤炎症性細胞数および浸潤部位数は、GVHR2週目、4週目、8週目と経過するに伴い減少し、2週目と比較して8週目では浸潤細胞数ならびに部位数は有意に減少した。

遺伝子解析の結果、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の特異的マーカーであるCD25 mRNA発現は、非GVHRの同週齢のコントロールと比較すると、GVHR0週目では0.8倍であったのに対し、2週目では1.6倍と増加し8週目では1.7倍と発現が維持されていた。同様に、Tr1細胞の特異的マーカーであるIL-10R $\alpha$ とIL-10R $\beta$ のmRNA発現は、GVHR0週目ではそれぞれ0.9倍と1.0倍であったのに対し、2週目では3.3倍と1.3倍に増加し8週目では3.5倍と1.4倍と発現の維持が確認された。

免疫組織化学染色において、GVHRモデルマウス肝組織における炎症性浸潤細胞群にCD4、CD8、CD20の発現とともに、CD25、CD161、IL10Rの発現も確認された。それらの表面マーカー陽性細胞は、GVHR2週目から8週目まで発現が観察された。

さらに、抗CD25-Texas Red抗体と抗CD4-FITC抗体にてCD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞を、抗IL-10R-Texas Red抗体と抗CD4-FITC抗体にてTr1細胞を、抗CD161-FITC抗体と抗CD4-Texas RedにてNKT細胞を蛍光二重免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、それぞれの表面マーカーが共発現した細胞を認め、CD25、IL-10R、CD161陽性細胞には、それぞれCD4も共発現しており、各制御性T細胞を示していることが確認された。

#### D. 考 察

免疫組織化学検討の結果、網羅的遺伝子発現検討に加え、GVHRモデルの肝組織内炎症性浸潤細胞群にCD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞、Tr1細胞、NKT細胞の制御性T細胞の浸潤が確認された。炎症性細胞の浸潤に対して、

これらの制御性T細胞が加わることにより、免疫自己寛容の破綻に対して自己寛容の誘導をもたらす結果、このモデルにおけるGVHR改善が生じていると推測される。

#### E. 結 論

GVHRモデルにおいて、組織学的に制御性T細胞の出現が確認され、GVHR病変改善に制御性T細胞による免疫自己寛容の再誘導が大きく関与していることが示唆された。

今後は、GVHRの経過に伴う、制御性T細胞の出現頻度の解析、ならびにCD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞の活性を阻害するConcanavalin A投与GVHRモデルやTr 1細胞を不活性化する抗IL-10抗体投与GVHRモデルにおける組織化学的制御性T細胞の解析を行い、自己免疫肝疾患の病変進展に対する制御性T細胞の関連性を明らかにする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他          なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### PBC患者におけるMRP2とMRP3発現の変化—早期患者と進行した患者肝における検討—

研究協力者 向坂彰太郎 福岡大学医学部 第三内科 教授

**研究要旨：**胆汁うっ滞の臨床例において、トランスポーターとの関わりについての研究報告が少ない。本研究では未治療のPBC患者を、組織学的に早期と後期に分類し、肝臓のトランスポーターであるMRP2、MRP3のmRNAレベルの発現について測定した。さらに各々の調節因子FXR、FTFのmRNAレベルについても測定した。PBC早期未治療患者の肝内MRP2、MRP3 mRNAレベルは共に増強し、胆汁うっ滞の代償機構が働いていた。病態の進行に伴い、これらのトランスポーターの発現低下が認められ、代償機構の破綻が病態の増悪をもたらすものと考えられた。

#### 共同研究者

竹山 康章 福岡大学医学部 第三内科

#### A. 研究目的

胆汁うっ滞ラットモデルでは、肝内のMrp2の発現が低下し肝内のMrp3の発現が増強して代償的に働いている事を以前共同研究者が報告した。さらにMrp2の変化に核内ホルモンレセプターであるFXR/RXRが関わっている事をも報告した。今回我々は、胆汁うっ滞性疾患の機序として、肝内トランスポーターの変化が関わっていると仮説をたて、原発性胆汁性肝硬変（PBC）未治療患者肝における早期患者と進行した患者肝におけるMRP2、MRP3のmRNAレベルの発現の検討を行った。

#### B. 研究方法

PBC未治療患者で、十分なインフォームドコンセント後同意を得られた患者29人。肝組織を経皮的針生検にて取得し、組織学的にScheuer分類I～VI期に分類した。I期6人、II期10人、III期9人、IV期4人。I、II期を早期、III、IV期を後期とした。MRP2、MRP3、FXR、FTF mRNAレベルをreal time RT-PCR法で測定した。MRP2、MRP3のタンパクの局在をImmuno Histochemistry法で、MRP3の転写因子との結合する局在をSouthWestern Histochemistry法で確認した。

