

requirement for the NK/NK T-associated innate immune effector mechanisms in the initiation of a breakdown of tolerance and a potential major role of a continued adaptive response in the natural history of disease.

## Materials and methods

### Murine immunization

Female C57BL/6J (B6) mice aged 8–9 weeks were obtained from Kyudo (Kumamoto, Japan) and maintained in ventilated cages under specific pathogen-free conditions. Each mouse was immunized intraperitoneally with a mixture of 2-octynoic acid-bovine serum albumin (2OA-BSA) conjugate (100 µg/25 µl) incorporated in complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 10 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra. The mice subsequently received biweekly booster doses of 2OA-BSA incorporated in incomplete Freund's adjuvant (IFA; Sigma-Aldrich), as reported previously [9]. Groups of these 2OA-BSA-immunized mice were either treated intravenously with 100 µg of NK1.1 antibody (Cedarlane, Alexis, NC, USA) to deplete NK cells or NK T cells (group A,  $n = 32$ ) or treated with control mouse immunoglobulin (group B,  $n = 32$ ) every week before 2OA-BSA treatment and up to the time of killing. As negative controls, female B6 mice (group C,  $n = 12$ ) were immunized with BSA incorporated in CFA (Sigma-Aldrich) and boosted using the same dose and schedule as the experimental mice. Sera and spleens were collected before and at every 6 weeks post-immunization to 24 weeks. Serological AMA was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [10] and spleen mononuclear cells were isolated for detection of NK1.1-positive cells by flow cytometry and enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. In a nested study, liver samples were collected from eight mice from groups A and B and three mice from group C, each at 6, 12, 18 and 24 weeks, and subjected to histological analysis [11–13].

### Flow cytometric analysis of the cell surface antigens

Two-colour flow cytometry was performed on cell suspensions using a fluorescence activated cell sorter (FACS) Caliber flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), as described previously [14]. Cell surface monoclonal antibodies utilized included anti-CD3 and NK1.1 (BD Biosciences). Splenic mononuclear cells ( $2.5\text{--}5.0 \times 10^5$ ) were stained for cell surface antigen expression at 4°C in the dark for 30 min, washed twice in 2 ml phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide, and were fixed in 200 µl of 1% paraformaldehyde. Isotype-matched control antibodies were used to determine the background levels of staining.

### Peptide synthesis

Murine PDC-E2 peptides encompassing the inner lipoyl domain, which correlates with human PBC-specific T cell epitopes [15], were synthesized by fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) chemistry and the peptide purity was more than 80%, as determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The synthetic peptide sequences were aa 232–246 (GTVQRWEKKVGEKLS), aa 236–250 (RWEKKVGEKLSEGD), aa 240–254 (KVGKLESEGD-LAEI), aa 244–258 (KLSEGDLLAEIETDK), aa 248–262 (GDLLAEIETDKATIG), aa 252–266 (AEIETDKATIG-FEVQ), aa 256–270 (TDKATIGFEVQEEGY) and aa 260–274 (TIGFEVQEEGYLAKI), all purchased from Genenet (Fukuoka, Japan).

### Detection of AMA

AMA was determined by ELISA using the triple-expression hybrid clone, pML-MIT-3 (pML-MIT-3-ELISA) [10,16,17]. Briefly, recombinant proteins containing the AMA-reactive immunodominant epitopes localized to the three distinct lipoyl domains of human pyruvate dehydrogenase complex (PDC)-E2 [18], bovine branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC)-E2 [19] and rat 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC)-E2 [10] were cloned and co-expressed in the plasmid vector, pGEX-4T-1 (Pharmacia, Alameda, CA, USA) and the product used as antigen. Serological AMA was determined using serum samples at a 1:250 dilution and the bound antibodies were detected by peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (diluted 1:50 and 100 ul/well; Dako, Glostrup, Denmark). The optical density (OD) was determined using a microplate reader at 450 nm.

### Evaluation of splenic PDC-E2 peptide-specific T cell responses by ELISPOT

Splenic mononuclear cells were obtained from mice before and at 6, 12, 18 and 24 weeks post-immunization and were treated with either NK1.1 antibody ( $n = 8$  each time) or with control immunoglobulin ( $n = 8$  each time) or negative control ( $n = 3$  each time). A total of  $1 \times 10^6$  cells were dispensed into each well of a 24-well plate and cultured with murine PDC-E2 synthetic peptides, as mentioned below. After 3 days of culture, viable splenocytes were harvested and ELISPOT assays were performed [RSD ELISPOT set, mouse interferon (IFN)- $\gamma$  ELISPOT set, Minneapolis, MN, USA]. Briefly, 96-well nitrocellulose plates were coated with an optimized capture monoclonal antibody (mouse anti-IFN- $\gamma$ ) in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated overnight at 4°C. Unbound antibody was removed by washing with PBS containing 0.05% Tween (PBS-Tween). Viable cells were added at  $3 \times 10^5$  cells/well in 100 µl RPMI-1640 in triplicate. The plates were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

for 24 h; the plates were then washed, labelled with biotin-labelled anti-IFN- $\gamma$  and developed by incubation with streptavidin-alkaline phosphatase, followed by incubation with a final substrate solution (BD™ AEC substrate reagent set, San Diego, CA, USA). The reaction was stopped by rinsing the contents with distilled water, and the number of spots was counted by using a KS ELISPOT Reader (Zeiss, Thornwood, NY, USA). Known positive and negative samples were included throughout. In addition, antigen-specific spot-forming cells (SFC) were quantitated as SFC in the presence and absence of antigen and the net SFC calculated. The average number of SFC in the absence of antigen was fewer than 10 (data not shown).

### Histological analysis of murine liver sections

Immediately after killing, liver was harvested, cut into small fragments and fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 5- $\mu$ m sections. Liver sections were deparaffinized, stained with haematoxylin and eosin and evaluated under light microscopy by a 'blinded' qualified pathologist; the degree of liver inflammation, portal inflammation, bile duct damage, parenchymal inflammation and granuloma was scored as described previously [20–22]. Briefly, each section (except for those that showed bile duct damage or granuloma) was scored as either 0 = no significant change, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate or 4 = severe pathology. The sections that showed bile duct damage and granuloma were scored as either 0 = no significant observation, 1 = low frequency observed or 2 = frequently observed.

### Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the data points shown are means of these triplicate analyses. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (s.d.), and the significant differences between samples was determined using Student's *t*-test. All analyses were two-tailed and *P*-values < 0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed using Intercooled Stata 8.0 (Stata Corp, College Station, TX, USA).

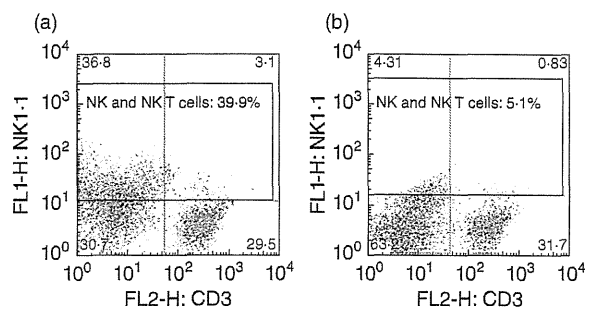
## Results

### Depletion of NK and NK T cells

To evaluate the role of NK and NK T cells, we depleted NK and NK T cells by administering NK1.1 antibody. This treatment was confirmed to be effective due to the marked reduction in the frequency of NK1.1-positive NK cells or NK T cells by Stanford flow cytometry (Fig. 1).

### Anti-mitochondrial antibodies

At both 6 and 12 weeks post-immunization, serum AMA were decreased significantly in the NK1.1-depleted mice immu-

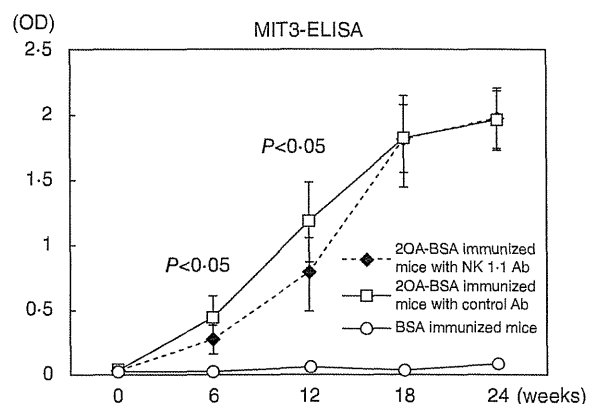


**Fig. 1.** Effect of natural killer (NK)1.1 antibody deletion. Cell surface markers were determined in spleen mononuclear cells by flow cytometry. Splenic mononuclear cells contained 30.7% CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> cells, 29.5% CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> cells, 36.8% CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup> cells and 3.1% CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> cells (a). After NK1.1 antibody treatment, NK1.1-positive cells decreased from 39.9% to 5.1% (b).

