

また PXR は CYP3A4 の反応産物である 4β -hydroxycholesterol を選択した。

C4 が CYP7A1 活性の良いバイオマーカーであることは既に我々も報告しているが、今回はより少ない血清で分析を可能にする高感度化が達成された。Plant sterol と 4β -hydroxycholesterol がそれぞれ ABCG5/G8 と CYP3A4 の良いマーカーであることは他の施設により報告されているが、今回開発した新しい分析方法を用いて我々も確認する必要があると考えている。

PBC 患者血清の分析は今回 3 例と少ないが、来年度の予備実験として行った。PBC 患者では高コレステロール血症を呈する例も多く、大量のコレステロールが分析にどのような影響を与えるかの確認が必要なためである。今回の 3 例には血清コレステロール値が 400 以上の患者も含まれていたが、同じ方法にて特に支障なく定量が行えた。わずか 3 例（ベザフィブラート使用前後のデータがあるのは 2 例）ではあるが、ベザフィブラート投与前に比べて投与後で著明な血清 C4 濃度の低下を認め、CYP7A1 の抑制が起きていることが推測されたことから、そのことが肝組織中胆汁酸濃度を低下させ、胆汁うっ滞を改善させる一因になっていることが考えられた。またベザフィブラート投与で CYP7A1 の抑制が起きているということは、FXR の活性化が起きていると推測され、動物実験で示されているように、ヒトでも FXR を介して BSEP と MDR3 の発現が誘導され、胆汁うっ滞改善に寄与している可能性が示唆された。今後さらに症例数を増やした検討が必要である。

E. 結 論

核内レセプター FXR, LXR α , PXR 活性の *in vivo* バイオマーカーである血中 C4, plant sterol および 4β -hydroxycholesterol 濃度を、LC-MS/MS を用いて高い信頼性の下で高感度定量する方法を確立した。PBC 患者血清を用いた予備実験において、ベザフィブラートは FXR の活性化を介して肝内胆汁酸濃度を低下させ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) Honda A, Yamashita K, Numazawa M, et al: Highly sensitive quantification of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS. J Lipid Res 48 : 458-464, 2007.

2. 学会発表

1) 本多彰, 池上正, 松崎靖司: ヒト *in vivo* における核内レセプター FXR および LXR α 活性化状態の評価 (ワークショップ). 第 11 回日本肝臓学会大会, 神戸, 2007.

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患者肝の胆汁酸トランスポーターの変化とその相関—FXR, SHP, LXR, CYP7A1

研究協力者 向坂彰太郎 福岡大学医学部 消化器内科 教授

研究要旨:胆汁うっ滞モデルにおいて、胆汁酸トランスポーターが、胆汁酸の取り込み、合成、代謝、排泄などの働きに関与することが知られている。しかしながら、ヒトについては明らかではないためPBC患者肝組織における胆汁酸に関わるトランスポーターを解析した。PBC患者において、肝内NTCP, FXR, SHP, LXRA, FTF, CYP7A1, BSEP mRNAの発現は、いずれも増加していた。一方、進行PBC患者の肝内CYP7A1 mRNAの発現は、低下していた。進行PBC患者においても、胆汁酸の取り込みや排泄などに関わるトランスポーターは保たれ、CYP7A1発現が低下するという“胆汁うっ滞”に対する防御機構が働いていた。

共同研究者

竹山 康章 福岡大学医学部 消化器内科 助教

表1 PBC非進行患者と進行患者の胆汁酸トランスポーターmRNA発現

	PBC非進行患者(n=41)	PBC進行患者(n=5)	
NTCP	1328.1±114.6	393.3±52.5	<0.05
FXR	532.1±67.8	212.8±45.4	<0.05
SHP	201.8±16.9	152.6±33.1	NS
LXR	406.3±82.2	91.6±26.7	<0.01
FTF	369.7±70.0	64.2±6.6	<0.001
CYP7A1	1409.0±108.0	29.6±13.7	<0.01
BSEP	1081.7±97.8	562.2±69	<0.01

A. 研究目的

胆汁うっ滞モデルでは、胆汁うっ滞が進むとNTCP (胆汁酸の取り込みに関わる) が低下し、BSEP (胆汁酸の排泄に関わる) が増加することが知られている。さらに、胆汁酸合成に関わる酵素であるCYP7A1は低下し、胆汁酸合成を抑制することにより“抗胆汁うっ滞”防御機構が働いている。CYP7A1発現に関しては核内ホルモンレセプターである、FXR-SHP-LXRa-FTF系のシグナル伝達を介して調節されている。これらのトランスポーターのヒトの発現については明らかではないために、PBC患者の肝臓を用いて発現の検討を行った。

B. 研究方法

対象は、PBC患者 (十分なinformed consentのもと同意を得られた) 46名の肝臓組織。肝内NTCP, FXR, SHP, LXRA, FTF, CYP7A1, BSEP 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=5) 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

PBC患者の肝内NTCP, FXR, SHP, LXRA, FTF, CYP7A1, BSEP mRNAレベルは、各群ともコントロールに比べ有意に増加していた (図1)。PBC進行患者 (血清ビリルビン4.0mg/dl以上, n=5) の肝内NTCP, BSEP mRNAレベルは、PBC非進行患者肝のmRNAレベルに比べて有意に減弱していたが (表1), コントロールに比べて有意に増加していた (図2)。一方、肝内CYP7A1 mRNAレベルはPBC非進行患者肝, コントロールに比べて有意に低下していた (表1, 図2)。PBC進行患者の肝内SHP mRNAレベルは、コントロールに比べて増加傾向であり、肝内FTF mRNAレベルは有意に低下していた。

D. 考察

PBC進行患者の、肝内CYP7A1の発現の低下は、胆汁うっ滞モデルと同様に“抗胆汁うっ滞”防御機構と考えた。今回はmRNA発現レベルにおける検討を行ったが、タンパク発現レベル (イムノプロット法), シグナル伝達 (ゲルシフト法) などさらなる研究が今後必要であると考えた。

E. 結論

1. PBC患者において、胆汁酸の取り込みや排泄などに関わるトランスポーターの発現は増加し、PBC進行患者においても、それらの発現は保たれていた。
2. PBC進行患者のCYP7A1発現は低下し、“胆汁うっ滞”に対する防御機構が働いていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Irie M, Suzuki N, Sohda T, et al : Hepatic expression of gamma-glutamyltranspeptidase in the human liver of patients with alcoholic liver disease. Hepatol Res 37 : 966-973, 2007.
 - 2) Sohda M, Misumi Y, Yoshimura S, et al : The Interaction of Two Tethering Factors, p115 and COG complex, is Required for Golgi Integrity.

Traffic 8 : 270-284, 2007.

3) Tanaka Y, Sohda T, Matsuo K, et al : Vascular endothelial growth factor reduces Fas-mediated acute liver injury in mice. J Gastroenterol Hepatol : in Press, 2008.

4) Sohda T, Iwata K, Kitamura Y, et al : Reduced expression of low-density lipoprotein receptor in hepatocellular carcinoma with paraneoplastic hypercholesterolemia. J Gastroenterol Hepatol : in Press, 2008.

