

PBC患者における肝内MRP 4 の発現

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：胆汁うっ滞動物モデルにおいて肝内Mrp 4 の発現増強の報告はあるが、ヒトにおいて肝内MRP 4 発現の報告は未だ少ないのが現状である。そこで我々はPBC患者治療前の肝内MRP 4 mRNA の発現について検討した、さらに、転写因子であるCAR mRNAについても併せて検討した。PBC末治療患者において、肝内MRP 4 の発現は早期より代償的に増強しており、その発現は晩期においても保たれていた。その代償機構は、肝内CAR発現によって調節されている可能性が示唆された。

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

MRP 4 は、類洞側肝細胞膜に存在する胆汁排泄に関わるトランスポーターで、通常発現は少なく胆汁うっ滞時に増強することが知られている。我々は以前、胆管結紮ラットを用いて、肝内Mrp 4 の発現が増強している事を報告した（J Hepatol 40: 585-591 : 2004）。マウスの胆汁うっ滞モデルでも、肝内Mrp 4 発現は増強しており、種による差異は認められない。しかしながら、ヒトにおいては遺伝性肝内胆汁うっ滞 progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) の小児患者で肝内MRP4発現増強しているという報告はあるが、その他の疾患についての報告はみられない。そこでPBC患者の治療前の肝生検組織より、RNAを抽出し、肝内MRP mRNAの発現について検討を行った。さらにMRP4発現の転写因子として、核内ホルモンレセプターであるCAR (Constitutive androstane receptor) が知られており、CAR mRNAの発現についても検討した。

B. 研究方法

対象は、PBC治療前患者（十分なinformed consentのもと同意を得られた）33名。肝組織は、針生検組織の一部を用いた。（Scheuerの組織学的分類：I期4名、II期17名、III期8名、IV期4名）。肝内MRP 4、CAR mRNAをreal-time RT PCR法（Applied Bio. 7500 Fast）にて測定した。Normal controlとしてHuman RNA（n=3）を使用し、内因性遺伝子としてGAPDHを用い補正を行った。

C. 研究結果

肝内MRP 4 mRNAの発現は、各I～IV期で有意に増強していた（図1）。I、II期の早期より有意に増強しており（図2：p<0.01）、さらにIII、IV期の晩期においても、増強は保たれていた（図2：p<0.05）。核内ホルモンレセプターであるCARの発現とMRP 4 の発現の間には、相関関係を認めた（図3：r=0.46, r²=0.21, p<0.05）

図1：PBC患者肝のMRP 4 mRNAの発現

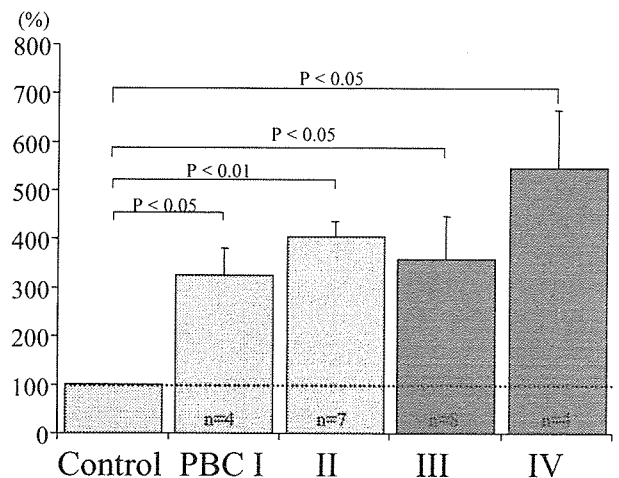


図2：PBC患者肝のMRP 4 mRNAの発現

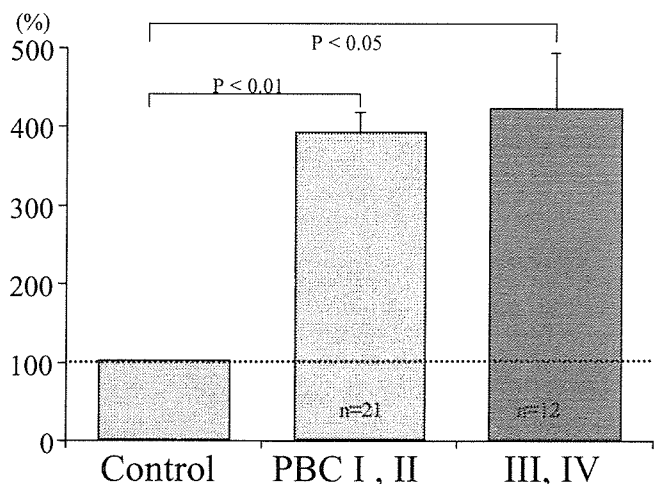
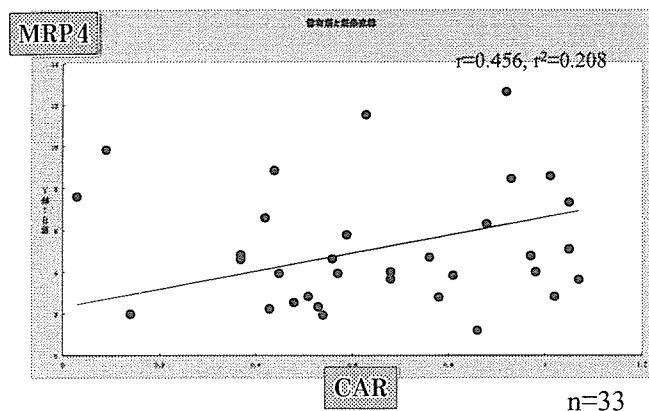


図3：PBC患者CARとMRP4の発現



D. 考 察

PBC未治療患者において、MRP4 mRNAは晩期になっても保たれていた、しかしながら針生検では十分な量の蛋白が得られないため、今後高感度の蛋白解析の研究が望まれる。今回は未治療患者の解析を行ったが、UDCA治療により改善のみられたPBC患者における、治療前後のトランスポーター発現の解析を行い、UDCAが肝内トランスポーターの発現にどのような影響を与えているのかを解析することが、今後の課題である。

E. 結 論

PBC未治療患者において、肝内MRP4の発現は早期より代償的に増強しており、その発現は晩期においても保たれていた。その代償機構は、肝内CAR発現によって調節されてい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) Ueda S, Basaki Y, Yoshie M, et al : PTEN/Akt signaling through epidermal growth factor receptor is prerequisite for angiogenesis by hepatocellular carcinoma cells that is susceptible to inhibition by gefitinib. *Cancer Res* 66 : 5346-5353, 2006.
- 2) Suzuki N, Irie M, Iwata K, et al : Altered expression of alkaline phosphatase (ALP) in the liver of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. *Hepatol Res* 35 : 37-44, 2006.

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

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態進展に伴う遺伝子発現変化と予後予測遺伝子の検討

研究協力者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科 恒常性制御学 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態進展に伴う遺伝子発現変化をcDNAマイクロアレイ，Serial analysis of gene expression (SAGE) 法を用いて明らかにし，病態進展に伴う遺伝子発現変化，予後予測遺伝子の同定を試みた。PBC移植進展例ではIL-6シグナル伝達，タンパク翻訳亢進が認められ，胆管上皮細胞増殖を反映していた。またケモカイン・接着因子の上昇やアポトーシス，ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応の亢進が認められ，肝線維化に加え，胆汁うっ滞による肝細胞障害・酸化ストレスの亢進が示唆された。またPBC予後不良群では予後良好群と比較しLymphoid chemokineであるCCL19，CCL20の強い発現亢進が認められPBCの活動性の指標の一つと考えられた。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（以下PBC）症例の中で早期に症候性PBC（s2-PBC）へ進展する予後不良な群が存在する。今回，原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態進展に伴う遺伝子発現変化をcDNAマイクロアレイ，Serial analysis of gene expression (SAGE) 法を用いて明らかにし，病態進展に伴う遺伝子発現変化，予後予測遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

生体部分肝移植術を施行した59歳女性のPBC症例を対象とした。症例は全身掻痒感にて発症，肝生検にてPBC（Stage 2）と診断された。約10年間の経過で進行し肝移植に至った。移植時に得られた肝組織よりmRNAを抽出，SAGE libraryを構築し遺伝子発現を網羅的に解析した。またPBC症例で比較的予後良好であった7例と肝移植または肝不全死に至った3例において肝組織の遺伝子発現をcDNAマイクロアレイにて解析した。

