

ヒト培養胆管細胞および MRL/lpr マウスの胆管炎に対する  
PPAR $\gamma$  リガンドの抗炎症効果

分担研究者 原田 憲一 金沢大学大学院・形態機能病理学 講師

**研究要旨：** 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の障害胆管で抗炎症性分子 PPAR $\gamma$  の発現低下がみられ、菌体成分に対する感受性の亢進が PBC 胆管炎の発生に加担していると推測されている。今回、PPAR $\gamma$  リガンドによる抗炎症効果について検討した。① *in vitro* 研究： PPAR $\gamma$  リガンドとして 15d-PGJ2 またはトログリタゾンを用いて、ヒト培養胆管細胞での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 活性や TNF- $\alpha$  産生の影響を検討した結果、15d-PGJ2, トログリタゾン共に LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B や TNF- $\alpha$  産生が抑制された。② *in vivo* 研究： PBC 類似の胆管炎を自然発症する MRL/lpr マウスを対象に、15d-PGJ2 (腹腔内投与) またはトログリタゾン (混餌投与) の抗炎症効果を検討した結果、どちらの PPAR $\gamma$  リガンド共に胆管炎に対して抗炎症効果が得られた。以上より、PPAR $\gamma$  リガンドが PBC の新たな治療薬として応用できる可能性が示唆された。

**研究協力者：**

中沼 安二

金沢大学大学院・形態機能病理学 教授

**A. 研究目的**

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病因または病態形成に、細菌成分や生体異物に対する異常な免疫反応の関与が示唆されている。我々は、胆管上皮細胞における菌体成分認識受容体(Toll 様受容体)の機能的解析を行い、胆管系に固有の自然免疫機構が存在すること(Harada et al, Lab Invest, 2003)、また、PBC の障害胆管では抗炎症因子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$  (PPAR) $\gamma$  の発現低下が見られること(Harada et al, Hepatology, 2005)を報告し、PBC 胆管炎の病態発生に胆管系自然免疫の感受性亢進が関与していると考えている。近年、潰瘍性大腸炎の腸管上皮で PPAR $\gamma$  発現が低下しており(Dubuquoy ら, Gastroenterology, 2003)、また、PPAR $\gamma$  リガンド投与にて腸炎モデルマウスの症状が軽減することも報告されている(Wada ら, Trends Mol Med, 2001)。今回我々は、PPAR $\gamma$  リガンドを用いた胆道系自然免疫の制御を PBC 治療に応用する事を目的とし、ヒト培養胆管細胞および PBC 類似の胆管炎を自然発症する自己免疫疾患発症動物(MRL/lpr マウス)を用いて PPAR $\gamma$  リガンドによる抗炎症効果を検討した。

**B. 研究方法**

**1. 培養細胞**

培養細胞は、転移性肝癌患者由来の 2 株の培養胆管細胞(HIBEC 1 および HIBEC 2)を使用した。

**2. PPAR $\gamma$  リガンド**

PPAR $\gamma$  リガンドとして、内因性リガンドである 15d-deoxy- $\Delta$ 12,14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2, Calbiochem)、チアゾリジン誘導体であるトログリタゾン(Cayman)を用いた。

**3. PPAR $\gamma$  リガンドによる抗炎症効果の評価**

各培養細胞を、15d-PGJ2(10 $\mu$ M)またはトログリタゾン(10 $\mu$ M)で前処置後、TLR4 リガンドであるリポポリサッカライド(LPS, 1 $\mu$ g/mL)で刺激した。培養胆管細胞の反応性は、細胞内シグナルの主要伝達分子である NF- $\kappa$ B の活性化(NF- $\kappa$ B-DNA binding assay)と TNF- $\alpha$  mRNA 産生(real time-PCR 法)で評価した。

**4. MRL/lpr マウスと PPAR $\gamma$  リガンド投与方法**

18~20 週齢の雌雄 MRL/lpr マウス を三共ラボから購入した。

**1) 15d-PGJ2：**15d-PGJ2 の投与は、腹腔内注射にて行った。15d-PGJ2 投与群と溶媒投与群(DMSO, 対照群)を作成した。15d-PGJ2 の投与量は、400mg/kg/日(低濃度 15d-PGJ2 腹腔内投与群)または 1,000mg/kg/日(高濃度 15d-PGJ2 腹腔内投与)で 3 週間、腹腔内注射にて施行した。

**2) トログリタゾン：**トログリタゾンの投与は 0.2%トログリタゾン混餌にて行った。トログリタゾン投与群と対照群として通常の飼料投与群を作成し、4 週間後に屠殺した。

3) 評価方法：抗炎症効果の判定は、主要臓器を組織学的に観察し、炎症の程度をなし（0点）、軽度（1点）、中等度（2点）、高度（3点）に半定量した。

### 5. 免疫組織化学的検討

マウス肝のホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象に、T細胞マーカーとしてCD3、B細胞マーカーとしてCD20、マクロファージマーカーとしてCD68の抗体（共にSanta Cruz）を用いてEnvision法(Dako)にて免疫組織化学的染色を行った。

## C. 研究結果

### 1. 培養胆管細胞を用いたLPS誘導性炎症反応に対するPPAR $\gamma$ リガンドの抗炎症効果

培養胆管細胞のNF- $\kappa$ B活性は、LPS刺激にて13.8倍に亢進したが、15d-PGJ2の前処置にて3.3倍、トログリタゾンの前処置にて5.2倍にまで活性亢進が抑制された。次に、TNF $\alpha$  mRNA産生にて検討した結果、LPS刺激にて29倍にまで発現が亢進し、15d-PGJ2の前処置にて2.2倍、トログリタゾンの前処置にて6.2倍にまで発現亢進が抑制された。

### 2. MRL/lprマウスでのPPAR $\gamma$ リガンドの抗炎症効果

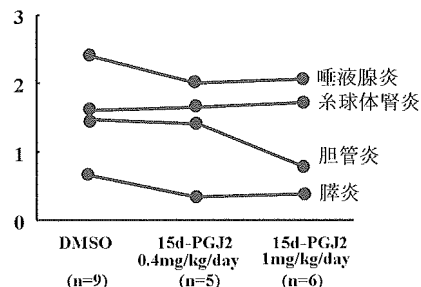
1) MRL/lprマウスの組織像(対照群)：MRL/lprマウスは、全身のリンパ節腫脹の他、唾液腺、腎、肺、関節、肝にも種々の程度の炎症を認めた。特に唾液腺炎は必発であり、ほとんどの個体で広範かつ組織破壊性の炎症を認めた。肝では門脈域内に種々の程度のリンパ球浸潤を認め、約1/3の個体に慢性非化膿性破壊性胆管炎類似の胆管炎が見られたが、発生頻度及び炎症の程度の個体差が大きかった。

2) 15d-PGJ2腹腔内投与群：低濃度15d-PGJ2投与群ではMRL/lprマウスの胆管炎および門脈域炎は残存しており、胆管炎を伴う門脈域の頻度および炎症の程度ともに対照群と同程度であった。しかし、高濃度15d-PGJ2投与群では、胆管炎の軽減傾向が見られ、胆管炎や門脈域炎の頻度、さらにそれらの程度も軽減していた。また、6匹中1匹では門脈域炎、胆管炎をまったく認めない個体も見られた。唾液腺炎に関しては、高濃度のみならず低濃度15d-PGJ2投与群においても限局性に炎症を認めるのみであった。

諸臓器における炎症の程度を組織学的に半定量した結果、唾液腺炎、膵炎に関しては低濃度および高濃度15d-PGJ2投与で炎症の軽減傾向が見られた。胆管炎に関しては、高濃度15d-PGJ2投与群でのみ軽減が見られた。糸球体腎炎に関しては明らかな抗炎症効果は確認

できなかった(図1)。

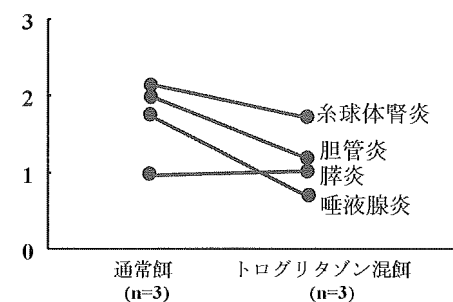
図1 MRL/lprマウスの各臓器における組織学的炎症の程度(15d-PGJ2の抗炎症効果)



