

## ヒト肝組織を用いた線維化/脱線維化の解析

研究分担者 原田憲一 金沢大学形態機能病理学

**研究要旨:** HCV 関連の前硬変肝/肝硬変患者の肝実質では、組織学的正常肝に較べて活性化星細胞、TGF- $\beta$ 、MMP、Wnt 経路の関連分子の発現パターンが異なっており、また好中球や CD11b 陽性細胞の減少も見られ、肝線維化進展との関連性が示唆された。また、HCV 肝硬変の門脈域には細胆管反応を伴う interface 肝炎を認めるが、胆管細胞は自然免疫応答や炎症性サイトカイン刺激にて肝星細胞走化性分子 MCP1 を産生し、胆管細胞が直接肝星細胞を誘導し肝線維化に加担することが示唆された。PRI-724 投与による抗線維化機序を解明するため、Wnt シグナル伝達系の変化に加えて、肝星細胞、細胞外マトリックス分解酵素、炎症細胞および胆管細胞の観点からも解析する必要がある。

### A. 研究目的

PRI-724 は CREB-binding protein(CBP)/ $\beta$ -カテニンの複合体形成を選択的に阻害する低分子化合物であり、Wnt シグナルが異常亢進している癌細胞に対して細胞増殖抑制作用を示す。一方、Wnt シグナル伝達経路は肺線維症などの線維化にも関与しており、PRI-724 が HCV 慢性肝炎モデルマウスにおいて抗線維化作用を示すことも報告されている。我々の研究目的は、HCV 関連の肝硬変患者に関して PRI-724 が肝線維化を軽減することを確認し、更に PRI-724 による抗線維化機序の基礎的解析を行うことである。本年度、我々は HCV 関連肝硬変における肝線維化機序の病理学的解析ならびに Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)を介した肝線維化における胆管細胞の関与について解析を行い、PRI-724 にて期待される抗線維化の機序解明に向けての予備的研究を施行した。

### B. 研究方法

#### B-1: 肝組織における肝線維化関連因子の検出

対象：HCV 感染患者より診断目的に施行され

た肝生検材料で病理学的に F3~F4 相当の進行性肝疾患(前硬変肝~肝硬変)と診断された 10 例の肝針生検を対象とした。また、対照群として原因不明の肝障害患者より診断目的に肝生検が施行され、組織学的に特異的な所見が見られなかった症例(組織学的正常肝) 5 例を用いた。

方法：肝線維化および脱線維化に関与する細胞や分子として、活性化星細胞マーカーである SMA、好中球マーカーである好中球エラストラーゼ、単球/マクロファージマーカーで NK 細胞、顆粒球にも発現する CD11b、M2 マクロファージのマーカーである CD163、主要な profibrogenic factor である TGF- $\beta$ 、細胞外マトリックス分解酵素である MMP1、MMP8、Wnt 経路のシグナル伝達分子である  $\beta$ -カテニン、CBP、P300 の免疫組織化学的解析を施行した。

#### B-2: 肝線維化進展における胆管細胞の関与

対象：培養ヒト胆管細胞 2 株、ヒト肝星細胞株(LI90, HSRRB より分与)および HCV 関連慢性肝炎の他、各種肝疾患患者より得られた肝針生検。

方法：ヒト培養胆管細胞における profibrogenic factor (MCP-1, PDGF-B, CTGF, endothelin 1, TGF- $\beta$ ) の mRNA を PCR 法にて検出し、さらに poly(I:C) (TLR3 リガンド), Pam3CSK4 (TLR1/2 リガンド), LPS (TLR4 リガンド) または炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) 刺激による profibrogenic factor の動態を解析するため、Real-time PCR および一部 ELISA 法にて検出した。また、ヒト肝星細胞株における MCP-1 受容体 (CCR2) の発現および TLR リガンドや炎症性サイトカイン刺激による動態を検討した。最後に、肝組織切片を対象に、MCP-1, SMA, CCR2 の免疫組織化学的染色を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認済みである。課題名：「胆道系炎症性疾患および胆道系腫瘍の病理学的解析 - 病理検体の研究目的での使用について - 」(審査番号 305)。