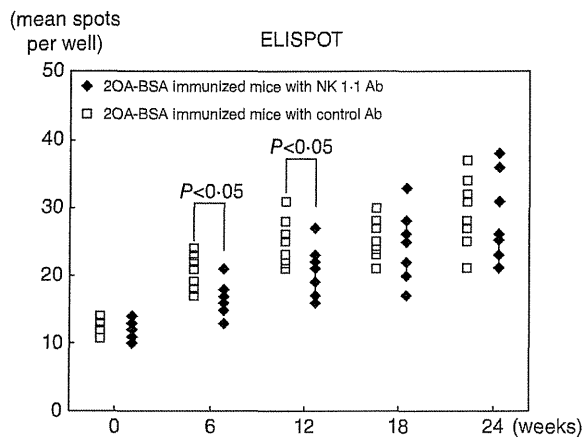
nized with 2OA-BSA (*n* = 8) compared to sera from control mice immunized with 2OA-BSA. Interestingly, however, after 18 weeks there was no significant difference in AMA titres in the two groups of animals (Fig. 2). As expected, there were no detectable AMA in BSA control mice.

### Detection of IFN- $\gamma$ -secreting T cells recognizing mouse PDC-E2 peptides

We evaluated T cell responses to PDC-E2 at 6, 12, 18 and 24 weeks using our ELISPOT assay in individual NK1.1-depleted and control 2OA-BSA immunized mice (Fig. 3). As noted, the numbers of IFN- $\gamma$ -secreting T cells from the



**Fig. 2.** Antibody to mitochondrial antigens. Quantification of anti-mitochondrial antibody (AMA) in the sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at 6-week intervals after immunization shows significant increases in optical density (OD). Sera obtained from mice before and at 6, 12, 18 and 24 weeks post-immunization were treated with either natural killer (NK)1.1 antibody (*n* = 8 each time) or with control immunoglobulin (*n* = 8 each time) or negative control (*n* = 3 each time). In immunized mice, NK1.1 antibody-treated mice had lower OD than control immunoglobulin-treated mice (*P* < 0.05) within 12 weeks.

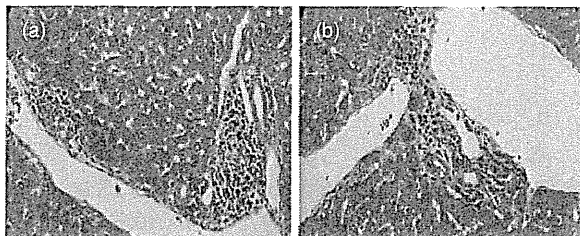


**Fig. 3.** Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) assay [interferon (IFN)- $\gamma$ ] of 2-octynoic acid-bovine serum albumin (2OA-BSA)-immunized mice with natural killer (NK)1.1 antibody and with control immunoglobulin. Cytokine production of splenic mononuclear cells in response to pyruvate dehydrogenase complex (PDC)-E2 synthetic peptides using ELISPOT. The y-axis indicates the number of IFN- $\gamma$ -producing T cells reactive to PDC-E2 synthetic peptides/ $3 \times 10^5$  splenic mononuclear cells. Note that NK1.1 antibody-treated mice had lower frequencies of autoreactive T cells than those with control immunoglobulin ( $P < 0.05$ ) within 12 weeks.

control 2OA-BSA-immunized mice both at 6 and 12 weeks were significantly higher than the 2OA-BSA-immunized NK1.1-depleted group. However, the mean number of such IFN- $\gamma$ -secreting T cells was similar in both groups at 18 and 24 weeks.

### Histological studies

The coded series of liver tissues from the various groups of mice were studied by a pathologist blinded to the groupings of the donor mice. As seen in Fig. 4, there were no major differences in the degree of lymphoid cell infiltration in tissues from mice treated with the NK1.1 antibody compared



**Fig. 4.** Microscopic examination of liver tissue from 2-octynoic acid-bovine serum albumin (2OA-BSA) with natural killer (NK)1.1 antibody and control immunoglobulin. (a) Light microscopy ( $\times 400$ ) with NK1.1 antibody shows mild infiltration of lymphocytes in portal tracts, particularly surrounding damaged intralobular bile ducts. (b) Light microscopy ( $\times 400$ ) with control immunoglobulin demonstrates similar findings to those shown in (a).

with tissues from the control mice at 24 weeks. Both the levels of bile duct lesions and lymphoid cell infiltration appear to be mild in the NK1.1-depleted and control mice. These data suggest that NK1.1 depletion initiated prior to immunization does not appear to influence the degree of lymphoid cell infiltrates and/or severity of the ductal lesions (data not shown).

### Discussion

Recent work has emphasized that the unique destruction of biliary cells requires the triad of macrophages from patients with PBC, biliary epithelial cell apoptoses and AMAs; this leads to a burst of proinflammatory cytokines [23]. In addition, there is evidence that NK cells are involved in biliary cell cytotoxicity, and in this respect it is noteworthy that there is considerable heterogeneity among the NK and perhaps also the NK T cell lineages [24,25]. Thus, previous dogmas with regard to NK cells require re-examination, particularly with regard to function, as there is now evidence for NK cell memory and a regulatory function has also been ascribed to NK cells [25]. One of the strongest cases for NK cell heterogeneity comes from studies of the phenotypical and functional differences of the NK cell lineages that reside within the gut compared with the blood and lymph nodes [26,27]. Thus, while organ-resident NK cells control the magnitude of organ inflammation, they also have a role concurrently in influencing the generation of autoimmunity and pathology [28,29]. Peripherally derived NK cells have an impact upon autoimmune responses which are manifested by their ability to synthesize cytokines rapidly that, in turn, influence the quality and quantity of acquired immune responses [30–34]. While the CD1d-deficient mouse [35–38] and the use of  $\alpha$ -GalCer to activate NK T cells [39–41] are both available to perform standard addition/subtraction experiments in efforts to define a role for the NK T cell lineage, reagents are not readily available for a similar study of the role of NK cells. This is due to the fact that the use of the classical NK1.1 monoclonal antibody (mAb) to deplete NK cells also deletes NK T cells, because the latter lineage also expresses NK1.1. As NK T cells have been shown to contribute to the exacerbation of disease in PBC [5,6], results of the findings reported herein indicate that the depletion of both NK cells and NK T cells prior to immunization has a minimal role in the overall breakdown of tolerance. Thus, and as shown herein, while depletion of NK1.1 cells appeared to delay significantly the generation of autoimmune-specific acquired humoral and cellular responses, the data indicate clearly that depletion of the NK1.1 lineage did not lead to any detectable differences in the pathology seen in the NK1.1-depleted *versus* control mice.

It is well known that liver contains NK cell subsets which have reduced effector function [42,43], but under appropriate inflammatory conditions become potent killers [44]. NK cells sense normal or abnormal cells with their inhibitory

or activating receptors [32]. Thus, under normal circumstances, NK cells will not damage autologous cells due to the engagement of inhibitory receptors. Nevertheless, NK cells have the capacity to spontaneously kill autologous immature dendritic cells [45], stromal cells or fibroblasts [46], and under special conditions such as the presence of restricted innate immune stimulation NK cells destroy autologous biliary epithelial cells [24]. The natural history of autoimmune cholangitis in this model requires, first, the loss of tolerance to PDC-E2 and secondly, the inflammatory portal infiltrates in liver. Our data imply that there are different phases to the natural history of disease, a theme which is similar to our previously published work [47,48]. In other words, one factor which can facilitate the onset of autoimmunity is NK and NK T cell populations. However, once tolerance is initiated, the disease will be perpetuated via other mechanisms, again highlighting the promiscuous nature of autoimmunity and the involvement of multiple effector pathways.

### Acknowledgements

Financial support was provided by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (Kakenhi 22590739) and partially by the Research Program of Intractable Disease provided by the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan; NIH grant no. DK067003.

### Disclosure

The authors have no conflicts of interest to declare.