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

図1 PBC患者肝の胆汁酸トランスポーターmRNA発現

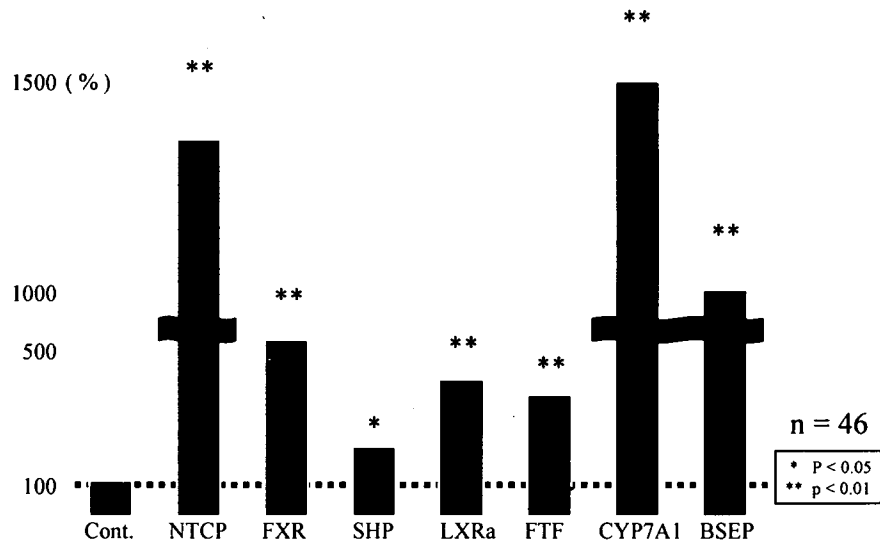
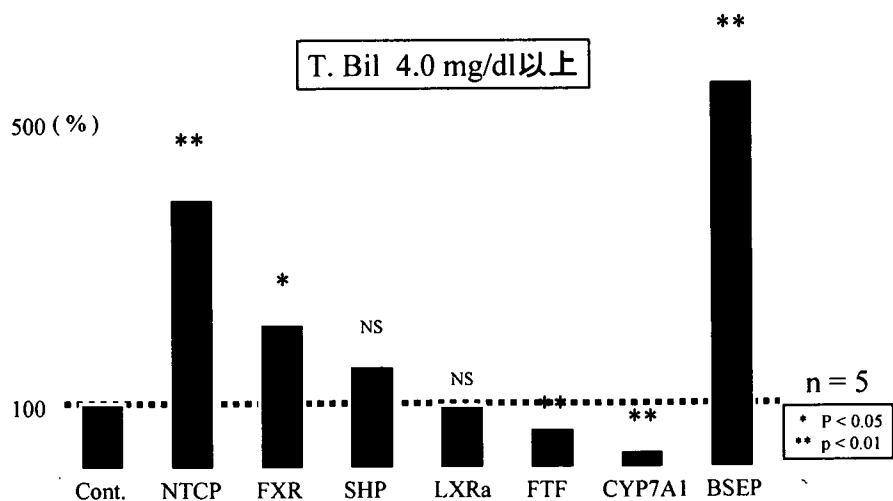


図2 PBC進行患者肝の胆汁酸トランスポーターmRNA発現



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症例の末梢血単核球遺伝子発現解析

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: 末梢血単核球 (以下PBMC) は多種の免疫担当細胞を含みその遺伝子発現は種々の疾患の診断や病態解析に有用であることが示唆されている。今回、原発性胆汁性肝硬変 (以下PBC) 10例のPBMCの遺伝子発現プロファイルをもとに10例の健常人と比較した。解析にはAffymetrix Human 133U Plus2.0を用いた。階層クラスタ解析により、PBC群と健常群で1症例を除き2群に群別されPBCのPBMCは健常人と異なることが明らかとなった。PBCではミトコンドリアの酸化的リン酸化、プロテアソーム、カスパーゼ、IL10、IL18、アクチン合成、上皮間葉移行、TCA サイクル (ミトコンドリア) に関わるパスウェイの活性化が認められ、PBCの病態との関連が示唆された。

A. 研究目的

これまでにPBC症例の肝組織の遺伝子発現プロファイルを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を報告してきた。PBMCは多種の免疫担当細胞を含みPBCをはじめ他の免疫疾患の診断や病態解析に有用であることが示唆される。今回、PBC症例のPBMCの遺伝子発現プロファイルを健常人と比較した。

B. 研究方法

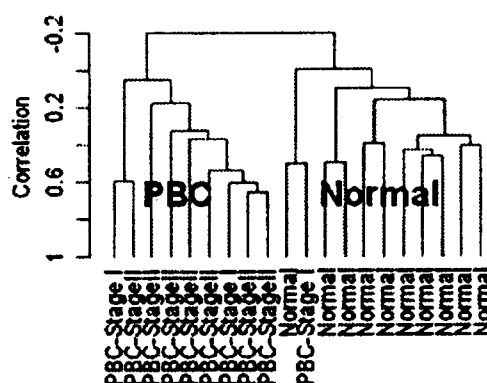
Stage I 及びIIの早期PBC症例10例、コントロールとして年齢・性別を合わせた健常人10例を対象とした。ヘパリン採血後、PBMCをFicollにて分離しtotal RNAを分離した。遺伝子発現解析にはAffymetrix Human 133U Plus 2.0を用いた。発現データ解析にはBRB array tool (NCBI)を用いた。

C. 研究結果

約5万4千遺伝子配列のうち、解析症例の半数以上に発現が認められた2万5千個の遺伝子を解析対象とした。2万5千個の遺伝子を用いて階層クラスタ解析を行った結果、PBC群と健常群で1症例を除き2群に群別された。クラスタ解析の障害となる、変動しない遺伝子をfilteringにて除き、少なくとも2割以上の症例で2倍以上の変動を示す遺伝子1300個を用いてクラスタ解析を行った (図)。同様に1症例のみmiss classificationされたが、より強いクラスタ傾向が認められ、クラスタの再現性は100%、誤分類確率は0%であった。

PBC症例で健常群に群別された1症例はALP値が263 (IU/ml) でありPBC群の中で最も活動性が低い症例であった。PBC群と健常群で異なる遺伝子のパスウェイを解析すると、PBC群ではミトコンドリアの酸化的リン酸化、プロテアソーム、カスパーゼ、IL10、IL18、アクチン合成、上皮間葉移行、TCAサイクル (ミトコンドリア) に関わるパスウェイの活性化が認められ、PBCの病態との関連が示唆された。

図



D. 考察

PBMCは多種の免疫担当細胞を含みその遺伝子発現は種々の疾患の診断や病態解析に有用であることが示唆されている。これまでにSLEの病態の活動性、腎細胞癌の予後、肝細胞癌に対するソラフェニブの治療効果予測に有用であるなどの報告がなされている。我々もC型慢性肝炎症例と健常者の違いや、糖尿病症例での遺伝子発現変化を報告している¹⁾²⁾。

今回、PBCのPBMCは健常者と明瞭に異なっていることが明らかとなった。PBCではミトコンドリアの酸化的リン酸化をはじめとした様々なパスウェイの活性化が認められた。今後、PBCの病態の進行に伴う変化の有無やC型慢性肝炎症例など他疾患との比較が必要である。また発現変化の誘因となる機序を解明するため肝浸潤リンパ球の解析も必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tateno M, Honda M, Kawamura T, et al : Expression profiling of peripheral - blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy. J Infect

Dis 195 : 255-267, 2007.

- 2) Takamura T, Honda M, Kaneko S, et al : Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. Biochem Bioph Res Co 361 : 379-384, 2007.

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の重症度に関連する遺伝子の同定と予後診断への応用

研究協力者 大曲 勝久 県立長崎シーボルト大学看護栄養学部 栄養健康学科 教授

研究要旨: PBCの進行に関与する遺伝子の同定を目的として、MDR3遺伝子多型とPBC重症化との相関解析を行った。PBC患者を病態や重症化への進行度から、early stage 群か late stage 群、あるいはnon-hepatic failure群かhepatic failure群の2群に分け、両群間で遺伝子多型の出現頻度の有意差検定を行った。進行への関与を認めたrs31658, rs31672, rs1149222の3つのSNPsを組み合わせてhaplotypeを構築し、haplotypeやdiplotype解析も行った。Hap 1/Hap 1の患者は黄疸を伴う重症肝硬変へ進行せず (p=0.011, OR=0.24), Hap 2/Hap 2の患者は黄疸を伴う重症肝硬変へ進行しやすかった (p=0.0003, OR=17.73)。本研究よりMDR3遺伝子はPBCの重症化関連遺伝子であることが示唆された。

共同研究者

塚元 和弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
薬物治療学 教授
大石 裕樹 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
薬物治療学
中村 稔 国立病院機構長崎医療センター
臨床研究センター
石橋 大海 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

して、この遺伝子多型とPBCの進行・重症度間で相関解析を行った。

B. 研究方法

PBC患者148名(stage I : 104例, stage II : 34例, stage III : 10例)を病態の進行と重症度から、early stage群(stage I)とlate stage群(stages II+III)に、またnon-hepatic failure群(stages I+II)とhepatic failure群(stage III)に分類した。MDR3遺伝子内に存在するSNPsから7つのtag SNPsを選別し、PCR-RFLP法とPCR-direct DNA sequencing法で多型解析した。各多型の出現頻度を各群間で有意差検定(カイ二乗法とロジスティック回帰分析法)を行った。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の患者で、病態の進行や薬剤に対する応答性に個人差を認め、他の自己免疫疾患の併発や家族集積性を認めることから発症や進行に遺伝因子の関与が示唆されている。本研究ではPBCの進行に関与する遺伝子を同定して、PBCが進行する分子機序を解明し、同時に重症化しやすい患者を予測できるbiomarker(s)を検索することを目的とする。ICPやPFICの発症に関与するMDR3遺伝子を候補遺伝子と

C. 研究結果

rs31658, rs31672, rs1149222はPBCの進行に関与していた(表1)。この3つのSNPsを組み合わせて8つのhaplotypesを構築した。Hap 1の出現頻度はlate stage群やhepatic failure群で有意に低かった(P=0.021, OR