3) トログリタゾン混餌投与：MRL/lprマウス体重推移および摂餌量は、トログリタゾン投与群と対照群との差に有意な差異は認められなかった。解剖時、対照群の雌1例に無色透明の腹水および胸水がみられ、軽度の皮下水腫を認めた。トログリタゾン投与群においては通常のMRL/lprマウスに較べて明らかな肉眼的著変は認めなかった。なお、対照群の1匹が投与期間中に死亡した(22週例時)が、トログリタゾン混餌投与群には死亡例はなかった。組織学的検討にて、トログリタゾン投与群で唾液腺炎の明らかな軽減が見られた。肝では、トログリタゾン投与群でも対照群と同程度に門脈域炎が散見された。しかし、トログリタゾン投与群では全体的に門脈域炎の程度が軽減し、対照群でみられるような高度の炎症細胞浸潤を示す門脈は認めなかった。

諸臓器における炎症の程度を組織学的に半定量した結果、唾液腺炎、胆管炎に対してはトログリタゾンによる軽減傾向が見られた(図2)。糸球体腎炎に関しては若干の軽減傾向、膵炎に対しては明らかな抗炎症効果は認めなかった(図2)。

図2 MRL/lprマウスの各臓器における組織学的炎症の程度(トログリタゾンの抗炎症効果)



### 3. MRL/lpr マウスの門脈域内炎症細胞

胆管炎の軽減が見られた高濃度 15d-PGJ2 腹腔内投与群とトログリタゾン混餌投与群および対照群を対象に T 細胞, B 細胞, マクロファージの門脈域内浸潤の程度を検討した結果、胆管炎の軽減が見られた門脈域では、T 細胞浸潤の軽減が著明であった。しかし、B 細胞とマクロファージの門脈域内浸潤に関しては投与群と対照群との間に明らかな差は認めなかった。

### D. 考察

我々は、抗炎症作用を有する PPAR $\gamma$  が胆管上皮細胞で恒常的に発現しているが、PBC の障害胆管では PPAR $\gamma$  発現が低下していることを見出し、また Th1 型サイトカインである IFN- $\gamma$  が胆管細胞の PPAR $\gamma$  の発現を低下させることも明らかにした。これらの所見より、PBC 胆管周囲での Th1 型サイトカインへの偏位が胆管における PPAR $\gamma$  発現を低下させ、菌体成分に対する感受性が亢進、さらには胆管炎の発生に関与していると我々は推測している。

PPAR $\gamma$  リガンドは、内因性リガンドとチアゾリジン誘導体とに大別でき、内因性リガンドはアラキドン酸カスケードのプロスタグランジン代謝産物である 15d-PGJ2 が広く知られている。チアゾリジン誘導体は、トログリタゾンの他、現在、糖尿病や非アルコール性脂肪性肝炎の治療薬として応用されつつあるピオグリタゾンなどが挙げられる。今回、ヒト培養胆管細胞を用いて 15d-PGJ2 およびトログリタゾンの抗炎症効果を検討した結果、両リガンド共に LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B の活性化および TNF- $\alpha$  mRNA の産生亢進を有意に抑制し、これらのリガンドが菌体成分刺激に対する炎症反応を軽減させることが示唆された。

次に、*in vivo* の胆管炎に対して PPAR $\gamma$  リガンドが有効かどうかを検討するため、自己免疫疾患自然発症モデルである MRL/lpr マウスを用いて検討した。MRL/lpr マウスは、Fas 変異遺伝子 '*lpr*' によるリンパ球増殖性病変が病変の主体であり、唾液腺炎、関節炎や糸球体腎炎などの種々の自己免疫疾患を自然発症する。また、慢性非化膿性破壊性胆管炎類似の胆管炎やミトコンドリア抗体が出現することから PBC モデルの一つとして報告されている (Tsuneyama ら, *Pathol Int*, 2001)。今回、このマウスを用いて胆管炎に対する 15d-PGJ2, トログリタゾンの抗炎症効果を検証した結果、高濃度の 15d-PGJ2 腹腔内投与およびトログリタゾンの混餌投与で胆管炎の軽減が見られた。胆管炎自体の発生頻度が低く、また炎症の程度も個体差が大きいため、全体的に抗炎症効果の

程度は軽度ではあったが、高濃度 15d-PGJ2 腹腔内投与の 1 匹では完全に胆管炎および門脈域炎を欠く個体も見られ、胆管炎に対する PPAR $\gamma$  リガンドの抗炎症効果は十分に期待できる。また、門脈域内の炎症細胞について T 細胞, B 細胞, マクロファージについて検討した結果、PPAR $\gamma$  リガンド投与群では主に T 細胞の減少を認めた。PBC の胆管病変形成に T 細胞が重要な役割を演じている。PPAR $\gamma$  リガンドが T 細胞減少を主体として抗炎症効果を示すことは、PBC の胆管病変にも充分抗炎症効果を示すことが示唆される。

トログリタゾンは、以前に糖尿病治療薬として使用されていたが、重篤な肝障害の副作用が指摘され現在ヒトでは使用されていない。しかし、近年、トログリタゾンの薬効が再び注目され、本年 2005 年だけでも炎症性腸疾患および大腸癌発癌, 糖尿病, 慢性膵炎, 敗血症などの治療薬として動物実験での薬効性が報告されている。今回の検討においてもトログリタゾンによる肝障害が懸念されたが、トログリタゾン投与群に死亡例はなく、組織学的にも肝障害を示唆する所見は認めなかった。しかし、内因性リガンドである 15d-PGJ2 に較べて、トログリタゾンの細胞毒性や副作用は強いいため、生体への投与には十分注意が必要であろう。また、トログリタゾンは混餌投与で薬効が得ることができ、15d-PGJ2 の腹腔内投与に較べて、投与方法が極めて簡便である。また、糖尿病治療薬として使用されたトログリタゾンが AMA 陰性 PBC 患者の肝機能を改善したとの症例報告もある (Okai T, et al. *Am J Gastroenterol* 2002)。今後、PBC 患者への本格的な応用が期待される。

### E. 結論

内因性 PPAR $\gamma$  リガンドである 15d-PGJ2、チアゾリジン誘導体リガンドであるトログリタゾンともに MRL/lpr マウスの胆管炎を軽減させた。PBC の胆管炎に対しても薬効が期待され、PPAR $\gamma$  リガンドが PBC の新たな治療薬として応用でき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) Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Interferon- $\gamma$  accelerates NF- $\kappa$ B activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligands interaction. *J Clin Pathol* (in press)
- 2) Harada K, Isse K, Kamihira T, Shimoda S,

Nakanuma Y. Th1 cytokine induced down-regulation of PPAR $\gamma$  in biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis.

Hepatology 2005, 41(6):1329-1238

## 2. 学会発表

- 1) 野崎佑介, 一瀬久美子, 古坊真一, 原田憲一, 中沼安二. 自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける 15d-PGJ2 の抗炎症効果. 第 94 回日本病理学会総会. 横浜, 2005. 4. 14-16

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

PBC 患者における血清 BAFF (B cell activating factor belonging  
to the tumor necrosis factor family) 濃度とその意義

分担研究者 右田 清志 国立病院機構長崎医療センター 病因解析研究部長

**研究要旨:** BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) は、B 細胞の分化、自己抗体産生を誘導する、TNF ファミリーに属する分子である。今回、PBC 患者血清中の BAFF 濃度を ELISA 法で測定した。その結果、PBC 患者血清中の BAFF 濃度は有意に増加していた(健常人  $732 \pm 167 \text{mg/ml}$ 、PBC 患者  $1369 \pm 1169 \text{mg/ml}$ )。血清 BAFF 濃度と抗ミトコンドリア抗体価の間に相関は認められなかったが、血清ビリルビン値との間に正の相関を認めた。また病期の進行した症例、interface hepatitis の程度の強い症例において、血清 BAFF 濃度は高い傾向にあった。以上の結果より、PBC の肝障害に BAFF が関与している可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis; PBC) は、中等大の小葉間胆管あるいは隔壁胆管の慢性非化膿性破壊性胆管炎 (chronic non-suppurative destructive cholangitis; CNSDC) により慢性肝内胆汁うっ滞をきたし、最終的には肝硬変に至る疾患である。病因として自己免疫性機序が考えられており、自己免疫の関与を裏付ける根拠としては、血中自己抗体である抗ミトコンドリア抗体 (anti-mitochondrial antibody; AMA) が高頻度に陽性で、高力価を示すが、自己抗体と胆管障害の関係は明らかでない。BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) は TNF ファミリーに属する分子で B 細胞の生存、分化、抗体産生に重要な役割を果たしている。BAFF 過剰発現マウスでは、SLE に類似した症状を呈することより自己免疫疾患との関連が示唆されている。今回、PBC 患者血清中の BAFF を測定した。