### References

- Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; **353**:1261–73.
- Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008; **14**:3328–37.
- Liu H, Norman GL, Shums Z *et al*. PBC screen: an IgG/IgA dual isotype ELISA detecting multiple mitochondrial and nuclear autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2010; **35**:436–42.
- Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M *et al*. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 2002; **123**:1031–43.
- Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K *et al*. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology* 2011; **53**:915–25.
- Chuang YH, Lian ZX, Yang GX *et al*. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008; **47**:571–80.
- Selmi C, Lleo A, Pasini S, Zuin M, Gershwin ME. Innate immunity and primary biliary cirrhosis. *Curr Mol Med* 2009; **9**:45–51.
- Berg PA. The role of the innate immune recognition system in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis: a conceptual view. *Liver Int* 2011; **31**:920–31.
- Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS *et al*. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology* 2008; **48**:531–40.
- Moteki S, Leung PS, Dickson ER *et al*. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1996; **23**:436–44.
- Bioulac-Sage P. Primary biliary cirrhosis: a new histological staging and grading system proposed by Japanese authors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; **35**:333–5.
- 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* 2010; **60**:167–74.
- Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978; **379**:103–12.
- Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y *et al*. IL-2 receptor alpha(–/–) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006; **44**:1240–9.
- Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *J Exp Med* 1995; **181**:1835–45.
- Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1987; **138**:3525–31.
- Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K *et al*. Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology* 2001; **34**:243–8.
- Cha S, Leung PS, Coppel RL, Van de Water J, Ansari AA, Gershwin ME. Heterogeneity of combinatorial human autoantibodies against PDC-E2 and biliary epithelial cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994; **20**:574–83.
- Leung PS, Chuang DT, Wynn RM *et al*. Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. *Hepatology* 1995; **22**:505–13.
- Dhirapong A, Lleo A, Yang GX *et al*. B cell depletion therapy exacerbates murine primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2011; **53**:527–35.
- Moritoki Y, Zhang W, Tsuneyama K *et al*. B cells suppress the inflammatory response in a mouse model of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2009; **136**:1037–47.
- Yang GX, Lian ZX, Chuang YH *et al*. Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology* 2008; **47**:1974–82.
- Lleo A, Bowlus CL, Yang GX *et al*. Biliary apotopes and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2010; **52**:987–98.
- Shimoda S, Harada K, Niuro H *et al*. Interaction between Toll-like

- receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2011; **53**:1270–81.
- 25 Waggoner SN, Cornberg M, Selin LK, Welsh RM. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* 2011; **481**:394–8.
  - 26 Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE *et al.* Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med* 2010; **207**:1333–43.
  - 27 Alter G, Heckerman D, Schneidewind A *et al.* HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* 2011; **476**:96–100.
  - 28 Hao J, Liu R, Piao W *et al.* Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *J Exp Med* 2010; **207**:1907–21.
  - 29 Brauner H, Elemans M, Lemos S *et al.* Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2010; **184**:2272–80.
  - 30 Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:304–16.
  - 31 Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004; **5**:996–1002.
  - 32 Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; **9**:495–502.
  - 33 Wu HJ, Sawaya H, Binstadt B *et al.* Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med* 2007; **204**:1911–22.
  - 34 Feuerer M, Shen Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 2009; **31**:654–64.
  - 35 Hua J, Liang S, Ma X, Webb TJ, Potter JP, Li Z. The Interaction between regulatory T cells and NKT cells in the liver: a CD1d bridge links innate and adaptive immunity. *PLoS ONE* 2011; **6**:e27038.
  - 36 Oh KH, Lee C, Lee SW *et al.* Activation of natural killer T cells inhibits the development of induced regulatory T cells via IFN $\gamma$ . *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **411**:599–606.
  - 37 Teige A, Bockermann R, Hasan M, Olofsson KE, Liu Y, Issazadeh-Navikas S. CD1d-dependent NKT cells play a protective role in acute and chronic arthritis models by ameliorating antigen-specific Th1 responses. *J Immunol* 2010; **185**:345–56.
  - 38 Shin Y, Hong C, Lee H, Shin JH, Hong S, Park SH. NKT cell-dependent regulation of secondary antigen-specific, conventional CD4+ T cell immune responses. *J Immunol* 2010; **184**:5589–94.
  - 39 Simkins HM, Hyde E, Farrand KJ *et al.* Administration of alpha-galactosylceramide impairs the survival of dendritic cell subpopulations *in vivo*. *J Leukoc Biol* 2011; **89**:753–62.
  - 40 Patel O, Cameron G, Pellicci DG *et al.* NKT TCR recognition of CD1d-alpha-C-galactosylceramide. *J Immunol* 2011; **187**:4705–13.
  - 41 Knothe S, Mutschler V, Rochlitzer S *et al.* The NKT cell ligand alpha-galactosylceramide suppresses allergic airway inflammation by induction of a Th1 response. *Vaccine* 2011; **29**:4249–55.
  - 42 Lassen MG, Lukens JR, Dolina JS, Brown MG, Hahn YS. Intrahepatic IL-10 maintains NKG2A+Ly49- liver NK cells in a functionally hyporesponsive state. *J Immunol* 2010; **184**:2693–701.
  - 43 Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S, Kaye PM. Posttranscriptional regulation of I110 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* 2008; **29**:295–305.
  - 44 Burt BM, Plitas G, Zhao Z *et al.* The lytic potential of human liver NK cells is restricted by their limited expression of inhibitory killer Ig-like receptors. *J Immunol* 2009; **183**:1789–96.
  - 45 Wilson JL, Heffler LC, Charo J, Scheynius A, Bejarano MT, Ljunggren HG. Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J Immunol* 1999; **163**:6365–70.
  - 46 Poggi A, Zocchi MR. Antigen presenting cells and stromal cells trigger human natural killer lymphocytes to autoreactivity: evidence for the involvement of natural cytotoxicity receptors (NCR) and NKG2D. *Clin Dev Immunol* 2006; **13**:325–36.
  - 47 Ambrosini YM, Yang GX, Zhang W *et al.* The multi-hit hypothesis of primary biliary cirrhosis: polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol* 2011; **166**:110–20.
  - 48 Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: convenient and inconvenient truths. *Hepatology* 2008; **47**:737–45.

# 3

## わが国における非 B 非 C 型肝炎の実態 (5) PBC における肝癌発生

小森 敦正\* 中村 稔\*  
石橋 大海\*

**Key words:** 原発性胆汁性肝硬変, 肝細胞癌, 門脈圧亢進症, 進行度, 有病率

### 要旨

慢性ウイルス肝炎のみならず, 原発性胆汁性肝硬変(PBC)も, 肝発癌の発生母地-危険因子である。2000年以降に国内外で報告された観察研究から, PBCにおける肝細胞癌(HCC)有病率は2.4~3.8%とされており, 年齢(70歳超), 男性, 門脈圧亢進症因子, 輸血歴, ursodeoxycholic acid (UDCA)に対する治療抵抗性が, 発癌危険因子の候補となっている。日常診療においては, 年齢および臨床的進行度で発癌高危険群を囲い込みながら, UDCAの効果によりサーベイランスの補填および強化をはかることが現実的である。さらにはPBCにおいても, 本邦でのHCC診断ガイドラインに準拠した画像, 腫瘍マーカーの利用が望ましい。

る interface hepatitis 並びに lobulitis (小葉炎) も程度の差はあれ合併する。壊死炎症反応が持続すると, 胆管消失と線維化が進行し, 典型的には胆汁うっ滞性肝硬変に至ると考えられている。一方で黄疸を伴わない肝予備能低下と門脈圧亢進症を呈する肝硬変進行例も存在する。上述の胆管障害と肝実質障害, およびそれぞれの修復過程のバランスが, 進行形態の決定因子であると思われる理由である。

原発性肝癌(肝細胞癌; HCC, 胆管細胞癌; CCC)は代表的な炎症性発癌であり, 慢性ウイルス肝炎を背景とすることが多い。直接的な病原微生物の関与はないが, 慢性炎症であるPBCも, 肝発癌の発生母地-危険因子となることが報告されてきた。

本稿ではPBCにおける肝癌発生について, 本邦並びに欧米での報告に加え, 国立病院機構における現況(*manuscript, in preparation*)を紹介する(表)。

### はじめに

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は, 小葉間胆管細胞が特異的に障害される自己免疫性疾患であり, 慢性非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)をその病理学的特徴とする。したがって, 単核球を主体とした細胞浸潤を伴う炎症の主座はグリゾン鞘となり, 微小胆汁うっ滞も一因と考えられ

\*国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター  
(〒856-8562 長崎県大村市久原2-1001-1)

表 PBC における肝癌発生—問題点と今後

1. PBC における HCC：有病率と発癌率	PBC の治療およびスクリーニング法の基準が明確な前向き観察研究の不在
2. PBC における発癌リスク評価	a. 輸血歴の再評価 b. 生活習慣病関連因子(糖尿病等)の評価
3. PBC の病態進行予測マーカーと発癌	抗 gp 210 抗体および抗セントロメア抗体と発癌：後向き-前向き観察研究の不在
4. PBC の治療反応性と発癌	Fibrate 製剤も組み込んだ PBC 治療体系と発癌：前向き観察研究の不在
5. PBC における発癌サーベイランス	A. 多因子によるリスク評価/層別化を介したスクリーニングの重点化 B. 本邦 HCC 診断ガイドライン (PIVKA-II 含む) の適応
6. PBC 合併 HCC の治療法と予後	A. 背景肝の予備能評価と治療法の選択：ウイルス肝炎由来 HCC との相違 B. 移植適応の再考

## I. PBC における HCC：有病率と発癌率

### この項のポイント

- 画像評価を半年ごとに施行しているコホートでは、有病率 3.34~3.54%.
- Scheuer 分類 III + IV 患者からの 10 年累積発癌率は、I + II に対し有意に高値.

