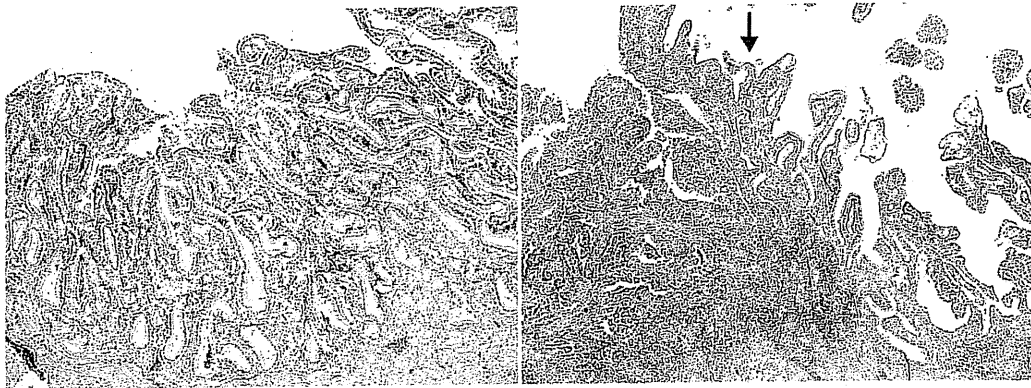


a. BiIN-2 (図1aの連続切片)

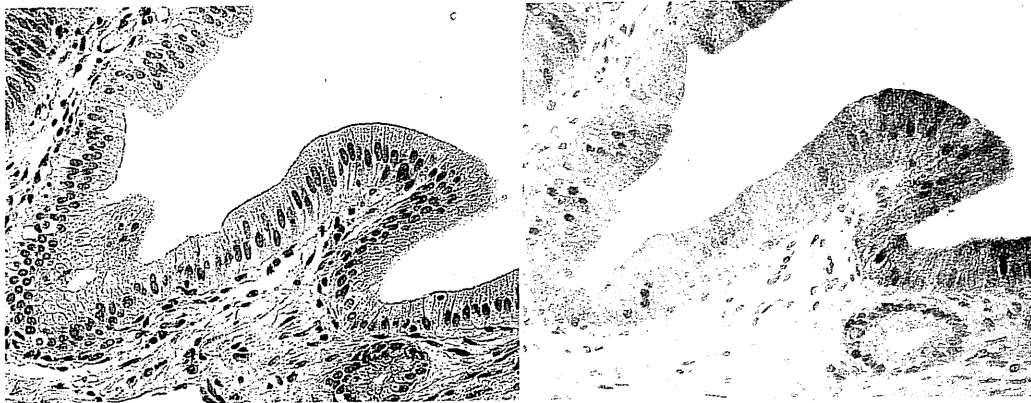
b. BiIN-3 (図1bの連続切片)

図2. BiIN-2/3での EZH2の発現 (EZH2の免疫染色, 150倍)



a. びまん性過形成 (HE 染色, 70倍)

b. 膵管胆管合流異常例での胆嚢癌. 右半分はびまん性過形成で, 左半分は胆嚢癌 (矢印: 境界部, HE 染色, 70倍)



c. びまん性過形成 (HE 染色, 150倍)

d. びまん性過形成. P16^{INK4A}の発現 (P16^{INK4A}の免疫染色, 150倍)

図3. 膵管胆管合流異常例にみられた病変

幼児例のPBMの胆嚢にすでに出現することが知られているが、胆嚢癌の多くは成人になってから発生し、50歳代にピークがある。つまり、乳幼児期にPHPが出現して、実際の発癌までの期間が前癌病変、あるいは癌に移行する病変としては長過ぎる問題点がある。また、われわれの最近の研究では、このPHPには癌抑制遺伝子であるP16やP21などの細胞老化マーカーがびまん性に発現していることが明らかとなった(図3c, d)³⁾。さらに、PHPでの細胞増殖活性は低く、正常の胆嚢とほぼ類似の増殖活性を示した。また、胆管上皮の癌化に関連するポリコーム蛋白群であるEZH2の発現がみられなかった。これらの所見より、PHPはPBMの胆嚢で癌に先行する病変であるが、癌の発生に直接関連する癌促進性の病変ではなく、むしろ癌の発生に抑制的に作用している可能性があると思われる³⁾。

c) PHPは細胞老化病変

細胞老化は、細胞増殖能が停止し、さらに増殖刺激に対して反応しない状態であり、テロメアの短縮や酸化ストレス、またデオキシリボ核酸(DNA)損傷により発生する^{16,17)}。そして、癌化への自己防御機構(セルフガード機構)として注目されている¹⁷⁾。たとえば、母斑(nevus)は良性腫瘍であり、細胞老化を示すメラノサイトから構成され、長い年月の間、悪性黒色腫には進展しない。そして、悪性黒色腫へと進展するには、細胞老化からの逸脱あるいはバイパスが必要とされている¹⁸⁾。PBMに発生するPHPも、ほとんどの細胞が細胞老化を示しており、PBMからの癌の発生、進展への自己防御機構が作動している病変であり、この細胞老化病変から癌が発生しにくくなっている可能性がある。この病変から癌が発生するためには、細胞老化をバイパスする、あるいは細胞老化からの逸脱する機構が発生する必要があると思われる。

筆者らの研究でPBMに発生した癌部にはEZH2が強く発現していたので、PBMから発生する胆嚢癌の発生にもEZH2が関与していると考えられる³⁾。PHPと胆嚢癌発癌との関連性の解明には今後のさらなる研究が必要である。

おわりに

胆嚢癌の前癌病変、上皮内腫瘍として、2010

年に改訂されたWHOの消化器腫瘍分類が提唱した平坦型異型病変であるBiINと乳頭状異型病変であるIPNに関して、その病理像を述べた。新たな試みであり、今後の研究が期待される。胆石症+胆嚢癌は、背景粘膜にBiINがみられ、発癌との関連性が注目される。一方、PBMの胆嚢にみられるPHPは細胞老化病変であり、癌化への進展を防御している可能性があることを述べた。今後の研究の展開に期待したい。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) Matsumoto Y, Fujii H, Itakura J et al : Recent advances in pancreaticobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9 : 45-54, 2002
- 2) Albores-Saavedra J, Kloppel G, Adsay NV et al : Carcinoma of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. WHO Classification of Tumours of the Digestive System : World Health Organization of Tumours, 4th Ed, ed by Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH et al, IARC, Lyon, p266-273, 2010
- 3) Yamaguchi J, Sasaki M, Harada K et al : Papillary hyperplasia of the gallbladder in pancreaticobiliary maljunction represents a senescence-related lesion induced by lysolecithin. *Lab Invest* 89 : 1018-1031, 2009
- 4) Miyazaki M, Takada T, Miyakawa S et al : Risk factors for biliary tract and ampullary carcinomas and prophylactic surgery for these factors. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 15 : 15-24, 2008
- 5) Sugiyama Y, Kobori H, Hakamada K et al : Altered bile composition in the gallbladder and common bile duct of patients with anomalous pancreaticobiliary ductal junction. *World J Surg* 24 : 17-20, 2000
- 6) Nakanuma Y, Curabo MP, Franceschi S et al : Intrahepatic cholangiocarcinoma. WHO Classification of Tumours of the Digestive System : World Health Organization of Tumours, 4th Ed, ed by Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH et al, IARC, Lyon, p217-224, 2010
- 7) 鬼島 宏 : 胆嚢・胆管. 外科病理学, 第4版, 向清, 真鍋俊明, 深山正久(編), 文光堂, 東京, p665-698, 2006
- 8) Chen TC, Nakanuma Y, Zen Y et al : Intraductal papillary neoplasia of the liver associated with hepatolithiasis. *Hepatology* 34 : 651-658, 2001
- 9) Zen Y, Fujii T, Itatsu K et al : Biliary papillary tumors share pathological features with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatology* 44 : 1333-1343, 2006
- 10) Zen Y, Aishima S, Ajioka Y et al : Proposal of histological criteria for intraepithelial atypical/proliferative biliary epithelial lesions of the bile duct in hepatolithiasis with respect to cholangiocarcino-