C. 研究結果

SAGE libraryから得られた約2000クローンの塩基配列決定を行い1 tagあたり21塩基の配列情報を単位として，総タグ数2,9674の遺伝子発現情報を得た。重複して出現するタグ配列を除いた，uniqueタグは1,0343であった。NCBIデータベースとタグ配列のマッチングを行い，6615タグ（64%）で発現遺伝子の同定が可能であった。遺伝子の発現頻度をタグカウントとして表し，各遺伝子の発現プロファイルを得た。

正常肝の発現プロファイルと比較し，PBC移植肝ではfibrinogen関連遺伝子，ミトコンドリア関連遺伝子が有意に発現上昇していた。またC型肝炎変との比較ではコレステロール代謝，鉄代謝，接着因子関連遺伝子の発現変化を認めた。MetaCore™を用いたパスウェイ解析ではPBC移植肝では正常肝と比較しタンパク翻訳関連，IL-6シグナルを中心とした免疫応答，細胞接着，細胞死シグナルの亢進が認められた。C型肝炎変との比較ではケモカイン・接着因子，アポトー

シス，ミトコンドリアの酸化的リン酸化，胆汁酸合成の亢進が認められた。一方，C型肝炎変ではユビキチン，JAK-STATパスウェイ，ミトコンドリア脂肪酸β-酸化に関わるパスウェイが亢進していた。

PBC症例で比較的予後良好であった7例と予後不良であった3例におけるcDNAマイクロアレイの解析では，予後不良群ではlymphoid chemokineであるCCL19，CCL20の強い発現亢進が認められた。CCL19，CCL20の発現はリアルタイムPCRでも確認した。またELISAによる血清CCL19量は肝組織におけるmRNA量と相関していた。

D. 考察

PBC移植進展例ではIL-6シグナル伝達，タンパク翻訳亢進が認められ，胆管上皮細胞増殖を反映していると考えられた。またケモカイン・接着因子の上昇やアポトーシス，ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応の亢進が認められ，肝線維化に加え，胆汁うっ滞による肝細胞障害・酸化ストレスの亢進が示唆された。またPBC予後不良群ではlymphoid chemokineであるCCL19，CCL20の強い発現亢進が認められPBCの活動性の指標の一つと考える。これらのケモカインの意義に関しては，今後多数症例を用いた検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda M, Kawai H, Shirota Y, et al : Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. Am J Gastroenterol 100 : 2019-2030, 2005.
- 2) Honda M, Yamashita T, Ueda T, et al : Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. Hepatology 44 : 1122-1138, 2006.

2. 学会発表 なし

G. 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

原発性胆汁性肝硬変におけるToll-like receptorの病態への関与

研究協力者 大平 弘正 福島県立医科大学 内科学第二講座 助教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因として感染症因子の関与が提唱されている。細菌などの微生物の認識に重要な Toll-like receptor（TLR）の発見による自然免疫研究の進歩とともに、PBC病態における自然免疫の関与が近年注目されている。今回我々は、細菌の認識に関与しているTLR 1 とTLR 9 およびTLR 4 の負のフィードバック機能を有するRP105（radioprotective105）の遺伝子多型（SNP）について解析し、TLRのPBC病態形成への関与について検討した。今回対象としたPBC患者と健常人におけるTLR 9 遺伝子の2848 G/A, -1486 T/Cにおける各SNPのgenotype, haplotype, duplotypeの比較では統計学的有意差は認められなかった。また、TLR 9（2848 G/A）のgenotypeと臨床検査値との比較では、ALT, LDH, ALP, γ -GPT, T-Bil, 血小板数, IgG, IgM値について検討したが統計学的有意差は認められなかった。しかし、診断時年齢で比較してみると、若年で診断されたPBC（40歳未満）では2848AAが有意に多く認められた。一方、TLR 1 遺伝子の2079 G/Tにおけるgenotypeは、PBC患者、健常人ともにそのほとんどがTTであり（ともに一例のみGT）有意差を認めなかった。同様にRP105においては、健常人との間にアリル頻度、genotypeに差は認められなかったが、genotypeと臨床検査値との間に有意差が認められた。本研究において、健常人とPBC症例において統計学的にTLR 1, 9 およびRP105遺伝子のSNPには有意差を認めなかったが、若年で診断されたPBC症例ではTLR 9 遺伝子の2848AA頻度が有意に多く認められており、PBCの病態に関与している可能性が示唆された。今後も症例数を増やし、検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

近年、原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自然免疫との関連を示唆する報告がなされるようになり、本症の病態解明のため新たな側面からのアプローチが進められようとしている。中でも細菌などの微生物の認識に重要なToll-like receptor（TLR）との関連が脚光を浴びている。TLRは現在まで13種類が報告され、これらが認識する分子は、発生学的に構造が保持されている微生物構成成分であるpathogen-associated molecular pattern（PAMPs）であり、これら刺激によりNF κ Bの活性化が生じサイトカインやケモカインが産生される。さらに、TLRの遺伝子多型と感染症、動脈硬化、免疫不全といった様々な疾患との関係が明らかとなってきている。

PBCにおいて標的となる胆管系は腸管に由来する微生物成分に容易に暴露される環境下であり、TLRを中心とした自然免疫との関連を検討することは、本症の発症機序を解明する上で重要なことである。そこで、本研究ではPBC患者におけるTLR遺伝子のSNP（single nucleotide polymorphism）を解析し、臨床的な意義について検討することを目的とした。

B. 研究方法

本研究にあたっては、ヒトゲノム倫理委員会の承認を得た上で福島県立医科大学附属病院に通院中のPBC患者に研究の趣旨を説明し、承諾が得られた78症例を対象とした。また、健常人116例を対照とした。

末梢血液からgenomic DNAを抽出し、既報告のTLR 1, 9 ならびにTLR 4 の負のフィードバック機

能を有するRP105（radioprotective 105）の遺伝子塩基配列をもとにprimerを作成し、PCR法にてgenomic DNAを増幅した。RFLP法あるいはPCR産物をtemplateにautosequencerを用いたdirect sequence法にて塩基配列を決定した。さらに、各SNPと臨床検査値との差異の検討を行った。

なお、今回は既報のSNP、すなわちTLR1は2079 G/T, TLR 9は-1486T/C, 2848G/A, RP105は438G/C, 2085T/C, 2188G/Aの部位において検索を行った。

C. 研究結果

今回対象としたPBC患者と健常人におけるTLR 9 遺伝子の2848G/A, -1486T/Cにおける各SNPのgenotype, haplotype, duplotypeの比較では統計学的有意差は認められなかった。また、TLR 9（2848 G/A）のgenotypeと臨床検査値との比較では、ALT, LDH, ALP, γ -GTP, T-Bil, 血小板数, IgG, IgM値について検討したが統計学的有意差は認められなかった。しかし、診断時年齢で比較してみると、若年で診断されたPBC（40歳未満）では2848AAが有意に多く認められた。一方、TLR1 遺伝子の2079G/Tにおけるgenotypeは、PBC患者、健常人ともにそのほとんどがTTであり（ともに一例のみGT）有意差を認めなかった。同様にRP105の検討では、健常人との間にアリル頻度、genotypeに差は認められなかったが、genotypeと臨床検査値との間に有意差が認められた。

D. 考 察

当初、PBCにおけるTLR病態への関与を検討する

ために、TLR1, 2, 4, 6, 9遺伝子ならびにTLR 4と同様にLPSを認識するTLR類似物質であるRP105のSNPについて検討することとした。しかしながら、これまでTLR遺伝子で報告されているSNPは、アジア人において極めて低頻度であるために、ある程度のSNP頻度が期待できるTLR1, 9およびRP105についてのみ解析を行った。RP105 (CD180) は分子量180 KDaの成熟B細胞・単球上に発現するTLRファミリーの一員とされ、グラム陰性菌のLPSレセプターとして重要である。TLR 4のシグナル伝達のinhibitorとして働くことが知られており、PBC患者においては、RP105の発現が健常人と比較して有意に低下しているとの報告もある。PBC患者におけるLPSに対する反応性を考慮する際に重要な分子と考えられる。

今回、TLR1, 9およびRP105遺伝子のSNPは、健常人とPBC症例において統計学的に有意差を認めなかった。しかし、若年で診断されたPBC症例ではTLR 9 遺伝子の2848AA頻度が有意に多く認められており、PBCの病態に関与している可能性が示唆された。今後も症例数を増やし検討する必要があると考えられた。さらに、TLRのPBCの病態との関与を検討するためには、SNPのみならず、TLR自体の発現の増減、機能異常について今後検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanno Y, Rai T, Monoe K, et al : Possible association of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 genetic polymorphism with liver damage of primary biliary cirrhosis in Japan. Fukushima J Med Sci 52 : 79-85, 2006.