PBC 患者の HCC 有病率 (prevalence) に関しては、本邦、欧州 (イタリア、スペイン、イギリス) からの報告がある。2002 年に Shibuya らは、1980~1998 年にかけて関東地区で登録された 396 人の PBC 患者を対象として多施設共同後向き-前向き観察研究 (PBC Forum 21) を行い、PBC 患者の HCC 有病率を 3.54% と発表した<sup>1)</sup>。2009 年欧州の 3 次肝専門施設からの有病率もおおむねこれに合致するものである<sup>2)</sup> (イタリア Padova 3.36% 並びにスペイン Barcelona 3.34%)。これらは、HCC 定期スクリーニングとして画像評価 (腹部超音波; USG) を約半年ごとに施行しているコホートからの報告であり、1997 年英国 Newcastle から発表された、HCC スクリーニングの詳細不明な単施設由来

患者集団の有病率 2.39%<sup>3)</sup> より高いものである。

国立病院機構 31 施設からなる多施設 PBC 共同研究 (NHOSLJ) では、1989 年より 1,000 例以上の PBC 症例を登録し、発症および進行に関する因子の解析を進めている。同コホート内では 28 例の HCC が診断された。HCC 初診時に PBC が診断された同時診断例 6 例も含めた有病率は 2.76% であり、英国に近いものであった。

Shibuya らは診断時もしくは最終観察時の PBC 病期で層別化した累積発癌率も報告しており、Scheuer 分類 III + IV 患者からの 10 年累積発癌率は、同 I + II からのものに対し有意に高値であった (12.3% vs. 7.7%,  $P=0.021$ )<sup>1)</sup>。進行 PBC に限っても、その発癌リスクは本邦における C 型慢性肝炎 (CHC) F1-2 の年間発癌率レベルであり、CHC と PBC における肝炎の質、強度の差、およびウイルスの関与を反映したものと推測される。Barcelona コホートでも Scheuer 分類 III + IV 患者の 10 年累積発癌率は 11.2% とされ、Shibuya らの報告と大きな差

はないが、スペインでは HCV 由来肝硬変 (LCC) と比較可能な累積発癌率であると結論されている<sup>4)</sup>。NHOSLJ ではこれに対し、最終観察時臨床的肝硬変 (LC) 症例では 10.3%、非硬変 PBC では 0.945% という有病率が算出された ( $P < 0.001$ )。

## II. PBC における発癌リスク評価

この項のポイント

- 年齢、男性、輸血歴、門脈圧亢進症の存在が HCC 発症に独立して関与する。

### 1. 発癌危険因子の評価

#### —内外のコホート研究より

Lindor らは 1976~2002 年の間に Mayo Clinic で診断された胆汁性肝硬変合併肝癌患者情報から、PBC 合併 HCC 17 例を抽出し、同時期に PBC と診断された症例との間で case-control study を施行した。その結果、説明変数として年齢 (70 歳<)、男性、輸血歴、門脈圧亢進症の存在が、HCC 発症に独立して関連することを見出した (AUC ; 0.90)<sup>5)</sup>。HCC 合併推定危険率は 4 因子マイナス群が 0.6% であるのに対して、4 因子がすべて揃う群では 98.9% へ上昇すると報告している。すでに Shibuya らの観察研究でも、多変量解析により PBC 診断時年齢、男性、輸血歴が危険因子として抽出されており<sup>1)</sup>、同 3 危険因子の再現性が確認されたこととなる。

これに対し、欧州では Padova 並びに Barcelona に共通した HCC 危険因子 (case-control study) は組織学的進行度だけであり、男性因子は Padova でのみ確認された (輸血歴は検討されていない)<sup>2)</sup>。

またオランダからは組織学的な進行度と発癌リスクとの関連に若干否定的な前向き観察研究も報告されているが<sup>6)</sup>、解析はコホート内で 34% を占める組織ステージ不明例を除外したも

のであり、逆に総ビリルビン (T-Bil) ないしアルブミン (Alb) 値異常という独自の prognostic class や PBC Mayo risk score が単変量解析で有意な発癌リスク因子となっている点で、PBC 進行と発癌の関連を否定するものではない。

われわれも、上記因子のなかで性差および臨床的 LC が危険因子となりうるか、NHOSLJ PBC コホート内 case-control study によって解析を行った。その結果、HCC 合併 odds ratio は男性で 2.77 (95% 信頼区間 ; CI 1.27~6.05,  $P = 0.011$ )、臨床的 LC で 12.49 (95% CI 6.23~25.01,  $P = 0.00001$ ) となり、Lindor らの危険因子のうち二つに再現性が確認できた。輸血歴に関しては残念ながら解析ができなかったが、既往評価が可能であった HCC 24 例すべてに輸血歴は認めていない。

### 2. 他の因子の関与について

さらに NHOSLJ PBC コホート内には非 LC-HCC 例が 7 例確認できたため、既報の危険因子に加えて、糖尿病合併、飲酒歴、HBV 既感染が発癌に関与しうるか、非 LC 発癌 (case) と LC 発癌群 (control) との間で case-control study を行った。両群の PBC および HCC 診断年齢に、さらには上述の因子陽性率に有意差を認めず、PBC に直接関連しないこれらの因子の PBC 発癌への関与は明らかでなかった。

## III. PBC の病態進行予測マーカーと発癌

われわれは NHOSLJ PBC コホートの観察研究より、抗核膜孔抗体である抗 gp 210 抗体と抗セントロメア抗体陽性は、PBC 進行 (黄疸型、門脈圧亢進症型) の危険因子であることを明らかにしている<sup>7)</sup>。しかし、NHOSLJ PBC コホート内 HCC 合併 PBC 症例 (case) と非 HCC 合併



症例(control)間には、いずれの抗体陽性率にも有意差を認めなかった。抗 gp 210 抗体陽性 PBC 肝に特徴的な炎症と発癌の間には関連が少ないと示唆されたが、症例数を増加しての検討が必要であろう。

#### IV. PBC の治療(反応性)と発癌

この項のポイント

- 進行 PBC 患者のなかには、UDCA による発癌抑制効果が期待される一群が含まれる。

PBC 患者における ursodeoxycholic acid (UDCA) に対する治療反応性が生命予後に関連するということから、UDCA の効果を判定するさまざまな criteria が提案されている。しかしながら、治療反応性ないしは PBC に対する治療の有無と発癌の関連についての報告は少ない。

前述のオランダコホートは、全例に UDCA (13~15 mg/kg) の投与が確認されている 375 人の PBC 症例を対象とし、1990~2007 年にわたる観察期間の中央値が 9.7 年のコホート内で 9 人に HCC が診断された。年間発癌率は 0.2% であったが、UDCA 導入 1 年後に T-Bil and/or Alb 値が正常化(“Rotterdam 基準”)しなかった“UDCA 不応群”の 10 年累積発癌率は 9% に上った<sup>6)</sup>。前述の Tokyo (Shibuya ら) 並びに Barcelona コホートにおける Scheuer 分類 III + IV 患者の累積発癌率と比較可能な発癌率である。UDCA 導入時に、T-Bil あるいは Alb のいずれか、もしくは両者が異常な患者群(mod-erately advanced~advanced)の約 50% は UDCA 反応群であったとされることから<sup>8)</sup>、進行 PBC 患者のなかには、UDCA による生命予後改善に加えて、発癌抑制効果も期待される一群が含まれると考えられる。

これに対し、NHOSLJ PBC コホート内で HCC 診断時に PBC 併存が確認された患者(“同

時群”)は、PBC の治療および観察(中央値 9.0 年)中に発癌した患者(“異時群”)と比べ発癌年齢に有意差を認めなかった。前述のコホートにおける結果も併せると、UDCA 治療の発癌予防効果が乏しい進行 PBC 患者が存在することも示唆された。

#### V. PBC における発癌サーベイランス

この項のポイント

- 年齢・臨床的進行度で一次囲い込みをしたうえで、UDCA の効果によりサーベイランスの補填・強化をすることが現実的。

どのような PBC 患者をいかにスクリーニングすると、HCC の早期診断と引き続く予後改善につながるかは、臨床的に重要な課題である。

##### 1. Mayo Clinic 基準

Mayo Clinic では、2000 年から開始された PBC 全例に対する画像および AFP によるサーベイランスの結果診断された HCC 症例は、historical control ともなるサーベイランス未施行群からの発癌症例に比べ、生存期間が有意に長いとの成績が得られている<sup>9)</sup>。彼らは、年間発癌率が 1.5% 以上の集団で HCC スクリーニングを考慮すべきであるというアメリカ肝臓病学会(AASLD)ガイドラインに準拠し、現実的には前述の 4 因子〔年齢(70 歳<)、男性、輸血歴、門脈圧亢進症因子〕の組み合わせにより発癌高危険群を囲い込み、スクリーニングの対象とすることを提案している。重要な点は、stage 2~3 からの発癌例も認めたことから、発癌リスクの高い“進行症例”を、腹水、末梢浮腫、食道静脈瘤のいずれかの診断という“門脈圧亢進症例”と置き換えている点であろう。

