

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08341

研究課題名(和文) 自己免疫性疾患におけるオートファジー異常の役割の解明

研究課題名(英文) Involvement of dysregulated autophagy in autoimmune diseases

研究代表者

佐々木 素子 (Sasaki, Motoko)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70225895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、オートファジー異常と自己抗原異常表出の関連を中心に、原発性胆汁性胆管炎/肝硬変(PBC)の病態解明と新たな治療法の分子基盤の確立、オートファジー異常検出による新しいPBCの病理診断マーカーの開発を旨とした。肝移植後肝生検や原因不明肝硬変においても、PBC特異的なオートファジー異常とミトコンドリア抗原異常発現はPBCの病理診断に有用であることが示された。さらに、PBCの胆管病変におけるオートファジー異常、ミトコンドリア抗原異常発現、細胞老化の発現機構には、胆管保護に重要な役割を持つAnion Exchanger 2 (AE2)の発現低下が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study addressed to clarify a pathogenesis of primary biliary cholangitis (PBC), putting focus on the association of dysregulated autophagy with abnormal expression of mitochondrial antigens. This study also addressed to develop a useful diagnostic marker for PBC. This study revealed that immunohistochemical detection of dysregulated autophagy and abnormal expression of mitochondrial antigens is a useful marker for a diagnosis of recurrent PBC after liver transplantation and cryptogenic cirrhosis. Furthermore, this study disclosed that anion exchanger 2 (AE2), which plays a role in the protection of biliary mucosa by maintaining biliary bicarbonate umbrella, showed decreased expression in the bile duct lesion in PBC. Cell culture study demonstrated that the decreased expression of AE2 was associated with dysregulated autophagy, abnormal expression of mitochondrial antigens and cellular senescence in biliary epithelial cells in PBC.

研究分野：人体病理学

キーワード：オートファジー 細胞老化 自己免疫性疾患 病理学

1. 研究開始当初の背景

近年、オートファジーの生理学的意義とオートファジー異常と様々な疾患との関連が明らかになりつつある。私たちは、原発性胆汁性胆管炎/肝硬変(PBC)の病態形成に細胞老化が関与すること、老化胆管細胞は、ケモカインなどの産生を介して細胞周囲微小環境の調節を行い、炎症の増悪や周囲細胞のさらなる細胞老化を起こすこと、PBCの胆管病変では、細胞老化に先行してオートファジーが発生しており、ミトコンドリア抗原の異常発現に関連することを明らかにしてきた。そこで本研究では、PBCでは、「胆管細胞のオートファジー異常が自己抗原の異常表出や免疫炎症機構の制御異常を介して自己免疫性発症機構に関与する」という仮説を検証し、PBCの病態解明とオートファジー異常の制御による新たなPBC治療法の分子基盤の確立をめざした。また、胆管でのオートファジー異常の検出による、早期PBC、原因不明の肝硬変症例、PBCの移植後再発の診断に有用な新しいPBCの病理診断マーカーの開発もめざした。

2. 研究の目的

本研究では、オートファジー異常と自己抗原異常表出の関連を中心に、原発性胆汁性胆管炎/肝硬変(PBC)の病態解明と新たな治療法の分子基盤の確立、オートファジー異常検出による新しいPBCの病理診断マーカーの開発をめざした。具体的には、1) PBC胆管のオートファジー異常、ミトコンドリア抗原の異常表出発生状況の解析; 2) オートファジー異常を指標としたPBCの新たな病理診断マーカーの開発; 3) 胆管上皮のオートファジー/ミトコンドリア抗原異常表出の原因の解明; 4) AMAや抗原特異的T細胞クローンによるオートファジー異常胆管への反応性の証明; 5) オートファジー異常を基盤としたPBCモデル動物の作製と自己免疫性病態の