表1 : Distributions of tag SNPs in MDR3 among PBC patients

SNPID	Allele	Number(%) of alleles in		Allele comparison*		Number(%) of alleles in		Allele comparison*	
		Early stage	Late stage	OR (95% CI)	P value	Non-hepatic failure type	Hepatic failure type	OR (95% CI)	P value
rs31658	C	146 (70.2)	52 (59.1)	1.63 (0.97-2.74)	0.064	192 (69.6)	6 (30.0)	5.33 (1.98-14.36)	0.0003
	T	62 (29.8)	36 (40.9)						
rs31672	T	152 (73.1)	52 (59.1)	1.88 (1.11-3.17)	0.018	195 (70.7)	9 (45.0)	2.94 (1.17- 7.7)	0.017
	C	56 (26.9)	36 (40.9)						
rs1149222	T	130 (62.5)	43 (48.9)	1.74 (1.05-2.89)	0.030	165 (59.8)	8 (40.0)	2.23 (0.88- 5.63)	0.083
	G	78 (37.5)	45 (51.1)						
others	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total number of alleles		208	88			276	20		

*Each allele was compared with other allele by chi-square test

表2 : Distributions of haplotypes of MDR3 among PBC patients

Haplotype	SNP ID			Number(%) of haplotypes in		Allele comparison*		Number(%) of haplotypes in		Allele comparison*	
	rs31658	rs31672	rs1149222	Early stage	Late stage	OR(95% CI)	P value	Non-hepatic failure type	Hepatic failure type	OR (95% CI)	P value
Hap1	C	T	T	111 (53.4)	34 (38.6)	0.55(0.33-0.91)	0.021	140 (50.7)	5 (25.0)	0.32(0.11-0.92)	0.033
Hap2	T	C	G	40 (19.2)	26 (29.5)	1.76(0.99-3.12)	0.053	56 (20.3)	10 (50.0)	3.93(1.56-9.90)	0.004
others	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total unumber of haplotypes				208	88			276	20		

*Each haplotype was compared with haplotypes combined by regression analysis

表3 : Distributions of diplotypes of MDR3 among PBC patients

Diplotype	Number(%) of haplotypes in		Allele comparison*		Number(%) of haplotypes in		Allele comparison*	
	Early stage	Late stage	OR(95% CI)	P value	Non-hepatic failure type	Hepatic failure type	OR (95% CI)	P value
Hap1/Hap1	31 (29.8)	4 (9.1)	0.24(0.08- 0.71)	0.011	35 (25.4)	0	-	-
Hap2/Hap2	4 (3.8)	5 (11.4)	3.21(0.82-12.56)	0.095	4 (3.6)	4 (40.0)	17.73(3.77-83.42)	0.0003
others	-	-	-	-	-	-	-	-
Total unumber of patients		104	44		138	10		

*Each diplotype was compared with other diplotypes combined by logistic regression analysis

=0.55 と P=0.033, OR=0.32), Hap 2 の出現頻度は hepatic failure 群で有意に高かった (P=0.004, OR=3.93) (表2)。また, diplotype解析でHap 1/Hap 1の患者はlate stage群で少なく (P=0.011, OR=0.24), hepatic failure群にはいなかった。Hap 2/Hap 2の患者はhepatic failure群に多かった (P=0.0003, OR=17.73) (表3)。

D. 考 察

Hap 2/Hap 2多型は黄疸を伴う重症肝硬変へ進行しやすい感受性を示し, 逆にHap 1/Hap 1多型は黄疸を伴う重症肝硬変へ進行しない抵抗性を示した。これらのSNPsやhaplotypesの機能解析を行っていないが, MDR3が胆管上皮から管腔へphosphatidylcholineを分泌して胆汁酸塩をミセル化する機能の低下によりPBCの重症化に関与していることが示唆される。更なる機序解明が必要である。

E. 結 論

MDR3遺伝子は, PBCの重症化関連遺伝子であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mishima S, Omagari K, Ohba K, et al : Clinical implications of antimitochondrial antibodies in type 1 autoimmunehepatitis: a longitudinal study. Hepato-gastroenterol : in press, 2008.

2. 学会発表

1) 大石裕樹, 飯尾直美, 比嘉辰伍, 他 : MDR3はPBCの重症化関連遺伝子である。日本薬学会第128年会, 横浜, 2008.

2) 飯尾直美, 大石裕樹, 比嘉辰伍, 他 : PBCの重症化関連遺伝子の同定。日本薬学会第128年会, 横浜, 2008.

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

フェニルブチレートによるトランスポーター安定化作用機構の解析

分担研究者 杉山 雄一 東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学 教授

研究要旨: Bile salt export pump (BSEP) は、肝細胞の毛細胆管側膜上に発現し、肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄を担うトランスポーターである。BSEPをコードする遺伝子の変異により発症する進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型に代表されるように、肝細胞毛細胆管側膜上におけるBSEPの機能低下は肝内胆汁うっ滞を惹起することが知られているが、その分子機構は不明であり、確固たる内科的療法が存在しないのが現状である。これまでに、我々は4-phenylbutyrate (4PBA) という尿素サイクル異常症の治療薬が、BSEPの毛細胆管側膜上における発現量を増加させ、胆汁酸排泄機能を上昇させることを明らかにした。しかし、培養細胞を用いたin vitro実験及びSDラットを用いたin vivo実験の結果から、臨床適用の際には大量投与が必要となることが推測された。本年度は、将来的に4PBAよりも低投与量でBSEPの輸送活性を上昇させる化合物を開発することを目的とし、4PBAがBSEPの細胞膜上において発現量を上昇させるメカニズムについて検討を行った。ビオチンラベル法を用い、細胞膜上からのタンパク質分解速度を評価した結果、4PBAは細胞膜上からのBSEPの分解を抑制することが明らかとなった。BSEP mRNAの発現量やBSEPのタンパク合成量、細胞膜へのTraffickingに関しては、4PBA処理により変化は観察されなかった。以上の結果から、4PBAは細胞膜上からのBSEPの分解抑制により、BSEPの細胞膜上発現量を増加させていると考えられる。現在、マイクロアレイ、プロテオミクスといった網羅的解析を行い、4PBA処理により変化が観察される遺伝子、タンパク質の同定を進めている。

A. 研究目的

Bile salt export pump (BSEP) は、肝細胞の毛細胆管側膜上に発現し、肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄を担うトランスポーターである。BSEPをコードする遺伝子の変異により発症する進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型に代表されるように、肝細胞毛細胆管側膜上におけるBSEPの機能低下は肝内胆汁うっ滞を惹起することが知られているが、その分子機構は不明であり、確固たる内科的療法が存在しないのが現状である。これまでに、我々は4-phenylbutyrate (4PBA) という尿素サイクル異常症の治療薬がBSEPの毛細胆管側膜上における発現量を増加させ、その結果、胆汁酸排泄機能が上昇することを明らかにした (Hayashi H and Sugiyama Y. *Hepatology* 45: 1506-1516, 2007)。しかし、培養細胞を用いたin vitro実験及びSDラットを用いたin vivo実験の結果から、臨床適用の際には大量投与が必要となることが推測された。本研究は、将来的に4PBAよりも低投与量でBSEPの輸送活性を上昇させる化合物を開発することを目的とし、4PBAがBSEPの細胞膜上において発現量を上昇させるメカニズムについて検討を行った。

B. 研究方法

4PBAによるBSEPの細胞膜上発現量増加機構の解析には、組換えアデノウイルスにより構築したBSEP発現MDCKII細胞を用いた。細胞膜上発現量増加機構は、転写、分解、細胞膜へのTraffickingの三段階に分け、評価した。

①転写段階の検討

4PBA処理 (1mM, 24h) 細胞からmRNAを調整し、

逆転写反応を行った。調整したサンプルを用いて、定量的PCRを行い、mRNA発現量を測定し、4PBAの転写段階への影響を評価した。

②分解段階の検討

細胞膜上に発現しているBSEPをNHS-SS-Biotin (ピアス社) でラベルし、37°Cで一定時間のインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、細胞を可溶化し、Avidinビーズ (ピアス社) を用いて、分解を受けず、細胞内に残っているBiotinラベルされたBSEPを回収した。さらに、回収したサンプルをSDS-PAGEで分離し、Western Blottingにより、解析・定量することで、4PBA処理 (1mM, 24h) によるBSEPの分解への影響を評価した。