##### 2. Rotterdam 基準

しかしながらオランダコホートは Mayo 発

癌 score の有用性に否定的であり、UDCA に対する治療不応性を HCC スクリーニング基準と提案している<sup>6)</sup>。エントリー時 T-Bil/Alb 両者正常な同コホート内 PBC 患者 (“early PBC”) は、正常対照群と比べ生命予後に差がなく<sup>8)</sup>、Rotterdam 基準は治療反応性もパラメーターとした臨床的進行 PBC の絞り込み基準であると推察される。

総合すると、年齢および臨床的進行度で一次囲い込みをしたうえ(annually)で、UDCA の効果によりサーベイランスの補填および強化をすることが現実的かと考えられよう。同時に、PBC それ自身の進行危険因子である、自己免疫性肝炎(AIH)との overlap、抗 gp 210 抗体および抗セントロメア抗体陽性例を一次囲い込みに組み入れることにも、異論は少ないと思われる。輸血歴の有無に関してはさらなる検討が必要である。もちろん、HBs 抗原陽性、抗 HCV 抗体陽性、すなわち、B 型肝炎、C 型肝炎合併例は、それぞれウイルス肝炎のサーベイランスに従うべきであろう。

### 3. 発癌スクリーニングと腫瘍マーカー

PBC 発癌スクリーニングにおける腫瘍マーカーに関して、国外の報告では AFP のみが使用されている。NHOSLJ PBC コホート内 HCC 例で診断時腫瘍マーカー値が判明している症例(N=19)中、AFP(20 ng/ml<)例は 89.4%であったが、PIVKA-II(40 mAU/ml<)例は 78.9%にのぼり、両者陰性例を認めなかった。胆汁うっ滞による vitamin K 吸収不全は軽度-中等度高値-偽陽性につながることもあるが、PBC においても本邦の HCC 診断ガイドラインに準拠した PIVKA-II の併用が望ましいと考える。

## VI. PBC 合併 HCC の治療法と予後

Mayo Clinic は、PBC 合併 HCC 例の 5 年生存率は 49.4%、10 年生存率は 31.7%と報告している<sup>10)</sup>。

発癌時の組織学的 stage は予後と関連せず、予後改善につながる治療法は肝移植のみであった。逆に外科切除が予後不良因子となる傾向にあった( $P=0.0746$ )ことは興味深い。

### おわりに

一般に無症候性 PBC 例の治療に際しては、病態を正確に把握(PBC-AIH overlap の除外、胆管消失度の病理学的評価など)したうえで、抗 gp 210 抗体および抗セントロメア抗体の把握、さらに UDCA および fibrates 製剤に対する治療反応性を評価し、長期予後を予測することが必要である。臨床的進行例でなくても、このようにして難治 PBC すなわち将来的な HCC 高危険群の囲い込みが可能かと思われる。PBC における HCC リスクの正確な層別化に向けて、本邦においてもさらなる前向き観察研究の進展が望ましい。

### 文 献

- 1) Shibuya, A., Tanaka, K., Miyakawa, H., et al.: Hepatocellular carcinoma and survival in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 35; 1172-1178, 2002
- 2) Cavazza, A., Caballeria, L., Floreani, A., et al.: Incidence, risk factors, and survival of hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: comparative analysis from two centers. *Hepatology* 50; 1162-1168, 2009
- 3) Jones, D., Metcalf, J.V., Collier, J.D., et al.: Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis and its impact on outcomes. *Hepatology* 26; 1138-1142, 1997
- 4) Caballeria, L., Pares, A., Castellanos, A., et al.:

Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis—Similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* 96 ; 1160-1163, 2001

- 5) Suzuki, A., Lymp, J., Donlinger, J., et al. : Clinical predictors for hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5 ; 259-264, 2007
- 6) Kuiper, E. M., Hansen, B. E., Adang, R. P., et al. : Relatively high risk for hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis not responding to ursodeoxycholic acid. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 22 ; 1495-1502, 2010
- 7) Nakamura, M., Kondo, H., Mori, T., et al. : Anti-gp 210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 45 ; 118-127, 2007
- 8) Kuiper, E. M., Hansen, B. E., de Vries, R. A., et al. : Improved prognosis of patients with primary biliary cirrhosis that have a biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 136 ; 1281-1287, 2009
- 9) Silveira, M. G., Suzuki, A. and Lindor, K. D. : Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 48 ; 1149-1156, 2008
- 10) Imam, M. H., Silveira, M. G., Sinakos, E., et al. : Long-term outcomes of patients with primary biliary cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (2) ; 182-185, 2012

## Summary

### Hepatocellular Carcinoma in Primary Biliary Cirrhosis

Atsumasa Komori\*, Minoru Nakamura\*  
and Hiromi Ishibashi\*

Hepatocellular carcinoma (HCC) occurs with increased frequency not only in patients with chronic viral hepatitis, but also in those with primary biliary cirrhosis (PBC). The prevalence of HCC in patients with PBC is estimated to be between 2.4% and 3.8% through analysis of retrospective and prospective cohort studies, which were performed in Japan as well as in Western countries after 2000. Subjects over age 70, who were males, with a history of portal hypertension or advanced stage PBC, a history of blood transfusions, and who did not exhibit a response to UDCA were considered to be at risk for HCC in relation to PBC. In daily practice, patients who should be screened for development of HCC may primarily be identified due to the extent of disease progression in conjunction with age. Response to UDCA may serve as a practical alternative and provide additional clues to the necessity of HCC surveillance. Utilization of appropriate imaging and tumor markers (AFP and PIVKA-II), components of the clinical guidelines for diagnosis of HCC in Japan, is recommended for patients with PBC.

**Key words :** PBC, hepatocellular carcinoma, portal hypertension, advanced stage, prevalence, surveillance

\*Clinical Research Center, National Hospital Organization  
Nagasaki Medical Center, 2-1001-1 Kubara, Omura-shi,  
Nagasaki 856-8562, Japan

## 原発性胆汁性肝硬変 —何か新しい考え方が存在するのか?—

石橋 大海\* 中村 稔\*  
小森 敦正\* 下田 慎治\*\*

索引用語：診断基準，臨床病期，組織病期分類，ウルソデオキシコール酸（UDCA），  
ベザフィブラート

### 1 はじめに

原発性胆汁性肝硬変 (Primary Biliary Cirrhosis; PBC) については，病因，進展，およびそれらにかかわる因子の解析などに関して研究が進展しており，あらたなエビデンスも蓄積しつつある。臨床的な理解および実際の治療についても進歩がみられる。

### 2 臨床病期の定義が変更された

PBCは临床上，皮膚掻痒感，黄疸，食道胃静脈瘤，腹水，肝性脳症など肝障害に基づく自覚症状を有する症候性 (symptomatic) PBC (sPBC) と，これらの症状を欠く無症候性 (asymptomatic) (aPBC) とに分類され，aPBCは無症候のまま数年以上経過する。症候性PBCのうち2.0 mg/dl以上の高ビリルビン血症を呈するものをs2PBCと呼び，それ

未満をs1PBCと呼ぶ。

PBCの「診断基準」は1992年に「難治性の肝炎」調査研究班によって作成され，2005年に改訂された。この改訂の骨子は「症候」の表現の変更である。1992年版では「肝障害に基づく自覚症状」が「皮膚掻痒感，黄疸など」と記載されていたものが，2005年版では「皮膚掻痒感，黄疸，食道静脈瘤，腹水，肝性脳症など」と表現が改められた。これにより，改訂前は食道静脈瘤，肝硬変が存在するにもかかわらず皮膚掻痒感，黄疸がないため「無症候性PBC」と診断されていたものが，改訂後は，皮膚掻痒感，黄疸がなくても食道静脈瘤，腹水，肝性脳症など肝障害に基づく症候があれば「症候性PBC」と診断されるようになった。さらに，PBC症例の全国調査において，症候性PBCのうち掻痒感のみ呈するものをs1PBC，黄疸 (T.Bil $\geq$ 2.0 mg/dl) を呈するもの

Hiromi ISHIBASHI et al : Primary biliary cirrhosis (PBC) -Do any ideas exist?