#### B. 研究方法

72 名 PBC 患者血清を用い、血清 BAFF 濃度を ELISA キット (R&D 社) を用い測定した。採血時の各種肝機能検査 (AST、ALT、ALP、総ビリルビン)、病期 (Scheuer's grade) と血清 BAFF 濃度との関連を検討した。

#### C. 研究結果

健常人と比べ PBC 患者血清中の BAFF 濃度は有意に増加していた。(健常人  $723 \pm 167 \text{mg/ml}$  : PBC 患者  $1369 \pm 1169 \text{mg/ml}$ ) また、PBC 患者血清 BAFF 濃度は、病期の進行と共に増加していた。また interface hepatitis の程

度が強い症例ほど血清 BAFF 濃度は高い傾向にあった。PBC 患者の臨床検査所見との関連では、血清 IgG、抗ミトコンドリア抗体価と BAFF 濃度に相関はみられなかった。一方、血清ビリルビン値血清 BAFF の間には正の相関がみられた。(r:0.72 P<0.01)

#### D. 考察

BAFF は末梢 B 細胞、形質細胞の生存、自己反応性 B 細胞の抗体産生、免疫グロブリンのクラススイッチなどの液性免疫において重要な役割を果たしている。今回、PBC 患者の血清 BAFF の濃度の上昇は認めたものの、IgG、抗ミトコンドリア抗体価の間に相関は認めなかった。一方 PBC の病期の進行 interface hepatitis との関連が示唆された。BAFF は、B 細胞の活性化、分化誘導のみならず、T 細胞の活性化を誘導することも報告されており、PBC 含めた自己免疫性肝疾患の細胞性免疫の異常に関連していることが示唆された。

#### E. 結論

PBC 患者血清 BAFF 濃度は、健常人と比較して増加しており、病期の進行と共に増加する傾向にあった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. An active metabolite of leflunomide, A77

- 1726, inhibits the production of serum amyloid A protein in human hepatocytes. *Rheumatology* 44(4):443-448, 2005
- 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* 42(3):386-392, 2005
  - 3) Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42(4):505-510, 2005
  - 4) Amenomori M, Migita K, Miyashita T, Yoshida S, Ito M, Eguchi K, Ezaki H. Cytomegalovirus-associated hemophagocytic syndrome in a patient with adult onset Still's disease. *Clin Exp Rheumatol* 23(1):100-102, 2005
  - 5) Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, Nakao R, Kusumoto K, Nagaoka S, Yano K, Abiru S, Ueki T, Matsumoto T, Daikoku M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K, Yatsushashi H, Nakashima M, Harada M, Ishibashi H. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 85(7):908-920, 2005
  - 6) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Aoyagi T, Kawabe Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. FK506 suppresses the stimulation of matrix metalloproteinase 13 synthesis by interleukin-1beta in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett* 98(2):194-199, 2005
  - 7) Kogawa H, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Nakao M, Miyashita T, Kimura H, Ezaki H, Nakamura M, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Idiopathic portal hypertension associated with systemic sclerosis and Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 24(5):544-547, 2005
  - 8) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 579(14):3119-3125, 2005
  - 9) Migita K, Udono M, Kinoshita A, Osumi M, Ito M, Miyashita T, Hamada H, Ezaki H, Eguchi K, Mukobara S. Lupus erythematosus and sarcoidosis. *Clin Rheumatol* 24(3):312-313, 2005
  - 10) Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25(1):85-91, 2005
  - 11) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Kimura H, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 142(1):84-91, 2005
  - 12) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Mori T, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix metalloproteinase-9 induction in TNF-alpha-stimulated human hepatic stellate cells. *Life Sci* (in press)
  - 13) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsushashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 26(2):138-145, 2006
  - 14) Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 26(1):32-38, 2006
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
なし

AMA 産生動物モデルの胆管細胞を用いた網羅的検討

分担研究者 上野 義之 東北大学病院 講師

**研究要旨：**これまで、分離胆管細胞を用いて、その多様性を $\mu$ アレイ法や、プロテオーム法を用いて解析してきた。今回は AMA 陽性となる動物モデルから胆管細胞を分離して、その表出分子の変化を調べることにより原発性胆汁性肝硬変(PBC)の標的細胞である胆管細胞上の蛋白発現と、AMA 産生との関連を明らかにすることを目的とした。

**A. 研究目的**

これまで、主に分離胆管細胞を用いて、その多様性を $\mu$ アレイ法や、プロテオーム法を用いて解析してきた。今回は AMA 陽性となる動物モデルから胆管細胞を分離してその表出分子の変化を調べることにより原発性胆汁性肝硬変(PBC)の標的細胞である胆管細胞上の蛋白発現と、AMA 産生との関連を明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

NOD マウスは自己免疫現象を広範に起こすマウス種として知られているが、今回その亜種 2 系統を用いて胆管細胞の蛋白発現を検討することとした。そのため、まずは実験マウスのモデルとしての妥当性を検証し、またそのコロニーの維持を行った。

更に、形態学的、病理学的に胆管炎の有無を確認し、更に AMA 産生の有無を ELISA 法にて確認した。更に胆管細胞を分離する方法を新たに考案し、その後の解析に用いるための細胞回収法の基礎的検討を行った。

**C. 研究結果**

NOD マウスの亜種 2 種を米国より入手し、適当な検疫業務の後に繁殖させて安定したコロニーを作製した。更に、経時的のこのモデル動物を観察することにより胆管炎モデルとして妥当であることを確認した。さらに AMA が経時的に産生されてくることを確認した。また、今回新たに開発した胆管細胞の分離法が、純度の高い胆管細胞を得る方法として有望であることを確認した。

また、今回用いた手法を応用して、胆管細胞の多様性や、細胞特性についての共同研究をまとめて発表した。

**D. 考察**

胆管細胞の経時的变化については、現在最新のマイクロアレイ法とプロテインチップ法で解析中である。

**E. 結論**

今回用いたモデル動物の胆管細胞の表出分子を詳細に検討することにより、PBC の新たな治療法に貢献する可能性が示された。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

- 1) Taffetani S, Ueno Y, Meng F, Venter J, Francis H, Glaser S, Alpini G, Patel T. Tannic Acid Inhibits Cholangiocyte Proliferation after Bile Duct Ligation via a Cyclic Adenosine 5', 3'-Monophosphate-Dependent Pathway. *Am J Pathology* 2005;166:1671-1679
- 2) Glaser S, Alvaro D, Francis F, Ueno Y, Marucci L, Benedetti A, Marzioni M, De Morrow, S, Mancino MG, Phinizy JL, Reichenbach R, Fava G, Summers R, Venter J, Alpini G. Beta 1 and Beta 2 adrenergic receptor agonists prevent bile duct injury induced by adrenergic denervation by increased cAMP levels and activation of Akt. *Am J Physiology* (in press)
- 3) Moritoki Y, Ueno Y, Kanno A, Yamagiwa Y, Fukushima K, Shimosegawa T. The limited role of bone marrow cells in experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Liver International* (in press)

- 4) Marzioni M, Francis H, Benedetti A, Ueno Y, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Mancino MG, Summers R, Alpini G, Glaser S. Ca-dependent cytoprotective effects of urso-and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. Am J Pathology (in press)
- 5) Fukushima K, Ueno Y. The bioinformatic approach for understanding the heterogeneity of cholangiocytes. World J Gastroenterology (in press)
- 6) Meng F, Yamagiwa Y, Ueno Y, Patel T. Over-expression of Interleukin-6 enhances cell survival and transformed cell growth in human malignant cholangiocytes. J Hepatol (in press)
- 7) Tamai K, Fukushima K, Ueno Y, Moritoki Y, Yamagiwa Y, Kanno N, Jefferson DM, Shimosegawa T. Differential expressions of aquaporin proteins in human cholestatic liver diseases. Hepatol Res, 2006;34:99-103
- 8) Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. Gastroenterology (in press)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