③細胞膜へのTrafficking段階の検討

細胞を [³⁵S] Cystein/Methionineを含有する培地で培養し、1時間後、[³⁵S] Cystein/Methionine不含の培地に交換した。交換後、細胞を37°Cで1, 2, 5時間インキュベーションし、細胞の可溶化後、抗BSEP抗体で [³⁵S] ラベルされたBSEPを精製した。サンプルは、SDS-PAGEで分離し、BSEPのmature formの総量を評価することで、4PBA処理 (1mM, 24h) によるBSEPの細胞膜へのTrafficking段階への影響を評価した。

C. 研究結果

①転写段階の検討

4PBA処理細胞ではコントロール細胞に比して、BSEP mRNA発現量に若干の増加が観察されたが、統計学的には有意な差は観察されなかった。

②分解段階の検討

ビオチンラベル法を用いて、細胞膜上BSEPの半減

期を算出した結果、コントロール細胞では約7時間であるのに対し、4PBA処理細胞では約15時間に延長していることが明らかとなった。

③細胞膜へのTrafficking段階への影響

Pulse chase実験を行い、BSEPのmature formの総量、生成速度を評価した結果、コントロール細胞と4PBA処理細胞で有意な差は観察されなかった。

D. 考 察

4PBAは細胞膜上からのBSEPの分解抑制により、BSEPの細胞膜上発現量を増加させていることが示唆された。今後、4PBAの標的分子を同定し、BSEPの分解抑制に関与するより詳細な分子機構を解明することで、将来的な肝機能改善薬開発に極めて重要な情報が明らかになることが期待される。我々は、現在、マイクロアレイ、プロテオミクスといった網羅的解析を行い、4PBA処理により変化が観察される遺伝子、タンパク質の同定を進めている。今後、同定された分子のうち、タンパク質分解に関与することが報告、あるいは予想される分子に焦点を絞り、4PBAがBSEPの発現量増加を引き起こす詳細な分子メカニズムについて解析を進める予定である。

E. 結 論

4PBAは細胞膜上からのBSEPの分解抑制により、BSEPの細胞膜上発現量を増加させていることが考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hayashi H, Sugiyama Y : 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* 45 : 1506-1516, 2007.

2. 学会発表

1) 林久允, 杉山雄一 : 4-phenylbutyrateが野生型及び、PFIC2変異型BSEPを介した胆汁酸輸送に及ぼす影響. 第16回日本小児胆汁酸研究会, 東京, 2006.

2) 林久允, 杉山雄一 : 4-phenylbutyrateがBSEPを介した胆汁酸輸送に及ぼす影響. 第15回肝病態研究会, 東京, 2006.

3) 林久允, 杉山雄一 : 4-phenylbutyrate (4PBA) が野生型及び、PFIC2変異型Bile Salt Export Pump (BSEP) を介した胆汁酸輸送に与える影響. 第14回肝細胞研究会, 鹿児島, 2006.

4) 林久允, 杉山雄一 : 4-phenylbutyrate (4PBA) が野生型及び、PFIC2変異型Bile Salt Export Pump (BSEP) を介した胆汁酸輸送に与える影響. 第2回トランスポーター研究会, 東京, 2006.

5) Hayashi H, Sugiyama Y : Sodium 4-phenylbutyrate enhances cell surface expression and transport capacity of wild-type and PFIC2-type mutated Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11). 第8回ISSX, 仙台, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 申請中

【発明の名称】膜タンパク質の安定化剤及び安定化方法

【出願番号】特願2007-182846

【申請年月日】平成19年7月12日 (2007.7.12)

MDCK II細胞を用いてBSEP基質の経細胞輸送を評価することにより、野生型及び変異型BSEPの細胞膜上発現量を増加させる作用を持つ化合物を簡便に評価するスクリーニング系を確立した。さらにこの系を用いて、4PBAが細胞膜上BSEPを安定化させることにより、野生型及び変異型BSEPの細胞膜での発現量を増加させることを同定した。

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

PBCにおける自己抗原反応性T細胞の解析（健常者での自己抗原反応T細胞との比較）

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

研究要旨：自己抗原に反応するCD4陽性 T細胞は自己免疫疾患において中心的役割を果たすと考えられるが、健常者においても存在することが明らかとなっている。先に我々は原発性胆汁性肝硬変（PBC）患者では、ほぼ疾患特異的に出現する抗ミトコンドリア抗体の対応抗原である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細胞が存在すること、PBC由来のPDC-E2反応性 T細胞は抗原提示細胞からの側副刺激を必要としない場合が多い一方健常者由来のPDC-E2反応性 T細胞は側副刺激依存性であることが多いこと、側副刺激依存性の T細胞を側副刺激を欠いた抗原提示で刺激した場合 T細胞にアナジーが誘導され最終的に免疫調節能を有する T細胞に形質転換することを明らかとした。

今回我々はPBC由来の自己抗原PDC-E2に反応する側副刺激非依存性 T細胞クローンを詳細に検討し、PDC-E2の変異抗原を用いて側副刺激分子がない環境で刺激することで T細胞をアナジーに誘導できることを見出した。これはPBC由来の疾患を司る自己抗原反応性 T細胞自体を免疫調節能を有する T細胞に変換し自己免疫をできる細胞療法の可能性を示すものである。

A. 研究目的

PBCならびに健常者由来の自己抗原反応性T細胞の性状を解析することで、PBCにおける細胞療法の可能性を探索する。

B. 研究方法

PBCでは90%以上の症例で疾患特異的に抗ミトコンドリア抗体が出現する。この対応抗原であるPDC-E2のCD4陽性T細胞のエピトープであるPDC-E2 163-176アミノ酸残基を合成した。抗原提示細胞として、PDC-E2 163-176ペプチドはHLA DR53に拘束されて抗原提示されることが明らかとなっているので、HLA DR53陽性のPBC症例、あるいは健常者を用いて解析した。抗原提示細胞として自己の末梢単核細胞（PBMC）を側副刺激があるものとして、またマウス線維芽細胞にHLA DR53を遺伝子導入した細胞（L-DR53）を側副刺激がないものとして用いた。これらのペプチド抗原提示に反応するT細胞の増殖能、サイトカイン産生能をPBCならびに健常者で解析するとともにT細胞に抗原刺激を続け抗原反応性T細胞クローンを多数樹立した。このT細胞クローンの反応性を、自己PBMCあるいはL-DR53を抗原提示細胞として、また抗原としてPDC-E2 163-176以外にこの変異ペプチドを作成し、細胞の増殖能、サイトカイン産生能を検討した。またL-DR53に側副刺激分子であるCD80やCD86を遺伝子導入した細胞株を作成しさらなる検討を加えた。

C. 研究結果

抗原提示細胞をPBMCにした場合PBC、健常者ともに末梢CD4養成細胞は自己抗原に対してIL-10産生を伴うTh1タイプの反応を示した。抗原提示細胞をL-DR53にした場合、PBCでの反応性はそのまま保たれていた一方健常者ではIL-10の産生のみが保たれており、それらの細胞は免疫制御能を獲得していた（既報）。

今回PBC患者より樹立した多数のPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンを解析した結果、本来の自己抗原であるPDC-E2 163-176に対しては側副刺激非依存性である一方、各クローンで異なるものの、PDC-E2 163-176の変異ペプチド抗原を用いて側副刺激が欠損した環境でT細胞を刺激した場合T細胞にアナジーが誘導され、アナジーT細胞は免疫制御能を獲得することが明らかとなった。ここにCD80やCD86といった側副刺激がT細胞に入るとアナジーが誘導できないことも併せて確認した。

D. 考察

健常者に存在する側副刺激依存性の自己抗原反応性T細胞は、生体内ではアナジーが誘導されている可能性が高く、万一標的細胞に自己抗原が誤って表出されたとしてもアナジーT細胞が免疫制御能を有するため自己免疫の発症を制御している可能性が考えられた。一方PBCにおいて多く存在する側副刺激非依存性の自己抗原反応性T細胞は、生体外で側副刺激のない環境で変異抗原刺激した場合アナジーが誘導されるため、アナジー誘導後生体内に戻すことで自己抗原に対して免疫制御能を持つ役割を果たすことが期待できた。ただし側副刺激が存在した場合T細胞にアナジーが誘導できないことから、自己免疫の病変部位では側副刺激分子の発現が多く認められるため、生体内に変異ペプチドを投与しても、自己抗原反応性T細胞にアナジーは誘導できないであろうと考えられた。

E. 結論

自己免疫疾患であるPBCでは自己抗原反応性T細胞クローンを患者末梢血より樹立して、そのクローンに対応した変異抗原を用いて生体外で、側副刺激のない環境で刺激し、アナジーに陥ったT細胞を生体内に移入する細胞免疫療法が、自己免疫疾患のコントロール

に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawano A, Shimada S, Kamihira T, et al :
Peripheral tolerance and the qualitative
characteristics of autoreactive T cell clones in
primary biliary cirrhosis. J Immunol 179 : 3315-
3324, 2007.

