

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

C型慢性肝炎/肝硬変患者で抗ウイルス治療にて線維化の軽減が見られた症例では、SMA陽性筋線維芽細胞の減少、肝細胞におけるβカテニンおよびCBP活性化の減弱、エステラーゼ陽性好中球の増加を認めた。CBP/β-カテニンの複合体形成を選択的に阻害するPRI-724は、ウイルス治療後脱線維化過程と類似の作用を示すことが示唆された。

A. 研究目的

PRI-724はCREB-binding protein(CBP)/β-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PRI724投与による組織学的効果判定基準の策定のため、3名の委員（琉球大学医学部附属病院病理部 斉尾征直先生、東京都立駒込病院病理科 比島恒和先生、金沢大学医学系形態機能病理学 原田憲一）で構成される治療効果評価委員会にて手順書を作成した。また、PRI724の脱線維化に関する機序解明に向けての予備的研究を以下の如く施行した。

B. 研究方法

対象：HCV感染患者のうち抗ウイルス治療前後で肝生検施行され、組織学的に線維化軽減がみられた症例12例を対象とした。なお、これらの症例は治療後にSVRが得られたものの肝細胞癌の合併またはその他の肝疾患の精査にて治療後に

肝生検が施行された症例である。肝生検前後の期間は1～12年。

方法：HE染色の他、シリウスレッド染色にて線維化を評価した。また、肝線維化および脱線維化に関与する細胞や分子として、Wnt経路のシグナル伝達分子であるβカテニン、CBP、P300、活性化星細胞マーカーであるαSMA、portal fibroblastマーカーであるfibulin 2、好中球マーカーである好中球エラスターゼ、M2マクロファージのマーカーであるCD163、活性化マクロファージマーカーであるIba-1(AIF1)、細胞外マトリックス分解酵素であるMMP8の免疫組織化学的解析を施行した。

C. 結果

抗ウイルス治療にて線維化軽減を認めた対象症例について、肝線維化を新犬山分類にてstage1～stage4に評価した結果、12例中4症例は2ポイント、8例は1ポイントの線維化軽減を認めた。活動度(A0-3)については3例で不変であったが、その他は1ポイントの軽減を認めた症例であった。これらの症例を用いてウイルス治療前後で比較検討した結果、Wnt経路の関連分子であるβカテニン、CBP、P300のうち、活性化型を示唆するβカテニン、CBPの核発現は、C型慢性肝炎/肝硬変症例のinterface肝炎部周囲の肝細胞に発現を認め、12例中8例では治療後にβカテニンの核発現の軽減

を認め、CBP 発現の低下も 8 例に認めた(図 1)。しかし、p300 については増減を示す症例や不変の症例があり、一定の傾向は認めなかった。 α SMA 陽性の筋線維芽細胞は門脈域周囲の interface 肝炎付近に散見され、治療後では全例で筋線維芽細胞の減少が認められたが、門脈域内に存在する fibulin 2 陽性の portal fibroblast については増減に関する明らかな傾向は認めなかった(図 1)。Iba1 (AIF-1)および CD163 は Kupffer 細胞に発現を認めたが、特に治療前後での傾向は認めなかった。MMP8 陽性細胞は形態学的に好中球であり、MMP8 陽性好中球数に明らかな傾向は認めなかったが、Neutrophil elastase 陽性好中球はほぼ全例(11 例)で細胞数の増加を認めた(図 1)。免疫染色のサマリを表 1 に示す。C 型慢性肝炎では、肝細胞をはじめ、あらゆる細胞が β カテニンが活性化しており、ウイルス消失により β カテニンおよび CBP 活性化が減弱、筋線維芽細胞の減少、エラスターゼ陽性好中球が増加した。

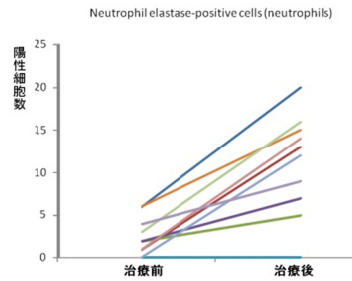
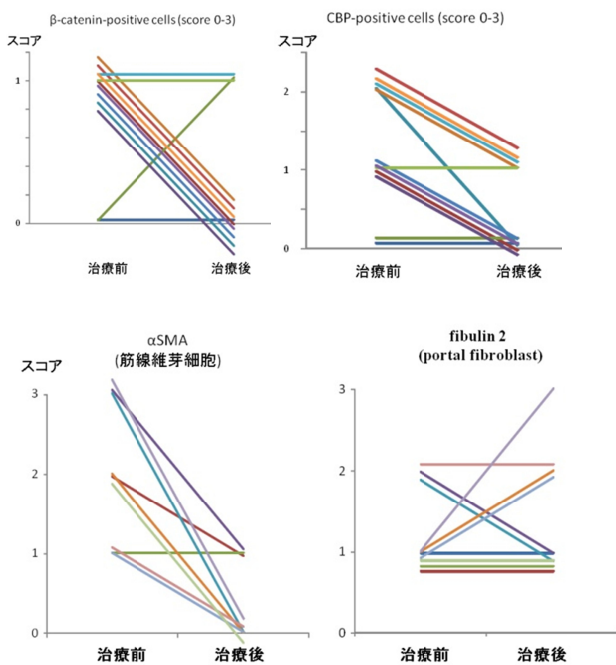