新たな胆管細胞分離法について  
（東北大学知的財産部と共同確認中）



Th1/Th2 バランス制御法の開発：インバリアント NKT 細胞亜分画による制御

分担研究者 松下 祥 埼玉医科大学免疫学講座 教授

**研究要旨：**Th1/Th2 バランスは臓器特異的な自己免疫疾患の病態や治療を考える上で重要であり、樹状細胞(DC)はTh1/Th2 分化に重要な影響を与える細胞の一つである。一方、種々の免疫疾患において、特定のインバリアント NKT (iNKT) サブセットの減少が認められ、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。しかし、ヒトにおいて iNKT サブセットが、DC を介して Th1/Th2 バランスを支配し、免疫応答性をいかにして制御しているのか、詳細な機序については明らかとされていない。

本研究では、異なる iNKT 細胞サブセットが、DC 機能の変化に及ぼす影響を比較検討し、iNKT 細胞サブセットのバランスが末梢における Th1/Th2 応答バランスを制御する重要な要因となり得ることを明らかにした。さらに iNKT は、自己免疫疾患関連ヘルパーT 細胞の活性化を抑制することを明らかにした。

**A. 研究目的**

ヒト V $\alpha$ 24 インバリアント NKT (iNKT) 細胞は、T 細胞とナチュラルキラー (NK) 細胞の両方の性質を持ち、T 細胞抗原受容体 (TCR) の他に、NK 細胞マーカーである NKR-P1A (CD161) 分子を発現する。特に TCRV $\alpha$  鎖 (V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18) は TCR 遺伝子再構成の際に N 領域の挿入を伴わない、均一な TCRAV24AJ18 遺伝子が使用されている。これに対し、TCR $\beta$  鎖は、TCRBV11、2、8、9、13 など限定された TCR 遺伝子ファミリーが用いられている。したがって、多様性の少ないヒト V $\alpha$ 24 iNKT 細胞の TCR は、限定された抗原を認識していることが示唆されている。1997 年、ヒト V $\alpha$ 24 iNKT 細胞の TCR 遺伝子と、高度に相同性を示す TCR 遺伝子再構成を有するマウス V $\alpha$ 14 iNKT 細胞が、CD1d 分子によって提示された  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -galactosylceramide:  $\alpha$ -GalCer) と呼ばれる糖脂質抗原によって活性化を受けることが明らかとなった。これに引き続いて  $\alpha$ -GalCer は、ヒト V $\alpha$ 24 iNKT 細胞をも CD1d 分子拘束性に活性化することが明らかとなった。また、2004 年、ヒト、およびマウスの iNKT 細胞が認識する iGb3 (isoglobotrihexosylceramide) と呼ばれる内因性の糖脂質リガンドが報告され、マウス V $\alpha$ 14 iNKT 細胞/CD1d 系が、ヒト V $\alpha$ 24 iNKT 細胞/CD1d 系として保存され、免疫応答に重要な役割を演じていることが示唆された。

TCR を介した抗原刺激により活性化された iNKT 細胞は、NK 細胞、樹状細胞 (dendritic cells: DCs)、B 細胞、および T 細胞などを活性化し、自然免疫応答、および獲得免疫応答を活性化するのみならず、多様なエフェクター作

用を有している。しかし、iNKT 細胞には、Th2 免疫応答を促進し、自己免疫応答を抑制する機能を有するという報告がある一方、interleukin (IL)-12 産生を促進することにより誘導される Th1 免疫応答を促進し、腫瘍細胞の拒絶、あるいは感染防御に貢献するという報告もある。この矛盾する観察は、iNKT 細胞には異なる機能を有するサブセットが存在し、これらのバランスの変化によって免疫応答性が制御されていることを示唆する。

ヒト iNKT 細胞 (V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18) は、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、および CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative: DN) の 3 つのサブセットから構成されており、それぞれ異なるサイトカイン産生性を有している (Takahashi T. et. al., J. Immunol. 2002; 168: 3140)。近年、全身性強皮症 (Sumida T. et. al. J. Exp. Med. 1995; 182:1163)、1 型糖尿病 (Wilson SB. et. al. Nature 1998; 391: 177) などの自己免疫疾患、およびアトピー性皮膚炎 (Oishi Y. et. al. Clin. Exp. Immunol. 2000; 119:404., Takahashi T. et. al. Hum. Immunol. 2003; 6: 586) などのアレルギー性疾患の患者群において、特定の iNKT サブセットが減少していることが報告され、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。しかし、ヒトにおいて iNKT サブセットのバランスが、Th1/Th2 バランスを支配する詳細な機序については明らかとされていない。我々のこれまでの研究により、抗原刺激により活性化した CD4 サブセットが、DC の DC1 分化を誘導し、抗原刺激により活性化した DN サブセットが、DC の DC2 分化を誘導することにより、Th1/2 バランスを制御しうることを報告してきた。今回は、異なる iNKT サブセット

がDCを介して、自己反応性Th細胞の活性化を抑制しうるかを評価した。

## B. 研究方法

$\alpha$ -GalCer 存在、あるいは非存在でCD4 iNKTサブセット、あるいはDN iNKTサブセットとDCの共培養を行った。16時間後、iNKT-DC共培養系に放射線照射(45Gy)し、各doseの65kDaグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65)p111-131ペプチドを添加した。さらに1型糖尿病患者より樹立したHLA-DR53拘束性GAD65自己反応性T細胞クローン(SA32.5( $V\alpha 1$ 陽性)およびMK20.2( $V\alpha 15$ 陽性))と共培養を行った。48時間後、 $1\mu\text{Ci/well}$ の $^3\text{H}$ -thymidineを添加し、さらに16時間後、細胞をharvestし、scintillation counterで細胞内に取り込まれた $^3\text{H}$ -thymidineの放射能を計測した。一方で、これらのT細胞クローンをCFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)でラベルし、共培養開始3日目の分裂をフローサイトメトリーにて評価した。フローサイトメトリーによる解析は、 $V\alpha 24$ 陽性細胞をgate outすることにより、各T細胞クローンの分裂の状態を評価した。

## C. 研究結果

$\alpha$ -GalCerにより活性化を受けたCD4およびDN iNKTサブセットと共培養したDCは、各doseのGAD65ペプチドに対して、GAD65自己反応性T細胞クローンSA32.5およびMK20.2の増殖応答を抑制した(図1A)。これらのT細胞クローンの増殖抑制は分裂が抑制されることに起因することが明らかとなった(図1B)。以上の観察は、CD4およびDN iNKTサブセットは、その活性化を通してDCにおける免疫寛容性分化を誘導することにより、自己反応性Th細胞の分裂・増殖を抑制することが明らかとなった。

## D. 考察

種々のマウス自己免疫疾患モデルおよびヒト自己免疫疾患患者において、DN iNKTサブセットの機能不全、あるいは減少が報告されている。NODマウスでも同様にDNサブセットの機能不全と減少が認められるが、これに $\alpha$ -GalCerを投与することにより、脾所属リンパ節でDCにおける寛容性のDC分化が誘導され、病原性のT細胞が抑制を受けることが知られている。

我々の観察では、ヒトCD4およびDN iNKTサブセットは共に $\alpha$ -GalCerによって活性化されることにより、寛容性のDC分化を誘導する。

つまり、DN iNKTサブセットの機能不全が認められる自己免疫疾患において、正常な機能を有するCD4 iNKT細胞の活性化を通して、病原性のTh細胞が抑制されることが予想される。

## E. 結論

$\alpha$ -GalCerによって活性化されたヒトCD4およびDN iNKTサブセットは、共にDCの寛容性分化を誘導する。したがってDNサブセットの機能不全が認められる種々の自己免疫疾患において、 $\alpha$ -GalCerの投与により、CD4 iNKTサブセットの活性化を通し、病原性T細胞を制御できるかもしれない。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsushita S, Liu T-Y. and Uemura Y. Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. Allergol. Int. 54(4):507-513, 2005
- 2) 松下 祥: T細胞シグナル伝達におけるHLAクラス II分子の役割. 炎症と免疫, 13(2): 213-219, 2005
- 3) 松下 祥, 涌井昌俊, 植村靖史: DC2細胞を誘導する物質. 臨床免疫, 44(1):38-45, 2005
- 4) 松下 祥監修, 免疫力がアップする50の法則. 法研, 2005