2. 学会発表

2007日本免疫学会総会

第58回アメリカ肝臓学会総会

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：PBC患者のAMAのIgGサブクラスを日米で比較した。主なサブクラスはIgG2であったが、米国ではPDC-E2に対するIgG3の反応性が高かった。日本のPBC患者の末梢血単核球細胞をCpGで刺激した場合、血清のIgGサブクラスと同様の結果が得られたため、AMAの産生に自然免疫反応が関与している可能性があると考えた。

共同研究者

菊池健太郎 帝京大学溝口病院 第四内科 講師

A. 研究目的

ヒトのIgGは抗原の起源やサイトカインによる影響を受け、4つのサブクラスに分化している。PBCにおけるAMAはSurhらによる報告以降、間接蛍光抗体(IF)法やELISAによりIgG3が優位と考えられてきたが、IgG2とする報告や国別による差異の推測もある。AMA産生の意義を追求することはPBCの病態解明に繋がると考え、今回、本邦および米国のPBC血清を用いてPDC-E2、BCOADC-E2、OGDC-E2に対する各IgGサブクラスの反応性を比較検討し、その頻度と意義を検討した。

B. 研究方法

本邦のPBC血清65例および米国のPBC血清64例を用い、recombinant PDC-E2、BCOADC-E2、OGDC-E2に対するIgGサブクラスの反応性を比較検討した。健康人20例の血清でカットオフ値を設定した。

また、本邦のPBC 14例の末梢血単核球細胞を、自然免疫刺激であるCpGおよびB細胞の活性化物質であるpokeweed Mitogen (PWM)で刺激し、AMAの各IgGサブクラスの産生をMIT3-ELISAを用いて測定した。

C. 研究結果

日米ともPDC-E2、BCOADC-E2、OGDC-E2に対してIgG2の陽性例が多かったが、米国はPDC-E2において、IgG3陽性例がIgG2陽性例よりも多く、IgG3陽性例の平均OD値も米国で有意に高かった。Ex vivo実験の結果、CpG刺激ではIgG2-AMAの産生を最も多く認め、次いでIgG3-AMAが多く、血清のIgGサブクラスの陽性率とよく似た結果が得られた。PWM刺激でIgG1-AMA、IgG4-AMAの産生はCpGと同程度であったが、IgG2-AMA、IgG3-AMAの産生はCpG刺激よりも低く、血清の反応性と相違していた。

D. 考察および E. 結論

AMAのサブクラスは主にIgG2であった。日米でPDC-E2に対するIgG3の反応性に相違を認めた。AMA

のサブクラスにIgG2、IgG3が多いのは、AMAの産生に自然免疫反応が関与しているためではないかと考えた。

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) 菊池健太郎, 細谷直美, 宮川浩, 他: 本邦の原発性胆汁性肝硬変に検出される抗ミトコンドリア抗体のIgGサブクラスについての検討. 第44回日本肝臓学会総会, 松山, 2008.

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おけるCpG DNA結合蛋白の解析

研究協力者 大平 弘正 福島県立医科大学医学部 内科学第二講座 教授

研究要旨：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、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 病態における自然免疫の関与が近年注目されている。これまで、PBCにおけるTLR9とCpG DNAに関する検討を行ってきたが、CpG DNA認識に関わる機構については不明な点が多い。今回我々は、CpG DNA結合蛋白質として新たにヌクレオリンを同定し、この分子の局在とPBC患者における発現に関して検討した。ヌクレオリンは主に核小体に存在しN-terminal, RBD, RGGの3つの主要ドメインより構成されるが、このうちCpG DNAはRGGドメインと結合した。ウエスタンブロッティングによりヌクレオリンが細胞膜と細胞質にも存在することを確認した。また、J774細胞の免疫染色でヌクレオリンとCpG DNAの局在が細胞表面で一致した。PBC患者の末梢血単核球におけるヌクレオリン発現量をリアルタイムPCR法にて健常人と比較すると、有意に発現量の増加を認めた。本研究において、CpG DNA結合蛋白としてヌクレオリンが同定され、PBC患者末梢血単核球におけるヌクレオリンmRNA発現量が健常人に比し増加していたことから、PBCにおけるCpG DNAに対する高反応性にヌクレオリン発現が関与する可能性が示唆された。

共同研究者

高橋 敦史 福島県立医科大学医学部 内科学第二講座
斉藤 広信 福島県立医科大学医学部 内科学第二講座

A. 研究目的

非メチル化CpGモチーフを有するバクテリアDNAや合成DNAは、B細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞などの免疫担当細胞を活性化する。CpGモチーフによる免疫細胞の活性化にはToll like receptor (TLR) 9が必須であることが報告されているが、TLR9は細胞内のエンドソームで発現しており、CpG DNAがどのような経路で認識されるかについては不明な点が多い。一方、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) においても自然免疫との関与が示唆され、抗原非特異的な免疫のみならず獲得免疫の連携にも関与するTLR9に関する報告が数多くなされてきている。そこで、CpG DNA認識に関与する分子の同定を行い、その分子の局在とPBC患者における発現に関して検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. CpG DNA結合蛋白の同定と局在

ヒト急性単球型白血病細胞 (THP-1) から膜画分を抽出し、CpGおよびGpCオリゴDNAをカップリングしたビーズを用い、DNAアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った。各ビーズから溶出した蛋白質はSDS-PAGEにて分離し、銀染色にて検出した。CpGオリゴDNAに特異的に結合した蛋白をMass解析により同定した (ヌクレオリン)。さらに組換え体の結合蛋白を作成し、CpG DNAとの結合に関わる領域を決定した。また、マウスのマクロファージ系腫瘍細胞 (J774) を免疫染色して結合蛋白とCpG DNAとの局在について共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

2. 末梢血単核球におけるヌクレオリン発現

PBC患者 (n=35) 末梢血単核球からcDNAを作成し、リアルタイムPCR法にてヌクレオリンmRNA発現量をGAPDH発現量の比として検討した。対照として、健常人 (n=16) 末梢血単核球を用いた。

C. 研究結果

DNAアフィニティーカラムにより分子量約60kDaのCpG DNA結合蛋白質を単離した。Mass解析でこの蛋白質はヌクレオリンの一部であることが判明した。ヌクレオリンは主に核小体に存在しN-terminal, RBD, RGGの3つの主要ドメインより構成されるが、このうちCpG DNAはRGGドメインと結合した。ウエスタンブロッティングによりヌクレオリンが細胞膜と細胞質にも存在することを確認した。また、J774細胞の免疫染色でヌクレオリンとCpG DNAの局在が細胞表面で一致した。一方、末梢血単核球におけるヌクレオリンの発現量 (ヌクレオリン発現量/GAPDH発現量) に関する検討では、PBC患者において 7.28 ± 9.69 、健常人 0.37 ± 1.32 と有意に ($p < 0.01$) PBC患者で発現量の増加が認められた。

D. 考察

ヌクレオリンは707アミノ酸からなる分子量105kDaの蛋白で3つの構造ドメインをもつ。主に核小体に存在し、リボソームの合成に関与しているが、核一細胞質間を移動するシャトリング蛋白で細胞膜にも存在する。細胞膜に存在するヌクレオリンは単独、あるいは他のレセプターと複合体を形成しシグナル伝達に関与することが報告されている。今回の検討でCpG DNA結合蛋白としてヌクレオリンが同定され、PBC患者末梢血単核球におけるヌクレオリンmRNA発現量が健常人に比し増加していたことから、PBCにおけるCpG

DNAに対する高反応性にヌクレオリン発現が関与する可能性が示唆された。今後、B細胞におけるヌクレオリン発現とCpG DNAとの反応性について検討する必要がある。

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 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

- ①原発性胆汁性肝硬変の新しい病期および活動度分類の提唱
- ②原発性胆汁性肝硬変の胆管病変の免疫病理学的解析

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：

①新しいPBCの病期分類，活動度分類を提唱した。
 ②原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態形成におけるTh17細胞と胆道系自然免疫のかかわりについて検討した。胆管細胞は自然免疫応答にてTh17細胞への誘導および維持サイトカインであるIL-1 β ，IL-6，IL-23の発現が誘導された。また，PBCの胆管炎周囲にIL-17陽性細胞（Th17細胞）が散見され，さらに胆管ではIL-1 β ，IL-6，IL-23が発現していることより，PBC胆管における自然免疫応答が胆管周囲でのTh17細胞への分化誘導に関与していると推測された。さらに，胆管細胞はIL-17刺激にてIL-1 β ，IL-6およびケモカインの発現が誘導された事より，Th17細胞はさらなるTh17細胞の分化誘導と炎症の持続に関与し，PBCにおける慢性胆管炎の組織発生に加担していると推測された。