#### C. 研究結果

##### 1) MRP2、MRP3 mRNAレベル

PBC早期患者の肝内MRP2 mRNAレベルは、後期患者のMRP2 mRNAレベルに比べて有意に増強していた ( $p < 0.01$ )。PBC早期患者の肝内MRP3 mRNAレベルにおいても、後期患者のMRP3 mRNAレベルに比べて有意に増強していた ( $p < 0.05$ ) (図1)。更に後期患者のMRP3レベルは正常コントロールに比べても減弱していた。

##### 2) MRP2とFXR、MRP3とFXR

MRP2の調節因子であるFXR、並びにMRP3の調節因子であるFTFとの関連は、それぞれ $r = 0.89$ ,  $r =$

0.67と相関関係を認めた (図2)。

##### 3) MRP2とMRP3タンパク局在

MRP2は毛細胆管側膜のマーカーであるDPPIVと colocalizeし、肝細胞の毛細胆管側の膜に局在していた、一方MRP3は、類洞側の膜マーカーであるNa/K ATPaseと colocalizeし、肝細胞の類洞側の膜に局在していた。

##### 4) MRP3の転写調節因子の発現状態 (South Western Histochemistry法)

PBC早期患者肝細胞の核タンパクに一致して、FTFドメイン部と結合するDNA結合タンパクの局在を認めた。

#### D. 考察

早期PBC未治療患者の肝臓内では、肝内に蓄積された胆汁を排泄するために、MRP2とMRP3が代償的に増強していた。PBC未治療患者からの針生検では十分な肝組織量が採れないため、膜タンパク、核内タンパクレベルの測定は不可能である。そこで我々は、mRNAレベルでの検討を行い、更に転写因子の測定にSouthWestern Histochemistry法を用いた。この方法はゲルシフト法の代わりに凍結切片上で転写因子の発現状況を評価できるという利点がある。

#### E. 結論

- 1) PBC早期未治療患者の肝内MRP2、MRP3は共に増強し、胆汁うっ滞の代償機構が働いていた。
- 2) 病態の進行に伴い、トランスポーターの発現低下が認められ、代償機構の破綻が病態の増悪をもたらすものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Zen Y, Harada K, Sasaki M, et al : Are bile duct lesions of primary biliary cirrhosis distinguishable from those of

autoimmune hepatitis and chronic viral hepatitis? Interobserver histological agreement on trimmed bile ducts. J Gastroenterol 40(2): 164-170, 2005.

- 2) Sakisaka S: New ultrastructural discoveries in the pathophysiology of liver diseases. Med Mol Morphol 38: 135, 2005.
- 3) 竹山康章, 向坂彰太郎: 選択, 適応基準とIC取得, 実践時期の設定 原発性胆汁性肝硬変(内科の立場から). 肝胆膵 50(1): 85-90, 2005.

## 2. 学会発表

- 1) Takeyama Y, Uehara Y, Anan A, et al: Hepatic ABCA1 transporter is upregulated in BDL with LPS-treated rats and in PBC patients. 40th EASL, Paris. 2005.4.
- 2) 竹山康章, 早田哲郎, 向坂彰太郎: 早期ならびに進行したPBC患者肝におけるMRP2とMRP3の発現の変化. 第36回日本肝臓学会西部会, ワークショップ. 鈴鹿. 2005.11.
- 3) 向坂彰太郎: 肝臓内科医からみた肝臓に対する肝移植の適応とその時期. 第41回日本移植学会総会, シンポジウム. 新潟. 2005.10.
- 4) 竹山康章, 入江真, 早田哲郎, 他: 胆汁うっ滞におけるコレステロールの動態. 第37回日本臨床分子形態学会, シンポジウム. 大阪. 2005.10.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1 PBC未治療患者の肝内MRP2とMRP3 mRNAレベル