2. 学会発表

1) 坂本夏美, 大平弘正, 斎藤広信, 他 : 原発性胆汁性肝硬変症例におけるToll-like receptor 9 遺伝子変異・多型の検索. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.

2) Sakamoto N, Kannno Y, Takahashi A, et al : Glutathione-S-transferase gene polymorphisms in patients with primary biliary cirrhosis. The 5th JSH Single Topic Conference, Nagasaki, 2006.

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

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NODリガンドで刺激し、サイトカインおよびIgMの産生を対照群と比較した。患者においてNOD2リガンド刺激によるIL-1 β 、TNF- α 産生を高く認めた。NOD2 mRNAは患者で高い傾向を認めた。今回の検討から、PBCではTLRのみならずNODに対する刺激において、特に単球で反応性が亢進していることが判明した。

A. 研究目的

PBCは血清学的にAMAの出現とIgMの高値を特徴とする。我々は「PBC患者はなぜIgMが高いのか」という臨床的疑問を持ち、PBCの病因論においてバクテリアの関与が示唆されていることから、バクテリア由来の合成DNA（非メチル化CpG）を用いて末梢血単核球細胞（PBMC）を刺激した。その結果、PBCにおいてIgM産生細胞の出現を高頻度に認め、刺激後にB細胞のToll-like receptor 9（TLR9）の発現が増強したことから、PBCではバクテリア刺激に対する自然免疫反応の亢進があると結論した¹⁾。

次いでB細胞以外の細胞ではどうかを調べるため、単球をTLR2のリガンドで刺激した結果、PBCにおいてIL-1 β 、TNF- α の産生を多く認め、TLRを介した系ではB細胞のみならず単球においても反応が亢進していることを平成17年度の本会において報告した。

TLRは細胞表面やリソゾーム、エンドゾームでバクテリアの脂質や核酸を認識するのに対し、nucleotide-binding oligomerization domain（NOD）はサイトゾル内でペプチドグリカンの構成成分を認識する。NODの異常はCrohn病、sarcoidosis、Blau症候群などで指摘されている。そこで今回我々は、TLR以外の自然免疫系として、NODのリガンド刺激に対するPBC患者のPBMCの反応性を検討した。

B. 研究方法

NOD2はPBMC中で単球に強く発現し、NOD1はB細胞に発現していることから、PBC患者および対照としてC型慢性肝炎患者、健常者各8例ずつのPBMCをmuramyl dipeptide（MDP：NOD2リガンド）10 μ g/mlで24時間刺激し、単球からのIL-1 β 、TNF- α の産生量をELISAで測定した。またFK156、FK565（NOD1リガンド）10 μ g/mlで刺激し5日間培養の後、B細胞からのIgMの産生を検討した。

C. 研究結果

健常者におけるMDP刺激によるIL-1 β 、TNF- α はそれぞれ197.2 \pm 83.9pg/ml、462.9 \pm 293.2pg/mlで、C型慢性肝炎では212.7 \pm 93pg/ml、407.2 \pm 111.2pg/mlであった。PBCにおいては304.9 \pm 76.2pg/ml、776.8

\pm 207.4pg/mlとIL-1 β 、TNF- α の産生をいずれも多く認めた（ p <0.05）。しかしながら、FK156、FK565単独刺激では有意なIgM産生を認めず、対照との差も認めなかった。

次いでPBMC中のNOD1、NOD2のmRNAの発現を検討した。健常者ではそれぞれ0.45 \pm 0.13、0.46 \pm 0.05、C型慢性肝炎では0.3 \pm 0.02、0.38 \pm 0.04、PBCでは0.32 \pm 0.03、0.56 \pm 0.07で、NOD2ではPBCで高い傾向を認め、特にC型慢性肝炎との間に有意差を認めた（ p <0.05）。

D. 考察

今回の検討から、PBCではTLRのみならずNODに対する刺激において、特に単球で反応性が亢進していることが判明した。NOD2を介した刺激でサイトカインの高い産生性を認めた理由として、PBCではNOD2 mRNAの発現が高く、リガンド刺激を受けやすい状態にあるためと考えた。

PBCでNOD2 mRNAの発現が高い理由について、今後さらに検討を進めていきたい。

（参考文献）

1. Kikuchi K et al. Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27(+) memory B cells in primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 128 : 304-312, 2005.

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 2007年発表予定

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

PBCの胆管病変形成における自然免疫の関与

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）の病態形成における胆道系自然免疫のかかわりについて、近年第3のTh細胞として分類されたTh17細胞について検討した。培養胆管細胞を用いた検討にて、胆管細胞はTh17誘導サイトカインであるTGF-β1 mRNAを恒常的に発現しており、またToll様受容体リガンド刺激でIL-23, IL-6の発現が誘導された。また、Th17細胞の代表的産生サイトカインであるIL-17の免疫染色にて、PBCの胆管炎周囲にTh17細胞が散見された。Th17細胞は自己免疫性疾患での慢性炎症に関与する病原性細胞と想定されている。PBCの胆管における異常な自然免疫応答がTh17細胞を分化誘導し、慢性胆管炎の発生に関与していることが示唆された。

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感染症や菌体成分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（Toll-like receptor）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を報告し、PBC胆管炎の病態発生に胆管系自然免疫が関与していると推測している。またPBCの胆管障害に、Th1型優位なサイトカイン環境に起因する細胞性免疫の関与が報告されているが、このようなPBC特異的なサイトカイン環境と胆道系自然免疫との関連性は不明である。近年、Th1/Th2細胞に加え第3の病原性Th細胞としてTh17細胞が新たに分類され、自己免疫性疾患に見られる慢性炎症への関与が注目されている。このTh17細胞は、IL-23, TGF-β, IL-6の存在下で前駆T細胞から分化し、分化後はIL-17(A), IL-17F, IL-6, TNF-α産生を特徴とする。今回我々は、胆管細胞がTh17細胞への誘導サイトカインを産生することに注目し、胆管上皮細胞におけるTh17環境形成における胆道系自然免疫のかかわりについて検討した。

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株を用いた。PBC由来培養胆管細胞2株と正常肝（転移性肝癌の非癌部正常肝）由来1株で、いずれも肝移植時摘出肝より培養・樹立した。またヒト肝組織として、PBC3例（1～2期）、原発性硬化性胆管炎1例（2期）、閉塞性黄疸1例、組織学的正常肝1例の凍結肝組織切片を使用。

2. Reverse Transcription-PCR

培養胆管細胞におけるサイトカインIL-23（αサブユニットのp19）、IL-6、TNF-β1のmRNA発現をRT-PCRで検出した。

3. TLRリガンドによる刺激

TLRリガンド（Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）としてLPS（TLR4リガンド、1 μg/ml）、Pam 3 CSK 4（TLR1/2リガンド、

100ng/ml）、MALP（TLR2/6リガンド、100ng/ml）、Poly(I:C）（TLR3リガンド、25 μg/ml）を用い、各濃度で培養上清に添加し刺激を行った。刺激後3時間目の培養細胞をRT-PCR解析に供した。

4. 免疫組織化学的染色

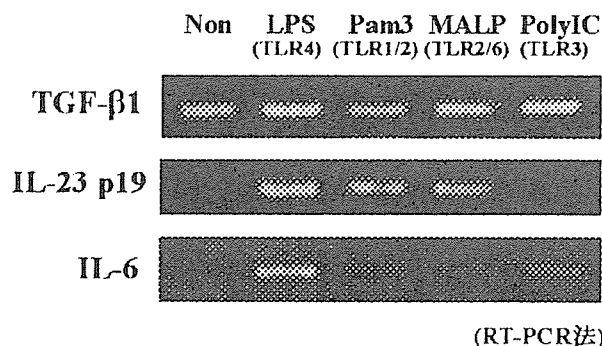
IL-17抗体（R&D）を用いたEnvision法（Dako）にて免疫組織化学的染色を行った。

C. 研究結果

1. Th17誘導性サイトカインの発現とPAMPs刺激による制御

培養胆管細胞はTh17誘導性サイトカインであるTGF-β1、IL-23、IL-6のうち、TGF-β1 mRNAを恒常的に発現していたが、IL-23とIL-6は無刺激状態での発現はなかった。PAMPs刺激にて、TGF-β1発現の明らかな挙動は認めなかったが、LPS、Pam 3 CSK 4、MALP刺激にてIL23の発現が誘導された。またLPS、Poly（I:C）刺激にて明らかなIL-6の発現が誘導され、Pam 3 CSK 4、MALPでは若干の発現誘導が見られた（図1）。

図1：胆管細胞におけるTh17誘導性サイトカインの検出

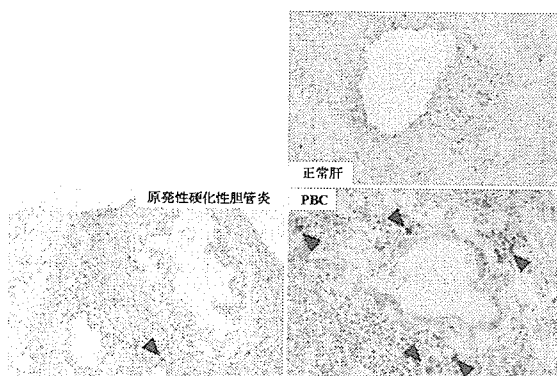


2. 肝組織内でのIL-17陽性細胞の分布

凍結肝組織を用いてIL-17の免疫染色を施行した結果、PBCの胆管炎周囲にIL-17陽性細胞が散見された。しかし、正常肝や閉塞性黄疸では殆ど陽性細胞

胞は見られず、原発性硬化性胆管炎ではごく少数陽性細胞を見るのみであった（図2）。

図2：IL-17免疫染色



D. 考 察

免疫系を制御するヘルパーT細胞は、従来、細胞性免疫に関与するTh1型と液性免疫に関与するTh2型に大別され、種々の自己免疫疾患や感染症でTh1/Th2バランスの異常が病的現象の発生に関連するとされている。しかし、近年、善玉の制御性T細胞や第3の悪玉としてTh17細胞が新たなThサブクラスとして分類された。Th17細胞への誘導サイトカインとしてIL-23, TGF- β , IL-6があるが、胆管細胞はTGF- β 1 mRNAを恒常的に発現しており、PAMPs刺激による明らかな発現の挙動は認めなかった。IL-23とIL-6は無刺激状態での発現はなかったが、LPS, Pam3CSK4, MALPなどの細菌成分の刺激にてIL23の発現が誘導された。またLPS, Poly(I:C)などのグラム陰性菌やウイルス刺激にてIL-6の発現が誘導された。TGF- β はFoxp3陽性制御性T細胞の誘導サイトカインでもある。前駆T細胞からの抗原特異的な分化誘導の際にTGF- β のみ存在すると制御性T細胞へ分化するが、TGF- β とIL-23が存在するとTh17細胞に分化する。したがって、自然免疫応答を示さない状態では胆管細胞からのTGF- β により制御性T細胞への分化が誘導されるが、細菌やウイルスに対する自然免疫応答が存在する場合、胆管細胞由来のTGF- β , IL-6, IL-23にてTh17細胞への分化が誘導されると推測される。

Th17細胞はIL-17(A), IL-17F, IL-6を産生するが、特にIL17はTh17細胞の代表的な産生サイトカインである。IL17はproinflammatory cytokineのひとつで、上皮細胞、血管内皮、線維芽細胞に作用し、IL-1 β , TNF- α , IL-8, iNOSなどの炎症性メディエータを誘導し、慢性炎症に関与する。IL-17は従来から、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、移植拒絶、炎症性腸疾患などの（自己）免疫性疾患の病態形成に重要であることが報告されており、近年、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）やコラーゲン誘導性関節炎モデルにおいてIL-17の重要性が確立された。今回、肝組織内におけるIL-17陽性細胞（IL-17細胞）を免疫染色

で検出した結果、PBCの胆管炎周囲でIL-17細胞が散見されたが、浸潤単核球全体ではかなりマイナーな細胞群であった。しかし、対照群として用いた閉塞性黄疸や正常肝では、殆どTh17細胞は見られず、原発性硬化性胆管炎でも胆管周囲にごく少数のTh17細胞を見るのみであり、PBCにおけるTh17細胞の出現になんらかの意義があるものと推測された。今後、Th17細胞やTh1/2細胞との相互作用など更に詳細に検討する必要がある。

E. 結 論

胆管細胞は自然免疫応答にてTh17型環境へ誘導しうる事が明らかとなり、PBCの胆管周囲における慢性炎症に関与している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Harada K, Nakanuma Y : Molecular mechanisms of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Med Mol Morphol* 39 : 55-61, 2006.

2. 学会発表

1) Harada K, Isse K, Nakanuma Y : Expression and function of tumor necrosis factor receptor superfamily in human intrahepatic biliary epithelial cells. American Society of Investigative Pathology (ASIP) Annual Meeting at Experimental Biology, San Francisco.

2) Harada K, Isse K, Nakanuma Y : Responsiveness to double stranded RNA in human biliary epithelial cells: Involvement of innate immunity in the pathogenesis of cholangiopathy. American Society of Investigative Pathology (ASIP) Annual Meeting at Experimental Biology, San Francisco.

3) Harada Y : Biliary innate immunity and cholangiopathy. The 5th JSH Single Topic Conference, Nagasaki, 2006.

4) 原田憲一 : PBCとinnate immunity. 第18回肝臓フォーラム（西部）、大阪。

5) 原田憲一 : 胆道系疾患の病態形成における自然免疫の関与. 第42回肝形態科学研究会、京都。

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の病態形成における細胞傷害性T細胞の研究

研究協力者 宇高 恵子 高知大学医学部 免疫学 教授

研究要旨：PBCの病態形成に関わる細胞性免疫応答を調べるため、ヒトとマウスのMHCクラス1分子について、PBC患者に検出される自己抗体の標的分子であるPDCに対するT細胞エピトープ候補ペプチドを同定した。一方、ユビキタスな自己抗原に対する免疫応答が、なぜ胆管という組織に特異的に起こるのか、を明らかにするため、まずTh細胞の組織浸潤についてOVAモデル抗原系で解析を行った。

A. 研究目的

1. PBCにおいて組織傷害のエフェクターとなる可能性が高いCD8 T細胞が認識する自己抗原の同定を試みる。
2. ユビキタスな自己抗原に対するエフェクターが示唆されるにも関わらず、胆管に病変が起こる機序について、Th細胞の組織特異的浸潤機構の視点から研究を進める。

B. 研究方法

1. PBC患者のHLAクラスI遺伝子の解析および、それに結合して提示されるPDC由来ペプチドの同定。
2. OVAをモデル抗原として、Th細胞の組織特異的浸潤に関わる抗原提示細胞の解析をする。

C. 研究結果

1. HLA-A*2402結合性PDCペプチド、および、マウスMHCクラスI結合性PDCペプチドの同定ができた。
2. 骨髓キメラを作成して研究したところ、OVA特異的Th細胞のOVA発現細胞の周辺への浸潤には、血管内皮細胞および組織に分布した骨髓由来樹状細胞上でのMHCクラスII分子の発現が必須であることがわかった。

D. 考 察

1. 自己抗原であるPDCについて、CTLが誘導されるかどうかを調べる実験系ができた。
2. 細胞傷害の組織特異性を決める要因としてThの組織浸潤の有無が重要であることがわかった。

E. 結 論

1. PBCの自己抗原として注目されているPDCについて、ヒトHLA-A*2402結合性ペプチド、マウスMHCクラスI分子結合性ペプチドが同定できた。今後、これらのペプチドを認識するCTLが患者末梢血に存在するか、また、マウスを免疫して、CTLの誘導が可能かどうかを調べたい。
2. ユビキタスな自己抗原に対するCTLがエフェクターとなる免疫応答において、Th細胞が組織特異性を決めてい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) Mashiba T, Uduka K et al : Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. Immunogenetics 59 : 197-209, 2007.
2. 学会発表
 - 1) 野口安史, 小松利広, 駒庭学志, 他 : CD4 T細胞の腫瘍内浸潤にかかわるMHC class II分子発現細胞の解析. 第36回日本免疫学会総会, 大阪, 2006.

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肝病態変化に対する制御性T細胞の関与—免疫組織化学解析—

研究協力者 松崎 靖司 東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科 教授

研究要旨：肝組織内炎症性細胞浸潤の経時的改善を示すgraft-versus-host reaction (GVHR) マウスモデルの肝組織において、免疫組織学的解析の結果、各表面マーカー陽性炎症性細胞はそれぞれ病態の改善に伴い減少を示す一方、IL-10レセプター陽性細胞（Type 1 制御性T細胞：Tr 1 細胞）のみ浸潤細胞数の維持が見られた。抗IL-10抗体投与GVHRマウスモデルにて、Tr 1 細胞の浸潤阻止の結果、肝組織における炎症性細胞浸潤の増悪が確認され、Tr 1 細胞が免疫自己寛容へ関与し、病態改善に貢献していることが確認された。

共同研究者

宮崎 照雄 ジョージワシントン大学 研究員
土井 幹雄 茨城県衛生研究所 所長

A. 研究目的

我々は原発性胆汁性肝硬変（PBC）や自己免疫性肝炎の病態解明を目的に、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 1×10^7 個静注することにより作製される。その病態の特徴は、胆管上皮細胞に異所性のMHC class IIの発現、門脈・中心静脈周囲の炎症性細胞群の浸潤、自己抗体の産生などであり、自己免疫機序の関与した肝病変が観察される。GVHR導入5日目より2週目まで、門脈・中心静脈周囲に炎症性細胞浸潤の増悪を認める。しかし、その後、8週目までの自然経過観察下で炎症性細胞浸潤は改善し、線維化や肝硬変には至らない。この一過性の自己免疫性病態の原因、すなわち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の一助となると考えられる。

これまでの研究で、GVHRモデルの肝組織浸潤炎症性細胞群に対し、cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現頻度解析ならびに一般免疫染色ならびに多重免疫蛍光染色を用いた免疫組織学的解析を行ったところ、肝組織内浸潤細胞群内に自己免疫寛容を調節する制御性T細胞の関与が認められた。cDNAマイクロアレイによる炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現解析では、制御性T細胞のマーカーであるCD25 (CD25⁺CD4⁺制御性T細胞)とIL-10レセプター (R) (CD4⁺IL-10R⁺ Tr 1 細胞)、およびTh 1 (IFN γ , IL-2)とTh 2 (IL-4, IL-10)の遺伝子発現は、それぞれ病態の変化に伴ってGVHR導入2週目に増加し8週目には低下した。組織学的検討は、CD4, CD8, CD20, CD25 (IL-2 α), CD45RO, CD161, IL-10R β , FoxP3の抗体を用いて免疫染色を行った結果、浸潤炎症性細胞群において、全ての抗体に対して、陽性細胞の存在が確認された。免疫蛍光二重染色によりCD25⁺・CD4⁺共陽性細胞 (CD25⁺CD4⁺制御

性T細胞), CD4⁺・IL-10R⁺共陽性細胞 (Tr 1 細胞), CD4⁺・CD161⁺共陽性細胞 (NKT細胞)が認められ、浸潤炎症性細胞群内での制御性T細胞の発現が確認された。

そこで本研究では、GVHRモデル病態変化に伴う炎症性細胞群内の各表面マーカー陽性細胞数を定量し、経時的病態改善と制御性T細胞の浸潤状況との関係性を検討した。また、抗IL-10抗体投与GVHRマウスモデルを作成し、GVHR病態改善に対する制御性T細胞、特にTr 1 細胞の関与について検討を加えた。

B. 研究方法

GVHR導入後2, 4, 8週目のマウスの肝組織切片において、CD4, CD8, CD20, CD25 (IL-2R α), CD45RO, CD161, IL-10R β , FoxP3抗体にて免疫組織化学染色を行い、各肝組織浸潤領域におけるそれぞれの表面マーカー陽性細胞数をカウントした。また、HE染色において、浸潤領域における炎症性細胞の総数を定量し、各表面マーカー陽性細胞数を炎症性細胞総数に占める割合として算出した。

また、(bm12×B6) F1 メスマウスに抗マウス抗IL-10抗体もしくはコントロールモノクローナル抗体 (Rat IgG1 Isotype) を1匹あたり500mgにて腹腔内投与した。抗体投与4時間後、これまでのGVHR作成と同様の手法を用いてB6脾臓より分離したT細胞を 1×10^7 個静注し、2週間後に組織学的検討を行った。組織学検討は、肝組織切片を作成し、HE染色ならびに制御性T細胞のマーカーであるFoxp3 (CD25⁺CD4⁺制御性T細胞)とIL-10R β (Tr 1 細胞)に対する免疫染色を行った。HE染色像より、肝組織内炎症性細胞浸潤面積を定量した。

C. 研究結果

GVHR 2, 4, 8週後の肝組織内浸潤炎症性細胞群における各表面マーカー陽性細胞数を定量した結果、CD4, CD8, CD20, CD25 (IL-2R α), CD45RO, CD161, Foxp3の各表面マーカー陽性細胞は2週目をピークに病態の改善とともに減少を示し、それぞれの陽性細胞数は、2週目と比較して4週目、8週目にお

いて有意に低値であった。一方、IL-10R β 陽性細胞は、GVHR 2週目から8週目まで、浸潤細胞総数に対する発現の割合には変化がみられなかった。

抗IL-10抗体投与GVHRモデルにおいて、GVHR導入2週後、GVHR 2週目（抗体投与なし）ならびにコントロール抗体投与GVHRモデルと比較し、肝組織内炎症性細胞浸潤が著しくかつ有意に増加した。免疫染色の結果、IL-10R陽性細胞の浸潤は完全に抑えられていることが確認された。一方、CD25⁺CD4⁺制御性T細胞の特異的マーカーであるFoxp3陽性細胞浸潤の著しい増加が確認された。

D. 考 察

免疫組織化学染色において、各表面マーカー陽性炎症性細胞数は、GVHR病態改善に伴い減少を示した。しかしながら、IL-10R陽性細胞、すなわちTr1細胞のみ、肝組織への浸潤は維持されていた。これは、このGVHRモデルマウスの病態改善に制御性T細胞、特にIL-10R陽性Tr1細胞が大きく関与している可能性を示唆するものと考えられる。

抗IL-10抗体投与GVHRモデルにおいて検討した結果、抗IL-10抗体により肝細胞浸潤内炎症性細胞群にTr1細胞の出現が完全に抑えられ、肝組織における炎症性細胞浸潤が著しく増加した。この結果は、GVHRマウスモデルの肝病態改善にTr1細胞の関与を裏付けるものと考えられる。一方、抗IL-10抗体投与GVHRモデルにおけるFoxp3陽性細胞の浸潤の増加は、Tr1細胞の分化・活性にCD25⁺CD4⁺制御性T細胞が関与しているとの先行研究の報告を踏まえると、抗IL-10抗体投与によりCD25⁺CD4⁺制御性T細胞の浸潤が代償的に高まっているものと考えられる。これは、以前我々が報告したconcanavalin A投与GVHRモデルにおいても肝病態の増悪が見られるため、CD25⁺CD4⁺制御性T細胞がconcanavalin Aにより分化・活性が抑制されたことによるTr1細胞への分化・活性不全が生じた結果であろうと推測される。

E. 結 論

経時的炎症性細胞浸潤改善を示すGVHRマウスモデルの肝組織において、免疫組織学的検討の結果、制御性T細胞、特にIL-10R陽性Tr1細胞の関与が認められ、抗IL-10抗体投与GVHRモデルにおける病態増悪の結果、Tr1細胞がGVHRモデルにおける免疫自己寛容の誘導し、病態改善に貢献していることが確認された。

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

1) Miyazaki T, Doy M, Ikegami T, et al :
The role of regulatory T (Tr) cells on liver

pathology in the graft versus host reaction (GVHR) model mouse. The 107th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases and the Digestive Disease Week. Los Angeles, 2006.

- 2) 宮崎照雄, 松崎靖司, 本多彰, 他 : 自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病変と肝内制御性T細胞発現との関連性. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.
- 3) Miyazaki T, Doy M, Honda A, et al : Relationship between the liver pathology and the regulatory T (Tr) cells expression in a graft versus host reaction (GVHR) mouse model. The 5th JSH Single Topic Conference, Nagasaki, 2006.

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

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 センター長

研究要旨：平成18年度は、TLR3-IFN β 系の活性化とPBCの胆管障害との関係を明らかにする目的で、PBCの小葉間胆管細胞のTLR3の発現、胆管細胞のTLR3を介したサイトカイン・ケモカイン分子の発現誘導機構について検討した。PBCの小葉間胆管細胞では、in vivoの免疫染色でTLR3、RIG-Iの発現が増強しており、in vitroの免疫染色でも培養ヒト肝内胆管上皮細胞（HIBEC）では明らかなTLR3、RIG-Iの発現が認められた。HIBECではdsRNA（polyI:C）の細胞外からの刺激によりIFN β の軽度の誘導が、polyI:Cのtransfectionによる細胞内の刺激によりIFN β 、IL-6、TNF α の強い発現が誘導された。MAVS、TICAM-1のノックダウン実験から、polyI:Cのtransfectionでは、主にRIG-I-MAVS-IRF3経路によりIFN β の発現が誘導されることが示唆された。このようにPBCの小葉間胆管細胞においては、TLR3、RIG-IなどのdsRNA sensorの発現が増加していること、これらのdsRNA sensorはIFN β の誘導機能を有する機能的レセプターであることが明らかとなったが、TLR3、RIG-Iを介するシグナル伝達経路の活性化の胆管細胞障害における意義に関しては今後の研究課題である。

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
右田 清志 国立病院機構 長崎医療センター

A. 研究目的

昨年度までの研究で、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の発症早期の門脈域、肝実質域ではTLR3、IFN β のmRNA発現が増強し、TLR3とIFN β mRNAの発現量の間には強い正の相関のあることを見出し、PBCの胆管障害にTLR3-IFN β シグナル伝達経路の活性化が関与している可能性が示唆された。そこで本年度は、TLR3-IFN β 系の活性化とPBCの胆管障害との関係を明らかにする目的で、PBCの小葉間胆管細胞のTLR3の発現、胆管細胞のTLR3を介したサイトカイン・ケモカイン分子の発現誘導機構について検討した。

B. 研究方法

肝生検組織は、PBC、自己免疫性肝炎（AIH）、C型慢性肝炎（CHC）のホルマリン固定標本と凍結標本を用いた。ヒト肝内胆管上皮細胞（HIBEC）は、摘出肝をコラゲナーゼ処理した後、BerEp4-magnetでpositive selectionした後、専用の培地（HGF+、EGF+、dexamethasone+）で継代培養した。免疫染色は、マウス抗TLR2、3、4モノクローナル抗体、ウサギ抗RIG-Iポリクローナル抗体、マウス抗CK7、CK19モノクローナル抗体を用いて行った。各種TLRs、サイトカインのmRNAはlight cyclerを用いて定量、培養液中の各種サイトカインの濃度はELISAにて測定した。polyI:C刺激によるシグナル伝達経路はMAVS、TICAM-1のsiRNAを用いて検討した。

C. 研究結果

In vivoの免疫染色で、PBCの小葉間胆管細胞ではTLR3、RIG-Iの発現の増強を認めた。In vitroの免疫染色でも、培養HIBECでは細胞内にTLR3、RIG-Iの明らかな発現を認めた。また、TLR3は細胞表面にも弱く発現していた。培養HIBECではdsRNA（polyI:C）の細胞外からの刺激によりIFN β の軽度の誘導が認められたのに対し、polyI:Cのtransfectionによる細胞内刺激では、IFN β 、IL-6、TNF α の強い発現が誘導された。MAVS、TICAM-1のノックダウン実験から、培養HIBECのpolyI:C transfectionでは、主にRIG-I-MAVS-IRF3経路を介してIFN β の発現が誘導されることが示唆された。

D. 考察

PBCの小葉間胆管細胞においては、TLR3、RIG-IなどのdsRNA sensorの発現が増加していること、これらのdsRNA sensorは細胞内外のdsRNA刺激に反応してIFN β 誘導能を有する機能的レセプターであることが明らかとなった。しかし、TLR3、RIG-Iの発現増強機構やこれらのdsRNA sensorを介するシグナル伝達と胆管細胞障害との関連については未だ明らかでなく今後の研究課題と思われる。

E. 結論

PBCの小葉間胆管細胞においては、TLR3、RIG-IなどのdsRNA sensorの発現が増加し、リガントの刺激によりIFN β が誘導されることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Kondo H, Mori T, et al : Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 45 : 118-127, 2007.
- 2) Omagari K, Kadokawa Y, Nakamura M, et al : IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex are not predictive markers of histopathological progression in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity* 39 : 107-112, 2006.
- 3) 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- κ B and -MAPK signaling pathways. *Liver International* 26 : 467-476, 2006.
- 4) Nakamura M, Takii Y, Ito M, et al : Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmunity* 26 : 138-145, 2006.
- 5) 小森敦正, 瀧井康, 石橋大海, 他 : コランギオサイトのセルサイクルとその制御. *肝胆膵* 53 : 1065-1071, 2006.
- 6) 中村稔, 小森敦正, 瀧井康, 他 : コランギオサイトの免疫環境. *肝胆膵* 53 : 1085-1091, 2006.
- 7) 中村稔, 舟見健児, 小森敦正, 他 : ヒト胆管上皮細胞のToll-like receptor (TLRs) の発現と機能解析. *消化器と免疫* 43 : In press, 2006.

2. 学会発表

- 1) 中村稔, 舟見健児, 小森敦正, 他 : ヒト胆管上皮細胞のToll-like receptor (TLRs) の発現と機能解析. 第43回日本消化器免疫学会総会, シンポジウム, 弘前, 2006.
- 2) 小森敦正, 横山照史, 藤原紳祐, 他 : 培養ヒト肝内胆管細胞の再生分化を特徴づける遺伝子発現パターンの解析. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.
- 3) 中村稔, 森剛志, 小森敦正, 他 : 原発性胆汁性肝硬変の予後予測に有用な自己抗体の検討. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.
- 4) 右田清志, 阿比留正剛, 小森敦正, 他 : 一酸化窒素 (NO) 関連分子のヒト肝星細胞MMPs産生に対する作用. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.
- 5) Nakamura M, Komori A, Kondo H, et al : The predictive role of anti-gp210 and anti-centromere antibodies in the long-term outcome of PBC. The 5th JSH Single Topic Conference. symposium, Nagasaki, 2006.
- 6) Komori A, Nakamura M, Fujiwara S, et

al : Human intrahepatic biliary epithelial cell as a possible modulator of hepatic regeneration: The potential role of biliary epithelial cell for hepatic remodeling in vivo. The 5th JSH Single Topic Conference. symposium, Nagasaki, 2006.

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患者由来の自己抗原反応性T細胞の解析

研究協力者 下田 慎治 九州大学大学院医学系研究院臨床医学部門 病態修復内科学 助手

研究要旨：PBCにおいて自己抗原ピルビン酸脱水素酵素E2 コンポーネント（PDC-E2）反応性T細胞にアナジを誘導することが疾患特異的な免疫療法になる可能性があること、しかし患者由来の自己抗原反応性T細胞はこの自己抗原が拘束されるHLA DR53分子を導入した側副刺激の欠損したマウス線維芽細胞（L-DR53）を抗原提示細胞（APC）として用いて検討した結果、増殖に側副刺激を必ずしも必要としない側副刺激非依存性のものが多いため、アナジが誘導しにくいことが今までの研究で明らかとなった。そこで患者由来のDEX処理未成熟樹状細胞（DC）やIL-10/TGF- β 処理成熟DCをAPCとして用いたが、この場合も自己抗原反応性T細胞にアナジを誘導できないことを、難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する研究において先に報告した。

今回は抗原として変異のないPDC-E2抗原163-176ペプチド（wild type）以外に、T細胞認識部位である168番のEを他の19アミノ酸に各々置換する変異抗原を計19種類合成し、これらを抗原とした場合、自己末梢単核球（PBMC）がAPCの際に増殖がありL-DR53をAPCとした際に増殖がない、いわゆるアナジを誘導できる変異抗原の有無を検討した。その結果wild typeの168番のEをD, K, R, W, Cに各々置換した場合アナジが誘導でき、かつアナジを誘導できたT細胞は、側副刺激非依存性の自己抗原反応性T細胞がwild typeの自己抗原を認識する際にregulatory機能を発揮することが明らかとなった。以上の結果より疾患特異的な免疫療法として自己抗原反応性T細胞をin vitroでL-DR53をAPCとしてwild typeの変異抗原を用いた環境でアナジを誘導後in vivoに戻す治療法が有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は以前PBCや健常者由来の自己抗原反応性T細胞クローンを多数樹立し、抗原提示細胞として側副刺激分子を保持した末梢単核球（PBMC）および側副刺激を欠損したネズミ線維芽細胞にHLADR53分子のみを導入したL-DR53細胞を用いることで、自己抗原認識に側副刺激依存性のものと非依存性のものが存在し、患者由来のものは非依存性のものが多く、健常者由来のものは依存性のものが多いことを示した。また、側副刺激依存性のクローンは側副刺激を欠損した環境で抗原提示がされた場合アナジが誘導されアナジが誘導されたT細胞はregulatory機能を持つようになることを示した。以前抗原提示細胞の種類を変えることで自己抗原反応性T細胞にアナジが誘導できるかを検討した。すなわち側副刺激を欠損した樹状細胞（immature regulatory DC）を、単核球よりIL-4およびGM-CSF刺激でミエロイドDCとして、さらにこの細胞をIL-10およびTGF- β で培養し誘導し、このirDCを抗原提示細胞として使用することで自己抗原反応性T細胞にアナジが誘導できるかを検討したが、irDCを抗原提示細胞とした場合、自己抗原反応性T細胞クローンにアナジは誘導できなかった。そこで今回はPBC由来の自己抗原反応性T細胞の免疫制御を行う目的で、このT細胞をアナジ状態に誘導できる環境をirDCを抗原提示細胞とする場合以外で探索した。

B. 研究方法

今回、APCとしてはL-DR53細胞を用いて、抗原と

して本来の抗原（wild type）以外にwild typeをアミノ酸置換した抗原ペプチドを多数準備して、自己抗原反応性T細胞にアナジが誘導できるかを検討した。wild typeであるPDC-E2 163-176はGDLLAEIETDKATIの配列を持つ。このペプチド抗原のT細胞に認識される部位である168番のEをE以外の19種類のアミノ酸に置換した変異抗原

(168D:GDLLADIETDKATI,
168K:GDLLAKIETDKATI,
168R:GDLLARIETDKATI,
168F:GDLLAFIETDKATI,
168W:GDLLAWIETDKATI,
168Y:GDLLAYIETDKATI,
168G:GDLLAGIETDKATI,
168A:GDLLAAIETDKATI,
168I:GDLLAIETDKATI,
168L:GDLLALIETDKATI,
168M:GDLLAMIETDKATI,
168V:GDLLAVIETDKATI,
168P:GDLLAPIETDKATI,
168C:GDLLACIETDKATI,
168H:GDLLAHIETDKATI,
168N:GDLLANIETDKATI,
168Q:GDLLAQIETDKATI,
168S:GDLLASIEIETDKATI,
168T:GDLLATIEIETDKATI)

を作成し、これらを各々抗原とし、APCとしてPBMCを用いた場合は増殖しL-DR53を用いた場合は増殖を示さないすなわちT細胞にアナジを誘導でき

る変異抗原の存在を検討した。最後にアナジを誘導できたT細胞は、側副刺激非依存性の自己抗原反応性T細胞がPBMCをAPCとしてwild typeの自己抗原を認識する場合にregulatory機能を持つかを確認した。

C. 研究結果

wild typeの168番のEをD, K, R, W, Gに各々置換した変異抗原をL-DR53で抗原提示した際、側副刺激非依存性T細胞にアナジが誘導でき、かつアナジを誘導できたT細胞は、regulatory機能を持つことが明らかとなった。

D. 考 察

以前の我々の研究よりアナジ誘導T細胞にはregulatory機能があることから疾患特異的な免疫療法として自己抗原反応性T細胞にアナジを誘導することが有効であると考えられてきた。しかしPBC患者由来の自己抗原反応性T細胞は側副刺激非依存性のものが多いためにAPCとしてL-DR53, 抗原としてwild typeではアナジの誘導が困難であった。また以前の我々の検討の結果APCとしてirDC, 抗原としてwild typeでもアナジの誘導が困難であった。そこで今回の検討ではAPCとしてL-DR53, 抗原としてwild type以外の変異抗原を用いた場合、側副刺激非依存性の自己抗原反応性T細胞にアナジの誘導ができ、かつこのアナジ誘導T細胞はregulatory機能を持つことが明らかとなった。この結果よりPBC患者由来の自己抗原反応性T細胞をin vitroでL-DR53をAPCとして変異抗原で刺激してアナジを誘導後in vivoに戻す治療法が有効であ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 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

自己免疫性肝炎における抗ミトコンドリア抗体出現の意義

研究協力者 大曲 勝久 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 助教授

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）の経過中での抗ミトコンドリア抗体（AMA）出現の頻度およびAMA陽性AIHとAMA陰性AIHとで肝組織学的あるいは生化学的データに差がないかを、20か月以上経過観察され、かつ2回以上血清保存されている、国際診断基準で「definite AIH」と診断された20例を対象に検討した。Definite AIH20例中、7例（35%）に組織学的に胆管病変が認められた。そのうち2例はPBCと区別がつかない慢性非化膿性破壊性胆管炎（CNSDC）や小葉間胆管の消失が認められた。また、そのうち2例と他の5例、合計7例（35%）は、経過中少なくとも1回はWestern blot法にてAMA陽性であった。胆管病変の有無およびAMA出現の有無と、血清総ビリルビン、AST、ALT、ALP、 γ -GTPなど生化学データとの関連は認められなかった。したがって、20～68か月（中央値43か月）という比較的短い観察期間においては、AMA出現の有無と胆管病変などの組織学的所見および生化学的データとの関連は認められず、AIHにおけるAMAの臨床的意義は不明であった。さらに長い観察期間での検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

抗ミトコンドリア抗体（AMA）や慢性非化膿性破壊性胆管炎（CNSDC）は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）に特徴的とされているが、近年AMAやCNSDCが自己免疫性肝炎（AIH）の20～30%に認められることが報告されている。しかしながら、その臨床的意義は不明である。

われわれは、AIHの経過中でのAMA出現の頻度およびAMA陽性AIHとAMA陰性AIHとで組織学的あるいは生化学的データに差がないかを検討した。

B. 研究方法

1999年5月から2005年10月までに長崎自己免疫性肝炎研究会に登録されたAIH40例とPBC52例のうち、20か月以上経過観察され、かつ2回以上血清保存されている、国際診断基準で「definite AIH」と診断された20例（全例女性、年齢31～76歳、中央値55.5歳）を対象とした。

登録時の肝組織学的検討は、臨床情報を知らされていない病理医が、主に胆管病変の有無を中心に評価し、AMA出現との関連を検討した。

AMAの測定は、通常免疫蛍光抗体間接法に加えて、MESACUP-2テストミトコンドリアM2（MBL社）キットによるELISA法、およびウシ心筋ミトコンドリアを抗原に用いたWestern blot法にて行った。

さらに、血清総ビリルビン、AST、ALT、ALP、 γ -GTPの経時的変化とAMA出現の有無との関連を検討した。

C. 研究結果

definite AIH20例中、7例（35%）に組織学的に胆管病変が認められた。そのうち2例はPBCと区別がつかないCNSDCや小葉間胆管の消失が認められた。また、そのうち2例と他の5例、合計7例（35%）は、経過中少なくとも1回はWestern blot法にてAMA

陽性であった。

胆管病変の有無およびAMA出現の有無と、生化学データとの関連は認められなかった。

D. 考察

われわれはこれまでに、いわゆる自己免疫性胆管炎（AIC）の一部は経過中Western blot法でAMA陽性の時期があり、PBCと（一部の）AICはおそらく同じ疾患であり、一時点の血清反応性のみで判定するのではなく、経過を観察することによって総合的に考える必要性を報告してきた。AIHにおいても同様で、AIHの一部がAMA陽性であることが報告されているが、それがAIHの病態や経過にどのような影響を与えているかを今回検討した。その結果、20～68か月（中央値43か月）という比較的短い観察期間においては、AMA出現の有無と胆管病変などの組織学的所見および生化学的データとの関連は認められなかった。さらに長い観察期間での検討が必要と考えられた。

E. 結論

AIHにおけるAMAの臨床的意義は不明である。

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

1) Mishima S, Omagari K, Masuda J, et al : Clinical implication of antimitochondrial antibodies in autoimmune hepatitis. The 5th JSH Single Topic Conference. Nagasaki, 2006.