### 2. 学会発表

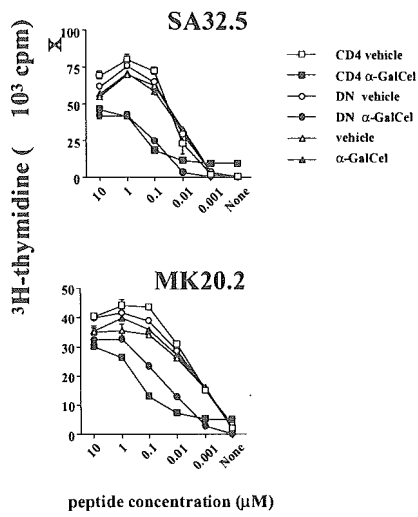
- 1) 涌井昌俊, 植村靖史, 劉 天懿, 高木理英, 橋本久実子, 中野和久, 成田弥生, 松下祥: Th1/Th2アジュバント刺激後のヒト抗原提示細胞に認められるNotchリガンドの発現変化. 日本アレルギー学会, 盛岡, 2005. 10
- 2) 植村靖史, 劉 天懿, 鈴木 元晴, 成田 弥生, 大山秀樹, 中野和久, 涌井昌俊, 松下 祥:  $V\alpha 24$ インバリエントNKT細胞サブセットによるDCを介した免疫制御機構の解析. 日本免疫学会, 横浜, 2005. 12

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

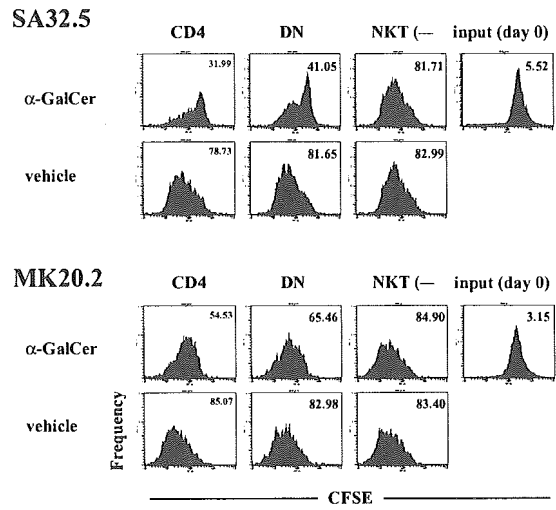
なし

# 図 1

## A



## B



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：** 我々はこれまでに、経門脈的に流入する抗原により抗原特異的な肝 CD4T 細胞の活性化と選択・機能分化が起こること、その結果 FasL 陽性、IL-4, TGF-beta, IL-10 を産する細胞が出現することを明らかにした。この細胞の移入により、Th1 型の免疫反応の抑制が起こることをこれまで報告してきた。今回、抗原特異的、非特異的に起こる肝障害モデルを設定し、この免疫調節性細胞の移入、及び経口からの抗原投与により肝障害が阻止されか検討した。その結果いずれのモデルにおいても、肝障害阻止効果が認められた。肝組織T細胞の機能を検討したところ、細胞移入と抗原の投与により、肝傷害性 CD4T 細胞の機能が抑制されていることが確認された。

**A. 研究目的**

肝臓固有の免疫調節性 CD4 T細胞が存在することを報告してきた。この、免疫調節性 CD4T 細胞は、経門脈的に到達した抗原により活性化されて、FasL 分子を発現し、大量の IL-4, IL-10, TGF-beta 産生能を有する細胞である。in vitro において、細胞傷害活性を有するとともに、未感作個体に移入すると、様々な免疫反応を調節する。今回、この肝固有の免疫調節細胞を用いることにより、果たして、免疫学的機序で起こる肝障害が阻止できるか、動物モデルを作成して検討した。

**B. 研究方法**

抗原特異的、非特異的に起こる肝障害モデルを用いた。即ち、(A) 卵白アルブミン (OVA) ペプチドに特異的な T 細胞抗原受容体を強制発現したマウス (D011.10) にリポゾームに包埋した OVA を尾静脈より投与して肝障害を惹起した。(B) 抗原非特異的な肝障害モデルとして、BALB/c マウスに Concanavalin A (ConA) を尾静脈より投与した。投与後各々 48 時間後に肝組織と血清を採取して肝障害を定量的に評価した。実験 A においては、100mg の OVA あるいは対照 (PBS) を隔日に 5 回経口で投与し、最終投与 3 日後に OVA-リポゾームの投与を行った。実験 B においては、D011.10 マウスを直接用いる、あるいは BALB/c マウスに D011.10 マウスの脾臓細胞を移入した 3 日後に、実験 B 同様に経口から抗原を投与して、最終投与 3 日後に ConA を投与した。肝炎を惹起したマウスの肝臓より浸潤 T 細胞

を分離して、その抗原特異的なリンホカイン産生を検討した。

**C. 研究結果**

(1) D011.10 マウスに OVA-リポゾームを投与することにより、肝炎を惹起した。血清 AST, ALT は各々約 1700IU/ml, 900IU/ml と上昇し、組織学的に門脈を中心に単核球の浸潤を認めた。OVA を予め経口的に投与した群では ALT, AST は各々、約 500IU/ml, 200IU/ml 程度に減少し、門脈周辺の細胞浸潤も著明に抑制された。肝臓より T 細胞を分離し、その機能を検討したところ、OVA 投与群では抗原 (OVA) 特異的、非特異的 (抗 CD3 抗体) 刺激に対して増殖反応の低下と、著明な IFN-gamma 産生の抑制が認められ、また IL-4 の産生も有意に増加していた。

(2) D011.10 マウスに ConA を静注することにより、ALT, AST 各々 2100IU/ml, 1300IU/ml 程度の上昇と肝組織に斑状に TUNEL で染まる、肝細胞壊死を認めた。予め OVA を経口投与することで ALT, AST の上昇は著明 (約 1/3) に抑制され、組織学的な肝細胞壊死も著明に抑制された。肝臓より浸潤 T 細胞を分離し、その OVA に対する反応を検討したところ、やはり著明な増殖反応と IFN-gamma 産生の抑制と IL-4 産生の増強が認められた。

(3) BALB/c マウスに D011.10 マウスの脾細胞を予め移入したのちに ConA を静注することによりやはり、AST, ALT の 1000IU/ml 以上の上昇と、斑状の肝細胞壊死をともなう肝炎が惹起された。OVA を経口投与した群では AST, ALT の

上昇は各々1/4, 1/5に抑制され、TUNEL陽性組織も著明に減少していた。

肝臓組織浸潤性T細胞を分離してOVAに対する反応を検討したところ、やはり、増殖反応とIFN-gamma産生の著明な抑制とIL-4産生の増強を認めた。

#### D. 考察

経口からの抗原投与により、肝臓で起こる免疫反応を制御することが可能であること、またこれを用いて、肝障害（肝炎）を阻止できることが判明した。

抗原投与後に肝臓で誘導されるCD4T細胞を直接移入したのちに、実験肝炎を誘導したところ、やはり肝臓組織障害が阻止されたことから、肝炎の阻止機序として、肝臓に誘導された、抑制性のT細胞が直接的な役割を担っていることが判明している。

我々の予備実験では、経口から抗原投与して、肝臓で抗原特異的に誘導されるCD4T細胞はFasL分子を表面に発現するため、当初抗原投与により、逆に肝臓障害が起こる可能性も考えられた。しかしその可能性は否定された。次に、経口から抗原を投与することにより肝臓において、肝炎を起こす傷害性の実効T細胞が除去された結果、肝炎が阻止されている可能性は無いと考える。何故なら、予め抗原を投与しておいた、マウスの肝臓CD4T細胞を移入した個体に肝炎を惹起しても肝臓障害は阻止されるからである。

即ち、能動的に肝炎抑制細胞が誘導されたものとする。次に、その機序は、抗原を経口投与して肝炎を誘導したマウスの肝臓浸潤細胞の検討から以下のように考えられる。ひとつには、免疫抑制性のCD4T細胞がTh2あるいはTr1細胞類似の機能を持っているため、産生するIL-4, IL-10, TGF-betaによりOVA-リポゾームあるいはConAの投与により起こるTh1型の免疫反応を抑制している可能性がある。あるいは、Th1型の肝炎実効細胞はTh2型のT細胞に比較してアポトーシスに対する感受性が高いため、肝臓で誘導された調節性T細胞の発現するFasLにより、レシビエントマウスの肝臓に出現したTh1型の実効細胞が除去された可能性がある。