- ma ; preliminary report based on interobserver agreement. *Pathol Int* **55** : 180-188, 2005
- 11) Zen Y, Adsay NV, Bardadin K et al : Biliary intraepithelial neoplasia ; an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. *Mod Pathol* **20** : 701-709, 2007
 - 12) Zen Y, Sasaki M, Fujii T et al : Different expression patterns of mucin core proteins and cytokeratins during intrahepatic cholangiocarcinogenesis from biliary intraepithelial neoplasia and intraductal papillary neoplasm of the bile duct ; an immunohistochemical study of 110 cases of hepatolithiasis. *J Hepatol* **44** : 350-358, 2006
 - 13) Shibahara H, Tamada S, Goto M et al : Pathologic features of mucin-producing bile duct tumors : two histopathologic categories as counterparts of pancreatic intraductal papillary-mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* **28** : 327-338, 2004
 - 14) Nakanuma Y, Sasaki M, Ishikawa A et al : Biliary papillary neoplasm of the liver. *Histol Histopathol* **17** : 851-861, 2002
 - 15) Sasaki M, Yamaguchi J, Itatsu K et al : Overexpression of polycomb group protein EZH2 relates to decreased expression of p16 INK4a in cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. *J Pathol* **215** : 175-183, 2008
 - 16) Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y et al : Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* **53** : 318-325, 2010
 - 17) Collado M, Gil J, Efeyan A et al : Tumour biology : senescence in premalignant tumours. *Nature* **436** : 642, 2005
 - 18) Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS et al : BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436** : 720-724, 2005

*

*

*

お知らせ

◆第15回臨床解剖研究会

- 会 期 : 2011年9月2日(金), 3日(土)
 会 場 : 東京大学弥生講堂(東京大学弥生キャンパス内)〔☎113-8657 東京都文京区弥生1-1-1〕
- 当番世話人 : 光嶋 勲〔東京大学形成外科教授〕
- 内 容
- シンポジウム : 「神経・血管・リンパ管解剖の臨床応用」
 - ワークショップ : 「穿通枝皮弁について」
 - 一般演題 : 「臨床解剖に関する演題」
- 募集演題
- 以下の要領で演題を募集いたします。奮ってご応募ください
- 募集演題 : 一般演題
- 演題募集締切日 : 2011年5月31日(火)
- 募集要項 : 東京大学形成外科教室ホームページ (<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/plastic/>) をご覧ください
- 問 合 先 : ☎113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
 第15回臨床解剖研究会事務局
 東京大学形成外科教室(担当 : 内田, 山崎)
 Tel : 03-5800-8777/Fax : 03-5800-8950

細胞老化と胆管障害, 細胆管反応

佐々木 素子* 中 沼 安 二*

索引用語：細胞老化, 老化関連分泌形質 (senescence-associated secretory phenotype; SASP), 原発性胆汁性肝硬変 (PBC), 胆管細胞, 細胆管反応

1 はじめに

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の臨床病理像は確立されつつあるが, 病因, 胆管病変の発生機序, 抗ミトコンドリア抗体(AMA)の役割についてはまだ十分解明されていない。わたしどもは, PBCの障害胆管は高率に細胞老化cellular senescenceを示し, 胆管消失への関与が示唆されること, PBCや原発性硬化性胆管炎(PSC)の進行期でみられる細胆管反応内の細胆管細胞も老化形質を示し, 線維化の進行と関連することを報告してきた。最近, 老化細胞は単なる細胞障害の結果ではなく, ケモカインなどの各種老化関連分泌形質(senescence-associated secretory phenotype; SASP)の発現を介して周囲の微小環境を調節し, 炎症の持続や線維化に関与することが明らかとなりつつある。PBC, PSC, その類縁疾患においても, 老化胆管細胞がSASPを介して病態形成に関与する可能性がある。

本稿では, PBCを中心に, 細胞老化と胆

管障害, 細胆管反応についての最近の知見を紹介する。

2 細胞老化とは

細胞老化cellular senescenceはさまざまなストレスによって生じる不可逆的な細胞増殖停止と定義される¹⁾。もともと細胞老化は1961年にHayflickにより発見された現象で, 正常な体細胞を哺乳動物の個体から取り出して培養すると, ある一定の回数分裂増殖を繰り返した後に増殖を停止し不可逆的な増殖停止状態に入る現象である¹⁾。その後の研究でテロメア短縮が細胞老化の主因であることが明らかになった(内因性細胞老化)。さらに, 細胞老化は種々のストレスによっても, テロメア長非依存性に誘導されることがわかってきた(外因性細胞老化)²⁾。細胞老化は発癌と老化のバランスをとる機構として注目されている³⁾。また, 炎症性疾患での細胞老化亢進も報告されている。細胞老化の要因はテロメア短縮, 酸化ストレス, DNAダメージなど

Motoko SASAKI *et al*: Cellular senescence in bile duct damages and ductular reaction in PBC and related diseases

*金沢大学大学院医学研究科形態機能病理学 [〒920-8640 石川県金沢市宝町 13-1]

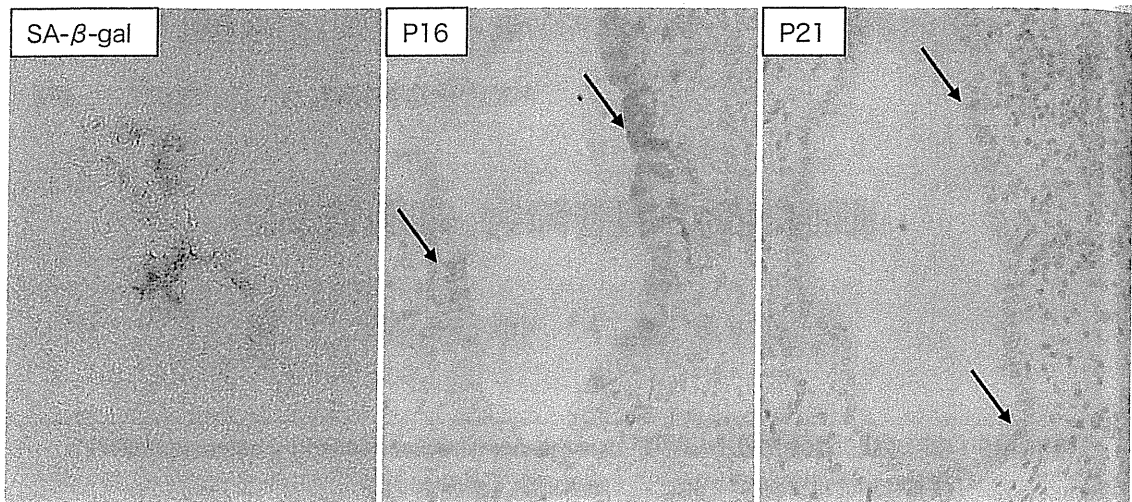


図1 PBCの障害胆管は細胞老化を示す
PBCのCNSDC部障害胆管に、細胞老化マーカー：SA-β-gal発現(左,青緑色), p16^{INK4a}発現亢進(中央,矢印), p21^{WAF1/Cip1}発現亢進を認める(右,矢印). PBC (2期)

とされる^{2,3)}.