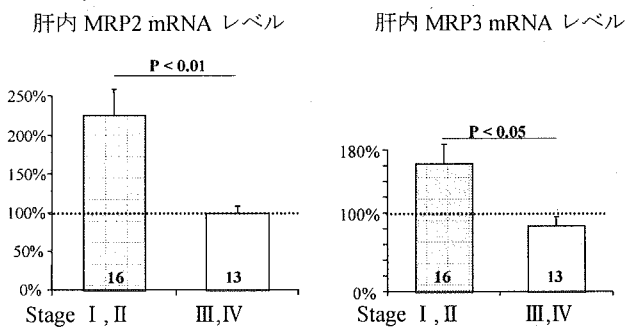
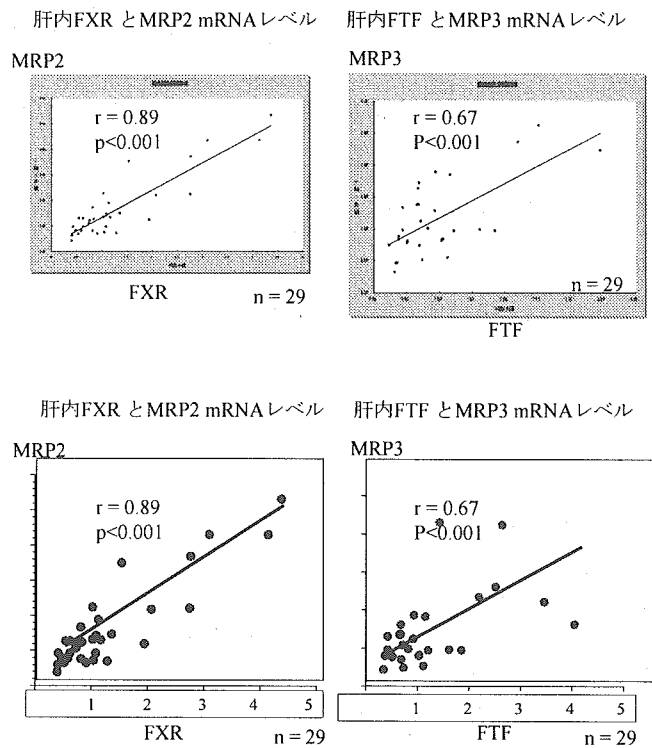


図2 肝内FXRとMRP2, FTFとMRP3 mRNAレベル





原発性胆汁性肝硬変に関わる自然免疫異常の研究

研究協力者 宮川 浩 帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科 非常勤講師

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）における自然免疫異常を明らかにする目的で、患者の末梢血単核球細胞をTLR 2リガンド、NOD 2リガンドで刺激し、サイトカイン産生を対照群と比較した。患者においてそれぞれのリガンド刺激によるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 産生を高く認めた。NOD 2リガンドのTLR 2刺激系への相乗効果は患者、対照群とも同様に認めた。以上から、PBCでは自然免疫反応が亢進していることは明らかである。

共同研究者

菊池健太郎 帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科 助手

A. 研究目的

PBCは血清学的に抗ミトコンドリア抗体の出現と総IgM値の上昇を特徴とする。その病因は不明であるが、遺伝的素因、環境因子ならびに感染因子の関連が示唆されている。

我々はPBC患者の末梢血単核球細胞を細菌に特異的な非メチル化CpG DNAで刺激することによりB細胞から有意なIgM産生を認めたことからPBCでは細菌に対する自然免疫反応が亢進しており、その結果として高IgM血症が生じていると発表した<sup>1</sup>。

しかしながら生体内では、CpGのみならず他の菌体成分を含めた多くの刺激に自然免疫が応対していることは無視できず、感染因子による多角的な免疫学的修飾がPBCの病態形成に関わることが推察される。

細菌の細胞壁の構成成分であるpeptido-glycan (PGN)の多彩な免疫生物学的活性については多年にわたる研究の歴史があり、特にアジュバント活性の研究はよく知られている。近年PGNの活性構造の追求から最小有効構造がmuramyl dipeptide (MDP)と確定され、また自然免疫研究の隆盛でMDPはPGNと違いToll-like receptor (TLR)2を介さず、nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 2により認識されること、さらにMDPはPGN刺激に対し相乗効果を示すことが明らかにされた<sup>2</sup>。

そこで今回我々は、PBCにおける自然免疫反応の亢進を追証するため、PGN、MDPをリガンドとして用いてPBCの末梢血単核球細胞におけるサイトカイン産生性、およびMDPのPGNによるTLR 2刺激への相乗効果を検討した。

B. 研究方法

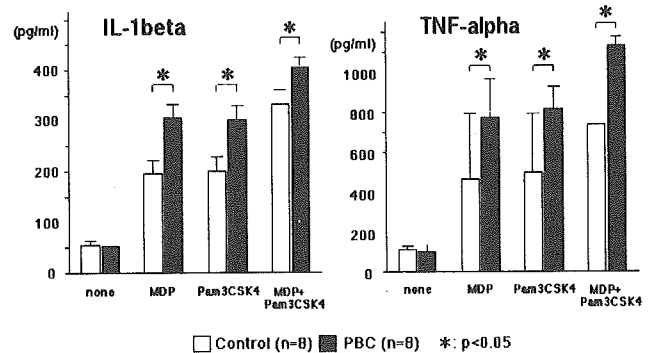
PBC患者8例および対照群8例の末梢血単核球細胞をPam 3 CSK 4 (合成PGN) 1  $\mu$ g/ml, MDP 10  $\mu$ g/mlを用いて24時間刺激し、培養上清中のIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の産生量をELISAで測定した。