図 1 C 型慢性肝炎の抗ウイルス治療前後の肝生検における β カテニン, CBP, α SMA, fibulin 2, 好中球エラスターゼ陽性細胞の変化。

	CH,C	
	CH~LC	Fibrosis resolving
線維化	Stage 1-4	↓
炎症	Activity 1-3	↓
β -catenin	肝細胞 他	↓
P300	肝細胞 他	→
CBP	肝細胞 他	↓
活性化HSC	interface肝炎部	↓
portal fibroblast	門脈域内	→
Iba1	多数浸潤	→
M2 macrophage	多数浸潤	→
MMP8	少数散見	→
好中球エラスターゼ	少数散見	↑

表 1 C 型慢性肝炎/肝硬変の線維軽減過程における各因子、細胞数の推移のまとめ

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 α SMA 陽性の活性化肝星細胞(筋線維芽細胞)は C 型肝炎/肝硬変の interface 肝炎部を中心に多数出現し、活性化肝星細胞は線維促進の一因であることが確認出来た。また、抗ウイルス治療にて SVR となり線維化が軽減した症例では、肝炎性活動度の軽減と共に筋線維芽細胞も減少しており、活性化肝星細胞の減少は抗線維化の重要な因子であることが示唆された。fibulin 2 陽性 portal fibroblast に関しては、C 型慢性肝炎の線維化の程度および治療前後にかかわらず門脈域内に限局して分布していたが、線維化の進展および軽減における明

らかな関与については見いだせなかった。βカテニン-CBP-p300 シグナル系の発現については肝細胞をはじめあらゆる細胞に核発現を認め、肝星細胞における発現に関する詳細については今後更に検討する必要がある。肝細胞における発現を見た限りでは、治療後線維化の軽減とともにβカテニンおよびCBPの活性化が減弱していた。このようなシグナル伝達系の変化はCBP活性化阻害を示すPRI724の作用効果と類似の変化と推定された。また、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MMP8の上昇が指摘されている。今回の抗ウイルス治療前後の肝生検で検討した結果では、Iba1 (AIF-1)やCD163(M2)陽性のKupffer細胞に治療前後での明らかな差はなかった。またMMP8陽性好中球に関しても明らかな差異は認めなかったが、好中球エラスターゼ陽性好中球は線維化軽減とともに細胞数の増加を認めた。このようにMMP8、好中球エラスターゼによる好中球の同定では相違が生じたが、好中球の数のみならず機能の変化も反映していると推測され、今後更に検討する必要がある。

E. 結論

C型慢性肝炎/肝硬変からの線維化軽減過程においてSMA陽性筋線維芽細胞の減少、エラスターゼ陽性好中球およびβカテニン-CBP-p300シグナル系伝達系の変化が関与している事が示唆された。CBP/β-カテニンの複合体形成を選択的に阻害するPRI-724は治療後線維化軽減過程と類似の作用を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)原田憲一. 特集 肝良性腫瘍および類似病変の

病理・画像診断 update. 肝良性腫瘍の病理診断. 画像診断 2015;35(2):148-157

2) Ren XS, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Furubo S, Song JY, Nakanuma Y. Activation of the PI3K/mTOR Pathway Is Involved in Cystic Proliferation of Cholangiocytes of the PCK Rat. PLoS One. 2014 Jan 30;9(1):e87660.

3)原田 憲一. 特集：臨床・画像・病理トライアングル 肝細胞癌と鑑別を要する疾患.

病理学的に肝細胞癌と鑑別を要する疾患. 映像情報メディカル 2014;46(5):418-420

4)原田 憲一. 今月の話題. 胆管癌と鑑別を要する良性胆管狭窄. 病理と臨床 2014;32(4):446-447

5)原田 憲一. メディカルインフォメーション医療 up-to-date. 良性胆管狭窄を来す胆道系炎症性疾患. 石川医報 2014;10(2):第1573号:27-29

2. 学会発表

1)原田 憲一、池田 博子、佐藤 保則、中沼安二. 胆道系腫瘍および前癌病変におけるglucose transporter1の発現. 第103回日本病理学会総会 (平成26年4月24日~26日、広島)

2)原田 憲一. 肝胆膵 肝細胞癌と鑑別を要する疾患：病理. 第33回日本画像医学会 (2014年2月22日、東京)

3)原田 憲一. PBCの病態および診断に関する最近の知見. 第10回新潟PBC研究会 (2014年6月26日、新潟市 新潟グランドホテル)

4) Harada K. Cholangiocarcinoma with respect IgG4 Reaction. IAP (2014.Oct 5-10, Bangkok, Thailand)

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得 特になし

実用新案登録 特になし

その他