3 細胞老化マーカー

細胞老化の特徴としては、細胞増殖の停止や細胞形態学的特徴とともに、1) senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) 発現、2) CDKインヒビター：p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1}の発現亢進、3)テロメア長短縮などがあげられる^{2~4)}。病理組織学的検討には、凍結切片を用いたSA-β-gal発現の検討、免疫組織化学を用いたp16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1}の発現の検討がよく用いられる。また、cyclin D1免疫染色も老化細胞の特徴である細胞周期G1期停止(G1 arrest)の検出に用いられる。組織切片上でのテロメア長の測定には、Quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH)法が有用である⁵⁾。

4 PBCの胆管病変における細胞老化

肝疾患をはじめ臓器の病的状態では、炎症などを背景に構成細胞の細胞老化が生じ、再生不全や線維化の進展などに関与する^{5~9)}。

PBCは代表的な臓器特異的な自己免疫性疾患であり、その標的組織は肝内の小型胆管(小葉間胆管)である。PBCの非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)と胆管消失の発症機序は十分に解明されていない。PBCのCNSDC部の障害胆管細胞は、組織学的老化形質、SA-β-gal発現、p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1}発現亢進、テロメア長短縮などの細胞老化を示す(図1)^{6,10~12)}。PBCの胆管細胞老化は増殖停止による胆管再生不全を生じ、胆管消失の要因となると考えられる^{6,10~12)}。PBCと並んで胆管消失症候群の一つである肝移植後慢性拒絶でも、拒絶早期に胆管細胞にp21^{WAF1/Cip1}発現亢進を伴い、細胞老化による胆管細胞の再生不良が胆管消失につながると推測されている^{6,7)}。

細胞老化の要因に酸化ストレスがあげられるが、PBCにおける胆管細胞老化にも酸化ストレスの関与が示唆される^{6,10~12)}。PBCの障害胆管における酸化ストレス亢進は従来報告されてきた。PBCの障害胆管では、酸化ストレスマーカー：8-OHdGと細胞老化マーカー：

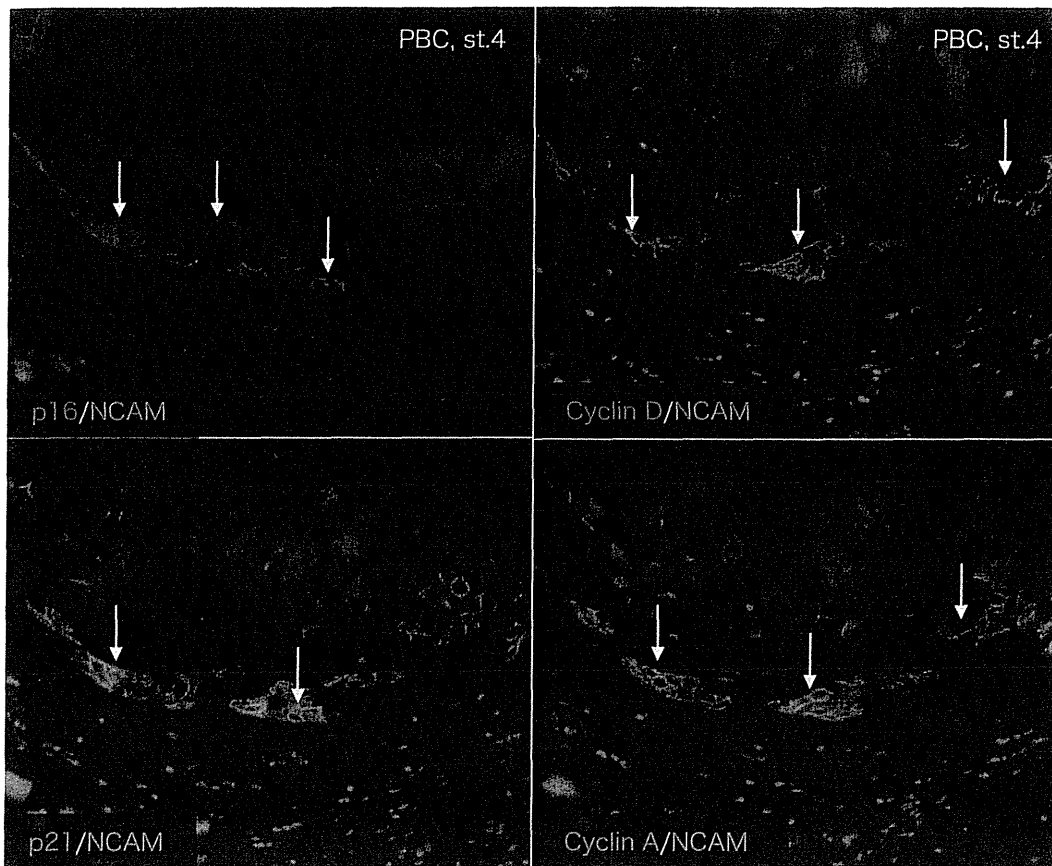


図2 PBCの細胆管反応におけるNCAM陽性細胆管は細胞老化を示す
NCAM陽性細胆管(緑色)は、細胞老化マーカー-p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1}発現亢進(赤色)を示す。また、NCAM陽性細胆管の多くはG1期マーカー:cyclin D発現を示し、S期マーカー:cyclin A発現はみられない。PBC (4期)

p21^{WAF1/Cip1}の共発現がみられ、p21^{WAF1/Cip1}の発現誘導には、ataxia telangiectasia-mutated (ATM) /p53経路の活性化がみられる¹¹⁾。また、PBCの老化胆管細胞ではstemness-geneとされるポリコム群蛋白Bmi1発現が低下している。培養胆管細胞では、酸化ストレスによりBmi1発現は低下し、siRNAを用いてBmi1発現を抑制すると細胞老化が生じる¹²⁾。

5 細胞老化とオートファジー

最近、細胞老化の過程におけるオートファジーの関与が報告されている¹³⁾。オートファジーはアポトーシスと並ぶ細胞のストレス反

応であり、両者の発生機序は相互に関連している。オートファジーは低栄養状態などの各種ストレスによって誘導され、オートファジー阻害により、細胞老化発生が低下する¹³⁾。PBCの胆管病変においてもオートファジー亢進がみられ、胆管細胞老化と関連する¹⁴⁾。また、オートファジー阻害状態では、培養胆管細胞に老化誘導ストレスを加えても、細胞老化はあまり起こらない。これらの結果は、PBCにおける胆管細胞老化の過程にオートファジーが関与することを示唆する¹⁴⁾。

表1 Senescence-associated secretory phenotype (SASP)

Type	Factors
Interleukin	IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-24
TNF ligand	TNFSF15
Chemokine	IL-8, GRO α , β , γ , CXCL20, CCL3, MCP-1
Chemokine receptors	CXCR1, CXCR2
Growth factors	Epiregulin, Neuregulin, Amphiregulin
TGF- β family	BMP2, Activin A
IGFBPs	IGFBP2, IGFBP5, IGFBP7
Matrix metalloproteinase	MMP3, MMP14
Protease inhibitors	PAI-1, PAI-2
Extracellular protease	uPA, tPA
Collagen	Col10A1

6 細胆管反応における細胞老化

慢性肝疾患にみられる細胆管反応 ductular reaction (DR) は、肝細胞の再生不全状態で肝STEM/前駆細胞群が活性化することにより生じるとされる¹⁵⁾。慢性ウイルス性肝炎 (CVH)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、などの慢性肝疾患では、DRは進行度に平行して増加する¹⁶⁾。一方、私どもの検討では、PBCやPSCの細胆管には高率に細胞老化形質を認める¹⁷⁾。一般にSTEM細胞の維持には細胞老化回避が必要であり、細胆管反応における細胞老化は一見相反する所見である。肝STEM/前駆細胞群マーカーとされるNCAM陽性細胆管は進行期PBCで進行期CVH、NASHと比較して有意に増加する。DRにおける細胞老化マーカー発現はPBC、CVH、NASHで進行度に平行し、特にPBCでは、CVH、NASHと比較して有意に亢進する¹⁷⁾。2重免疫蛍光法では、DRにおけるNCAM、細胞老化マーカー、G1-arrestを示すcyclin