\* 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター [〒 856-8562 長崎県大村市久原 2-1001-1]

\*\* 九州大学病態修復内科

表1 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の臨床病期(平成22年度, 厚労省研究班)

無症候性PBC (aPBC) : 下記症状を欠く	
症候性PBC (sPBC) : 皮膚掻痒感, 黄疸, 食道胃静脈瘤, 腹水, 肝性脳症など 肝障害に基づく自覚症状を伴う	
s1PBC	黄疸を伴わない(総ビリルビン値 2.0 mg/dl未滿)
s2PBC	黄疸を伴う(総ビリルビン値 2.0 mg/dl以上)

表2 PBCの組織病期

1期; Stage 1 (S1) (no progression)
2期; Stage 2 (S2) (mild progression)
3期; Stage 3 (S3) (moderate progression)
4期; Stage 4 (S4) (advanced progression)
非進行期; 炎症性病変が門脈域に限局, 軽度, 中等度; 中間的な段階, 高度進行期; 肝硬変.

表3 PBCの組織学的病期分類(中沼安二ら, 2006, 厚労研究会議, 2010)

1. PBC組織病期評価のための組織病変とスコア			
A. 線維化	Score	B. 胆管消失	Score
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	0	胆管消失がない	0
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	1	1/3以下の門脈域で胆管消失をみる	1
種々の小葉構造の乱れを伴う架橋性線維化	2	1/3~2/3の門脈域で胆管消失をみる	2
再生結節と高度の線維化を伴う肝硬変	3	2/3以上の門脈域で胆管消失をみる	3

2. 線維化(A)と胆管消失(B)スコアの合計による病期診断(Staging)	
Stage	A. 線維化 B. 胆管消失 各スコアの合計
Stage1 (no progression)	0
Stage2 (mild progression)	1~2
Stage3 (moderate progression)	3~4
Stage4 (advanced progression)	5~6

がs2PBCと定義されていたものが, 厚労省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班平成22年度版(坪内博仁班長)(2011)<sup>1)</sup>では, sPBCのうち2 mg/dl以上の高ビリルビン血

症を呈するものをs2PBCと呼び, それ未滿をs1PBCと呼ぶことが診断基準に記載された(表1).

表4 PBCの経過からみた病型

1) 緩徐進行型
2) 門脈圧亢進症先行型
3) 黄疸肝不全型

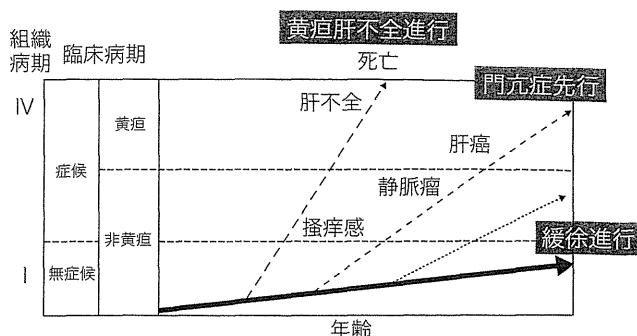


図1 PBCの臨床経過

3

組織病期分類には、新たに開発されたNakanumaらの分類が推奨されるようになった

PBCの進展、予後、発癌などを考えるうえで、組織病期の判定は重要である。しかし、PBCでは肝内の部位により病理組織像が異なることが知られており、肝針生検ではサンプリングエラーの問題が常につきまっていた。そのため、従来使用されてきた Scheuer 分類<sup>2)</sup>、Ludwig 分類<sup>3)</sup>による病期分類では限界があり、正確な病期分類が困難であった。それに対して、Nakanumaらにより新しい分類(2009年)(表2、表3)が開発された<sup>4-7)</sup>。本病期分類は活動度と病期の両方を取り入れたPBCの新しい病期・活動度分類である。病変の不均一な分布によるサンプリングエラーを最小限にするために、肝の線維化と胆管消失を中心に病変がスコア化され、活動度分類として、胆管炎 cholangitis (CA)の程度が CA 0～3に、また肝炎 hepatitis (HA)の程度が HA 0～3に分類された。病期分類として線維化の程度と胆管消失の程度の2項目を検討し(表3)、全体として stage 1～4に分類されている。今回の活動度分類・病期分類により、PBC患者の病態、病勢が半定量的に評価でき、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と考えられる。実際、海外でもよい評価が得られており<sup>8)</sup>、今後は、PBCの組織学的病期分類としては本分類を使用することが推奨される。

ちなみに、Scheuer分類はPBCに特徴的な肝・胆管病変を基に1～4期に分類されている。1期;CNSDC, 2期;非定型的細胆管増生, 3期;線維化, 癍痕, 4期;肝硬変期。一方、Ludwig分類は慢性肝炎の概念が病期分類に取り入れられており、1期;門脈域の炎症 (Portal hepatitis), 2期;インターフェイス肝炎(Periportal hepatitis), 3期;線維性隔壁形成, 架橋性壊死Septal (Bridging) fibrosis, 4期;肝硬変期(Cirrhosis)と分類されている。

4

臨床経過は大きく緩徐進行型、門脈圧亢進症先行型、黄疸肝不全型の3型に分類される

PBCは通常、無症候性PBCから一定期間を経て症候性PBCに移行するが、その期間は各人によって大きく異なる。患者の予後を予測する、あるいは予後を予測して治療介入を行うためには、各人の臨床経過、進展形式、病期を知ることが重要である。

PBCの臨床経過は、大きく分けて3型に分類される(表4、図1)<sup>9,10)</sup>。多くの症例では長い期間の無症候期を経て徐々に進行するが

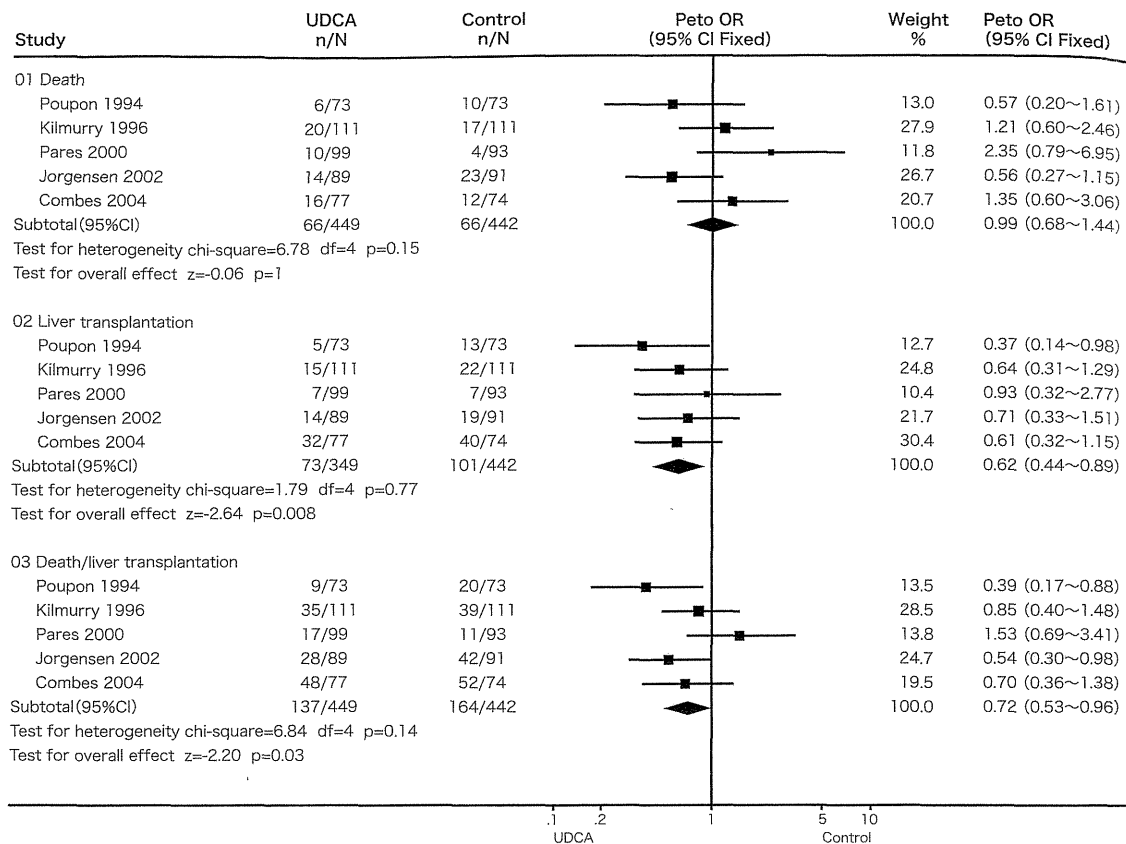


図2 大規模研究による臨床事象に対するUDCAの効果(文献17より引用)

(緩徐進行型), 黄疸を呈することなく食道静脈瘤が比較的早期に出現する症例(門脈圧亢進症型)<sup>11,12)</sup>, あるいは早期に黄疸を呈し肝不全に至る症例(黄疸肝不全型)がみられる。肝不全型は比較的若年の症例にみられる傾向がある。