## C. 結果

### C-1: 肝組織における肝線維化関連因子の検出

組織学的正常肝では、好中球エラスターゼ陽性好中球および CD11b 陽性細胞を実質内に散見したが、HCV 前硬変/肝硬変症例ではこれらの陽性細胞はごく少数のみであり、正常肝に比べて減少していた。CD163 陽性の M2 マクロファージは正常肝、HCV 症例ともに実質内に多数の細胞を認め、両群間で明らかな差は認めなかった。SMA 陽性の活性化肝星細胞は主に HCV 症例の interface 肝炎を伴う門脈域周囲に多数認めた。TGF- $\beta$  陽性細胞は、HCV 症例の類洞内細胞に散見し、また実質内の壊死部の肝細胞にも陽性所見を認めた。MMP1, MMP8 は好中球等の多核白血球の他、肝細胞に弱い発現を認め、MMP1 は胆管にも弱い発現を認めた。Wnt 経路の関連

分子である カテニン, CBP, P300 のうち、活性型を示唆する カテニン, CBP の核発現は、HCV 症例の interface 肝炎部周囲の肝細胞に発現を認めた。しかし、P300 の発現は正常肝の実質肝細胞にびまん性に発現を認めるものの、HCV 症例では全体的に P300 の発現が低下していた。

### C-2: 肝線維化進展における胆管細胞の関与

培養ヒト胆管細胞を用いた検討にて、胆管細胞から MCP-1, PDGF-B, CTGF, endothelin 1, TGF- $\beta$  のすべての profibrogenic factor の mRNA を検出できた。また、TLR リガンド (Pam3CSK4, poly(I:C), LPS) および炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  の刺激にて MCP1 発現の亢進が見られ(図 1)、ELISA 法でも MCP1 蛋白の分泌および産生亢進が確認出来た(培養上清中で 8-10ng/ml)(図 2)。また、ヒト肝星細胞は MCP1 リガンドである CCR2 を発現していなかったが、poly(I:C) および TNF $\alpha$  刺激にて CCR2 発現の誘導が見られた。また、肝組織切片を用いた免疫組織化学的検討にて、MCP1 の発現は門脈域周囲の増生細胆管に発現を認め、同部では SMA および CCR2 陽性の活性化肝星細胞も見られた(図 3)。

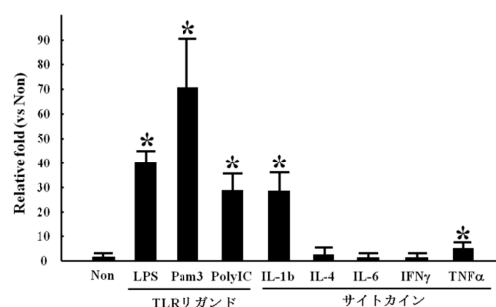


図 1 培養胆管細胞における TLR リガンド、炎症性サイトカイン刺激による MCP-1 mRNA 発現の変化。Real time PCR 法。\* < 0.01.

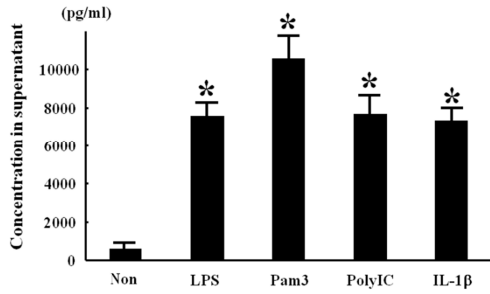


図2 培養胆管細胞におけるTLRリガンド,炎症性サイトカイン刺激による培養上清中MCP-1蛋白濃度。ELISA法。\* < 0.01.