D1発現の局在が概ね一致する(図2)。したがって、NCAM発現は特に進行期PBCにおいて、むしろ細胆管細胞老化の指標となると考えられる。また、急性肝炎、慢性肝疾患のいずれにおいてもDR内細胆管の増殖活性は肝細胞の増殖活性より有意に低く、DR内の細胆管は実は活発に増殖していない。これらの結果は、DRの病態における細胞老化の関与を示唆している¹⁷⁾。培養実験では、老化胆管細胞は、CCL2発現を介して肝星細胞の遊走を亢進し、線維化の進展との関連が示唆される(論文投稿中)。

7 老化細胞の役割：SASPIによる微小環境調節

最近、老化細胞は単なる細胞傷害の結果ではなく、SASPと総称される因子の分泌を介して、腫瘍形成促進、免疫誘導、線維化、血管新生など周囲微小環境を積極的に調節することが明らかになってきた^{18~21)}。代表的なSASPを表1に示す。SASPには、免疫調節に

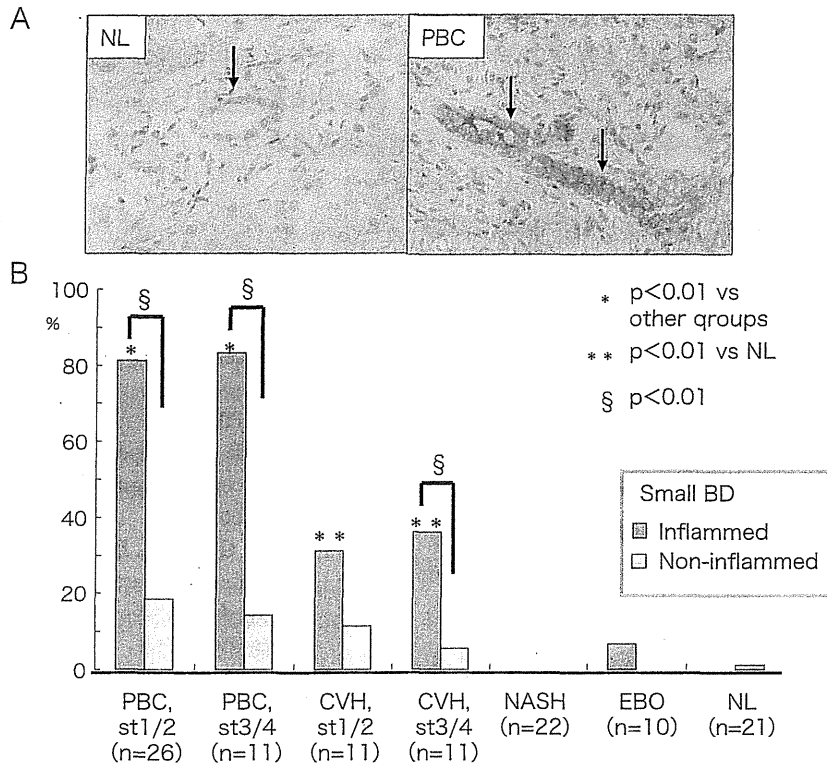


図3 PBCの炎症性胆管はCCL2発現亢進を示す
 A. CCL2発現は、正常肝(NL)の肝内小型胆管では陰性(左, 矢印)。PBCのCNSDC部では、障害胆管の細胞質と細胞膜にCCL2発現亢進をみる(右, 矢印)。
 B. CCL2発現の半定量的解析。Small BD, 炎症性胆管; Non-inflamed, 非炎症性胆管

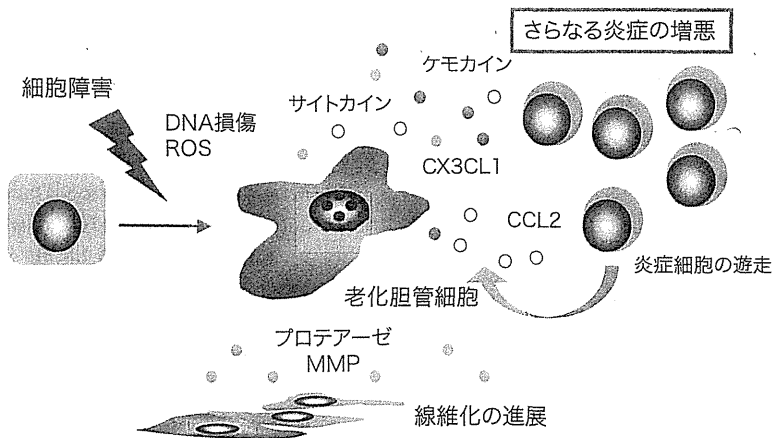


図4 シェーマ
 PBCの老化胆管細胞は胆管周囲の炎症を増悪させる

関連するIL-6, CCL2/MCP-1などの炎症性サイトカインや増殖因子など多彩な分子が含まれる。

PBCの胆管病変では、単球、リンパ球をはじめとする炎症細胞浸潤がみられ、さまざまな免疫調節機構の破綻が病態形成に重要とされる。私どもの最近の検討でも、細胞老化を示すPBCのCNSDC部障害胆管では、ケモカインCCL2, CX3CL1発現が亢進している(図3)²²⁾。また、培養老化胆管細胞にはCCL2, CX3CL1をはじめ多くのケモカイン発現亢進がみられ、実際に単球系細胞の遊走を亢進する²²⁾。従来、PBCの胆管病変を含めたヒト胆管系疾患や胆汁性線維症の動物モデルでは、胆管細胞がCCL2, CX3CL1などのケモカイン, IL-1, IL-6などのサイトカインや、線維化促進因子を発現し、炎症細胞や肝星細胞の動員や活性化を行うことが報告される^{23,24)}。これらのケモカイン, サイトカイン発現亢進は胆管細胞老化に伴うSASPである可能性がある。PBCの胆管病変では、CCL2, CX3CL1などのケモカインが炎症細胞の動員や活性化を引き起こし、さらなる炎症の増悪, 老化の亢進を起こすと考えられる(図4)。PBCの胆管周囲では、このような老化の悪循環が、免疫病態の進展に関与している可能性が示唆される(図4)。胆管病変で生じている老化の悪循環を制御することで、PBCの発生, 進展の抑制が可能になるかも知れない。

8 まとめ

PBCの胆管病変, PBCやPSCの細胆管反応における細胞老化の関与が明らかになりつつある。また、老化胆管細胞はケモカイン: CCL2, CX3CL1などのSASPを介して、炎症細胞を動員し、胆管病変の免疫病態形成に積

極的に関与する可能性が示唆される。AMAを中心とする自己免疫性機序と胆管細胞老化の関連については、今後さらなる検討が必要であろう。

文 献

- 1) Hayflick L, Moorhead PS : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-621, 1961
- 2) Sharpless NE, DePinho RA : Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113 : 160-168, 2004
- 3) Collado M, Blasco MA, Serrano M : Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130 : 223-233, 2007
- 4) Dimri GP, Lee X, Basile G et al : A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 9363-9367, 1995
- 5) Ferlicot S, Youssef N, Feneux D et al : measurement of telomere length on tissue section using quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). *J Pathol* 200 : 661-666, 2003
- 6) Sasaki M, Ikeda H, Haga H et al : Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. *J Pathol* 205 : 451-459, 2005
- 7) Lunz JG, Contrucci S, Ruppert K et al : Replicative senescence of biliary epithelial cells precedes bile duct loss in chronic liver allograft rejection: increased expression of p21 (WAF1/Cip1) as a disease marker and the influence of immunosuppressive drugs. *Am J Pathol* 158 : 1379-1390, 2001
- 8) Marshall A, Rushbrook S, Davies S et al : Relation between hepatocytes G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 128 : 33-42, 2005
- 9) Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M et al : Hepatocyte telomere shortening and senescence general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 16 : 935-942, 2002
- 10) Sasaki M, Ikeda H, Nakada S et al : Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology* 48 : 186-195, 2008