**5 PBC患者の予後予測には抗核抗体(抗gp210抗体, 抗セントロメア抗体)が有用であることが示された**

PBCでは、診断のマーカーとして使用されている抗ミトコンドリア抗体のほか、抗セントロメア抗体, 抗核膜抗体(抗gp210抗体), 抗multiple nuclear dot抗体(抗sp100抗体)な

ど数種の抗核抗体が陽性化する。抗セントロメア抗体は約20~30%のPBC症例に陽性となる。黄疸出現以前に門脈圧亢進症を呈する症例に高率に陽性化し、陽性例はむしろ生命予後はよいことが示されている<sup>13)</sup>。

一方、抗gp210抗体は核膜孔の構成成分のひとつであるgp210蛋白に対する自己抗体である。PBCの約20~30%の症例で陽性化し、特異度ほぼ100%と疾患特異性が高い。抗gp210抗体はPBCの臨床経過の予測因子として有用であることが複数の報告で示された。抗gp210抗体陽性症例は、肝組織にて陰性症例と比べてinterface hepatitisの程度が強く、経過中あるいはUDCAによる治療後も

表5 PBC-AIH オーバーラップ症候群—ステロイド投与のための診断指針

厚労省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班(2011年)

PBC-AIH オーバーラップ症候群と考えられる症例のうち、以下の2項目を同時に満たす症例に対しては、ウルソデオキシコール酸に加えて副腎皮質ステロイドステロイドの投与を推奨する。

1) 厚労省の診断基準(平成22年度版)によりPBCと診断される症例。

2) IAIHGのsimplified criteria (2008)によりprobable/definite AIHと診断される症例。ただし、病理(Liver histology)に関しては、中沼らによるPBC病期分類(2009)の肝炎スコア(HA)を用い、肝炎スコア0-1 (HA 0-1)を0 point, 肝炎スコア2 (HA2)を1 point, 肝炎スコア3 (HA3)を2 pointとして計算する。

(中沼らによるPBC病期分類はその項を参照のこと)

MEMO : AIH 国際診断基準(簡易版) (2008)

Simplified diagnostic criteria for autoimmune hepatitis

Variable	Cutoff	Points
ANA or SMA	$\geq 1:40$	1
ANA or SMA or LKM or SLA	$\geq 1:80$ $\geq 1:40$ positive	2
IgG	> Upper normal limit	1
	> 1.1 times Upper normal limit	2
Liver histology (evidence of hepatitis is a necessary condition)	Compatible with AIH	1
	Typical AIH	2
Absence of viral hepatitis	Yes	2
Total points	$\geq 6:$	probable AIH
	$\geq 7:$	definite AIH

(Hennes EM et al : Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. International Autoimmune Hepatitis Group. Hepatology 48 : 169-176, 2008)

抗gp210抗体価が持続高値の症例は予後が不良である<sup>13-15)</sup>。

## 6

### UDCAの使用によりPBC患者の予後は確実に延長している

ウルソデオキシコール酸(UDCA)の効果はランダム化比較試験(RCT)を含む多くの臨床試験で確認されている。UDCAは、肝機能検査値の改善とともに組織学的にも進行を遅延させ、また、肝移植までの期間や死亡までの期間を延長させることが複数のRCTとともにメタアナリシスでも確認されている(図2)<sup>16-19)</sup>。UDCAを使用する前の時代に比較すると、使用し始めてからの時代における

PBC患者の予後は明らかに延長している<sup>8)</sup>。

## 7

### 脂質異常改善薬Bezafibrateも胆道系酵素低下の効果がみられる

UDCAの効果が不十分な場合は、脂質代謝異常改善薬であるBezafibrateの併用が考慮される。Bezafibrateの効果については日本からの発信であり<sup>20-22)</sup>、英文報告を含め、すでに複数の報告がみられるが、まだ海外のガイドラインには取りあげられていない。UDCAとは作用機序が異なることから併用することにより作用は相加的となる。Fenofibrateについても効果有りとの報告がみられる<sup>23,24)</sup>。しかし、副作用として、



BezafibrateもFenofibrateも横紋筋融解症がみられ、特にFenofibrateは肝障害を悪化させることがあるので、肝障害のある患者には投与しないこととされている<sup>25)</sup>。そのため、PBC患者に投与する場合は、まずはUDCAを用い、治療効果が少ない場合にBezafibrateを追加して用いるようにすることが望ましい。

## 8

### PBCと診断される症例のうち、肝組織での肝炎所見が高度であるものに対して副腎皮質ステロイドの投与が推奨される

PBCの特殊な型として、肝炎の病態をあわせ持ちALTが高値を呈するPBC-AIHオーバーラップ症候群と称される病態がある。本病態は、副腎皮質ステロイドの投与によりALTの改善が期待できるため、PBCの亜型ではあるが、PBCの典型例とは区別して診断する必要がある。これまで複数の論文が報告されてきており、いずれも概念は類似しているが、具体的な定義は異なっており、国内でも基準がまちまちであった<sup>26~28)</sup>。

厚生省研究班(2011年)は、国内代表施設でのPBC-AIHオーバーラップ症候群症例をまとめ、本病態に対する副腎皮質ステロイドの投与基準を定めた<sup>1,29)</sup>。すなわち、1) 厚生省の診断基準(平成22年度版)によりPBCと診断される症例、2) 国際診断基準(簡易版)(2008)を用い、ただし、肝病理に関しては、中沼らによるPBC病期分類(2009)の肝炎スコア(HA)を用い、肝炎スコア0-1(HA 0-1)を0 point、肝炎スコア2(HA2)を1 point、肝炎スコア3(HA3)を2 pointとして計算して、probable/definite AIHと診断される症例に対して副腎皮質ステロイドの投与が推奨される<sup>29)</sup>。

## 文 献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班編. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の診療ガイドライン(2011年), 厚生労働省. 難病情報センターホームページ <http://www.nanbyou.or.jp/>, 2011.
- 2) Scheuer P: Primary biliary cirrhosis. Proc R Soc Med 60: 1257-1260, 1967
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 原田憲一, 中沼安二: PBCの新しい病期・活動度分類とvalidation. 肝胆膵 62: 685-692, 2011
- 7) 中沼安二, 石橋大海, 滝川 一, 他: PBCの新しい病期・活動度分類の提案. 日消誌 108: 1817-1818, 2011
- 8) Bioulac-Sage P: Primary biliary cirrhosis: a new histological staging and grading system proposed by Japanese authors. Clin Res Hepatol Gastroenterol 35: 333-335, 2011
- 9) Ishibashi H, Komori A, Shimoda S et al: Risk factors and prediction of long-term outcome in primary biliary cirrhosis. Intern Med 50: 1-10, 2011
- 10) Poupon R: Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. J Hepatol 52: 745-758, 2010
- 11) Takeshita E, Kumagi T, Matsui H et al: Esophagogastric varices as a prognostic factor for the determination of clinical stage in patients with primary biliary cirrhosis. J Gastroenterol 38: 1060-1065, 2003
- 12) Murata Y, Abe M, Furukawa S et al: Clinical features of symptomatic primary biliary cirrhosis initially complicated with esophageal varices. J Gastroenterol 41: 1220-1226, 2006
- 13) 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
- 14) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y et al : Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 42 : 386–392, 2005
  - 15) Nakamura M, Komori A, Ito M et al : Predictive role of anti-gp210 and anticentromere antibodies in long-term outcome of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 37 : S412–419, 2007
  - 16) Poupon RE, Poupon R, Balkau B : Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 330 : 1342–1347, 1994
  - 17) Shi J, Wu C, Lin Y et al : Long-term effects of mid-dose ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol* 101 : 1529–1538, 2006
  - 18) Gong Y, Huang Z, Christensen E et al : Ursodeoxycholic acid for patients with primary biliary cirrhosis: an updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials using Bayesian approach as sensitivity analyses. *Am J Gastroenterol* 102 : 1799–1807, 2007
  - 19) Corpechot C, Carrat F, Bahr A et al : The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 128 : 297–303, 2005
  - 20) Kurihara T, Maeda A, Shigemoto M et al : Investigation into the efficacy of bezafibrate against primary biliary cirrhosis, with histological references from cases receiving long term monotherapy. *Am J Gastroenterol* 97 : 212–214, 2002
  - 21) Yano K, Kato H, Morita S et al : Is bezafibrate histologically effective for primary biliary cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 97 : 1075–1077, 2002
  - 22) Iwasaki S, Ohira H, Nishiguchi S et al : The efficacy of ursodeoxycholic acid and bezafibrate combination therapy for primary biliary cirrhosis: A prospective, multicenter study. *Hepatol Res* 38 : 557–564, 2008
  - 23) Dohmen K, Mizuta T, Nakamura M et al : Fenofibrate for patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 10 : 894–898, 2004
  - 24) Wood NJ : Primary biliary cirrhosis: Fenofibrate plus UDCA promising for incomplete responders to UDCA. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8 : 63, 2011
  - 25) Dohmen K, Wen CY, Nagaoka S et al : Fenofibrate-induced liver injury. *World J Gastroenterol* 11 : 7702–7703, 2005
  - 26) Chazouillères 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
  - 27) Lohse AW, zum Büschenfelde 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
  - 28) Neuhauser M, Björnsson E, Treeprasertsuk S et al : Autoimmune hepatitis-PBC overlap syndrome: a simplified scoring system may assist in the diagnosis. *Am J Gastroenterol* 105 : 345–353, 2010
  - 29) Tanaka A, Harada K, Ebinuma H et al : Primary biliary cirrhosis - Autoimmune hepatitis overlap syndrome: A rationale for corticosteroids use based on a nation-wide retrospective study in Japan. *Hepatol Res* 41 : 877–886, 2011