更に、ConAに対して起こる肝炎に対してもOVAで誘導された調節性CD4T細胞が肝臓障害阻止効果を示したことから肝炎を惹起する抗原の特異性と、調節性T細胞を誘導する抗原の特異性は同一でなくても良いことがわかる。この

ことは臨床的に非常に重要な意義を有する。即ち、PBCあるいは自己免疫性肝炎においては、実際に肝臓障害を起こしているT細胞が認識する抗原は不明である。しかしながら肝臓に既知の抗原に特異的なCD4T細胞が存在し、その抗原を経口投与することにより、免疫調節性のCD4T細胞が誘導できれば、PBCあるいは自己免疫性肝炎のような起炎性抗原が不明な肝炎に対しても組織障害の阻止が可能であることを示唆している。

これまで、関節リウマチ、多発性硬化症、あるいはブドウ膜炎などの難治性臓器炎を経口より抗原を投与することにより治療しようとする試み（経口免疫寛容）がなされてきた。実際の起炎抗原を同定し、これを大量に準備することは技術的に困難である。

これらの研究と比較して、本研究では言及すべき幾つかの有利な点がある。即ち、経口的に抗原を投与した場合、腸管より吸収されて最初に到達する肝臓が標的臓器であるため、抗原のターゲティングが比較的容易である。また、標的臓器での炎症抑制機序が、これまで報告されてきた臓器炎と比較して、より詳細な細胞レベルでの解析が可能であること。更に、起炎抗原を同定せずとも、第三者抗原を利用して、炎症抑制が可能であることである。

実際の応用に際しては、経口から投与する抗原の選定が重要であり、予め幾つかの抗原のパネルを準備して、患者末梢血より採取したリンパ球との反応を参考にして決定する必要がある。

次に、炎症抑制効果を向上するためには、投与抗原特異的肝臓内CD4T細胞の出現頻度を高める必要がある。このためには、本研究から示唆されるように、予め末梢血リンパ球を*in vitro*で抗原刺激して、抗原特異的な細胞数を増やし、体内に戻すことが考えられる。今後、動物種を変えて、細胞移入により、実験肝炎が抑制できるか更なる検討を加える予定である。

#### E. 結論

経口からの抗原投与により、肝臓で免疫抑制性CD4T細胞を誘導し、自己免疫性肝臓障害を阻止することが可能であった。起炎抗原と肝炎阻止に用いる抗原は同一である必要がないため、将来の臨床応用を考えるうえで、有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamori M, Yoshida M, Watanabe T, Shirai Y, Iizuka T, Kita T, Wakatsuki Y. Antigenic activation of Th1 cells in the gastric mucosa enhances dysregulated apoptosis and turnover of the epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 316(4): 1015-1021
- 2) Watanabe T, Yamori M, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y. CD4+CD25+ T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflamm Bowel Dis.* 2005, 11(6):541-550
- 3) Itoh T, Seno H, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y. Th response to *Helicobacter pylori* differs between patients with gastric ulcer and duodenal ulcer. *Scand J Gastroenterol.* 2005, 40(6):641-647

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

- 1) 国内特許出願中 特願 2004-307885
- 2) 国外特許出願中 PCT/JP2005/019293

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における自己抗原 (PDC-E2) 反応性 T 細胞の免疫制御

分担研究者 下田 慎治 九州大学病態修復内科学 助手

**研究要旨：** 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における自己抗原 (PDC-E2) 反応性 T 細胞の免疫制御の臨床応用を最終目的とする。今年度は、抗原提示細胞 (APC) として免疫調節性樹状細胞 (regDC) を用いて、自己抗原反応性 T 細胞クローン (TCC) の増殖能の検討と、最終的にこの TCC が免疫調節性 TCC に変換されるかを検討した。regDC は通常の DC よりも抗原提示能は制御されたが、最終的に TCC を免疫調節性 T 細胞 (regT) に変換できなかった。以前検討した HLA DR53 導入マウス線維芽細胞 (L-DR53) では regT の誘導ができたが、今年度検討した regDC では、誘導できなかった原因のひとつとして、DC が元来抗原提示細胞であり L-DR53 がそうではないことが考えられた。今後は HLA 拘束性が明らかではない場合でも使用できる APC として、対象患者由来の線維芽細胞を採取しこれに IFN- $\gamma$  処理し HLA class II 発現をさせたものが regT を誘導できる APC になる可能性を検討したい。

**A. 研究目的**

昨年度までの研究で、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における自己抗原ピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント (PDC-E2) 抗原に反応する CD4 陽性 T 細胞クローン (TCC) を用いた解析から、この TCC が HLA DR53 に拘束されていること、および、側副刺激の欠損した HLA DR53 分子導入マウス線維芽細胞 (L-DR53) を抗原提示細胞 (APC) として用いることでこの TCC の一部はアナジーとなり、アナジーが誘導された T 細胞は抗原特異的に他の細胞の反応を調節する機能を有する T 細胞 (regT) になること、等を報告してきた。しかし L-DR53 を用いた場合、対象とする T 細胞の HLA 拘束性は DR53 に限定されるため、臨床応用が限られてくる可能性があった。

一方、末梢単球由来の未成熟樹状細胞 (DC) をデキサメサゾン (DEX) やビタミン D (Vit. D) で共培養すると調節性樹状細胞 (regDC) になることや、成熟 DC にする際に IL-10 や TGF- $\beta$  で共培養するとこれも regDC になることが今までの研究で明らかとなっている。今年度は HLA 拘束性が明らかではない場合でも使用できる APC として、この 2 種類の regDC を用いて、今までに樹立した TCC に対して L-DR53 と同様に TCC を regTCC に変換できるかを検討した。

**B. 研究方法**

HLA DR53 陽性健常者末梢血より密度勾配法により単核球 (PBMC) を採取し、IL-4、GM-CSF と培養し単核球由来未熟 DC とした。これに LPS

刺激を加え成熟 DC とした。これら以外の APC として PBMC および L-DR53 を用いた。

各種 APC の細胞表面分子を主に側副刺激分子についてフローサイトメトリーで確認した。TCC は先に樹立したヒト PDC-E2 抗原反応性の TCC を用いた。TCC の増殖能の検討は  $\gamma$  線照射後 APC に PDC-E2 抗原をパルスして TCC と共培養 3 日後に  $^3\text{H-TdR}$  の取り込みで確認した。

また、一旦各種 APC と共培養した TCC を培養 3 日後に回収して、新たに APC と共培養してアナジーへの誘導ができていないかを確認した。さらに、共培養 3 日後の TCC を、通常の APC と TCC の増殖アッセイ系に添加することで、共培養した TCC が細胞増殖能を制御するいわゆる regT に変換されていないかを確認した。

**C. 研究結果**

未成熟 DC を DEX、VitD、プロスタグランジン E2 (PG-E2) で処理した場合の抗原提示能の減少を、処理しなかった未成熟 DC と比較した。その結果、DEX で処理した場合が最も細胞増殖能が減弱した。

次に成熟 DC と IL-10/TGF- $\beta$  処理成熟 DC を比較すると、IL-10/TGF- $\beta$  処理成熟 DC での抗原提示能は成熟 DC と比べ抑制されたが、未成熟 DC よりも抗原提示能は強いものであった。

この抗原提示能の減弱は、フローサイトメトリーで確認した側副刺激分子 (CD80, CD86) の発現弱に起因していることが明らかとなった。

以上のように DEX 処理未成熟 DC や IL-10/TGF- $\beta$  処理成熟 DC を APC として用いた

場合では確かに TCC の増殖は減少したが、L-DR53 を APC として用いた場合に観察されたように増殖反応が消失するまでには至らなかった。

さらに、regDC を APC とした TCC では、L-DR53 を APC とした場合の TCC とは異なりアナジューは誘導されなかった。

また L-DR53 を APC とした場合のアナジュー誘導 TCC には細胞制御能が出てくるのが以前の検討から明らかとなっていたが、今回検討した DEX 処理未成熟 DC や IL-10/TGF- $\beta$  処理成熟 DC を APC とした場合 TCC には細胞制御能は誘導されなかった。

#### D. 考察

以上の結果より、今回検討した regDC では疾患を制御しにくいことが示唆された。regDC と L-DR53 の違いとして L-DR53 が付着細胞であることから、HLA 拘束性が明らかではない場合でも使用できる APC として、対象患者由来の線維芽細胞を採取しこれに IFN- $\gamma$  処理し HLA class II 発現をさせたものが regT を誘導できる APC になる可能性が考えられる。

今まで L-DR53 で regT に誘導できた現象を側副刺激分子とのみ関係づけて考察していたが、免疫シナプスの形成の差異などが、DC と L-DR53 にはある可能性も示唆された。そこで今後 HLA 拘束性のはっきりしない自己抗原反応性 T 細胞の制御には、auto の繊維芽細胞などもともと抗原提示細胞としては機能しない自己由来の細胞を APC として用いる方法を検討する必要があると考えられた。

#### E. 結論

regDC はナイーブ T 細胞に免疫制御反応を有することは過去の論文から指摘されているが、今回検討したメモリー T 細胞 (T 細胞クローン) に対しては、これを regT に変換することはできなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

- 1) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsuhashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased

expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis.

J Autoimmun. 2006, 26(2):138-145

- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsuhashi 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, 42(3):386-392
- 3) 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, 41(1):151-159

#### 2. 学会発表

- 1) 下田慎治他：原発性胆汁性肝硬変患者および健常者の自己抗原反応性 T 細胞の解析. 第 41 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2005. 6-16-17
- 2) 下田慎治他：原発性胆汁性肝硬変患者および健常者の自己抗原反応性 T 細胞の解析. 第 35 回日本免疫学会総会. 横浜, 2005. 12. 13-15

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし



## 自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析と治療応用に関する研究

分担研究者 喜多 宏人 自治医科大学消化器内科 助手

**研究要旨：** 原発性胆汁性肝硬変（PBC）に対する画期的な治療法の開発を目的とした。特に、自己抗原特異的 T 細胞を制御することにより PBC の進行を制御することが可能であるかどうかを明らかにすることを目標とした。PBC の自己抗原である抗ミトコンドリア抗体の主たる対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素の E2 コンポーネント (PDC-E2) を特異的に認識する CD8 陽性自己反応性 T 細胞がどのような機序により生体内で活性化を受け増殖しているのかは明らかでない。抗ミトコンドリア抗体陰性患者においても CD8 陽性自己反応性 T 細胞が活性化されているかどうかを明らかにするため、抗ミトコンドリア抗体陰性患者における CD8 陽性自己反応性 T 細胞応答を解析した。また、同様に抗ミトコンドリア抗体陰性患者における CD4 陽性自己反応性 T 細胞応答についても併せて解析した。これらの抗ミトコンドリア抗体陰性患者の血清中の抗体反応についても解析した。抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞や CD4 陽性自己反応性 T 細胞応答が存在しており、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC においても、T 細胞レベルでの自己抗原に対する異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC と抗ミトコンドリア抗体陽性 PBC は自己反応性 T 細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性 T 細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる可能性が示された。

### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因を明らかにすることにより、PBC に対する画期的な治療法を開発することを目的とした。特に、PBC における細胞性免疫応答を解析することにより、自己抗原特異的 T 細胞や NKT 細胞を標的とした PBC に対する免疫療法を開発することに焦点をおいた。

### B. 研究方法

#### 1. 研究方法

PBC は臓器特異的自己免疫疾患であり、自己抗原である抗ミトコンドリア抗体の主たる対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素の E2 コンポーネント (PDC-E2) を特異的に認識する CD8 陽性自己反応性 T 細胞が PBC 患者の末梢血及び肝臓に存在する。しかしながら、これらの CD8 陽性自己反応性 T 細胞がどのような機序により生体内で活性化を受け増殖しているのかは、依然として不明である。PBC は臨床的に一様ではなく、自己抗体陰性 PBC や自己免疫性肝炎とのオーバーラップなど、多彩な病像を呈する。抗ミトコンドリア抗体陰性患者においても、抗ミトコンドリア抗体陽性患者と同様に CD8 陽性自己反応性 T 細胞が活性化されているかどうかを明らかにするために、抗ミトコンドリア

抗体陰性患者における CD8 陽性自己反応性 T 細胞応答を解析した。抗原エピトープである PDC-E2<sub>159-167</sub> ペプチドをパルスした樹状細胞を抗ミトコンドリア抗体陽性および陰性 PBC 患者末梢血と混合培養する事により、PDC-E2 特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導した。PDC-E2<sub>159-167</sub> ペプチドをパルスした HLA-A2 陽性標的細胞に対する傷害活性を測定することにより、自己反応性 T 細胞の抗原特異的傷害活性を評価した。また、抗ミトコンドリア抗体陰性患者末梢血中の自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の頻度を ELISPOT 法で解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、患者様由来の検体（末梢血、肝組織）を用いるので、自治医科大学の倫理規定にのっとり倫理委員会での承認を受けた。また、被験者には十分な説明を行った上での文書による承諾書を頂き、またデータを公表するに当たっては被験者のプライバシー、人権に充分配慮し、それを損ねないようにした。特に遺伝子研究を行う際には被験者のみならず、その家族、血縁者、その他関係者の人権及び利益の保護を十分に配慮し、必要関係者への十分な説明を行い同意を得ると共に、個人情報

の秘密を厳守した。

### C. 研究結果

PBC 患者末梢血中には CD8 陽性で自己抗原である PDC-E2 抗原を特異的に認識する自己抗原特異的 T 細胞が存在し、抗原刺激に伴い特異的に誘導可能であった。自己抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞は抗原特異的な細胞傷害性活性を示した。抗ミトコンドリア抗体陽性 PBC 患者末梢血中から PDC-E2 特異的 CTL が誘導された。また、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞が存在していた。同様に抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中に CD4 陽性自己反応性 T 細胞が存在した。

### D. 考察

本研究を遂行することにより、PBC の発症に自己抗原特異的 CD8T 細胞や CD4T 細胞等の細胞性免疫応答が密接に関連していることが明らかになった。また、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞が存在していることが明らかにされ、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC においても、自己抗原に対する T 細胞レベルでの異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。又、抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC と抗ミトコンドリア抗体陽性 PBC は、自己反応性 T 細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性 T 細胞の制御が、病態進展を抑制する可能性が示された。

### E. 結論

抗ミトコンドリア抗体陰性 PBC と抗ミトコンドリア抗体陽性 PBC は、自己反応性 T 細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性 T 細胞の制御が、病態進展を抑制する可能性が示された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) HiroTo KiTa: PBC and eosinophilia: New insight from autoantibody response. Hepatol Res 32:12-13, 2005
- 2) HiroTo KiTa: A role of NKT cells in HCV

infection and development of hepatocellular carcinoma: Are they protective or destructive? Hepatol Res 32:197-199, 2005

- 3) HiroTo KiTa: Family study in PBC as a clue to the possible involvement of genetic and environmental factors. Hepatol Res 33: 5-6, 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, (分担執筆), 2005, 52-59
- 5) 喜多宏人, 宮川浩, 上野義之, 稲森英明, 磯田憲夫, 小野和則, 佐藤慎, 砂田富美子, 井戸健一, Gershwin ME, 井廻道夫, 菅野健太郎: 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, マイライフ社: 36-39, 2005
- 6) 喜多宏人: PBC 消化器疾患の分子生物学 分子消化器病. 先端医学社 2:49-54, 2005

### 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. パネルディスカッション 11, 自己免疫性消化器疾患の病態と診断と治療の新しい展開, 第 91 回日本消化器病学会総会, 東京, 2005. 4. 14-16

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

## PBC モデルマウスの作製に関する研究

分担研究者 松浦 栄次 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻  
病態機構学講座細胞化学分野 助教授