- 11) Sasaki M, Ikeda H, Sato Y et al : Activation of ATM signaling pathway is involved in oxidative stress-induced expression of mito-inhibitory p21 (WAF1/Cip1) in chronic non-suppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis: An immunohistochemical study. *J Autoimmun* 31 : 73-78, 2008
- 12) Sasaki M, Ikeda H, Sato Y et al : Decreased expression of Bmi1 is closely associated with cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 169 : 831-845, 2006
- 13) Young AR, Narita M, Ferreira M et al : Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 23 : 798-803, 2009
- 14) Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y et al : Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 90 : 835-843, 2010
- 15) Roskams T, Theise N, Balabaud C et al : Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39 : 1739-1745, 2004
- 16) Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE et al : Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 133 : 80-90, 2007
- 17) Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J et al : Bile ductular cells undergoing cellular senescence increase in chronic liver diseases along with fibrous progression. *Am J Clin Pathol* 133 : 212-223, 2010
- 18) Young AR, Narita M : SASP reflects senescence. *EMBO Rep* 10 : 228-230, 2009
- 19) Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A et al : Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133 : 1006-1018, 2008
- 20) Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC et al : Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133 : 1019-1031, 2008
- 21) Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X et al : Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132 : 363-374, 2008
- 22) Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y et al : Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 53 : 318-325, 2010
- 23) Shimoda S, Harada K, Niino H et al : Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis: the role of liver-infiltrating mononuclear cells. *Hepatology* 47 : 958-965, 2008
- 24) Tsuneyama K, Harada K, Yasoshima M et al : Monocyte chemotactic protein-1, -2, and -3 are distinctively expressed in portal tracts and granulomata in primary biliary cirrhosis: implications for pathogenesis. *J Pathol* 193 : 102-109, 2001

* * *

PBCの新しい病期・活動度分類とValidation

原田 憲一* 中沼 安二*

索引用語：原発性胆汁性肝硬変, 病期分類, 活動度分類, 予後

1 はじめに

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は免疫学的機序により隔壁胆管から小葉間胆管レベルの肝内小型胆管が障害を受け、小葉間胆管を中心に消失する¹⁾。PBCに特徴的な自己抗体である抗ミトコンドリア抗体(AMA)の対応抗原が同定されたのを皮切りに血清学的診断技術の充進および病態の解析が進み、さらにウルソデオキシコール酸(UDCA)やベザフィブレートによる薬物治療のデータ蓄積も相まってPBCの病態解明および治療戦略について近年大きな進歩を遂げた。PBCにみられる慢性非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)は本質的な病変であり²⁾、特に高度の炎症と胆管上皮の障害を伴う florid duct lesion は診断価値の高い所見である³⁾。長年、PBCの組織学的病期分類としてScheuer分類⁴⁾が広く慣れ親しまれてきた。しかし、PBC診断基準の改訂と共に時代のニーズにあった組織学的病期分類が必要とされ、さらに病勢の指標となる活

動度分類による病態の把握も必要とされ、われわれはPBCの新しい病理学的病期分類、活動度分類を提唱した⁵⁾。

本稿では、PBCの新病期分類、活動度分類と肝針生検への応用について概説し、本分類の特徴と有用性について検証したので論述する。

2 PBC活動度分類(Grading)と針生検への応用

近年、慢性肝炎に加えて非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の慢性進行性肝疾患では、疾患特異的な線維化および小葉構造の改築の程度を評価した病期分類に加えて、病勢を反映する壊死炎症性変化を評価した活動度分類が用いられている⁶⁾。PBCの基本像は、CNSDCを代表とする胆管炎と胆管消失、肉芽腫、慢性胆汁うっ滞であるが、門脈域炎と小葉炎からなる慢性活動性肝炎の所見も同時かつ種々の程度に出現し、胆管炎および肝炎性の変化とともにPBCの病勢を反映し病期進

Kenichi HARADA *et al* : Application and validation of a new histologic staging and grading system for primary biliary cirrhosis

*金沢大学大学院医学研究科形態機能病理学 [〒920-8640 石川県金沢市宝町 13-1]

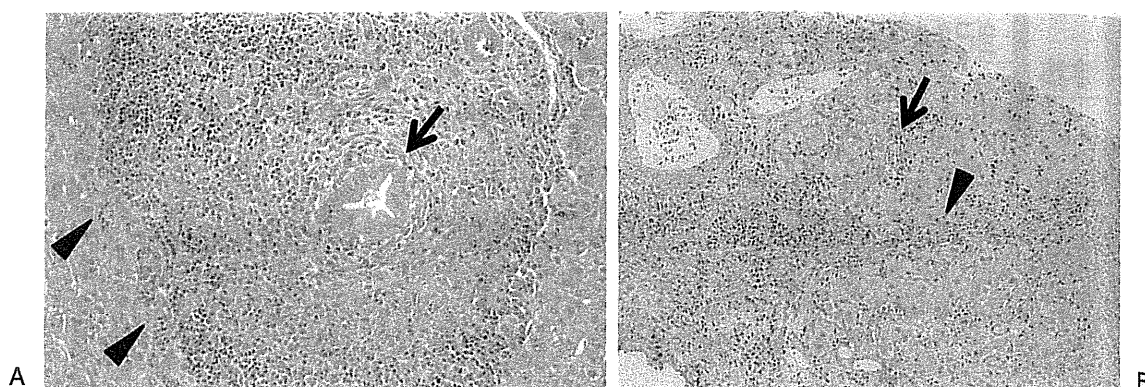


図1 PBCの活動度を規定する所見

A：PBCの門脈域で，慢性胆管炎の活動度(CA)を規定する慢性非化膿性破壊性胆管炎(矢印)および肝炎の活動度(HA)を規定するインターフェイス肝炎(矢頭)を認める。
 B：PBCの実質内に，巣状壊死(矢印)および架橋性壊死(矢頭)も認める。

表1 PBCの活動度分類(Grading)

慢性胆管炎の活動度 (Chronic cholangitis activity, CA)	
CA0 (no activity)	胆管炎がない，あるいは軽度の胆管上皮障害をみる。
CA1 (mild activity)	明瞭な慢性胆管炎を1カ所にみる。
CA2 (moderate activity)	明瞭な慢性胆管炎を2カ所以上にみる。
CA3 (marked activity)	CNSDCを少なくとも1カ所にみる。
(CNSDC: chronic nonsuppurative destructive cholangitis.)	
肝炎の活動度 (Hepatitis activity, HA)	
HA0 (no activity)	インターフェイス肝炎がない。小葉炎はないか，軽微。
HA1 (mild activity)	1カ所の門脈域または線維性隔壁周囲の肝細胞10個程度にインターフェイス肝炎をみる。軽度～中等度の小葉炎をみる。
HA2 (moderate activity)	2カ所以上の門脈域または線維性隔壁周囲の肝細胞10個程度にインターフェイス肝炎をみる。軽度～中等度の小葉炎をみる。
HA3 (marked activity)	半数以上の門脈域周囲の肝細胞20個程度にインターフェイス肝炎をみる。中等度の小葉炎，あるいは架橋性や帯状壊死をみる。

展に加担する⁷⁾。われわれはPBCの肝組織で観察される17の組織所見について解析し，活動性を反映する所見としてCNSDCを含む胆管炎，インターフェイス肝炎，小葉炎(図1)を抽出し，これらの所見をもとに慢性胆管炎(CA)および肝炎(HA)の程度を個別に1 (no activity)，2 (mild activity)，3 (moderate

activity)，4 (marked activity)の4段階にスコア化し，PBC活動度分類の原案を作成した⁵⁾。その後，肝針生検材料のデジタル画像を対象とした国内外の肝臓専門医および病理医によるInterobserver agreement studyの結果をもとに若干の改訂を行い，肝針生検材料を用いた病理診断におけるより利便性の高