\* \* \*

# Involvement of Commensal Bacteria may Lead to Dysregulated Inflammatory and Autoimmune Responses in a Mouse Model for Chronic Nonsuppurative Destructive Cholangitis

Ikuko Haruta · Ken Kikuchi · Minoru Nakamura · Katsuhiko Hirota · Hidehito Kato · Hiroshi Miyakawa · Noriyuki Shibata · Yoichiro Miyake · Etsuko Hashimoto · Keiko Shiratori · Junji Yagi

Received: 27 January 2012 / Accepted: 22 May 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

## Abstract

**Background** We previously reported a mouse model of primary biliary cirrhosis (PBC)-like chronic nonsuppurative destructive cholangitis (CNSDC), in which frequent injections of *Streptococcus intermedius* induced CNSDC and autoantibody production. The present study was performed to verify the model by examining 1) the reappearance of the PBC-like CNSDC after lymphocyte transfer from model to naïve mice, 2) the involvement of autophagy, and 3) the influence of the strain difference.

**Methods** Mice were inoculated with *S. intermedius* weekly for 8 weeks, then sacrificed to obtain samples. Spleen cells

obtained from *S. intermedius*-inoculated mice were transferred to RAG2<sup>-/-</sup> mice.

**Results** CNSDC and elevated serum level of anti-gp210 titers were observed in *S. intermedius*-inoculated C57BL/6 mice, similar to the results of our previous report using BALB/c mice. Portal inflammation was induced in the livers of RAG2<sup>-/-</sup> mice by the transfer of spleen cells from *S. intermedius*-inoculated C57BL/6 mice. Among the inflammatory cells in the RAG2<sup>-/-</sup> mice, CD3-positive cells were predominant. Autophagosome-like structures were detected histologically, in the cytoplasm of infiltrated cells around the bile ducts in the livers of *S. intermedius*-inoculated both

I. Haruta (✉) · H. Kato · J. Yagi  
Department of Microbiology and Immunology,  
Tokyo Women's Medical University,  
8-1, Kawada-cho,  
Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan  
e-mail: haruta@research.twmu.ac.jp

I. Haruta · E. Hashimoto · K. Shiratori  
Department of Medicine and Gastroenterology,  
Tokyo Women's Medical University,  
Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

K. Kikuchi  
Department of Infection Control Science and Department of  
Bacteriology, Faculty of Medicine, Juntendo University,  
Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

M. Nakamura  
Department of Hepatology, Clinical Research Center, National  
Hospital Organization Nagasaki Medical Center, Nagasaki  
University Graduate School of Biomedical Sciences,  
Nagasaki, Japan

K. Hirota · Y. Miyake  
Department of Oral Microbiology, Institute of Health Biosciences,  
The University of Tokushima Graduate School,  
Tokushima, Japan

H. Miyakawa  
Fourth Department of Internal Medicine, Teikyo University,  
Itabashi-ku, Tokyo, Japan

N. Shibata  
Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University,  
Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

C57BL/6 and BALB/c mice. In *S. intermedius*-inoculated C3H/HeJ mice, inflammation in the portal area was less extensive than that in the hepatic parenchyma.

**Conclusion** Bacterial component(s) and sequentially up-regulated innate and acquired immune responses, accompanied by autophagy, might trigger CNSDC, via autoimmune mechanisms. Throughout the generation of bacteria-triggered PBC-like CNSDC, strain difference may influence the response to *S. intermedius*-inoculation in the liver.

**Keywords** Chronic nonsuppurative destructive cholangitis (CNSDC) · primary biliary cirrhosis (PBC) · bacteria · innate immunity · gp210 · autophagy

#### Abbreviations

PBC	Primary biliary cirrhosis
AMAs	Anti-mitochondrial antibodies
LTA	Lipoteichoic acid
HLP	Histone-like protein
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
AIP	Autoimmune pancreatitis
LPS	Lipopolysaccharides
GWAS	Genome-wide association studies
TLR	Toll like receptor
PBS	Phosphate buffered saline

#### Introduction

The dysregulation of innate and acquired immunity is known to be involved in autoimmune diseases, which are occasionally associated with multifocal organ inflammation [1]. Primary biliary cirrhosis (PBC) is a slowly progressive autoimmune disease characterized by chronic nonsuppurative destructive cholangitis (CNSDC) in the liver and serologically by the presence of anti-mitochondrial antibodies (AMAs) [2, 3] and anti-gp210 antibody [4]. Although the pathogenesis of biliary epithelial cell damage in PBC is still not fully clarified, molecular mimicry has been proposed as a possible mechanism [2–7].

Reports from more than a decade ago have suggested that bacteria, particularly Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, exhibit highly conserved mitochondrial auto-antigens [6]. Sera from patients with PBC reportedly react with both human and *E. coli* pyruvate dehydrogenase complex E2 (PDC-E2) [8], leading to speculations that PBC may be induced by exposure to enterobacterial antigens, which exhibit molecular mimicry with the mitochondrial antigens in PBC. Cross reactivities have also been detected between *Lactobacillus delbrueckii* beta-galactosidase and PDC-E2 [9–11] and between *Novosphingobium aromaticivorans* and the human pyruvate dehydrogenase complex [12, 13].

In keeping with the possible involvement of bacterial components in PBC, the bacterial 16S ribosomal RNA, the sequence of which is highly homologous with that of *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria [14], has been detected in gallbladder bile and epithelioid granulomas in PBC patients [15]. *Propionibacterium acnes* DNA has also been detected in epithelioid granulomas of PBC patients [14]. A link between Toll-like receptors (TLRs), such as TLR4 and 9, and PBC has also been reported [14–18]. The elevated expression of TLR4 has been observed in intrahepatic bile duct epithelial cells in PBC [16]. Bacterial components, such as lipopolysaccharides (LPSs) and the TLR9 ligand CpG DNA, trigger peripheral lymphocytes, monocytes, and bile epithelial cells to produce cytokines and AMAs, suggesting that the pathogenesis of PBC is mediated through TLRs [16–20]. Recent genome-wide association studies (GWAS) have revealed the involvement of NF- $\kappa$ B signaling, T-cell differentiation, and TLR signaling. The activation of TLR signaling and its downstream effectors, such as TNF- $\alpha$ , have been well described in PBC [21]. In addition, recent progress in GWAS for PBC has revealed several susceptibility loci, such as *IRF5-TNPO3*, 17q12-21, *HLA*, *IL12A*, *IL12 RB2*, and so on [22–24].

We previously reported that the Gram-positive bacterial cell wall component lipoteichoic acid (LTA) was detected in the portal tracts of livers in PBC patients with CNSDC and that PBC patients had higher anti-LTA titers [25]. We analyzed the immunoreactivity against various strains from different species of the streptococcal genus using sera from PBC patients and found the highest IgM class titers to *Streptococcus intermedius* [26]. Generally, PBC is characterized by a high serum level of IgM [27]. Our observation suggested that a *Streptococcus*-activated inflammatory response may, at least in part, be involved in the pathogenesis of PBC. Supporting this possibility, we found that long-term *S. intermedius*-inoculations in normal BALB/c mice induced PBC-like CNSDC and the production of autoantibodies in the liver [28]. Thus, PBC might possibly be caused by the chronic persistence of low-immunogenic or avirulent bacteria commensally coexisting within the host over the long term, rather than a severe yet transient infection [29].

The lysosomal degradation pathway known as autophagy is used to degrade microorganisms, such as bacteria. In bacterial infections, a paradigm is emerging in which the coordinated regulation of microbial sensing, phagolysosomal maturation, and anti-bacterial activity involves the recruitment of autophagy proteins to the phagosome. In addition, autophagy proteins function in adaptive immunity, including the development and homeostasis of the immune system and antigen presentation [30]. We therefore hypothesized that autophagy-mediated mechanisms might also be involved in the pathogenesis of the *S. intermedius*-triggered PBC-like condition observed in our cholangitis-harboring