C. 研究結果

患者においてPam 3 CSK 4、MDP刺激によるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の産生を高く認めた（それぞれ $p < 0.05$ ）。MDPはPam 3 CSK 4刺激に対し相乗効果を示し、PBCではIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ で134%、139%であったのに対し、対照群ではそれぞれ165%、148%であった。

D. 考察

単球はTLR 2、NOD 2の発現が高く、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ を産生する主要な細胞である。今回の検討からPBCの単球において自然免疫反応が亢進していると言える。今後は単球におけるレセプターの発現、NF- $\kappa$ Bの活性化、細胞1個あたりのサイトカイン産生能を検討する。



E. 結論

PBCではB細胞のみならず単球においても自然免疫反応が亢進している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2006年学会発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得       なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他         なし

#### （文 献）

- 1 ) Kikuchi K et al. Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27(+) memory B cells in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 128(2): 304-312, 2005.
- 2 ) Uehara A et al. Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD 2 - and NOD 1 -dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* 7(1): 53-61, 2005.

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 微生物由来CpG DNAによる肝炎および胆管炎の誘導

研究協力者 佐藤由紀夫 福島県立医科大学 内科学第二講座 教授

研究要旨：自己抗原を微生物由来CpG DNAと免疫することで自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、自己抗体の産生や疾患の誘導がなされることが報告されている。これまで、我々は、ヒト由来肝細胞抗原をCpG DNAとともにマウスに投与し、抗calreticulin抗体が産生され、肝炎が惹起されることを報告してきた。免疫マウス血清中には、抗calreticulin抗体が出現し、免疫マウス由来の脾細胞をcalreticulin蛋白で刺激した場合にIFN- $\gamma$ 産生が認められたことから、免疫寛容の破綻が惹起され肝炎が誘導されたと考えられる。抗calreticulin抗体を用いた免疫染色では、CpG DNAを単独投与したマウス肝細胞においてcalreticulin蛋白の発現が増加していた。肝細胞膜上で抗原・抗体との反応により肝炎が惹起されたことが推察された。

一方、我々はPBC患者血清中に好酸球顆粒蛋白の一つであるeosinophil peroxidase (EPO) に対する抗体が認められることを報告してきた。そこでcalreticulin蛋白と同様にCpG DNAと共にマウスに投与し、組織学的に検討した。免疫マウス血清中には、抗EPO抗体が出現し、免疫マウス由来の脾細胞をEPO蛋白で刺激した場合に有意なIFN- $\gamma$ 産生が認められた。一部の免疫マウスの胆管周囲に単核球浸潤を伴った胆管炎像が観察された。以上のことから、自己免疫性の肝炎および胆管炎の発症には微生物由来CpG DNAが関与していることが示唆された。

#### 共同研究者

大平 弘正 福島県立医科大学 第二内科 助教授  
高橋 敦史 福島県立医科大学 第二内科  
雷 毅 福島県立医科大学 第二内科 助手  
小林 浩子 福島県立医科大学 第二内科 助手

#### A. 研究目的

近年、Th 1 タイプのアジュバント作用を有するCpG DNAと自己免疫疾患との関連が注目されており、自己抗原をCpG DNAとともに免疫することにより自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、病変の形成と自己抗体が産生されることが報告されている。

(Bachmaier K, et al. Science, 1999, Jones DE, et al. Hepatology, 2002)

これまで、ヒト肝細胞由来の蛋白をCpG DNAと共にマウスに免疫することにより、自己免疫性肝炎(AIH)患者血清にも検出される抗calreticulin抗体が産生され、肝炎が惹起されることを報告してきた。肝炎の発症機序を明らかにする目的で、抗calreticulin抗体を用いて肝細胞におけるcalreticulin蛋白の発現について検討した。

一方、我々は原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者血清中に好酸球顆粒蛋白の一つであるeosinophil peroxidase(EPO)に対する抗体が認められることを報告してきた。そこでcalreticulin蛋白と同様にCpG DNAと共にマウスに免疫することにより、免疫寛容が破綻し自己抗体産生と病変形成が認められるかについて検討した。

#### B. 研究方法

8週齢のメスB57BL/6NCrjマウスに50 $\mu$ gのCpG DNA (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3')