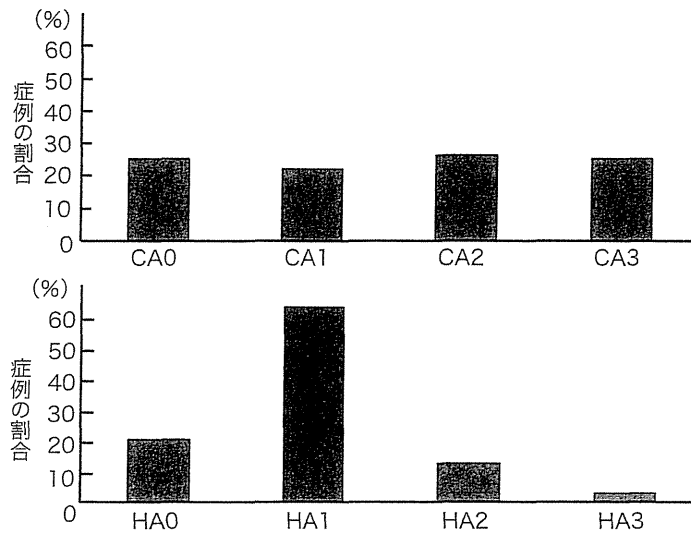


図2 PBCの活動度の分布

肝針生検材料166例を対象に活動度を検討した結果、慢性胆管炎の活動度(CA)はほぼ均一に分布しているが、肝炎の活動度(HA)はHA0～HA1の軽度の症例が多い。

い評価法を作成した(表1)⁸⁾。慢性胆管炎の活動度(CA)に関しては、明瞭な慢性胆管炎とCNSDCの所見の有無と程度をもとに評価し、肝炎の活動度(HA)に関してはインターフェイス肝炎と小葉炎の有無と程度をもとに評価する。

本活動度分類の特徴と妥当性を検証するため、臨床病理学的にPBCとして診断されたPBC 166例の肝針生検を用いて本活動度分類にしたがって評価した。その結果、慢性胆管炎の活動度(CA)は図2のごとく、ほぼ均一にCA0～CA3に分布することが明らかとなり、PBCの慢性胆管炎はあらゆる程度に出現することを示唆している。しかし、CA0やCA1には胆管自体が減少した進行症例も含まれており、胆管消失高度例における慢性胆管炎の評価の意義および妥当性については今後の検討課題と思われる。一方、肝炎の活動度(HA)はHA0～HA1が84%を占め、全体的にスコアは低い傾向であった(図2)。肝

炎の活動度の評価項目に、慢性活動性肝炎を特徴付けるインターフェイス肝炎や小葉炎が含まれており、自己免疫性肝炎(AIH)などの慢性活動性肝炎を示す症例と比較した場合、PBCではHAスコアが低い傾向にあることは理にかなった結果と思われる。現在、PBC-AIHオーバーラップ症候群はChazouilleres/Pouponら⁹⁾によって診断基準が提唱されているが、その病態はいまだ不明である。肝炎性変化の目立つPBC(肝炎型PBC)として病態を解釈する知見もあり¹⁰⁾、本分類でHA3(marked activity)を示すPBC症例はオーバーラップの指標の一つになる可能性もある。「CA」「HA」の個別の活動度評価はPBCの病態の把握、さらに治療効果や予後の判定に有用な指標であり、さらにはオーバーラップ症候群や非定型例の解析や治療選択にも応用できるとと思われる。

表2 PBCの古典的病期分類(Staging)

Scheuer分類(1967年発表)	
1期	慢性非化膿性破壊性胆管炎(Florid duct lesion)
2期	非定型的細胆管増生
3期	線維化・癒痕
4期	肝硬変

Ludwig分類(1978年発表)	
1期	Portal hepatitis
2期	Periportal hepatitis (interface hepatitis)
3期	線維性隔壁形成, 架橋性壊死
4期	肝硬変期

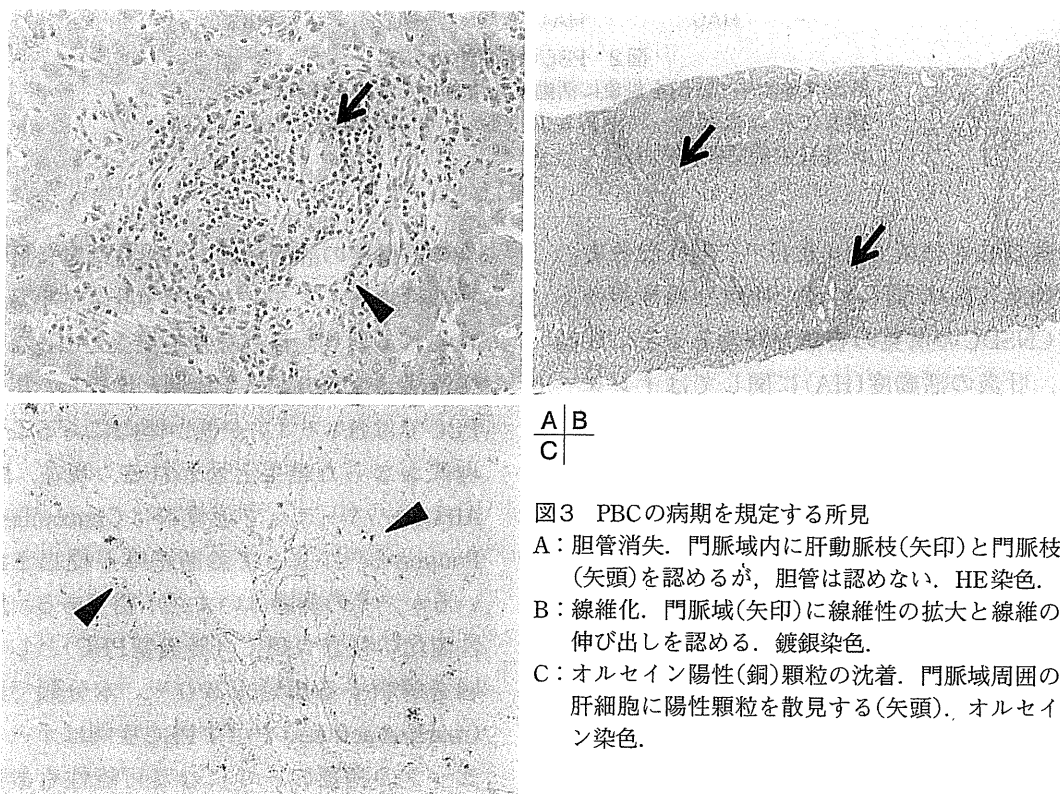


図3 PBCの病期を規定する所見
 A:胆管消失. 門脈域内に肝動脈枝(矢印)と門脈枝(矢頭)を認めるが, 胆管は認めない. HE染色.
 B:線維化. 門脈域(矢印)に線維性の拡大と線維の伸び出しを認める. 鍍銀染色.
 C:オルセイン陽性(銅)顆粒の沈着. 門脈域周囲の肝細胞に陽性顆粒を散見する(矢頭). オルセイン染色.