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

門脈圧亢進症とPBCの病態

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学大学院医学系研究科 先端病態制御内科学 教授

研究要旨：食道・胃静脈瘤や脾腫など門脈圧亢進症状とPBCの病態の関係を明らかにする目的にて以下の検討を行った。①当科で診断したPBCのうち経過観察中に皮膚痒感、黄疸、食道・胃静脈瘤、腹水の症候が出現した54例を食道、胃静脈瘤が他の症候に先行したPBC11例（v-PBC群）と皮膚痒感、黄疸が先行したPBC（s-PBC群）42例について、背景因子や血液生化学検査、肝細胞癌（HCC）の合併、予後の比較検討を行った。v-PBC群はs-PBC群に比べ年齢に差がなかったが、男性の割合が多かった。肝炎ウイルスマーカーや抗ミトコンドリア抗体などの自己抗体の陽性率に差はなかった。血液生化学検査では白血球数、血小板数、血清IgMがv-PBC群で有意に低かった（ $p < 0.05$ ）。v-PBC群では経過中、HCCの合併（5/11例）が有意に多かった（ $p = 0.0037$ ）。②当科にて経過観察中に腹部造影CT検査を行っているPBC症例77例を腹部造影CTを撮影した時の症候の有無により無症候性PBC（a-PBC）群42例と症候性PBC（s-PBC）群35例に分類、この2群について血液検査、肝、脾容積の比較検討を行った。s-PBC群は血清アルブミンやコリンエステラーゼが有意に低く（ $p < 0.01$ ）、総ビリルビン、ASTが有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。s-PBC群はa-PBC群と比較し脾容積が有意に大きかった（ $p < 0.001$ ）。

A. 研究目的

門脈圧亢進症状のあるPBCの予後やリスク、他の症候との位置づけなど詳細な臨床的特徴は不明な点が多い。食道・胃静脈瘤や脾腫などの門脈圧亢進症状のあるPBCの位置づけを解析することを目的とし以下の検討を行った。

B. 研究方法

①当科にて診断、経過観察された症候性PBCのうち腹部超音波検査、腹部造影CTなど画像診断が行われている54例。門脈圧亢進症状として胃・食道静脈瘤が先行した症例（v-PBC）12例、皮膚痒感、黄疸が先行した症例（s-PBC）42例に分類した。v-PBC群とs-PBC群について飲酒歴、喫煙歴などの生活歴、最初に症候が出現したときの年齢、各症候の有無、血算（白血球数・ヘモグロビン・血小板数）、生化学検査（AST・ALT・ γ -GTP・ALP・総蛋白・血清アルブミン・コリンエステラーゼ・総コレステロール）、血清学的検査（肝炎ウイルスマーカー・血清IgG・血清IgM）、肝細胞癌（HCC）の合併のリスク、死亡のリスクの比較検討を行った。②当科にて診断、経過観察を行い、経過観察中に腹部造影CT検査を行っているPBC症例77例を対象とし、腹部造影CTを撮影した時の症候の有無により無症候性PBC（a-PBC）群と症候性PBC（s-PBC）群に分類、その2群について血算（白血球数・血小板数）、生化学検査（AST・ALT・ γ -GTP・ALP・総蛋白・血清アルブミン・コリンエステラーゼ・総コレステロール）、腹部造影CTより測定した肝容積、脾容積を比較検討した。肝容積、脾容積はHeymsfield（Heymsfield SB, et al. Ann Intern Med. 1979;185-7.）らの方法に基づき、腹部造影CTを撮影、画像から肝臓、脾臓をトレースし、それをもとにAdobe Photoshop^R（Adobe Systems

Incorporated）、Scion Image^R（Scion Corporation）を用いて測定した。

統計学的検討はMann-Whitney U検定またはStudent T検定を用いた。

C. 研究結果

①背景としてv-PBC群とs-PBC群では症候出現時の年齢、喫煙歴、飲酒歴に差はなかったが、v-PBC群に男性が多かった（ $p = 0.041$ ）。血清中の肝炎ウイルスマーカーではHBs抗原、HBV-DNA、HCV-RNAは両群とも全例が陰性。HBc抗体、HBs抗体、HCV抗体の陽性率も両群で差はなかった。また抗核抗体の陽性率、抗ミトコンドリア抗体または抗ミトコンドリアM2抗体の陽性率にも差はなかった。症候出現時の血液検査ではヘモグロビン、総蛋白、血清アルブミン、コリンエステラーゼ、総ビリルビン、トランスアミナーゼ、ALP、 γ -GTP、総コレステロール、血清IgGに差はみられなかったが、白血球数（ $p = 0.010$ ）、血小板数（ $p = 0.004$ ）、血清IgM（ $p = 0.002$ ）が有意に低かった。また予後に関してはv-PBC群はs-PBC群と比較し死亡のリスクに差はなかった。しかし、v-PBC群ではHCCの合併率が有意に高かった（ $p = 0.0016$ ）。HCC診断までの観察期間は 123.6 ± 74.5 ヶ月と長期であった。肝炎ウイルスマーカーはHBs抗原、HBV-DNA、HCV抗体、HCV-RNAは全例陰性、HBc抗体は3人で陽性、HBs抗体は2人で陽性だった。Coxの比例ハザード法による症候性PBCにおけるHCC合併のリスク因子を検討したところ症候性PBCのHCC合併に関わる因子は症候出現時の血小板数、食道・胃静脈瘤のあること、食道・胃静脈瘤が他の先行することであった。②白血球数や血小板数にも有意差はなかったが、s-PBC群は血清アルブミン（ $p = 0.002$ ）やコリンエステラーゼ（ $p < 0.001$ ）が有意に低く、総ビリル

ビン ($p<0.001$), AST ($p=0.040$), 血清 IgG ($p=0.016$) が有意に高かった。肝容積は両群に差はないものの、脾容積 ($p<0.001$) に有意差がみられた。

D. 考 察

当科の検討では症候性PBC54例のうち12例では門脈圧亢進症状である食道・胃静脈瘤が痒痒感、黄疸など他の症候に先行していた。非硬変期に門脈圧亢進症状が出現する病態の鑑別の特発性門脈圧亢進症 (IPH) が挙げられるが、肝生検組織などにより否定された。症候出現時におけるv-PBC群とs-PBC群では白血球数や血小板数、血清IgMが低かった。白血球数、血小板数の減少は門脈圧亢進症を反映したものと考えられる。v-PBC群はs-PBC群と比較して生命予後は変わらないもののHCCを合併する可能性が高いことが明らかになった。v-PBC群にはHCV感染例はなく、またHBV既往感染症例が6例あるものの、血清HBV-DNAは全例で陰性であり、血清学的にHBVとHCV感染の関与は否定的であった。PBCとHCCの関連は不明な点はまだ多いが、近年PBCの管理や治療の向上による長期観察例の増加、HCCの診断技術の向上に伴いHCCを合併したPBCの報告例が増加している。PBCでのHCC合併のリスク因子としては肝炎ウイルス感染、男性、年齢、輸血歴、喫煙歴などが挙げられているが、現在のところ一定の見解はない。門脈圧亢進症状が先行するPBC症例は痒痒感や黄疸が先行するPBCと比較し男性に多く、HCCの発生が多かった。門脈圧亢進症状が先行したPBCはHCCの合併が高頻度であり、PBCの病期別分類の一重型「portal hypertensive PBC」であることが示唆され、食道・胃静脈瘤が先行するいわゆるv-PBCはそのプロトタイプであると考えられる。

また症候性PBCは無症候性PBCと比較し、脾容積が有意に高値であることが明らかになり、PBCの臨床病期の進行に伴い脾腫などの門脈圧亢進症状が潜在することが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 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