をアジュバントとして、calreticulin蛋白20 $\mu$ gあるいはEPO蛋白10 $\mu$ gを抗原蛋白として3回投与し免疫した。なお、EPO蛋白投与マウスにおいては2回免疫後アラム(1mg ip)投与を行った。Western blot法にて、免疫マウス血清中の自己抗体について検討した。また、免疫マウスの脾細胞を抗原蛋白で刺激し、培養上清中のIFN- $\gamma$ の測定を行なった。肝炎および胆管炎の誘導の確認は、血清ALT、ALP値ならびに組織学的検討にて行なった。さらに、抗calreticulin抗体を用いて間接蛍光抗体法にてcalreticulin蛋白発現について検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、当大学の実験動物取り扱い倫理指針を遵守して実験に使用した。

#### C. 研究結果

- 1) 免疫マウス血清中を用いたWestern blot法による検討では、calreticulin蛋白およびEPO蛋白に反応するバンドが確認された。
- 2) 免疫マウス由来の脾細胞をcalreticulin蛋白あるいはEPO蛋白で刺激した場合に有意なIFN- $\gamma$ 産生(1000pg/ml, 20000pg/ml)が認められた。
- 3) Calreticulin蛋白とCpG DNA投与マウスでは、組織学的に肝実質に巣状壊死が確認された。一方、EPO蛋白とCpG DNA投与マウスでは、一部で単核球細胞浸潤を伴った胆管炎の所見が観察された。
- 4) Calreticulin蛋白の発現の検討では、CpG DNA投与にて肝細胞のcalreticulin蛋白の発現が増加を認めた。

#### D. 考察

今回の検討から、免疫マウス血清中には、抗calreticulin

抗体や抗EPO抗体が出現し、免疫マウス由来の脾細胞を抗原蛋白で刺激した場合に有意なIFN- $\gamma$ 産生増加が認められたことから、微生物由来CpG DNAと抗原蛋白を投与することにより免疫寛容の破綻が惹起され肝炎および胆管炎が誘導されたと考えられる。

Calreticulin蛋白とCpG DNA投与マウスにおける肝炎発症機序については不明である。今回、抗calreticulin抗体を用いた免疫染色では、CpG DNAの単独投与のみでマウス肝細胞におけるcalreticulin蛋白の発現が増加していた。肝には、CpG DNAのレセプターであるTLR-9の発現が確認されており、CpG DNAが肝へ作用し、calreticulin蛋白の発現を誘導したと考えられる。さらに、肝細胞膜上で発現が増加した抗原と新たに産生された自己抗体との反応によって肝炎が誘発されたと推定される。

一方、我々はPBC患者血清中に好酸球顆粒蛋白の一つであるeosinophil peroxidase (EPO) に対する抗体が認められることを報告してきた。今回、calreticulin蛋白と同様にCpG DNAと共にマウスに投与すると、一部の免疫マウスの胆管周囲に単核球浸潤を伴った胆管炎像が観察された。EPO蛋白は好酸球の顆粒蛋白であり、活性化により好酸球膜上に表出し、抗EPO抗体と反応することが知られている。今回のマウスモデルでは好酸球浸潤を促すためにアラムを使用しているが、肝内の好酸球が確認されていない。今後、胆管炎の発症機序についても検討する必要がある。

今回誘導された肝炎や胆管炎の所見は、臨床的に観察されるAIHやPBCの組織所見とは明らかに異なっていることから、微生物由来CpG DNAは病変形性の初期段階に関与することが示唆される。

## E. 結 論

微生物由来のCpG DNAをアジュバントとしcalreticulin蛋白あるいはEPO蛋白と免疫することにより、免疫寛容の破綻が惹起され肝炎および胆管炎が誘導された。自己免疫性の肝炎や胆管炎の発症に微生物由来CpG DNAが関与することが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Abe K, Ohira H, Kobayashi H, et al : Role of CpG ODN in concanavalin A-induced hepatitis in mice. Fukushima J Med Sci 51(1) : 41-49, 2005.
- 2) Takiguchi J, Ohira H, Rai T, et al : Anti-eosinophil peroxidase antibodies detected in patients with primary biliary cirrhosis. Hepatol Res 32 : 33-37, 2005.

## 2. 学会発表

- 1) 大平弘正, 阿部和道, 雷毅, 他 : Calreticulin 蛋白をターゲットとした微生物由来CpG DNAによる肝炎の誘導. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪, 2005.6.16.
- 2) 滝口純子, 大平弘正, 雷毅, 他 : 原発性胆汁性肝硬変患者における抗ヒト eosinophil peroxidase (EPO) 抗体の検討. 第41回日本肝臓学会総会, 大阪, 2005.6.16.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし