

(1) 生体肝移植を受けた原発性胆汁性肝硬変の profile に関する研究
(2) 原発性胆汁性肝硬変の進行における自然免疫応答の関与の解明と
その制御による新規治療法開発に関する研究

分担研究者 市田 隆文 順天堂大学医学部附属静岡病院・消化器内科 教授

研究要旨(1)： わが国の生体肝移植レシピエントを調査し、特に自己免疫性肝疾患として原発性胆汁性肝硬変 221 例を中心に検索した。その結果、生体肝移植の移植成績は 5 年生存率 75%と良好であり、原発性硬化性胆管炎や自己免疫性肝炎も同様であった。原発性胆汁性肝硬変の再発は組織学的には 70 例中 7 例（10%）であることが判明したが、特異的な自己抗体である抗糸粒体抗体 (AMA) の再陽性率は 70%前後であった。さらに、この頻度をドナーとレシピエント間で血縁、非血縁者間で比較検討すると、非血縁者での AMA 陽性率は HLA クラス I の B locus の一致が深く関与していることが統計学的に示唆された。

研究要旨(2)： 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の標的臓器である肝臓内のリンパ球解析により、無症候性 PBC (aPBC) 症例と比較して肝移植に至った症候性 PBC (sPBC) 症例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加しており、免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。PBC の進行には FasL を発現した NKT 細胞による Fas-FasL 系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害など、自然免疫応答の活性化が関与している可能性がある。また、aPBC 末梢血単核球は分離直後の無刺激の状態ですでに活性化マーカーの発現や NF- κ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられたが、peptidoglycan や lipopolysaccharide による Toll 様レセプター (TLR) 刺激後のサイトカイン産生が健常人に比べて有意に高値であり、PBC の病態には TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している可能性が示唆された。PBC では aPBC 症例でもエンドトキシン血症が認められるという報告もあり、腸管滅菌などによるエンドトキシン血症の改善を含めて TLR を介した自然免疫系の活性化を抑制することが、PBC 進行を抑制する治療になりうるかどうか、また、TLR を介した刺激に対して高反応となる機序の解明とその制御による新規治療法の開発を目指したいと考えている。

共同研究者：

山際 訓, 本田 穰
新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器内科学

A. 研究目的

(研究 1) 生体肝移植を施行した自己免疫性肝疾患を集計し、特に原発性胆汁性肝硬変における背景を検索し再発機序を検討することにより、難治性肝疾患としての原発性胆汁性肝硬変の病態解明を目的とした。

(研究 2) 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別・予測と、その進行阻止は重要である。PBC の病因としてはミトコンドリア抗原や胆管に

対する自己免疫反応、特にミトコンドリア抗原に対する自己反応性 T 細胞の活性化や clonal expansion が重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。しかしながら、無症候性 PBC 症例が多数存在することを考慮すると、PBC 病態の進行のためには、他のさまざまな因子の関与が必要と考えられる。その様な病態持続・進行因子として、自然免疫による病態修飾の可能性が示唆されている。

本研究においては、自然免疫応答による PBC 病態修飾の可能性、特に肝臓に豊富に局在する NK 細胞や NKT 細胞など自然免疫応答の中心となるリンパ球の関与とともに、自然免疫系における微生物病原体の構成成分の認識に重要な Toll 様レセプター (TLR) を介した自然免疫系活性化

の関与について検討することを目的とし、最終的に自然免疫応答の制御による PBC 進展阻止を目指した新たな治療法の開発を目標とした。

B. 研究方法

(研究1)わが国における生体肝移植の実態調査を日本肝移植研究会の資料を基に独自のアンケート調査を施行し、特に原発性胆汁性肝硬変の症例を集積し、移植成績は元より進行性原発性胆汁性肝硬変へ進展する因子としての総ビリルビン値、合併症 (osteoporosis, pruritus, varics、肝臓の血流動態異常、HLA class I、II、さらには肝移植に至った経過としての発病から移植までの期間 (症候性になってからの期間) や移植を実施するにあたっての障害、問題 (移植後の状態、QOL、移植後の医療費、医療費を含めての負担、家族的、社会的、精神的問題) を検索し、今回特に肝移植後の再発を規定する因子としての HLA class I、II や術式 (胆道再建術式) ならびに免疫抑制剤の種類などを検討した。

(研究2)

1. PBCの肝内リンパ球に関する研究

1) 対象

1999年3月から2003年12月の間に新潟大学医歯学総合病院において、十分なインフォームドコンセントを得た上で生体肝移植を施行したPBCレシピエント7例 (sPBC) とそのドナー7例 (control)、ならびに診断目的に針生検を施行した無症候性PBC症例11例 (aPBC) を対象とした。

生体肝移植レシピエントは男性2名、女性5名で移植時の平均年齢は51.4歳、何らかの肝機能異常を指摘された初発時年齢は38.3歳と若年で発症した症例が多く、初発から移植まで平均13.1年の経過であった。

aPBC症例は男性3名、女性8名で、平均年齢は56.9歳。組織学的病期分類 (Scheuer分類) ではI期が8例、II期が3例であった。

生体肝移植ドナーは男性7名で、平均年齢は22.3歳だった。

2) フローサイトメトリーによる解析

肝臓と末梢血より Ficoll-Paque による比重遠心法により分離した単核球を各種モノクローナル抗体で三重染色後、FACSscan による解析を行った。

3) 免疫組織染色

肝臓はABC法を用いた免疫組織染色により、Fas Ligand (FasL) の発現について検討した。

2. PBCにおけるTLRを介した単核球活性化の研究

1) 対象

2004年4月より2005年12月の間に新潟大学医歯学総合病院を受診された無症候性PBC (aPBC) 25例、症候性PBC (sPBC) 5例と健常人15例を対象とした。

2) 方法

十分なインフォームドコンセントにより文書による同意を得た後、末梢血より単核球 (PBMC) を Ficoll-Paque による比重遠心法にて分離した。CD14陽性細胞、NK細胞、NKT細胞におけるTLR2、TLR4発現とともに活性化マーカーであるCD83、CD69などをFACSにより解析するとともに、TLR mRNA については real-time PCR 法により定量した。また、培養上清中のTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70をcytometric beads array (CBA) により測定し、活性化したNF- κ Bを測定するため、核抽出分画におけるNF- κ B p65をELISAにより測定した。これらを分離直後の単核球および血清中と、TLR2、4のリガンドであるpeptidoglycan (PGN)、lipopolysaccharide (LPS) にて刺激後の単核球および培養上清を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

使用する生体試料 (肝組織、末梢血、リンパ球など) は、研究の目的、副作用の有無、提供者が受ける不利益の有無、プライバシーの保護等に関する十分なインフォームドコンセントを行った後、文書による同意を得られたものに限った。個人情報の保護に関する法律 (平成15年5月法律第57号) 第50条の規定にもとづき、提供された試料・個人データの利用にあたっては、安全管理のために必要かつ適切な措置を講じ、提供者及びその家族・血縁者その他の関係者の人権及び利益の取り扱いについて十分に配慮し、また解析の終了した試料は速やかに厳格に破棄した。

C. 研究結果

(研究1)

表1 生体肝移植を受けた自己免疫性肝疾患 (日本)

自己免疫性肝炎(26)	40.5 \pm 14.8(14-61)歳
原発性胆汁性肝硬変(221)	49.6 \pm 8.0(28-69)歳
原発性硬化性胆管炎(66)	31.3 \pm 14.2 (3-66) 歳
合計(313)	44.9 \pm 12.7(3-69)歳

表2 血縁ドナーとAMA陽性率/死亡率

	AMA陽性率	死亡率
非血縁者	3/32(71%)	17/58(29%)
血縁者	79/101(78%)	35/150(23%)

生体肝移植を受けた邦人原発性胆汁性肝硬変は221例に及び(表1)、その5年生存率は75%であった。原発性胆汁性肝硬変の再発を示唆する所見として血清 AMA と生検組織検索があるが、AMA 再陽性者は血縁、非血縁者間ドナーレシピエントの間連でそれぞれ71%、78%と差異はなく(表2)、死亡率も差異はなかった。一方、肝生検組織の検索で CNSDC を見出したのは70例中7例(10%)であった。これらより、原発性胆汁性肝硬変の再発は10%と考えられるが、AMA 再陽性も重要な所見であり、これらを解析すると HLA クラス I B locus の関与が関連していることが推測された。

(研究2)

1. 肝臓内NK、NKT、およびT細胞比率の変化

aPBC 症例とレシピエント sPBC 症例におけるNK、NKT、T細胞分画の比較を行った。aPBC 症例の肝組織中では、正常肝に比しT細胞比率の有意な増加 ($p < 0.01$) と、NK細胞比率の有意な減少 ($p < 0.05$) が認められたのに対し、肝移植に至った sPBC 症例の肝組織中では、aPBC 症例で減少していた NKT 細胞比率の有意な増加 ($p < 0.05$) と、T細胞比率の減少傾向が認められた。また、CD4 陽性細胞は病期の進行とともに増加が認められた。これら結果から、aPBC 症例におけるT細胞特にCD4陽性細胞の関与と、sPBC 症例におけるNKT細胞関与の可能性が示唆された。

2. NKT細胞、T細胞における co-stimulatory molecule と FasL 発現

NKT細胞におけるCD28発現は、aPBC症例と肝移植に至ったsPBC症例ともに有意な低下が認められた ($p < 0.01$)。肝移植に至ったsPBC症例ではCTLA-4を発現し活性化したCD56陽性NKT細胞が有意に増加しており ($p < 0.01$)、またFasLの発現割合も有意に増加していた ($p < 0.01$)。

3. 免疫組織染色による FasL 発現

免疫組織染色上も、肝移植に至ったsPBC症例の肝組織中でFasL陽性単核球の浸潤が認められた。

移植症例の中で、初発時(診断時)の肝生検組織が検討可能であった症例が2例あり、どちらの症例も無症候期にはFasL陽性細胞は認められなかったのに対し、移植時にはFasL陽性細胞の浸潤が認められた。以上のように、免疫組織染色においても無症候期には認められなかったFasL陽性細胞の浸潤を肝移植時に確認し、特に同一症例においても確認した。

以上のようなNKT細胞の活性化には、CD4陽

性T細胞からのTh1サイトカインや、うっ滞胆汁由来菌体成分 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) などの関与が推測される。特にPAMPsについて、マウスのサルモネラ感染に伴う肝障害においてはTLR2を介してFasL発現の増加したNKT細胞が関与していることが報告されており (Shimizu H et al. Gastroenterology 123: 1265, 2002.)、PBCの進行にもTLR2を介してFasL発現の増加したNKT細胞によるFas-FasL系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害が関与している可能性があると考えられた。

4. NK細胞、NKT細胞におけるTLRおよび活性化マーカー発現

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

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

5. TLR刺激によるサイトカイン産生

PGNおよびLPS刺激6時間後と24時間後の培養上清を用いて測定を行った結果、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-8の産生はaPBC症例で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

6. TLR刺激後の活性化NF- κ B p65測定

核抽出分画における活性化NF- κ B p65の測定ではaPBC症例は分離直後の刺激前値が高く、また刺激による活性化を認めた。以上の結果はサイトカイン産生の結果とも合致し、aPBC症例ではPGNおよびLPS刺激に対してTLRを介した活性化が健常人よりも強く認められ、このようなTLRを介した反応性の違いがPBC病態の進行に関与している可能性があると考えられた。

D. 考察

(研究1)非血縁者間の生体肝移植に於いて、移植後のAMA再陽性化は、HLA-B allotypeが一致した場合に起こりやすいことが示唆された。一方で、この傾向はHLA-DR locusでは認められなかった。

また、血縁者間の肝移植に於いては、移植後のAMA再陽性化は、全てのHLA抗原locusのallotype一致率とは関連していなかった。さらに、従来から報告されている一致したHLA-Bのタイプ(51、52)に特定のタイプは認められなく、

一致した HLA-DR のタイプに DR8 は多くないことが判明した。今回の HLA-B 抗原との関連は、HLA-B 抗原遺伝子座の極近傍に存在する TNF 多型と関係している可能性が示唆された。

(研究 2)

PBC の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別は重要である。PBC の病因としては、ミトコンドリア抗原に対する自己反応性リンパ球の活性化や clonal expansion が何らかの役割を果たしていることが強く示唆されているが、無症候性 PBC 症例が多数存在することを考慮すると、PBC 病態の進展のためには、他のさまざまな因子の関与が必要と考えられる。そのような PBC 病態の持続・進展因子として、自然免疫による病態修飾の重要性が示唆されている。Tsuneyama らは PBC における障害小胆管上皮ならびに類上皮肉芽腫における CD1d 発現の亢進を報告し、NKT 細胞を介した類上皮肉芽腫形成の可能性を指摘した (Tsuneyama K et al. *Hepatology* 1998; 28: 620.)。また、Kita らは PBC 肝組織にて対照肝に比し NKT 細胞が増加していると報告している (Kita H et al. *Gastroenterology* 2002; 123: 1031.)。本研究において行った肝臓内のリンパ球解析においても、無症候性症例と比較して、肝移植に至った症候性症例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加しており、免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。そのような NKT 細胞の活性化には、CD4 陽性 T 細胞からの Th1 サイトカインや、うっ滞胆汁由来菌体成分 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) などの関与が推測される。特に PAMPs について、マウスのサルモネラ感染に伴う肝障害においては TLR2 を介して FasL 発現の増加した NKT 細胞が関与していることが報告されており (Shimizu H et al. *Gastroenterology* 2002; 123: 1265.)、PBC の進行にも TLR2 を介して FasL 発現の増加した NKT 細胞による Fas-FasL 系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害が関与している可能性がある。

TLR はそのリガンドによる活性化の結果、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-12 など) や補助機能分子 (CD40、CD80、CD86 など) の発現が誘導される。aPBC 末梢血単核球は分離直後の無刺激の状態ですでに活性化マーカーの発現や NF- κ B p65 が高値を示し、活性化状態にあると考えられたが、PGN、LPS 刺激後のサイトカイン産生が健常人に比べて有意に高

値であり、PBC の病態初期には TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している可能性が示唆された。同様の結果は、Mao らによっても報告されており (*Hepatology* 2005; 42 (4): 802.)、彼らは我々が検討した TLR2 と TLR 4 以外の TLR を介した刺激に対する反応性も、PBC 症例では高いことを報告している。PBC では aPBC 症例でもエンドトキシン血症が認められるという報告もあり、腸管滅菌などによるエンドトキシン血症の改善を含めて TLR を介した自然免疫系の活性化を抑制することが、PBC 進行を抑制する治療になりうるかどうか、また、TLR を介した刺激に対して高反応となる機序の解明とその制御を目指し、更なる研究の継続が求められる。現在、PBC 症例の単核球が TLR 刺激に高反応となる機序を解明すべく、TLR を介したシグナル伝達経路、特に TLR のアダプター分子である MyD88 やシグナル伝達を阻害する IL-1R-associated kinase (IRAK) などとともに LPS の反応性に関与する分子群について検討を行っており、今後、TLR 刺激に対する高反応性の機序を解明することにより、それを標的とした新規の治療法の開発につながる可能性があると考えている。

E. 結論

(研究 1) 原発性胆汁性肝硬変の生体肝移植の成績は良好で、その再発率は 10%前後と考えられた。しかし病態に関与する自己抗体の AMA の再陽性は HLA クラス IB locus との一致が特に非血縁者で認められたことは、病態解明に寄与するものと考えられた。

(研究 2) PBC の進行には FasL を発現した NKT 細胞による Fas-FasL 系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害など、自然免疫応答の活性化が関与している可能性があり、その機序のひとつとして TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している可能性が示唆された。PBC では aPBC 症例でもエンドトキシン血症が認められるという報告もあり、腸管滅菌などによるエンドトキシン血症の改善を含めて TLR を介した自然免疫系の活性化を抑制することが、PBC 進行を抑制する治療になりうるかどうか、また、TLR を介した刺激に対して高反応となる機序の解明とその制御による新規治療法の開発を目指した基礎研究が今後も必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 市田隆文：肝移植時の B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルス再感染の予防と治療. 肝胆膵 2003;47(5):715-724
- 2) Ichida T: Artificial liver support system for fulminant hepatic failure as bridge-use to living donor liver transplantation. Internal Med 2003, 42(10):920-921
- 3) 市田隆文：生体肝移植-EBM から将来へ、肝疾患の新しい展開. 第 7 回大塚リバーシンポジウム記録, メディカルレビュー社, 大阪, 81-89
- 4) 市田隆文：生体肝移植におけるドナー選択のピットホール. 今日の移植 2003, 16(5):440-450
- 5) 市田隆文：バイオ人工肝臓の臨床成績と適応. 細胞, 2003, 35(12):456-458
- 6) 市田隆文：原発性胆汁性肝硬変. ダイナミックメディスン 4, 下条文武, 斎藤康監修: 西村書店, 新潟, 2003. 15-39
- 7) Sato Y, Ichida T, Watanabe H, Yamamoto, Oya H, Nakatsukasa H, Kobayash T, Watanabe T, Kameyama H, Hatakeyama K: Repeated intraportal donor specific transfusion may induce tolerance following adult living related donor liver transplantation. Hepatogastroenterology 2003;50:601-606
- 8) Sato Y, Ichida T, Watanabe H, Yamamoto S, Abo T, and Hatakeyama K. Macrochimerism of donor type CD56⁺CD3⁺ T cells in donor specific transfusion via portal vein following living related donor liver transplantation. Hepatogastroenterology. 2003; 50(54): 2161-5.
- 9) 市田隆文, 石川雅邦, 渋谷智義, 小川薫: 原発性胆汁性肝硬変. 外科 2004, 66(9):1055-1060.
- 10) 市田隆文, 島田裕慈, 石川雅邦, 渋谷智義, 小川薫: 原発性硬化性胆管炎と原発性胆汁性肝硬変の肝移植と再発問題. 肝胆膵 2004;49(2):251-255
- 11) Miyakawa R, Ichida T, Yamagiwa S, et al: Hepatic natural killer and natural killer T cells markedly decreased in two cases of drug-induced fulminant hepatic failure rescued by living donor liver

transplantation. J Gastroenterol Hepatol 2005, 20(7):1126-30

- 12) 山際 訓, 本田 穰, 高村昌昭, 松田康伸, 市田隆文: Toll-like receptors: PBC 病態形成への関与. 肝胆膵 2005, 51(4):565-572

2. 学会発表

- 1) Ichida T: Living donor liver transplantation for autoimmune hepatitis in Japan. The Second Single Topics Conference of Japanese Society of Hepatology. Otsu, Shiga, 2004. 10. 13
- 2) 石本結子, 市田隆文, 山際訓, 佐藤好信, 渡部久実, 安保徹, 青柳 豊: 生体肝移植症例における原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球解析. 第 39 回日本肝臓学会総会. 福岡, 2003. 5. 22
- 3) 石本結子, 市田隆文, 山際訓, 佐藤好信, 渡部久実, 安保徹, 青柳 豊: 生体肝移植症例における原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球解析. 第 17 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 東京, 2003. 12. 14
- 4) Ishimoto Y, Ichida T, Yamagiwa S, et al.: FAS-L⁺CD56⁺CD3⁺ cells significantly increase in the liver of patients with late stage primary biliary cirrhosis (PBC) compared with early stage PBC: possible involvement in the disease progression. PBC フォーラム. 大村, 2004. 9. 18
- 5) 本田 穰, 山際 訓, 青柳 豊, 松田康伸, 石本結子, 高村昌昭, 野本 実, 市田隆文: 原発性胆汁性肝硬変における Toll 様レセプターを介した単核球活性化の検討. 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。) なし

原発性胆汁性肝硬変における PPAR α の発現

分担研究者 伊東 正博 国立病院機構長崎医療センター 研究検査部長

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

結果：①進行例と非進行例で初回生検が同じ Scheuer stage でも interface hepatitis や炎症スコアが高い症例が進行群に有意に多くみられ、炎症要素が強いほど進行することが予測された。②PPAR α は病変が進行するに従って肝細胞の細胞質・膜発現が亢進していたが、核内移行は少数例にしかみられなかった。肝細胞内 catalase 発現は PBC の進行症例で低下していた。③mRNA レベルでも PPAR α の発現は亢進していた。④肝細胞培養実験で、PPAR α は分裂、増殖する細胞の核内に限局した発現がみられ、48 時間培養で核、細胞質に発現がみられた。Bezafibrate 添加群で PPAR α の発現は亢進し、細胞増殖効果、catalase 発現亢進が観察された。⑤Ubiquitin は進行した PBC で有意に発現亢進がみられた。HSP90 α は進行した PBC で核内発現が広く観察された。考察：Fibrate の受容体である PPAR α の発現は進行した PBC 症例で蛋白レベル、mRNA レベルで亢進していたが、PPAR α の核内発現を伴っていなかった。PPAR α が間細胞内で分解されずに安定化している要因として、核内移行抑制に作用する HSP90 α の発現亢進、蛋白分解を司る ubiquitin 蛋白の異常蓄積が考えられた。PBC における PPAR α 発現に関する一部を明らかにすることができた。フィブレート系の薬剤は進行した PBC 症例の PPAR α のリガンドとして、理論的に適当な治療薬であることが示唆された。今後、進行した PBC 症例の治療薬として安定的に蓄積した PPAR α を効率的に活性化する分子・製剤の開発が期待される。

A. 研究目的

PBC には無症候性症例と進行性症例が存在し、進行性症例にはウルソ抵抗性で肝不全や肝移植が必要になる症例が散見される。ウルソ抵抗性症例には PPAR α のリガンドであるフィブレート系の薬剤が選択される場合が多く、PPAR α には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用などが知られている。本研究ではフィブレート系の薬剤選択の理論的根拠を検討する目的で、PBC における PPAR α とその発現調節機構や肝細胞内酸化酵素の発現を検討した。

B. 研究方法

①組織学的解析

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

維化、銅沈着、肉芽腫形成、胆管消失などをスコア化し判定量的な解析を 2 名の病理医、肝臓専門医で施行した。

②免疫組織化学

パラフィン包埋切片を用い PPAR α 、catalase、CK7、Tol4、Ubiquitin、HSP90 α の発現を PBC、CHC、CHB、AIH、正常肝で比較検討した。培養細胞を用い PPAR α 、catalase の発現を検討した。

③レーザーマイクロダイセクション (LCM) による mRNA 解析

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

④培養細胞レベルでの機能解析

胎児肝から樹立した Primary Human Hepatocyte (PHH)、胆管細胞由来の BEC を用い、

LTB4、Bezafibrate 添加による細胞増殖能、PPAR α の発現、catalase 発現を検討した。

C. 研究結果

①進行例と非進行例で初回生検が同じ Scheuer stage でも piecemeal necrosis や炎症スコアが高い症例が進行群に有意に多くみられ、炎症要素が強いほど進行することが予測された。CNSDC や肉芽腫の程度は病変進行と関連はみられなかった。

②PPAR α は病変が進行するに従って肝細胞の細胞質・膜発現が亢進していたが、核内移行は少数例にしかみられなかった。他の慢性肝疾患に比し PBC では PPAR α の膜、細胞質発現は高かった。肝細胞内 catalase 発現は PBC の進行症例で低下していた。Ubiquitin は進行した PBC で有意に発現亢進がみられた。HSP90 α は進行した PBC で核内発現が広く観察された。

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

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

D. 考察

PPAR α には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、抗アポトーシス作用があることが知られている。Fibrate の受容体である PPAR α の発現は進行した PBC 症例で蛋白レベル、mRNA レベルで亢進していたが、PPAR α の核内発現を伴っていない。PPAR α はリガンド刺激や自己リン酸化で核親和性が亢進しレチノイド X 受容体と dimer を形成し、プロモーター領域の PPRE に作用しさまざまな酵素類の転写を調節している。PBC では PPAR α の発現は亢進しているが、核内で転写促進には至っていない。PPAR α が間細胞内で分解されずに安定化している原因に核内移行抑制や分解抑制に関する分子の検討を行ったところ、核内移行抑制に作用する HSP90 α の発現増強、蛋白分解を司る ubiquitin 蛋白の異常蓄積が観察された。進行した PBC の PPAR α の発現は亢進状態に fibrate 製剤を投与すると、PPAR α の核内移行が誘導され、様々な生理作用が連鎖し PBC の炎症反応が抑制されることが推察された。肝細胞培養実験で Bezafibrate による PPAR α の核内発現、

細胞増殖、catalase 発現亢進が確認され、進行した PBC 症例では Bezafibrate の効果が得られやすい状態にあると推察された。Catalase は PPAR α により誘導された β 酸化により産生された過剰な過酸化水素を分解する役割を担っている。過酸化水素は脂肪酸やアルコールなどの β 酸化を効率的に行うのに重用な分子であるが、過剰の過酸化水素は細胞毒として存在し、星細胞を活性化し線維化を促進することが知られている。進行した PBC 症例では肝細胞内 catalase が低下しており、Bezafibrate の一つの効果に catalase 発現亢進を介する線維化抑制が挙げられる。さらに Bezafibrate による細胞増殖作用は傷害部位の肝細胞再生を誘導していることが推察される。

E. 結論

PBC における PPAR α 発現に関する一部を明らかにすることができた。今後、進行した PBC 症例の治療薬として安定的に蓄積した PPAR α を効率的に活性化する分子・製剤の開発が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito M, Ishibashi H. Interobserver variation in assessing small bile duct lesions in PBC, CVH, and AIH. *J Gastroenterol*, 2005;40:223-224
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*, 2005;42:386-392
- 3) 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, 2005;85:908-920

2. 学会発表

- 1) 瀧井 康, 中村 稔, 伊東正博, 横山照史, 吉田由紀, 小森敦正, 右田清志, 植木俊仁, 大黒 学, 八橋 弘, 原田実根, 石橋大海: LCM を用いた PBC のサイトカインと Toll-like receptor (TLR) 遺伝子解析. 第 93 回日本病理学総会, 札幌. 2004. 6. 9-11
- 2) 瀧井 康, 中村 稔, 伊東正博, 小森敦正, 右田清志, 藤岡ひかる, 八橋 弘, 原田実根, 石橋大海: 肝生検組織を用いた原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における Toll-like receptors (TRLs) と type 1 IFN についての解析. 第 94 回日本病理学会総会, パシフィコ横浜. 2005. 4. 14-16
- 3) Nakamura M, Takii Y, Mori T, Komori A, Yokoyama T, Ito M, et al. Anti-gp210 antibody in combination with anti-centromere antibody may identify PBC patients who are at high risk for end-stage hepatic failure. AASLD abstract #678, SF, USA. November 13, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

原発性胆汁性肝硬変の胆管病変発生における
ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR) γ の関与
- PPAR γ リガンドを用いた分子標的薬剤の開発 -

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)の病因または病態形成における菌体成分の関与を解明し、胆管炎を軽減する治療法について検討した。その結果、ヒト肝内胆管にはToll様受容体(TLR)関連の自然免疫機構が存在し、またペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR) γ が胆道系自然免疫の重要な抑制因子として作用していた。しかし、PBCの胆管ではTh1型優位なサイトカイン環境によるTLR感受性亢進およびPPAR γ の発現低下が見られ、胆管炎の増悪に関与していることが示唆された。さらに、PPAR γ リガンドにてTLR刺激由来のNF- κ B活性化を抑制することができ、さらにMRL/lprマウスの胆管炎も軽減することができ、PPAR γ リガンドがPBCの新たな治療薬として期待された。

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、微生物菌体成分や外来異物に対する異常な免疫反応の関与が示唆されている。しかし、菌体成分と胆管病変との関連性については不明である。今回、胆管細胞と菌体成分との直接的な相互作用を検討するため、①ヒト胆管細胞における菌体成分認識受容体 Toll-like receptor (TLR) および関連分子の発現と機能的解析、②TLR 発現と pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) 感受性におけるサイトカイン環境の影響、③抗炎症作用を示すペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR) γ の発現、④自己免疫疾患自然発症モデルであるMRL/lprマウスを用いた PPAR γ リガンドの抗炎症作用について検討し、PBC胆管炎の発生と胆道系自然免疫との関連性、さらにPBCの新たな治療法について検討した。

B. 研究方法

- 1) 対象：培養細胞としてヒト肝内胆管由来培養細胞3株を樹立した。またヒト肝組織として、PBC(1~3期)と対照疾患のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。
- 2) TLR, TNF- α , PPAR γ の検出：TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, MD2, TNF- α , PPAR γ を検出す

るため、RT-PCR法および免疫組織化学的染色を施行した。

- 3) NF- κ B-DNA binding assay：PAMPsに対する培養細胞の反応性を細胞内シグナルの主要伝達分子であるNF- κ Bの活性化にて評価した。培養細胞から核成分のみを抽出し、NF- κ BとコンセンサスDNAとの結合能を測定した。
- 4) PAMPsとサイトカインによる刺激：TLRのリガンドとなるPAMPsとしてペプチドグリカン(TLR2)およびLPS(TLR4)(最終濃度1 μ g/mL)、またリコンビナントサイトカイン(IL4, IL6, IFN- γ , TNF- α)(1000U/mL)を培養上清に添加し、刺激後の培養細胞をNF- κ B-DNA binding assayとRT-PCR解析に供した。
- 5) IFN- γ , PPAR γ リガンドによる前処置とPAMPs刺激に対する反応性：IFN- γ およびPPAR γ の内因性リガンド(15d-PGJ2)で、各々36時間と4時間前処置後、PAMPsに対する感受性の変化をNF- κ B活性とTNF- α mRNA産生(real time-PCR法)にて評価した。
- 6) MRL/lprマウスと15d-PGJ2投与方法：18~20週齢のMRL/lprマウスを対象に、15d-PGJ2投与群(400mg/kg/日または1,000mg/kg/日の腹腔内投与)、トログリタゾン投与群(0.2%混餌投与)と各々の対照群を作成し、15d-PGJ2およびトログリタゾンの効果を組織学的に評価した。

C. 研究結果

- 1) 胆管細胞における TLR の発現と機能解析: ヒト培養胆管細胞は TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, MD-2, CD14 mRNA を恒常的に発現していた。また、ヒト肝組織内での肝内胆管は TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 をびまん性に発現していた。培養細胞を PAMPs (ペプチドグリカン, LPS) で刺激した結果、NF- κ B の活性化と TNF- α mRNA の発現が誘導された。
- 2) 胆管細胞の自然免疫におけるサイトカインの影響: 胆道系自然免疫におけるサイトカインの影響を検討した。まず、培養胆管細胞をサイトカインで刺激した結果、IFN- γ 刺激で TLR2 mRNA 発現を 3.5 倍に、TLR3, TLR4, TLR5 の発現を 2.0~2.3 倍に亢進させた。また、TNF- α は TLR2 を 3.9 倍に発現亢進させた。さらに、IFN- γ による前処理により PAMPs 刺激による NF- κ B の活性化が亢進し、IFN- γ は菌体成分刺激による NF- κ B の活性化を相乗的に亢進させた。
- 3) 肝組織内における PPAR γ の発現とサイトカインによる PPAR γ 発現の変化: 肝内における PPAR γ の発現を検討した結果、PPAR γ は主に肝細胞と胆管細胞の細胞質にみられたが、PBC の障害胆管ではしばしば発現の低下が見られた。また、培養胆管細胞にサイトカインで刺激後、経時的に PPAR γ mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価した結果、IL-4 (Th2 型) 刺激後 3 時間目から PPAR γ mRNA 発現が亢進し、その後発現量が漸減した。IFN- γ (Th1 型) 刺激では刺激後 12 時間まで明らかな変化を認めなかったが、24 時間後には有意に PPAR γ の発現低下が見られた。
- 4) LPS 誘導性炎症反応に対する PPAR γ リガンドの抗炎症効果: PPAR γ リガンドを用いた胆道系自然免疫の制御を PBC 治療に応用する為、培養胆管細胞を用いて 15d-PGJ2 の抗炎症効果を検討した。その結果、培養胆管細胞の NF- κ B 活性は LPS 刺激にて 13.8 倍に亢進したが、15d-PGJ2 の前処置を加えることにより 3.3 倍にまで活性が押えられた。また、TNF α mRNA 産生は LPS 刺激で 29 倍に亢進したが、15d-PGJ2 の前処置を加えることにより 2.2 倍にまで抑制された。
- 5) MRL/lpr マウスでの PPAR γ リガンドの抗炎症効果: *in vivo* の胆管炎に対して PPAR γ 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。諸臓器

における炎症を組織学的に観察した結果、15d-PGJ2 投与(400mg/kg)で唾液腺炎、間質性肺炎、脾炎の軽減傾向が見られたが、胆管炎、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。しかし、15d-PGJ2 増量投与(1,000mg/kg)で胆管炎がやや軽減する傾向があり、また胆管炎を全く認めない個体も見られた。また、*in vivo* の胆管炎に対して PPAR γ リガンドが有効であるデータを得つつある。

D. 考察

TLR による自然免疫機構はマクロファージなどの免疫担当細胞のみならず腸管などの上皮系にも存在し、上皮細胞自身も感染防御に加担していることが示されている。今回の検討にて、ヒト胆管細胞は機能的な TLR を発現しており、胆道系自然免疫の存在が証明できた。

近年 クロウン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患で、自然免疫の破綻または異常が病態形成に関与していることが明らかとなっている。また、サイトカインは自己免疫性疾患の発生、進展に重要な役割を果たし、特に CD4 陽性 T 細胞からなる Th1/Th2 バランスの異常が重要である。PBC の障害胆管周囲では Th1 型サイトカインが優位な状態であり、Th1 型サイトカインが胆管障害に関与していると考えられている。今回、胆道系自然免疫におけるサイトカインの影響を検討した結果、胆管細胞における TLR の発現は Th1 型サイトカインである IFN- γ にて亢進し、また PAMPs に対する感受性も亢進した。このことより PBC 胆管周囲での Th1 型サイトカインへの偏位は、胆管細胞における菌体成分に対する感受性を亢進させ、NF- κ B の活性化を介した炎症性サイトカインの産生亢進が胆管炎の発生に加担していると推測された。

PPAR γ は脂肪細胞分化と糖代謝に関わる核内転写因子であるが、また NF- κ B 活性化を抑制することにより抗炎症作用も示す。近年、潰瘍性大腸炎の腸管上皮で PPAR γ 発現の低下が見られることが報告され、PPAR γ による抗炎症作用の低下が疾患の病態形成に関与していると推測されている。今回、肝内における PPAR γ の発現を検討した結果、PBC の障害胆管ではしばしば発現の低下が見られた。また、IFN- γ (Th1 型) 刺激 24 時間後には培養胆管細胞の PPAR γ 発現を低下させた。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 γ 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ことが示唆された。

PPAR γ リガンドは、糖尿病治療薬として使用されたチアゾリジン誘導体（トログリタゾン）の他、内因性リガンドとしてアラキドン酸カスケードの prostaglandin 代謝産物 (15d-PGJ2) が知られている。PPAR γ リガンドを用いた胆道系自然免疫の制御を PBC 治療に応用する為、培養胆管細胞を用いて 15d-PGJ2 の抗炎症効果を検討した。その結果、培養胆管細胞の NF- κ B 活性は LPS 刺激にて 13.8 倍に亢進したが、15d-PGJ2 の前処置を加えることにより 3.3 倍にまで活性が押えられた。また、TNF α mRNA 産生は LPS 刺激で 29 倍に亢進したが、15d-PGJ2 の前処置を加えることにより 2.2 倍にまで抑制された。この結果より、15d-PGJ2 は培養胆管細胞における LPS 誘導性 NF- κ B の活性化および TNF- α mRNA の産生亢進を有意に抑制し、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。

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。諸臓器における炎症を組織学的に観察した結果、高濃度 15d-PGJ2 腹腔内投与 (1mg/kg) で胆管炎がやや軽減する傾向があり、また胆管炎を全く認めない個体も見られた。また、トログリタゾンの混餌投与でも胆管炎を軽減する傾向が見られ、*in vivo* の胆管炎に対して PPAR γ リガンドが有効であるデータを得つつある。

E. 結論

ヒト肝内胆管系における自然免疫機構の制御に胆管周囲のサイトカインネットワークおよび PPAR γ が関与していることが示唆され、異常な自然免疫現象が PBC の胆管病変形成に加担していると推測された。また、PPAR γ リガンドが PBC の新たな治療薬として期待された。

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- γ accelerates NF- κ 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 γ in biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. Hepatology 2005, 41(6):1329-1238
- 3) Harada K, Ohba K, Ozaki S, Isse K, Hirayama T, Wada A, Nakanuma Y. Peptide Antibiotic Human Beta-Defensin-1 and -2 Constitute Antimicrobial Defense in the Intrahepatic Biliary Tree. Hepatology. 2004, 40(4):925-932
- 4) Harada K, Ohira S, Isse K, Ozaki S, Zen Y, Sato Y, Nakanuma Y. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. Lab Invest. 2003, 83(11):1657-67
- 5) 原田憲一, 中沼安二. 細菌/ウイルス感染と PBC. 肝胆膵 2004, 49(2):147-157
- 6) 原田憲一, 中沼安二: Biliary cell lineage. 2. 自然免疫の観点から. 肝臓 2004; 45(12): 642-645

2. 学会発表

- 1) Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Endotoxin Tolerance and its Molecular Mechanism in Human Intrahepatic Biliary Epithelial Cells. 56th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) San Francisco, USA, 2005
- 2) Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Expression of apoptosis-related molecules and their regulation by pathogen-associated molecular patterns in human intrahepatic biliary epithelial cells. 56th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) San Francisco, USA, 2005
- 3) 原田憲一, 一瀬久美子, 中沼安二: 原発性胆汁性肝硬変の肝内胆管上皮での菌体成分誘導性アポトーシス関連分子の発現: 培養胆管上皮細胞を用いた検討. 第 42 回日本消化器

免疫学会総会. 東京, 2005. 8

- 4) 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
- 5) 原田憲一, 一瀬久美子, 中沼安二: 原発性胆汁性肝硬変の胆管炎発生における PPAR γ の関与. 第 41 回日本消化器免疫学会総会. 大津, 2004. 7
- 6) 原田憲一, 一瀬久美子, 尾崎聡, 中沼安二: 培養胆管上皮細胞におけるエンドトキシントランスの誘導. 第 8 回日本肝臓学会大会. 2004
- 7) 原田憲一, 一瀬久美子, 中沼安二: 胆管上皮細胞における Toll-like receptor 4 の発現調節機構 -培養系を用いた検討-. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003
- 8) 原田憲一, 一瀬久美子, 太平周作, 中沼安二: 胆管細胞のリポポリサッカライド反応性における胆汁酸の影響. 第 16 回西日本臨床胆汁酸研究会. 2003
- 9) 原田憲一, 一瀬久美子, 中沼安二: 胆管細胞におけるヒト β -defensin 2 の発現機序. 第 29 回日本病理学会総会. 2003
- 10) 原田憲一, 尾崎聡, 一瀬久美子, 中沼安二: 菌体成分による培養胆管細胞での誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現誘導. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

PBCの病態形成における Wnt シグナル伝達の関与

分担研究者 田中 篤 帝京大学医学部内科 講師

研究要旨： 研究者は以前、原発性胆汁性肝硬変（PBC）肝内に Wnt2B 遺伝子が過剰発現していることを報告し、PBC の病態形成に Wnt シグナルが関与している可能性を示した。本研究ではまず、1) real-time PCR によって多くの PBC 進行例で Wnt2B 遺伝子の発現が増強していることを示し、2) さらに免疫組織染色によって Wnt シグナル伝達経路の下流に位置する β -catenin が PBC 肝では細胞質ないし核内に存在し、Wnt シグナル伝達経路活性化されていることを明らかにした。これらの結果、および近年の報告から、PBC 肝内で Wnt シグナル伝達が胆管上皮細胞の分化・再生に関わっ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）は肝内の胆管上皮細胞が特異的に障害される疾患であるが、障害の機序は不明である。我々は以前、PBC の胆管上皮細胞で Wnt2B 遺伝子が過剰発現していることを見出したが、これは胆管障害に Wnt シグナルがかかわっている可能性を示唆している。本研究では、PBC における Wnt シグナル伝達系の関与を明らかにし、ひいては Wnt シグナル伝達系を操作することが PBC の画期的治療法になりうるか否か検討することを目的とする。

B. 研究方法

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

（倫理面への配慮）

臨床検体を採取する際には患者に対してインフォームドコンセントを行い、当該研究に用

いる旨承諾を得た。なお、当研究は遺伝子解析を伴うものであり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従って行われている。

C. 研究結果

1) Wnt-2B の定量

PBC 進行例と正常肝・PSC・HCV 肝硬変との間で Wnt-2B 量を比較すると、いずれとの比較においても有意差は認めなかった（advanced PBC vs. normal, $p=0.1549$; advPBC vs. PSC, $p=0.4339$; advPBC vs. HCV, $p=0.1473$ ）。しかし正常例と比較して有意差はなかったものの、PBC 進行例で Wnt-2B の発現が増強している症例が 3 例存在した。一方、stageII の PBC では Wnt-2B の発現が増強している症例はみられなかった。

2) β -catenin 免疫組織染色

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

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

β -catenin の細胞質・核内の存在はまったく見られなかった(0/14)。

D. 考察

近年、 β -catenin が肝の bipotential cell から胆管上皮細胞への分化に関与しているという報告がみられる (Gastroenterology 2003:202, Exp Cell Res 2004:157)。stage I・II の PBC では細胆管の旺盛な増生が観察されることが知られており、今回の結果でみられた早期例の PBC での β -catenin の活性化は、 β -catenin がこの時期の PBC 肝において、bipotential cell から胆管上皮細胞への分化を促し、細胆管の増生に関与している可能性を示唆する。しかし、Wnt-2B の発現が stage II の PBC でみられなかったことから、他の Wnt 分子が β -catenin の活性化をもたらしている可能性も考えられる。今後は in vitro の系によって β -catenin 活性化をもたらしているシグナル、および β -catenin によって転写が亢進している遺伝子の同定を進める予定である。

E. 結論

本研究では PBC 肝の胆管上皮細胞において Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の果たしている役割を解明し、この経路を操作することによって PBC の画期的治療法を見出すことを目的とするものである。現段階まで、臨床検体を用いた検討により、Wnt 遺伝子の発現が増強し、加えてその下流の β -catenin が活性化されている結果を得、Wnt シグナルが PBC での胆管病変に何らかの形で関与している可能性が示された。今後さらに詳細に解析を行い、画期的治療法の開発につなげたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka A, Tsuneyama K, Mikami M, Uegaki S, Aiso M, Takikawa H. Gene expression profiling in whole liver of bile duct ligated rats - VEGF-A expression is upregulated in hepatocytes adjacent to the portal tract -. Submitted.

2. 学会発表

1) 田中 篤, 滝川 一, 下田慎治: 原発性胆汁性肝硬変の病態形成における Wnt シグナル伝

達の関与の可能性. 第 8 回日本肝臓学会大会, 福岡. 2004. 10. 21

2) Tanaka A, Tsuneyama K, Shimoda S, Gershwin E, Takikawa H. Possible involvement of WNT signaling pathway in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston. 2004. 10. 31

3) 田中 篤, 常山幸一, 佐野直代, 高柳もとえ, 栗原裕子, 笹本貴広, 三神昌樹, 明石雅博, 長町由紀子, 上垣佐登子, 相磯光彦, 高森頼雪, 滝川 一: 胆汁うっ滞ラットにおける肝内発現遺伝子の包括的検索-胆管増殖に対する VEGF の関与の可能性. 日本肝臓学会総会, 大阪. 2005. 6. 17

4) 田中 篤, 常山幸一, 佐野直代, 高柳もとえ, 栗原裕子, 笹本貴広, 三神昌樹, 明石雅博, 上垣佐登子, 相磯光彦, 高森頼雪, 滝川一: 胆汁うっ滞ラットでは VEGF の発現が亢進している. 第 41 回日本胆道学会学術集会, 岡山. 2005. 9. 30

5) 根津佐江子, 田中 篤, 奥山周平, 中村一久, 松岡弘泰, 浅葉宣之, 佐藤悦久, 川村直弘, 中島洋, 滝川一, 高橋信一: 血中、および唾液・尿中の IgA 型 AMA と原発性胆汁性肝硬変の進展度との関連. 第 9 回日本肝臓学会大会, 神戸. 2005. 10. 6

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

胆管細胞の Bioinformatic 法を用いた解析

分担研究者 上野 義之 東北大学病院 講師

研究要旨： 平成16年度から参加し、同年度は主にプロテオーム解析を用いた手法を応用して、胆管細胞の増殖に ephrin 分子が関与することを見出した。さらにマイクロアレイ法の解析より、胆管細胞にレトロウイルスのエントリー蛋白表出がある可能性より、逆転所酵素阻害剤が PBC に対する新しい治療法として有効であるが二重盲検法を実施した。平成17年度は PBC 動物モデルからの胆管細胞を分離して Bioinformatic 手法により、新たな治療法に応用可能な表出蛋白の探索を行った。

A. 研究目的

PBC の標的細胞は胆管上皮細胞であるが、同細胞の解析は遅れており、最新の手法を用いて、その多様性や、病的分子の表出を検討することにより、新たな治療法の標的となる分子の探索を行うことを目的とした。

B. 研究方法

平成16年度は主に正常動物より分離された胆管細胞を用いて、 μ アレイ、プロテオミクス法といった最新の技術を用いて、胆管細胞特異的に発現される蛋白の探索を行った。特に胆管細胞の多様性に寄与する分子に着目し、そのうちの一つとして ephrin が挙げられることを明らかにした。また、 μ アレイ法によりレトロウイルスのエントリーに関与する蛋白が小葉間胆管特異的に発現されることを見出したため、逆転写酵素阻害剤を用いた二重盲検試験を組織し、実際の PBC 患者に投与した。平成17年度は、AMA 産生を伴う胆管炎動物モデルから胆管細胞を分離し、AMA の産生と関連する蛋白の探索を行った。

C. 研究結果

平成16年度の研究より小型胆管により優位に発現される蛋白の一つとして、EphA5 が見出された。膜蛋白である Eph 受容体 family はリガンドである ephrin 刺激によるチロシンキナーゼの活性化を介する系と、非刺激下で Eph 受容体に結合する RhoGEF 等を介する系による Rho ファミリーの調節を経て、アクチンの構築を制御していると考えられており、神経突起、血管新生、細胞の malignant transformation に関与している。NMC-S、NMC-L 上の EphA member の発現と局在を検討し、細胞運動、形態に与え

る機能を検討するために、小型、大型肝細胞上の EphA 発現を RT-PCR, direct sequence で確認し、免疫染色、共焦点レーザー顕微鏡で局在を検討した。EphA の機能の検討にはリガンドである ephrinA5-Fc キメラを用い、糸状仮足の形態を観察した。糸状仮足の形成を膜透過性の cyclic AMP analogue である N6, 2'-O-dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic (dcAMP) 刺激下で検討した。その結果、EphA8 は大型、小型の胆管細胞双方に認められたが、EphA5 は小型胆管細胞に強く発現が認められた。EphrinA5 は糸状仮足を有意に退縮させた ($p < 0.01$)。EphA5 の発現は主に糸状仮足に局在し、細胞質にも一部認められた。さらに EphA8 は細胞質と葉状仮足に認められた。dcAMP 刺激により、EphA5、EphA8 の membrane 上への translocation が認められ、小型胆管細胞の糸状仮足の伸張が認められたが、大型胆管細胞には認められなかった。

さらに、Lamivudine を用いた PBC 患者での二重盲検試験では、同剤の有効性を確認することは出来ず、実際の患者応用では困難と結論した。また、平成17年度の研究では 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

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

このように、 μ アレイによる情報をもとに、蛋白発現の網羅的検討を行うことにより、未知の胆管細胞独自のユニークな蛋白発現の探索が行える方法を確立した。さらに AMA 産生動物から得た胆管細胞の経時的変化については、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

cDNA μ アレイ法、及びその情報を加味したプロテオーム解析は、胆管細胞にユニークに発現される蛋白の網羅的検討に適しており、この技術を応用しての新たな分子・蛋白標的治療法の可能性が示唆された。したがって、平成 17 年度得られた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) Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinizy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005;128:121-37.
- 2) Marienfeld C, Yamagiwa Y, Ueno Y, Chiasson V, Brooks L, Meng F, Patel T. Translational regulation of XIAP expression and cell survival during hypoxia in human cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:1787-97.
- 3) LeSage GD, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Marucci L, Roskams T, Phinizy JL, Marzioni M, Benedetti A, Taffetani S, Barbaro B, Fava G, Ueno Y, Alpini G. Alpha-1 adrenergic receptor agonists modulate ductal secretion of BDL rats via Ca(2+)- and PKC-dependent stimulation of cAMP. *Hepatology* 2004;40:1116-27.
- 4) Gigliozzi A, Alpini G, Baroni GS, Marucci L, Metalli VD, Glaser SS, Francis H, Mancino MG, Ueno Y, Barbaro B, Benedetti A, Attili AF, Alvaro D. Nerve growth factor modulates the proliferative capacity of the intrahepatic biliary epithelium in experimental cholestasis. *Gastroenterology* 2004;127:1198-209.
- 5) Francis H, Glaser S, Ueno Y, Lesage G, Marucci L, Benedetti A, Taffetani S, Marzioni M, Alvaro D, Venter J, Reichenbach R, Fava G, Lynne Phinizy J, Alpini G. cAMP stimulates the secretory and proliferative capacity of the rat intrahepatic biliary epithelium through changes in the PKA/Src/MEK/ERK1/2 pathway. *J Hepatol* 2004;41:528-37.
- 6) 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;166:1671-80.
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) Fukushima K, Ueno Y. The bioinformatic approach for understanding the

- heterogeneity of cholangiocytes. World J Gastroenterology (in press)
- 11) 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)
- 12) 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 (in press)
- 13) 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。

1. 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 TCR $V\alpha$ 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・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 α -ガラクトシルセラミド (α -galactosylceramide: α -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 α -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、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、および $CD4^-CD8^-$ (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。

本研究では、異なる iNKT サブセットにおける、DC を介した免疫応答制御機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Monocyte (Mo)-DC の誘導

健康人ボランティアの末梢血から Ficoll を用いた比重遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を分離した。PBMCs より、CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD14 陽性細胞を分離した。分離した CD14 陽性細胞を 6 穴プレートに 2×10^6 /ml になるように調整し、100 U/ml recombinant human (rh) IL-4、および 100 ng/ml rhGM-CSF (Primmune, Osaka, Japan) を加えた 10% ウシ胎児血清 (FCS, fetal calf serum) 入り RPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で 5 日間培養したものを monocyte 由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた。

ヒト V α 24 iNKT 細胞株の樹立

健康人末梢血単核細胞 (PBMCs) より、FITC 標識抗ヒト TCRV α 24 抗体 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)、FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて TCRV α 24 陽性細胞を分離した。抗原として 10 ng/ml α -GalCer を添加した Mo-DC を抗原提示細胞とし、7-9 日おきに複数回刺激することにより、 α -GalCer 特異的ヒト V α 24 iNKT 細胞株を樹立した。さらに FITC 標識抗ヒト CD4 抗体 (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA)、抗ヒト CD8 \cdot 抗体 (Beckman Coulter)、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)、および FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて、iNKT、DN V α 24 iNKT の各サブセットを分離した。さらに、抗ヒトインバリアント NKT 細胞抗体 (clone 6B11) (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA) を用いて V α 24⁺6B11⁺CD4⁺CD8 \cdot 、および V α 24⁺6B11⁺CD4⁻CD8 \cdot の各サブセットをセルソーターを用いて精製した (JSAN cell sorter, Bay Bioscience, Japan)。分離した各 V α 24 iNKT 細胞サブセットは Flow cytometer (FACscan)、および CellQuest software (BD Biosciences) を用い

て解析、確認を行った。

CD1 分子安定発現細胞株の樹立

HeLa 細胞への CD1a、b、c、d、mock 遺伝子の導入は、Transfectam reagent (Promega, Madison, WI) を用いた lipofection 法により実施した。薬剤選択は 1000 \cdot g/ml G418 (Invitrogen) で実施した。

C1R 細胞株への各 CD1 遺伝子の導入は electroporation 法により実施した。薬剤選択は G418 (1000 μ g/ml) で実施した。約 2 週間培養の後、CD1 分子の発現を Flow cytometry にて確認した。確認には、マウス抗ヒト CD1a (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA)、CD1b、CD1c (Beckman Coulter)、CD1d 抗体 (BD Biosciences)、および FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Caltag Laboratories) を用いた。さらに CD1 分子を高発現する細胞群は、FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて分離精製した。

V α 24 iNKT 細胞増殖応答の評価

96well round bottom plate 1well あたり、各 dose の α -GalCer を添加し、irradiation (45Gy) 処理した Mo-DC (3.0×10^4) を APC として、V α 24 iNKT 細胞株 (1.5×10^4) を共培養した。48 時間培養後、1 μ Ci/well の [³H]-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 [³H]-thymidine の放射能を計測した。

V α 24 iNKT 細胞サイトカイン産生性の評価

96well round bottom plate 1well あたり、各 dose の抗原を添加し、irradiation (45Gy) 処理した 3.0×10^4 Mo-DC、あるいは CD1 分子発現細胞株 (5.0×10^4) を APC として、CD4 および DN V α 24 iNKT 細胞株 (5.0×10^4) を共培養した。一方で、固相化抗ヒト CD3 抗体、可溶性抗ヒト CD28 抗体刺激を行った。24 時間後、培養上清を回収し、ELISA 法により定量した (Pierce Endogen, Rockford, IL)。

Mo-DC におけるサイトカイン産生性、および表面分子の発現の評価

96well round bottom plate 1well につき、 α -GalCer (100 ng/ml) 添加および無添加の Mo-DC (3×10^4) と、各 V α 24 iNKT 細胞サブセット (1.5×10^4) を共培養した。その際、 α -GalCer による V α 24 iNKT 細胞の活性化に引き続く新たな蛋白合成を阻害する目的で

V α 24 iNKT 細胞を emetine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis) で処理したものも用いた (90 \cdot g/ml)。未熟 DC (iDC) の成熟を誘導する陽性コントロール刺激として、1 \cdot g/ml *Escherichia coli* LPS (serotype 055:B5, L2880, Sigma)、を用いた。上清を回収し、上清中の IL-6、IL-12 p40 (48 時間後)、IL-12 p70 (24 時間後) を ELISA 法により定量した (Pierce Endogen)。

共培養開始後の DC 上の表面分子は、FITC 標識抗ヒト HLA-DR 抗体 (G46-6)、FITC 標識抗ヒト CD40 抗体 (5C3)、FITC 標識抗ヒト CD80 抗体 (CloneL307.4)、PE 標識抗ヒト CD83 抗体 (CloneHB15e)、FITC 標識抗ヒト CD86 抗体 (CloneFUN-1) (BD Biosciences)、抗ヒト OX40L 抗体 (R&D systems) を用いて、Flow cytometry により解析した。

DC のアロ (同種異系反応) 誘導活性の評価

DC のドナーと HLA-DR が共通していないドナーの PBMCs より、CD4⁺ T cell isolation kit II、および CD45RO MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4⁺CD45RO⁻ 細胞を negative selection し、これをアロの naive CD4⁺ T 細胞として用いた。

96well round bottom plate 1 well につき、Mo-DC (1 \times 10⁴) と、各 V α 24 iNKT サブセットを共培養した。16 時間培養後、放射線照射 (45 Gy) し、アロの naive CD4⁺ T 細胞 (5.0 \times 10⁴) を加え、共培養を行った。5 日後に 1 μ Ci/well の [³H]-thymidine を添加し、さらに 14 時間後に [³H]-thymidine の取り込みを定量し、増殖応答を評価した。

分化 Th 細胞におけるケモカイン受容体の発現、および細胞内サイトカインの評価

96well round bottom plate 1 well につき、DC (1 \times 10⁴) と、各 V α 24 iNKT 細胞サブセット (5.0 \times 10³) を共培養した。16 時間培養後、放射線照射 (45 Gy) し、アロの naive CD4⁺ T 細胞 (5.0 \times 10⁴) を加え共培養した。8 日後に CD4⁺ T 細胞を回収し、PMA および ionomycin によって刺激した。刺激 6 時間後の細胞内 IFN- γ 、および IL-4 を Flow cytometry にて評価した。同時に分化 Th 細胞における CCR4 および CXCR3 の発現も Flow cytometry により評価した。評価には PE 標識抗ヒト CCR4 抗体 (clone 1G1)、PE-Cy5 標識抗ヒト CXCR3 抗体 (clone 1C6)、PE 標識抗ヒト IL-4 抗体 (clone 3010.211)、FITC 標識抗ヒト IFN- γ 抗体 (clone 25723.11) (BD

Biosciences) を用いた。

自己反応性 T 細胞増殖応答抑制能の解析

α -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 α 1 陽性) および MK20.2 (V α 15 陽性)) と共培養を行った。48 時間後、1 μ Ci/well の [³H]-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 [³H]-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 succinimidylester) でラベルし、共培養開始 3 日目の分裂を Flow cytometry にて評価した。Flow cytometry による解析は、V α 24 陽性 NKT 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

ヒト V α 24 iNKT 細胞株の樹立と抗原特異性の評価

α -GalCer 特異的ヒト V α 24 iNKT 細胞株を効率良く樹立するために、健常人 PBMCs より、magnetic cell sorting 法を用いて TCRV α 24 陽性細胞を分離した。抗原として 10 ng/ml α -GalCer を添加した Mo-DC を抗原提示細胞とし、TCRV α 24 陽性細胞を刺激することにより、 α -GalCer 特異的ヒト V α 24 iNKT 細胞株を樹立した。

さらに CD4⁺、および DN V α 24 iNKT サブセットは、CD4 および CD8 \cdot の発現を指標に magnetic cell sorting 法、およびセルソーターを用いることにより分離精製した。樹立された細胞株は、CD161 陽性、TCRV α 24 陽性、V \cdot 11 陽性、インバリアント CDR3 (6B11) 陽性であった (図 1A)。また、これらの細胞集団は α -GalCer 濃度依存性に増殖応答を示したが、無関係な抗原である cerebroside には、全く増殖応答を示さなかったことから (not shown)、 α -GalCer 特異的ヒト V α 24 iNKT 細胞株であることを確認した (図 1B)。

CD1 分子を安定に発現する細胞株の樹立

C1R、および HeLa に CD1a、-b、-c、および