①原発性胆汁性肝硬変の新しい病期および活動度分類の提唱

A. 研究目的

現在，一般的に用いられている原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病期分類としてScheuer分類が代表的であり，PBCに特徴的な肝病変から1，2，3，4期に分類するものである。1期が慢性非化膿性破壊性胆管炎（CNSDC）であり，4期が肝硬変期であり，1967年に発表された。また，1978年，Ludwigらも同じくPBCに特徴的な病変からPBCを1，2，3，4期に分類した。Ludwig分類では，慢性肝炎様の変化（インターフェイス肝炎や架橋性壊死）を病期分類に取り入れた点が特徴的である。しかし，PBCでは肝内の部位によりその病理組織像が異なることが知られており，従来の病期分類ではサンプリングエラーの問題が解決されていない。さらに，これらの病期分類はいずれも30年以上も前に提唱されたものであり，最近，ウィルス性肝炎やNASHで用いられている活動度と線維化（病期）の両方を取り入れた判定的な病態把握の概念が含まれていない。これらの問題点を解決するため，我々は新しい病期分類を提唱する（表1）。

B. PBC病理組織像の新しい評価

PBCの肝生検で一般的に観察される17種の病変を抽出し，これらを因子解析により大きく1群（肝線維化，線維性ピースミール壊死，胆汁栓，マロリ体，網状変性，胆管消失，非定型的細胆管増生），2群（門脈域の炎症，好酸球浸潤，リンパ濾胞，類上皮肉芽腫，慢性非化膿性破壊性胆管炎を含む胆管炎），それに3群（インターフェイス肝炎，小葉炎，好酸体，色素貪食細胞）に分けることが出来た。1群は，MayoクリニックのPBCの予後計算式や臨床像との関連性を示した。一方，2群と3群の所見は，これらとは関連性を示さなかった。

そこで，PBCの進行度あるいは病期に関連する病変として，1群の病変の中から肝線維化，胆管消失，それにオルセイン陽性顆粒の沈着（銅結合蛋白であり，慢性胆汁うっ滞を反映）を抽出し，またPBCの活動度に関連する病変として，慢性非化膿性破壊性胆管炎を含む胆管炎，インターフェイス肝炎，肝小葉炎を抽出し，これらの病変の組み合わせにより，PBC肝全体の進展度（病期）と活動度を設定した。

表1 PBCの新しい病期:活動度の組織学的指標

病期の指標	0	1	2	3
組織化	Absent or limited in portal tracts	Periportal fibrosis (incomplete septa)		
胆管消失	Absent	<1/3 portal tracts	1/3-2/3 portal tracts	>2/3 portal tracts
オルセイン陽性顆粒の沈着	Absent	<1/3 periportal areas	1/3-2/3 periportal areas	>2/3 of periportal areas
活動度の指標	0	1	2	3
慢性胆管炎	Absent or ambiguous	Evident cholangitis in <1/3 portal tracts	Evident cholangitis in 1/3-2/3 portal tracts	Evident cholangitis in >2/3 portal tracts
インターフェイス肝炎	Absent	Focal and mild	Moderate	Severe and extensive
肝小葉炎	Absent	Mild and focal	Many and multiple, focal necroses	Zonal/bridging necrosis

C. PBCの新しい病期および活動度分類とその応用

従来の慢性肝炎やNASHの病期および活動度分類では、3段階あるいは4段階の分類が多い。そこで今回の新分類でも病期と活動度をそれぞれ、4段階とすることとした(病期S1, S2, S3, S4および活動度A0, A1, A2, A3)。この新分類では、6種類の組織病変がPBCの病期stagingあるいは活動度gradingに応用するものである。

病期:線維化,胆管消失,オルセイン陽性顆粒の沈着を表1に示す如く,それぞれ0, 1, 2, 3にスコア化し,その合計によりS1(総計が0), S2(総計が1-3), S3(総計が4-6), S4(総計が7-9)に分類した。

活動度:胆管炎を(表1)に示すごとく0, 1, 2, 3にスコア化した。肝実質炎とインターフェイス肝炎の組み合わせにより0, 1, 2, 3にスコア化する。そして,その合計によりA0(総計が0), A1(総計1-2), A2(総計3-4), A3(総計5-6)とする。従って,個々の症例の病期活動度は, S2, A1などと記載されることになる。

D. まとめ

最近の病期,活動度を取り入れた新しいPBCの病期分類を提唱した。この分類では6種類の病変を判定量的に用いるので,サンプリングエラーや主観が少なくなると思われる。また,6種類の病変あるいはいくつかの組み合わせでPBCの病態の把握や治療効果判定に応用出来る利点もある。今後,この分類が普及することを期待したい。

E. 文 献

- 1) Hiramatsu K, Aoyama H, Nakanuma Y, et al: Proposal of a new staging and grading system of the liver for primary biliary cirrhosis. *Histopathology* 49: 466-478, 2006.

②原発性胆汁性肝硬変の胆管病変の免疫病理学的解析

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推測されているが,細菌の存在がPBCの胆管病変などの病態形成にどのように関与しているかは不明である。現在まで我々は,胆管細胞が菌体成分認識受容体であるToll様受容体(TLR)を発現し,さらにPathogen-associated molecular patterns(PAMPs)に対する反応性も示すことから,胆管系独自の自然免疫機構が存在することを明らかにした。さて,免疫系を制御するヘルパーT細胞は,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態の発生に関連するとされている。しかし,近年,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, IL-6, IL-1 β (マウスではTGF- β)の存在下で前駆T細胞から分化誘導および維持さ

れ,分化後はIL-17(A), IL-17Fなどの炎症性サイトカイン産生を特徴とする。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着目し, Th17環境形成における胆道系自然免疫の関与について検討した。

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または外科的部分切除肝より培養・樹立した。また,ヒト肝組織として,PBC8例(1~2期),ウイルス慢性肝炎9例(F1~F2, HCV関連)のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。

2. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

培養胆管細胞におけるIL-23(IL-23 p19およびIL-23/IL-12 p40), IL-6, IL-1 β , IL-17受容体(IL-17RA, RC)および各種ケモカインのmRNA発現をRT-PCRで検出し,またリアルタイムPCRで定量比較した。

3. TLRリガンド, IL-17による刺激

TLRリガンド(PAMPs)としてLPS(TLR4リガンド, 1 μ g/ml), Pam3CSK4(TLR1/2リガンド, 100ng/ml), Poly(I:C)(TLR3リガンド, 25 μ g/ml), またはIL-17(1000U/ml)を培養上清に添加し,刺激後3時間目の培養胆管細胞をmRNA解析に供した。

4. 免疫組織化学的染色

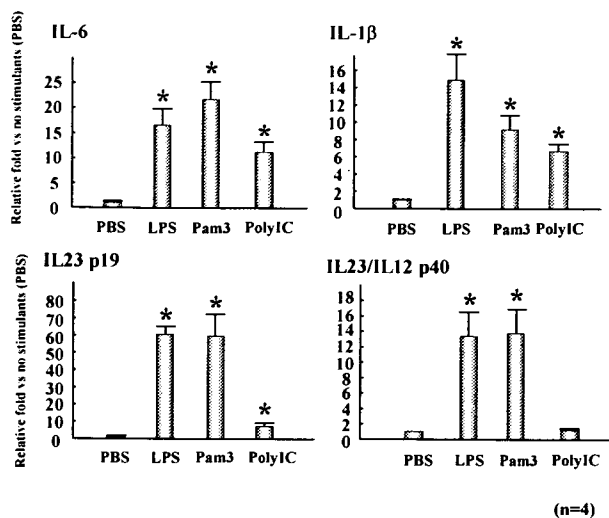
T-bet(Th1), GATA3(Th2), IL-17(Th17), IL-23 p19, IL-6, IL-1 β に対する抗体を用いてEnvision法(Dako)にて免疫組織化学的染色を行った。評価は,各症例より3~5個の胆管を評価対象とし,IL-17に関しては胆管周囲の陽性細胞数,IL-23 p19, IL-6, IL-1 β に関しては胆管における発現強度を0~3に評価して,各症例ごとに平均値を算出した。

C. 研究結果

1. 胆管細胞におけるTh17誘導性サイトカインの発現とPAMPs刺激による発現誘導

ヒトTh17細胞誘導性サイトカインであるIL-6, IL-1 β , IL-23の発現についてRT-PCRにて検出した結果,培養胆管細胞におけるこれらのサイトカインの発現は無刺激状態では軽微または皆無であった。しかし,LPS, Pam3CSK4刺激でIL-23(IL-23 p19およびIL-23/IL-12 p40), IL-6, IL-1 β の発現誘導が見られ,またPoly(I:C)刺激でもIL-23 p19, IL-6, IL-1 β の発現が誘導された(図1)。

図1 PAMPs刺激によるTh17細胞誘導性サイトカインの誘導



2. 肝組織内でのTh17細胞の分布および胆管におけるIL-23 p19, IL-6, IL-1βの発現

PBCの胆管周囲にはT-bet陽性のTh1細胞が多数浸潤しており、GATA3陽性のTh2細胞はほとんど認めなかった。IL-17にてTh17細胞を同定した結果、Th1細胞に比べ浸潤陽性細胞数は少ないが、PBCの胆管炎周囲および門脈域辺縁にIL-17陽性細胞が散見され、胆管周囲では平均5.7個認められた(図2)。ウイルス性慢性肝炎では門脈域辺縁に陽性細胞を散見したが、胆管周囲ではごく少数であった(平均1.3個)。また、胆管におけるIL-23 p19, IL-6, IL-1βの発現を検討した結果、IL-23 p19は恒常的に肝内胆管で発現しており、胆管における疾患特異的な所見は認めなかった(PBC 2.45, ウイルス性慢性肝炎 2.56)。しかしIL-6, IL-1βの発現は、PBCの胆管でIL-6が1.5, IL-1βが1.3, ウイルス性慢性肝炎の小葉間胆管でIL-6が0.3, IL-1βが0.43であり、IL-6, IL-1βともPBCの傷害胆管で亢進していた。

3. IL-17に対する胆管細胞の反応性

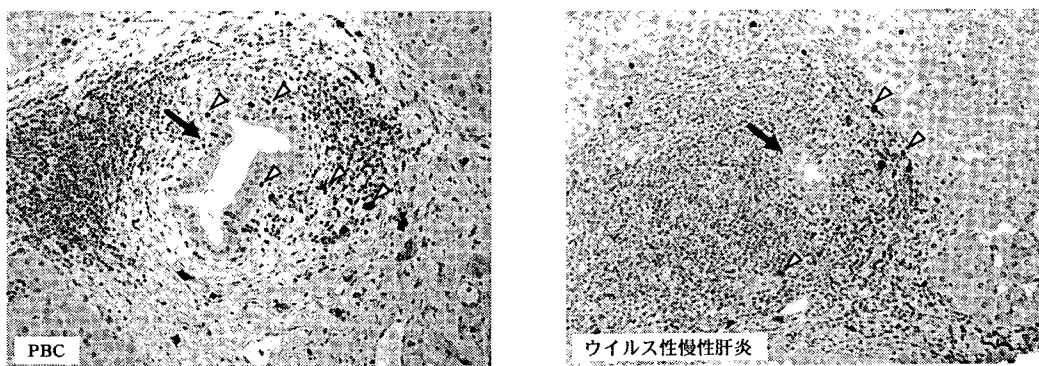
Th17細胞はIL-17の産生を特徴とし、上皮細胞を含めたあらゆる細胞に対して炎症性サイトカインとして作用する。培養胆管細胞はIL-17受容体(IL-17RA, IL-17RC)を恒常的に発現しており、IL-17刺激にてIL-6が7.6倍、IL-1βが4.1倍と有意に発現が亢進した。IL-23 p19, IL-23/IL-12 p40も各々3.0倍、3.1倍と発現誘導傾向が見られたが、統計学的有意差はなかった。次に、ケモカイン産生について検討した結果、IL-17刺激にてCCL2/MCP1が2.6倍、CXCL1/GRO-αが15.5倍、CXCL6/GCP-2が3.3倍、CXCL8/IL8が4.7倍、CCL20が6.3倍と有意に発現亢進が見られた。

D. 考察

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。当初マウスTh17細胞への誘導維持サイトカインとしてTGF-β, IL-6, IL-23が報告されたが、その後ヒトTh17細胞の検討にてTGF-βの代わりにヒトではIL-1βがTh17誘導因子として報告された。今回培養胆管細胞を用いた検討にて、胆管細胞は細菌性PAMPs刺激にていずれのTh17誘導性サイトカインも産生が誘導された。また、PBCの小葉間胆管や傷害胆管では、IL-6, IL-1β, IL-23 p19の発現が見られた。細菌に対する胆管の自然免疫応答にて、胆管細胞はIL-6, IL-1β, IL-23を産生し、胆管周囲の樹状細胞やマクロファージにおけるTh17細胞への分化誘導に関与すると推測された。すなわち、胆管における自然免疫応答が、胆管周囲のTh17細胞の分化誘導に加担していることが示唆された。

近年、Th1, Th2, Th17細胞を転写因子の発現で区別され、各々T-bet, GATA3, RORγtが同定されている。現在ヒトRORγtに対する有用な抗体がないため、今回の免疫染色による検討ではIL-17陽性細胞をTh17細胞として検討した。T-bet, GATA3, IL-17の免疫染色にてPBC胆管周囲のTh1, Th2, Th17細胞を評価した結果、Th1細胞が最も細胞数が多く、続いてTh17細胞、Th2細胞の順であった。サイトカイン発現パターンの

図2 肝組織におけるIL17陽性細胞の検出 (IL17免疫染色)



(矢印は胆管、矢頭はIL-17陽性細胞を示す)

解析による既報と同様、Th1型優位なサイトカイン環境に起因する細胞性免疫がPBCの胆管障害に関与していると考えられた。しかし、PBCの胆管炎周囲におけるIL-17陽性細胞の浸潤は疾患特異性の高い所見であり、慢性炎症の持続など胆管炎の組織発生に関与している可能性が示唆された。

Th17細胞はIL-17(A), IL-17F, IL-6, TGF- α などを産生するが、特にIL-17はTh17細胞を特徴付ける代表的なサイトカインである。IL-17は炎症性サイトカインのひとつで、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やケモカインを誘導し、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、PBCの胆管炎周囲におけるIL-17陽性細胞浸潤の意義について慢性炎症の観点から検討するため、IL-17刺激に対する胆管細胞の反応性について検討した。胆管細胞はIL-17受容体（IL-17RA, RC）を発現しており、またIL-17刺激にてIL-6, IL-1 β の発現が亢進したことから、自然免疫応答のみならず胆管周囲のTh17細胞からもIL-17を介してTh17細胞誘導を助長することが示唆された。さらに胆管細胞はIL-17刺激にて、CCL2/MCP1, CXCL1/GRO- α , CXCL6/GCP-2, CXCL8/IL8, CCL20などの炎症性ケモカインや恒常性ケモカインの発現誘導または発現亢進が見られた。これらのケモカインパターンからは、未熟樹状細胞、単球、メモリーT細胞、CD8T細胞、NK細胞、好中球などが誘導されることになる。また、近年Th17細胞に発現するケモカイン受容体が報告されつつあり、現在までの報告によると、Th17細胞はCCR2, CCR4, CCR6（Satoら, *J Immunol*, 2007. Acosta-Rodriguezら, *Nat Immunol*, 2007. Singhら, *J Immunol*, 2008）を発現している。したがって、ケモカイン受容体の発現パターンからは、IL-17刺激にて胆管細胞から産生される5つのケモカインのうちCCL2（MCP-1）, CCL20（MIP-3 α ）がTh17細胞の動員因子として作用することが推測され、さらなる炎症の持続に関与していることが示唆された。今後、PBC肝組織の胆管上皮におけるこれらケモカインの発現やTh17細胞と抗原提示細胞との関連性について検討し、PBC胆管炎周囲におけるTh17細胞の意義について更に追求する必要がある。

E. 結 論

胆管細胞は自然免疫応答にてTh17細胞への分化誘導に加担し、胆管炎の持続的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 : Biliary innate immunity and cholangiopathy. *Hepatol Res* 37 : S 430-437, 2007.
- 2) Harada K, Sato Y, Itatsu K, et al : Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology* 46 : 1146-1154, 2007.
- 3) Ikeda H, Sasaki M, Ishikawa A, et al : Interaction of Toll-like receptors with bacterial components induces expression of CDX2 and MUC2 in rat biliary epithelium in vivo and in culture. *Lab Invest* 87 : 559-571, 2007.
- 4) Isse K, Harada K, Nakanuma Y : IL-8 expression by biliary epithelial cells is associated with neutrophilic infiltration and reactive bile ductules. *Liver Int* 27 : 672-680, 2007.
- 5) Sawada S, Harada K, Isse K, et al : Involvement of Escherichia coli in pathogenesis of xanthogranulomatous cholecystitis with scavenger receptor class A and CXCL16-CXCR6 interaction. *Pathol Int* 57 : 652-663, 2007.