**研究要旨：**平成17年度より、マウスにおけるPDC-E2に対する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導と原発性胆汁性肝硬変(PBC)モデルの開発を目的として研究を開始した。具体的には、以下の実験を計画し実施中である。ヒトHLA-A0201遺伝子を導入(ノックイン)したトランスジェニックマウス(HHDマウス)、雌性、6週齢をPDC-E2(159-167)ペプチドあるいはホスファチジルエタノールアミン修飾ペプチドをCFAおよびMDP含有リポソームを用いて免疫しCTLを誘導する。CTL活性検討には、PDC-E2(1-414)遺伝子をpIRES2-EGFPに導入し、HLA-A0201マウス由来RMA-HHD細胞へのトランスフェクション後、GFPおよびネオマイシンでセレクションを行うことで樹立したPDC-E2(1-141)/HLA-A0201安定発現株を用いる。免疫マウスの肝臓の病理標本を調製し、胆管の周囲における様々な単核球細胞、特に、CD4陽性、 $\alpha\beta$ TCR陽性T細胞や種々のリンパ球の集簇・浸潤を観察する。

### A. 研究目的

「マウスにおけるPDC-E2に対する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導と原発性胆汁性肝硬変(PBC)モデルの開発」

本年より、当該難治性疾患克服研究事業の研究分担を開始したため、研究目的、現在までの研究結果に合わせて今後の実施計画を記載する。

本研究は、米国カリフォルニア大学デイビス校のM. Eric Gershwin教授、Patrick SC Leung博士、仏国パスツール研究所 Francois Lemonnier博士、埼玉医科大学微生物学講座赤塚俊隆教授、松井 政則博士との共同で実施している。

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、難治性の肝臓特異的な自己免疫疾患であり、炎症を伴った肝内胆管損傷が病理学的特徴である。破壊された胆管の周囲には様々な単核球細胞、特に、CD4陽性、 $\alpha\beta$ TCR陽性T細胞、胆管上皮には、種々のリンパ球の集簇・浸潤が見られる。

PBC患者では、発症のかなり以前より血中の抗ミトコンドリアドリア抗体(AMA)が出現すると共に、総IgM抗体量の上昇が見られる。また、圧倒的に女性に発症することも知られている。PBC患者末梢血中に出現するAMAは、ミトコンドリアに存在するピルビン酸脱水素酵素複合体のE2コンポーネント(E2 component of pyruvate dehydrogenase complex; PDC-E2)を認識していることが明らかになっている。Van de WaterらやShimodaらにより、CD4陽性T細胞

のエピトープがPDC-E2の163-176番目のアミノ酸配列であること、また、AmanoらによりAMAの認識するエピトープ(B細胞エピトープ)がPDC-E2ペプチドの169-183番目のアミノ酸配列であり、更に、173番目のリジン(K)がリポイル化されることが認識に必須であることが示された。

ところで、Kitaらは、PBC患者末梢血単核球からCTLをクローニングしそれらのT細胞エピトープがPDC-E2の159-167アミノ酸部分であり、かつ、HLA-A\*0201に拘束性であることを報告した。

これまでの動物を用いた実験では、PDC-E2のペプチドを、アジュバンドを用いて免疫することで、AMAを容易に誘導できることは確かめられているが胆管炎を発症させるに至っていない。また、前述の通り、PBC患者末梢血単核球細胞より、PDC-E2(159-167)に特異的なCTLがクローニングされているものの、実験動物におけるCTL誘導については報告がない。PBCに関しては、現在までに、免疫学的かつ病理学的な解析が進められているものの、動物モデルが樹立されていないために、詳細な病因解明には至っていない。そのため決定的に有効な薬剤がなく、発症後はフィブラート系薬剤などで症状の進行を遅らせているのが現状である。

我々は、PBC発症モデルマウスを確立するため、パスツール研究所で作製されたHLA-A0201トランスジェニックマウスを用い、PDC-E2ペプ

チドに対する CTL を誘導することで PBC 様の胆管炎を誘導することが出来るか否かを検証することを目的とし検討を開始した。

## B. 研究方法

### 免疫

マウスは、ヒト HLA-A0201 遺伝子を導入 (ノックイン) したトランスジェニックマウス (HHD マウス)、雌性、6 週齢、を使用する。PDC-E2 (159-167) ペプチドあるいはホスファチジルエタノールアミン修飾ペプチドを CFA および MDP 含有リポソームを用いて一次免疫を皮下に行った後、複数回追加免疫を行う。コントロール群には PBS を用いる。また、PDE-E2 (1-414) の組換え型タンパク質の免疫についても検討を行う。

### サイトカインの測定

最終免疫から 2 週間後のマウス脾細胞を 24 穴プレートに播種し、PDC-E2 (159-167) ペプチドによる刺激をおこない、5 日間培養後、上清中のサイトカイン (IFN-g、IL-2、IL-4 など) を測定する。

### CTL の誘導および $^{51}\text{Cr}$ を用いた CTL 活性測定

最終免疫から 2 週間後のマウス脾細胞を 24 穴プレートに播種し、これを PDC-E2 (159-167) ペプチドによる刺激をおこない、7 日間培養する。これをエフェクタ細胞として、細胞傷害活性の検討をする。

また PDC-E2 (1-414) 遺伝子を pIRES2-EGFP に導入し、HLA-A0201 マウス由来 RMA-HHD 細胞へのエレクトロポレーションによるトランスフェクション後、GFP およびネオマイシンでセレクションを行い、PDC-E2 (1-141)/HLA-A0201 安定発現株を樹立する。これを CTL 活性検討の標的細胞として用いる。

定法に従い、標的細胞を RPMI-1640 10% FCS 100 ml に浮遊させ、 $^{51}\text{Cr}$  1.9 MBq を加え、 $\text{CO}_2$  インキュベータに 1 時間おく。3 回の洗浄の後、E/T 比が 20/1 となるように U 底 96 well plate に播種する。また自然遊離量および最大放出量を求めるために RPMI-1640 10%FCS、1% Triton-X 100 をそれぞれ標的細胞に加える。 $\text{CO}_2$  インキュベータにて 4 時間保持した後、上清 100  $\mu\text{l}$  をガンマカウンタで測定する。細胞傷害活性は次式より求める。Cytotoxicity (%) = (release in assay - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release)  $\times$  100。

### 病理的解析

処理マウスの肝臓の病理標本 (ホルマリン固定後パラフィン包埋、凍結切片) を調製し、胆管の周囲における様々な単核球細胞、特に、CD4 陽性、 $\alpha\beta$  TCR 陽性 T 細胞や種々のリンパ球の集簇・浸潤を観察する。

### (倫理面への配慮)

本研究は、主に DNA 組み換え実験が中心となる。DNA 組み換え実験、および動物実験の承認を受けて実施している。

## C. 研究結果及び考察

これまでに、Kita らにより同定された CTL エピトープおよび B 細胞エピトープを含むペプチド合成した他、免疫リポソームを作製するため、これらのペプチドとホスファチジルエタノールアミンとの複合体を作製した。

これらのペプチド含有リポソーム (LPS) リポソームの高脂血症モデルマウスである *ApoE*<sup>-/-</sup> マウスへの免疫でペプチド抗体が誘導されたと共に、蛍光物質を封入したリポソームを用いる抗原特異的抗体の定量系を確立した。

現在、CTL 活性測定のための標的細胞の調製を開始している。実際には、PDC-E2 (1-414) 遺伝子 (J Exp Med 195:113, 2002) と標的細胞である RMA-HHD (J Virol 78:9093, 2004)、RMA-S-HHD (TAP1 deficient cell line)、EL4 (S3)-HHD (J Exp Med 185:2043, 1997) を用いて stable line を作製する。

この様に、HLA-A0201 (HHD) トランスジェニックマウスを用いれば、マウスでヒトと同様のエピトープを認識する CTL が誘導されることが期待される。

しかしながら、仮に CTL が誘導されたとしても、胆管炎を発症するかは不明である。二次的な targeting が必要な可能性もあり、*apoE*<sup>-/-</sup> マウスや *ldlr*<sup>-/-</sup> とのバッククロスを行う他、ホスファチジルセリン含有リポソームによる肝臓へのターゲティングについても検討する。

一方、PBC では細菌感染、免疫寛容の崩壊、あるいは単染色体症が発症要因として不可欠であるかも知れない。*Novosphingobium aromaticivorans* は、グラム陰性の好気性細菌で、土壌、水中、海岸の自然沈殿まで広範に存在している。*N. aromaticivorans* は PDC-E2 と高いホモロジーを持つタンパクを有しており、PBC 患者血清がこのタンパクに対して反応することが報告された。このことから、*N. aromaticivorans* に対する免疫応答がトレラン