3

PBC新病期分類 (Staging) と針生検への応用

古くから最も汎用されてきたPBCの組織学的病期分類は1967年に発表されたScheuer

分類⁴⁾であり, 表2に示す特徴的な肝・胆管病変をもとに1~4期に分類し, その後Ludwigら¹¹⁾は慢性肝炎の概念をPBCの病期分類に取り入れた(表2). しかし, いずれも単一の組織所見に重点を置いた方法であり,

表3 PBCの新組織学的病期分類(Staging) (PBC 組織病期評価のための組織病変とスコア)

線維化のスコア		
Score 0	門脈域での線維化がないか、あるいは線維化が門脈域に限局	
Score 1	門脈域周囲の線維化あるいは不完全な線維性隔壁を伴う門脈域線維化	
Score 2	種々の小葉構造の乱れを伴う架橋性線維化	
Score 3	再生結節と高度の線維化を伴う肝硬変	
胆管消失のスコア		
Score 0	胆管消失がない	
Score 1	以下の門脈域で胆管消失をみる	
Score 2	1/3-2/3の門脈域で胆管消失をみる	
Score 3	2/3以上の門脈域で胆管消失をみる	
オルセイン陽性顆粒沈着のスコア		
Score 0	陽性顆粒の沈着なし	
Score 1	1/3以下の門脈域周辺の肝細胞(少数)に陽性顆粒の沈着をみる	
Score 2	1/3-2/3の門脈域周辺の肝細胞(種々の程度)に陽性顆粒の沈着をみる	
Score 3	2/3以上の門脈域の周辺肝細胞(多数)に陽性顆粒の沈着をみる	
上記組織病変スコアの合計による病期診断		
Stage	3因子スコアの合計 (線維化+胆管消失+ オルセイン陽性顆粒沈着)	2因子スコアの合計 (線維化+胆管消失)
Stage 1 (no progression)	0	0
Stage 2 (mild progression)	1-3	1-2
Stage 3 (moderate progression)	4-6	3-4
Stage 4 (advanced progression)	7-9	5-6

組織学的病変が不均一に分布するPBCでは同一症例に病期を特徴づける所見が重複してみられたり、単一の所見をもとに分類するためサンプリングエラーも起こりやすい。また、Ludwigらの分類はPBCに特徴的な胆管炎関連の所見が考慮されておらず、PBCでの有用性に疑問が残る。いずれも簡便な方法ではあるが、判定に苦慮する症例が多々あり、実際のところScheuer分類とLudwig分類の双方の所見を鑑みて診断していたのが実状と思われる³⁾。われわれは、組織所見の不均一性より生じる病期評価時の矛盾の回避および肝針生検材料で生じるサンプリングエラーの問題を回避するため、複数の組織所見をもとに評

価する新病期分類の作成を目的とした。PBC肝組織で観察される組織所見のうち、病期を規定する所見として胆管消失、銅沈着、肝線維化(図3)が因子解析により選出され、これらの組織所見の程度から病期を評価する新たなPBC組織学的分類を提唱した^{5,8)}。その方法は表3に示すごとく、線維化、胆管消失、さらにオルセイン染色標本がある場合にはオルセイン陽性顆粒沈着の程度をおのおのスコア0~3に評価し、2組織所見または3組織所見のスコアの合計点をもとにStage 1 (no progression)、Stage 2 (mild progression)、Stage 3 (moderate progression)、Stage 4 (advanced progression)の4段階に病期分類

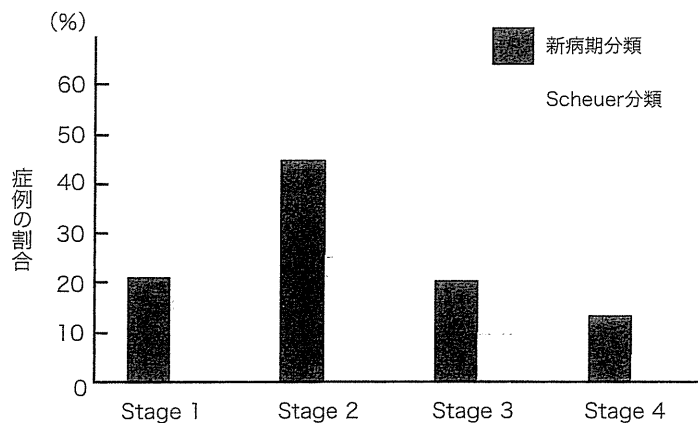


図4 新病期分類とScheuer分類の比較
肝針生検材料166例を対象に病期を評価した結果、両分類間に分布の違いを認める。

した。これらの方法により、従来の病期分類の指標であった線維化、非定型的細胆管増生、架橋性壊死などの単一の組織所見に基づく評価の不具合を回避することができ、より客観的および正確な進行度の評価が可能となった。

新病期分類の妥当性を検討するため、PBC症例の肝針生検材料を用いて線維化スコアおよび胆管消失スコアの2組織所見スコアでの病期分類を行った結果、新病期分類Stage2が45%を占め、Stage1とStage3が約20%、Stage4が約15%程度に分布した(図4)。新病期分類の大きな特徴のひとつは「no progression」として定義したStage1の存在であり、PBC病態の極めて病初期の段階またはhealthy carrier的な保因者と解釈される群である。新病期分類では、このStage1と評価されたPBC症例が約20%存在することがわかった。AMA陽性など臨床的にPBCの所見が揃っているにもかかわらず肝生検ではPBCに特徴的な組織所見に乏しく「nonspecific reactive change」としか診断できない症例をしばしば経験するが、このような症例はStage1 (no progression)のPBCとし

て取り扱うことができる可能性がある。今後、このような病理学的裏付けが取れないPBC症例の取り扱いを含め、本分類の適応基準について検討する必要があると思われる。

4 新病期分類と古典的病期分類との比較

PBC症例肝針生検材料を用いて2組織所見スコアによる新病期分類と現在まで汎用されてきたScheuer分類との比較をした。その結果、前述のごとく新分類ではStage2が最も割合が高かったが、Scheuer分類ではStage1症例をピークにStageが進むにつれて割合は減少し、両分類による症例の分布に大きな違いがみられた(図4)。両者の相違をきたした大きな要因として、Scheuer分類Stage1に分類される症例のうち「線維化スコア0」「胆管消失スコア1」の症例が新分類でStage2に移行した。また、Scheuer分類Stage3に分類される症例のうち「非硬変肝(線維化スコア1または2)、胆管消失スコア2または3」が新分類のStage4に移行した。すなわち新病期分類のStage4は、前硬変肝の状態でも中

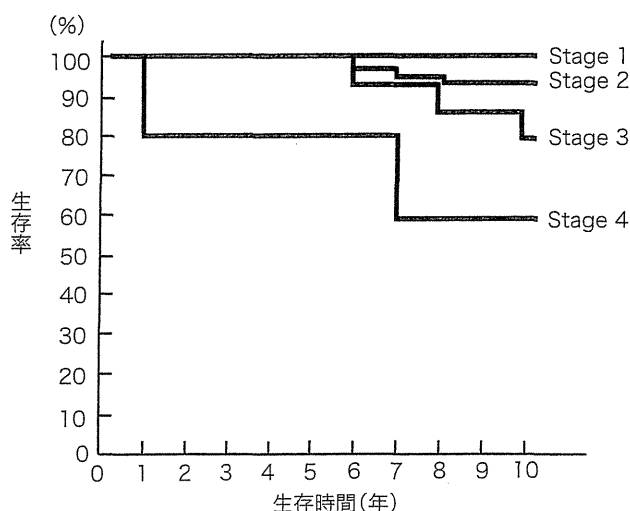


図5 新病期分類による生存曲線
 各病期の分離が良好であり、予後と良く相関している。
 (the log-rank test, p=0.02)

等度～高度の胆管消失を伴う症例が含まれており、単に肝硬変期と定義する古典的分類とは大きく異なる。次に、両分類の相違についてさらに検討するため、10年目の追跡予後調査を実施した。予後調査結果が得られた76例中8例が死亡または肝移植が施行されており、Scheuer分類では8例中3例がStage 1であったが、新分類ではStage 1の症例は含まれていなかった。新分類Stage 1は「no progression」として定義した病期であり、10年後生存率100%という結果は「no progression」として妥当なカテゴリーと確認できた。さらに、生存曲線による検討にて、新病期分類ではScheuer分類に比較して各病期の分離が良好であり予後と良く相関していた(図5)。近年、Scheuer分類stage 3相当で肝移植適応となる症例をしばしば経験する。このような症例は高度の胆汁うっ滞をきたした非代償性肝不全の状態であり、新病期分類ではstage 4に分類される症例である。また、今回の予後調査結果に基づく生存曲線解析に