2. 学会発表

- 1) 原田憲一, 中沼安二 : 末梢および肝門部胆管細胞におけるFas誘導性アポトーシスの解析. 第43回日本肝臓学会総会. 東京, 2007.
- 2) 原田憲一, 中沼安二 : ヒト胆管細胞におけるFasおよびLPS誘導性アポトーシスの解析. 第96回日本病理学会総会. 大阪, 2007.
- 3) 原田憲一 : 胆道系自然免疫機構と原発性胆汁性肝硬変の病態形成への関与. 第21回肝臓洞壁細胞研究会. 松山, 2007.

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患者の末梢血単核細胞では、PDC-E2由来のHLA-A分子結合性ペプチド抗原を認識するIFN- γ 産生細胞の増加傾向がみられ、組織傷害のエフェクターとなる可能性が示唆された。一方、マウスのモデル抗原系を使って調べたところ、血管内から組織へのリンパ球浸潤においては、血管内皮細胞のMHCクラスII分子に提示された組織抗原を認識するTh細胞が先に侵入し、IFN- γ を分泌して血管内皮細胞にケモカインを産生させることで、組織抗原特異的CTLを呼び込むことが明らかとなった。

A. 研究目的

1. PBC患者の末梢血T細胞の、PDC-E2由来HLAクラスI分子結合性ペプチドに対する反応性を健常人と比較し、自己抗原特異的なCD8陽性の細胞傷害性T細胞（CTL）のPBC発症における役割を調べる。
2. 組織抗原特異的なCD4陽性Th細胞の、組織抗原特異的CTLの組織内浸潤に対する働きを調べる。

B. 研究方法

1. PBC患者の末梢血単核球（PBMC）を、PDC-E2由来のHLA-A分子結合性ペプチドで刺激した後、IFN- γ 産生細胞数をELISPOTアッセイにより測定する。
2. OVAをモデル組織抗原として、組織抗原特異的ThおよびCTLの組織内浸潤のメカニズムを探る。

C. 研究結果

1. PBC患者のPBMCには、健常人に比べて、PDC-E2由来のペプチドに対するIFN- γ 産生細胞数が多い傾向があったが、個人ごとに反応性が異なり、特定のエピトープに集中してはいなかった。このため、PBC患者のCTLが、病原体などに対する交差反応として、特定の自己抗原に対して誘導された可能性は低く、向炎症性反応の場で自己PDC-E2ペプチドに反応性のCTLが2次的に誘導された可能性が高いと考えられる。
2. 組織抗原特異的CTLが存在しても、それら単独では組織内へ浸潤しにくいことがわかった。一方、組織抗原特異的Th細胞が存在する場合には、CTLの組織内浸潤が著明に促進された。研究の結果、血管内皮細胞が組織抗原を取り込み、MHCクラスII分子に提示したものを認識してTh細胞が組織に浸潤し、組織内でIFN- γ を産生する、それを受けて血管内皮細胞が、ケモカインのひとつであるI-TACを分泌するため、それを認識するCXCR-3を高発現するCTLが組織内に侵入する、というしくみが働いていることがわかった。

D. 考察

PBC患者では、従来注目されていたPDC-E2特異的

Th細胞に加え、CTLも増加していることがわかった。一方、PDC-E2というユビキタスな自己抗原に対するCTLが、なぜ胆管を標的とした組織障害を起こすのかという理由として、組織特異的Thが先導して組織に侵入し、その場所へCTLを呼び込むためであることが示唆された。

E. 結論

PBCの組織障害を起こすのはCTLであるが、組織障害の場を決めるのは、血管内皮細胞が提示した組織抗原を特異的に認識するTh細胞であることを示唆するデータが得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yano A, Komatsu T, Ishibashi M, et al : Potent CTL induction by a whole cell Pertussis vaccine in anti-tumor peptide immunotherapy. *Microbiol Immunol* 51 : 685-699, 2007.
- 2) Komatsu T, Noguchi Y, Yano A, et al : Tumor specific Th cells recruit cytotoxic T lymphocytes into solid tumors. (manuscript in preparation).

2. 学会発表

- 1) 矢野有紗, 小松利広, 宇高恵子 : 抗腫瘍ペプチド免疫療法における百日咳ワクチンのCTL誘導活性. 第37回日本免疫学会総会. 東京, 2007.

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

胆汁うっ滞性肝疾患の新規バイオマーカーの探索

研究協力者 上野 義之 東北大学病院 消化器内科 講師

研究要旨: 前年に引き続き胆汁うっ滞性肝疾患の新規バイオマーカーの探索を目的としてヒト正常胆管細胞を用いたプロテオミクス法による探索的研究を行った。IFN- γ により誘導されるスポットを解析し、有意な変動を認めたスポットから、Annexin A2が新規のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆されたため。培養ヒト胆管上皮細胞を用いて、同分子の役割を主にin vitroの実験系により検討した。その結果、胆汁のpHなどの制御に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

胆汁うっ滞性肝疾患の新規のバイオマーカーの探索を目的とする。

B. 研究方法

ヒト正常肝より株化した肝内胆管上皮細胞を用い、その細胞をIFN- γ で刺激したものと、コントロールでサブトラクション法で発現蛋白のスポット解析を行い、PMF法にて、蛋白の同定を行った。さらに、同定可能な蛋白についてはヒト病理検体を用いてその意義を検討した。

C. 研究結果

2次元電気泳動により、ヒト胆管細胞をIFN- γ で刺激した際に有意に誘導されるスポットのうち、16個がMALD-TOFMSにて解析可能であり、さらに、15個は同定することが可能であった。とりわけ、ANNEXIN A2については、ヒトPBC病理検体において、その染色性が確認され、胆管上皮細胞を標的とするヒト炎症性疾患との関連が示唆された。さらにAnnexin A2の胆管上皮細胞での生理的役割を検討したところ、pHの制御などbile physiologyに密接に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

今回の検討でみいだした Annexin A2の胆汁分泌における役割についての検討はこれまでほとんどなされていなかった。しかし今回、2次元電気泳動を用いたたんぱく質の網羅的検討により、これまで注目されていなかった分子の拾い上げが可能となり、新規のバイオマーカーとしての応用の可能性が示唆された。実際の疾患マーカーとして応用可能であるかという点については、多数例の症例での検討が必須であり、また適当な疾患コントロールを用いての検証も必要である。

E. 結論

新しい蛋白解析法を用いることにより、新規の胆管細胞のバイオマーカー探索の基盤的研究を行いえた。今後は、得られたバイオマーカーであるAnnexin A2の臨床的意義付けを行うとともに、更なるマーカーの

発見をより精度を上げて行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yahagi K, Ueno Y, Nomura E, et al : Mapping of a disease susceptibility locus in the HLA region for Primary Biliary Cirrhosis in Japan. *Hepato Res* 37 : 270-275, 2007.
- 2) Ueno Y, Moritoki Y, Shimosegawa T, et al : Primary biliary cirrhosis: what we know and what we want to know about human PBC and spontaneous PBC mouse models. *J Gastroenterol* 42 : 189-195, 2007.
- 3) Ueno Y, Fukushima K, Nakagome Y, et al : Bioinformatic approach for cholangiocyte pathophysiology. *Hepato Res* 37 : S444-448, 2007.
- 4) Ueno Y, Francis H, Glaser S, et al : Taurocholic acid feeding prevents tumor necrosis factor-alpha-induced damage of cholangiocytes by a PI3K - mediated pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* 232 : 942-949, 2007.
- 5) Taffetani S, Glaser S, Francis H, et al : Prolactin stimulates the proliferation of normal female cholangiocytes by differential regulation of Ca²⁺-dependent PKC isoforms. *BMC Physiol* 7 : 6, 2007.
- 6) Nakagome Y, Ueno Y, Kogure T, et al : Autoimmune cholangitis in NOD.c3c4 mice is associated with cholangiocyte-specific Fas antigen deficiency. *J Autoimmun* 29 : 20-29, 2007.
- 7) Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, et al : Amniotic epithelial cell - derived cholangiocytes in experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Hepato Res* 37 : 286-294, 2007.
- 8) Moritoki Y, Lian ZX, Wulff H, et al : AMA production in primary biliary cirrhosis is promoted