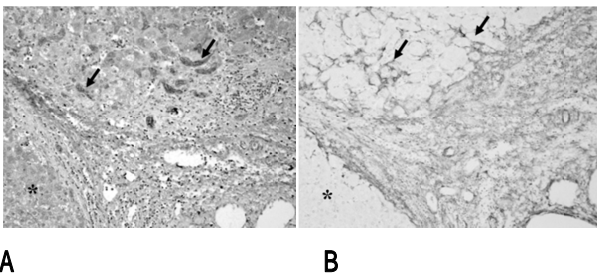


図3 HCV関連肝硬変。MCP1(A), SMA(B)の免疫染色。MCP1陽性の細胆管増生部位にはSMA陽性活性化肝星細胞を散見するが(矢印)、細胆管増生を認めない部位ではSMA陽性活性化肝星細胞は認めない(\*)。

#### D. 考察

肝線維化の発生および進展に、活性化肝星細胞から筋線維芽細胞への分化と細胞外マトリックスの異常増加が重要である。今回の検討によりSMA陽性の活性化肝星細胞(筋線維芽細胞)はHCV前硬変肝/肝硬変のinterface肝炎部を中心に多数出現し、静止期の線維芽細胞に対して活性化した線維芽細胞の遺伝子発現を引き起こすTGFの発現も見られた。また、HCV症例では組織学的正常肝に較べて好中球、CD11b陽性細胞が減少していた。好中球はMMP1, MMP8を産生する細胞であり、HCV前硬変肝/肝硬変ではMMP関連の線溶系機能不全が起って

いることが示唆された。HCVトランスジェニックマウスを用いた検討では、PRI-724投与による抗線維化の作用機序として単球/マクロファージ、好中球などの炎症性細胞の増加および肝内MMP-8の上昇が指摘されており、ヒトHCV患者でもPRI-724投与による同様な抗線維化機構が期待される。また、活性型カテニン、CBPの発現をinterface肝炎部周囲の肝細胞に認め、PRI-724の有効性が期待される所見と考えられた。なお、CD163陽性細胞はいわゆるM2マクロファージと解されているが、今回の検討では正常肝、HCV肝ともに多数の陽性細胞を類洞内に認め、CD163陽性クッパー細胞の明らかな増減は認めなかった。

MCP-1は単球/マクロファージの走化性因子および活性化因子として作用するケモカインで、また肝星細胞の走化性因子として肝線維化にも関与する(Marra et al., *Hepatology*, 1999)。今回の検討により、MCP1産生細胞としてinterface肝炎部に出現する増生細胆管を見出し、特にTLRを介した自然免疫応答およびIL-1等による炎症性サイトカインによるMCP1発現の誘導が見られた。細胆管増生は種々の病的肝で出現する非特異的反応であるが、慢性進行性肝疾患では特に目立つ組織反応であり、病期進展に大きく関連することが推測されている。しかし、病期進展の直接的な関与の機序については不明であったが、今回の検討により、増生細胆管の胆管細胞は自然免疫応答や炎症性反応によりMCP1を産生し、肝星細胞の動員に関与することが示唆された。一方、肝星細胞は、通常の培養状態ではMCP1の受容体であるCCR2の発現を認めなかったが、自然免疫応答および炎症性サイトカインにてCCR2の発現誘導が見られた。これらの所見より、通常の生理的環境では胆管細胞からのMCP1産生や肝星細胞のCCR2発現はないものの、感染や炎症に伴って胆管細胞からのMCP1産生および肝星細

胞の CCR2 発現が惹起され、肝星細胞の誘導、TGF- $\beta$  作用により線維化を来すことが示唆され、増生細胆管の組織反応が直接肝線維化に関わることが明らかとなった。

## E. 結論

HCV 肝硬変患者に対する PRI-724 投与の有効性を確認し、さらにその機序を解明するためには、Wnt シグナル伝達系の変化に加えて、肝星細胞、細胞外マトリックス分解酵素、炎症細胞および胆管細胞の観点からも解析する必要があると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Harada K, Kakuda Y, Sato Y, Ikeda H, Shimoda S, Yamamoto Y, Inoue H, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y. Alteration of energy metabolism in the pathogenesis of bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol*. 2013 Nov 29.
- 2) Harada K, Kakuda Y, Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of serum fractalkine in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2013 Jun 14.
- 3) Harada K, Sato Y, Ikeda H, Hsu M, Igarashi S, Nakanuma Y. Notch1-Hes1 signalling axis in the tumorigenesis of biliary neuroendocrine tumours. *J Clin Pathol* 2013;66:386-391
- 4) Harada K, Chiba M, Okamura A, Hsu M, Sato Y, Igarashi S, Ren XS, Ikeda H, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma

Y. Monocyte chemoattractant protein-1 derived from biliary innate immunity contributes to hepatic fibrogenesis. *J Clin Pathol* 2011 Aug;64(8):660-5

### 2. 学会発表

- 1) Harada K, et al. IgG4 reaction in biliary intraepithelial neoplasia and cholangiocarcinoma arising from sclerosing cholangitis. The 102nd USCAP ANNUAL MEETING (2013. Mar 2- 8, Baltimore, USA)
- 2) Harada K, et al. Energy metabolic change induced by ERR- $\alpha$ -PGC-1 axis in chronic non-suppurative destructive cholangitis of primary biliary cirrhosis. The 102nd USCAP ANNUAL MEETING (2013. Mar 2- 8, Baltimore, USA)
- 3) Harada K, et al. Pathological Differences between IgG4-Related Sclerosing Cholangitis with and without Autoimmune Pancreatitis. The 102nd USCAP ANNUAL MEETING (2013. Mar 2- 8, Baltimore, USA)
- 4) Harada K, et al. Clinicopathological significance of serum fractalkine and its regulation by ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. AASLD, The Liver Meeting 2013 (2013.Nov 1-5, Washington, DC)
- 5) Harada K, et al. Alteration of energy metabolism and subsequent oxidative stress in the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. AASLD, The Liver Meeting 2013 (2013.Nov 1-5, Washington, DC)
- 6) 原田憲一, 中沼安二. 自己免疫性膵炎合併の有無からみた IgG4 硬化性胆管炎の病

- 態の違い. 第 99 回日本消化器病学会総会 (2013 年 3 月 21~23 日、鹿児島)
- 7) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝の変化. 第 49 回日本肝臓学会総会 (2013 年 6 月 6~7 日、東京)
- 8) 原田憲一, 佐藤保則, 中沼安二. IgG4 関連硬化性胆管炎に出現する Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) 病変. 第 49 回日本肝臓学会 (2013 年 7 月 11~12 日、東京)
- 9) 原田憲一, 池田博子, 佐藤保則, 中沼安二. 胆管細胞腺腫における glucose transporter 1 発現 - 悪性ポテンシャルの解析. 第 49 回日本肝臓学会 (2013 年 7 月 11~12 日、東京)
- 10) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序: エネルギー代謝の変化と細胞死の関与. 第 50 回日本消化器免疫学会総会 (2013 年 8 月 1~2 日、東京)
- 11) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の胆管傷害とエネルギー代謝との関連性. 第 45 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 (2013 年 9 月 13~14 日、福岡)
- 12) 原田憲一, 佐藤保則, 中沼安二. IgG4 関連硬化性胆管炎に見られる BilIN 病変の解析. 第 49 回日本胆道学会学術集会 (2013 年 9 月 19~20 日、千葉)
- 13) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管における endocytosis 機能の低下. 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9~10 日、東京)
- 14) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝と細胞死との関連. 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9 日~10 日、東京)
- 15) 原田憲一, 中沼安二. 胆道系自然免疫

応答による胆道閉鎖症の病態形成機序.

- 第 40 回日本胆道閉鎖症研究会 (平成 25 年 11 月 16 日、茨城)
- 16) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝の変化 脂肪酸代謝系への偏位による胆管細胞アポトーシス感受性の亢進. 第 40 回日本肝臓学会西部会 (平成 25 年 12 月 6~7 日、岐阜)
- 17) 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管における endocytosis 関連分子の解析. 第 40 回日本肝臓学会西部会 (平成 25 年 12 月 6~7 日、岐阜)
- 18) 原田憲一, 池田博子, 佐藤保則, 中沼安二. 胆管癌および biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) における glucose transporter1 の発現. 第 40 回日本肝臓学会西部会 (平成 25 年 12 月 6~7 日、岐阜)

#### H.知的所有権の出願・登録状況

特許取得 特になし

実用新案登録 特になし

その他