おいても、Scheuer分類に較べ新病期分類で良好な相関が得られ、新病期分類の予後予測に関する有用性、さらに病期分類としての妥当性を示唆するものと思われる。

5 おわりに

われわれの提唱しているPBCの活動度分類および新病期分類は、現代のニーズにあったシステムであり、妥当性についても確認しつつある。活動度分類を用いることによりPBC患者の病態、病勢を的確に評価することができ、非定型例PBCやオーバーラップ症例の診断や薬物治療の選択および効果判定にも有用である。また、新病期分類は複数の組織所見より判断するため客観的かつ正確な評価法であり、予後とも良く相関した分類である。今後、本システムを用いた評価が臨床および研究の分野で大きく貢献すると期待している。

文 献

- 1) Nakanuma Y, Ohta G : Histometric and serial section observations of the intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 76 : 1326-1332, 1979
- 2) Rubin E, Schaffner F, Popper H : Primary Biliary Cirrhosis. *Chronic Non-Suppurative Destructive Cholangitis*. *Am J Pathol* 46 : 387-407, 1965
- 3) Scheuer P, Lefkowitz JH : *Liver biopsy interpretation*, 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Ltd 69-84, 2007
- 4) Scheuer P : Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med* 60 : 1257-1260, 1967
- 5) Hiramatsu K, Aoyama H, Zen Y et al : Proposal of a new staging and grading system of the liver for primary biliary cirrhosis. *Histopathology* 49 : 466-478, 2006
- 6) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM et al : Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94 : 2467-2474, 1999
- 7) Nakanuma Y, Saito K, Unoura M : Semiquantitative assessment of cholestasis and lymphocytic piecemeal necrosis in primary biliary cirrhosis: a histologic and immunohistochemical study. *J Clin Gastroenterol* 12 : 357-362, 1990
- 8) Nakanuma Y, Zen Y, Harada K et al : Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement. *Pathol Int* 60 : 167-174, 2010
- 9) Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L et al : Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. *Hepatology* 28 : 296-301, 1998
- 10) Lohse AW, zum Buschenfelde KH, Franz B et al : Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatic form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 29 : 1078-1084, 1999
- 11) Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS : Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis) . *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 379 : 103-112, 1978

*

*

*

胆管硬化とEMT

佐藤保則* 原田憲一* 中沼安二*

索引用語：胆管細胞, 胆管硬化, 線維化, 上皮-間葉転換, EMT

1 はじめに

上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) は個体発生や器官形成過程において必須の機構である。EMTは1980年代初めにElizabeth Hayが提唱した概念とされ、その逆の現象である間葉-上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition, MET) とともに発生過程には欠かせないプロセスである。

EMTの獲得は細胞運動性の亢進や細胞外マトリックスの蓄積をもたらすことから、臓器の線維症や創傷治癒、癌の浸潤転移との関連が注目され、これまでにTGFなどの細胞増殖因子やその下流のEMT制御因子についての研究がなされてきた。線維化や癌の進展におけるEMTの関与を明らかにすることは、EMTを標的とした疾患の予防や治療応用へとつながる。

現在まで、全身のさまざまな臓器において上皮系細胞のEMTの観点から線維化機序の解明が試みられてきた。肝胆道系では肝細胞

および胆管細胞のEMTに着目した線維化機序の解析が進行している^{1,2)}。また、肝細胞癌や胆管癌の高度悪性化におけるEMTの関与も検討されている。

本稿では胆管細胞のEMTの観点から、いくつかの肝胆道系疾患における胆管硬化、肝線維化の機序について、これまでにわれわれが行った研究成果を交えて紹介する。

2 EMT

1. 概念

EMTは一定の細胞形態をもって基底膜上に規則正しく配列した上皮系細胞がその細胞極性を失い、間葉系細胞に変化することを指す。上皮様細胞形態が線維芽細胞様の形態へと変化し、細胞骨格に関する細胞内タンパク質の発現が変化する。代表的な例として、細胞間接着分子であるE-cadherinの消失または低下、中間径フィラメントとしてのcytokeratin (CK)のvimentinへの発現変化がよく知られている。これらタンパク質の変化や細胞形態の変化を指標にEMTの研究が

Yasunori SATO *et al* : Sclerosing cholangiopathy and EMT

*金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 [〒920-8640 石川県金沢市宝町13-1]

行われており、S100A4 (fibroblast-specific protein 1, FSP1)の発現もEMTの指標としてよく用いられる³⁾。

EMTにより細胞極性を失い細胞間接着が低下した細胞は運動性が亢進し、ある条件下では細胞外マトリックスを産生する。微小環境における間質細胞や細胞増殖因子、プロテアーゼ、および細胞外マトリックスの複雑で動的な相互作用によりEMTが進行する。

2. 誘導機構

TGF- β は最も代表的なEMT誘導因子であり、その他にもFGF, HGF, EGF, IGF, PDGFなどの細胞増殖因子のEMT誘導作用が報告されており、細胞の種類によりこれら因子の作用は異なる。細胞内シグナルとしてSmad, Raf/MAPK, PI3Kなどのシグナル伝達系が重要と考えられている。また、Sonic hedgehog, Wnt/ β -catenin, Delta/Notch, NF- κ B/RelBなどのシグナル伝達系がEMTに関与することも報告されている。EMTを調節する転写因子としてSnail1 (Snail), Snail2 (Slug), Twist, ZEB1, SIP1などが明らかとなっている⁴⁾。

3. 分類

EMTは、1) 個体発生・器官形成と、2) 臓器の線維化・創傷治癒、3) 癌の進展という大きく3つの現象に関与しているが、この3つの現象の際に生ずるEMTは質的に異なっていることから、EMTを3つのタイプに分類する見方がある^{1,3)}。Type 1 EMTは発生・器官形成の際に出現し、EMT/METを介して臓器の形成に関与する。Type 1 EMTに線維化は伴わない。Type 2 EMTは通常、炎症反応を伴う組織の修復過程に観察され、EMTに由来するfibroblastic cellが線維化を進行させるもので、組織の傷害や炎症反応が持続すると過剰な線維化を生ずる。胆管硬化や肝線

維化に関与すると考えられるのは主にこのType 2 EMTである。Type 3 EMTは癌の進展の際にみられるもので、線維化反応が主体でない点はType 1 EMTと類似している。

EMTでは上皮系細胞の細胞極性が消失、転換するが、その現象は一気に進行するのではなく、徐々にもしくは段階的に進行する。こうした細胞極性の側面から、EMTの中間的な段階にある状態を‘partial EMT’とする考え方がある。また、癌細胞でE-cadherinを代表とする上皮系マーカー遺伝子の消失とvimentinなどの間葉系マーカー遺伝子の高発現を伴い、転移能のある線維芽細胞様形態を示すものを‘complete EMT’⁵⁾と定義することも提唱されている⁶⁾。一方で癌細胞にみられるEMTは上皮系から間葉系への完全なtransdifferentiationではないことから、‘EMT-like phenotype’⁷⁾と呼ぶべきであるとする研究者もいる⁸⁾。このようにEMTの定義にはやや曖昧な点が残されている。

3 胆管細胞EMTと線維化

1. 肝線維化

肝臓が傷害を受けると肝星細胞(hepatic stellate cell, HSC)が活性化され、筋線維芽細胞(myofibroblast, MF)様細胞へと変換し、collagenに代表される細胞外マトリックスを産生する。現在、HSCに由来するMFが肝線維化の主体をなす細胞と考えられており、そのマーカーとしてalpha-smooth muscle actin (α -SMA)が頻用されている。また、MFの由来として門脈域に常在するportal fibroblastや骨髄のstem cellの関与も想定されている。なお、骨髄由来に関しては動物実験で否定的な結果も示されている⁹⁾。

これまでに、腎臓では尿細管上皮のEMTに由来するMFが線維化に関与することが