解明、を計画した

3. 研究の方法

(1) 病理組織学的検討

① 肝臓病の肝組織におけるオートファジー異常発生状況の解析

人体材料を用いた免疫組織化学的手法で、PBCと対照肝のミトコンドリア抗原(pyruvate dehydrogenase complex-E2; PDC-E2 component, cytochrome c oxidase; COX)の発現状況を免疫組織化学的に検討した。LC3やp62/SQSTM1で検出したオートファジー異常の発生状況との関連を2重蛍光免疫染色法で解析した。病態進展との関連を臨床病理学的に解析した。

② オートファジー異常、ミトコンドリア抗原異常発現の診断マーカーとしての有用性の検討

ヒトの移植後生検・移植肝、原因不明肝硬変肝を収集(米国Washington大、Dr.Yehとの国際共同)して、①と同じ手法で、胆管細胞におけるオートファジー異常、ミトコンドリア抗原異常発現、細胞老化の発生状況を免疫組織化学的に検出した。臨床経過、病理組織学的診断と、これらマーカーの発現状況を詳細に解析して、PBCの診断に有用なマーカー(パネル)を決定した。

③ PBC胆管におけるAE2発現の検討

免疫組織化学的手法で、PBCと対照肝の胆管におけるAE2発現とオートファジー異常、ミトコンドリア抗原異常などとの関連を検討した。

(2) 培養細胞を用いた検討

① オートファジー異常とミトコンドリア抗原発現の解析: 培養胆管細胞に飢餓状態、疎水胆汁酸GCDC、パルミチン酸の投与など種々の細胞ストレスや各種阻害剤(ライソゾーム阻害剤bafilomycin Aなど)を加えてオートファジー異常、ミトコンドリア抗原の発現、細胞老化を検討した。また、PDC-E2

などのミトコンドリア抗原の発現局在，オートファゴゾームとの関連を検討した。2重蛍光免疫染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

②AE2 発現とオートファジー異常，ミトコンドリア抗原発現，細胞老化の関連の検討：種々の細胞ストレスを加えて，AE2 発現の変動を解析した。また，siRNA を用いて AE2 発現をノックダウンして，オートファジー，ミトコンドリア抗原発現，細胞老化との関連を検討した。

4. 研究成果

(1)病理組織学的検討

①PBC の胆管におけるオートファジー異常発生状況とミトコンドリア抗原発現異常

PBC の胆管病変部胆管では，オートファジー異常を示す p62/SQSTM の顆粒状蓄積，オートファジーマーカーLC3 の顆粒状蓄積，ミトコンドリア抗原 PDC-E2，CC0 の顆粒状発現が疾患特異的に認められた。

②ヒトの移植後 PBC 再発症例の生検・移植肝，移植後急性・慢性拒絶，原因不明肝硬変肝の検討

ヒトの移植後 PBC 再発症例の生検・移植肝，移植後急性・慢性拒絶，原因不明肝硬変肝の検討から，移植後 PBC 再発症例の胆管においても，①で確認された PBC 特異的なオートファジー異常/ミトコンドリア抗原異常発現のパターンが認められることが明らかになった。オートファジー関連分子とミトコンドリア抗原の異常発現は，肝移植後肝生検や原因不明肝硬変においても PBC の病理診断マーカーとして有用であることが示された。

③PBC の胆管における AE2 発現

また，PBC の病変部胆管には AE2 発現の低下があり，胆管細胞老化，ミトコンドリア抗原 PDC-E2 の異常発現，オートファジー異常を示す p62/SQSTM の顆粒状蓄積，LC3 の顆粒状異常蓄積と局在が一致することが，二重

蛍光免疫染色で明らかとなった。

(2)培養細胞を用いた検討

①培養胆管細胞を用いた検討で，PBC 特異的なオートファジー異常/ミトコンドリア抗原異常発現が，胆汁酸 GCDC や飽和脂肪酸パルミチン酸の投与によって再現できること，小胞体ストレスも関与すること，UDCA はオートファジー異常/ミトコンドリア抗原異常発現を軽減した。

②酸化ストレス，GCDC など誘導した老化胆管細胞では，AE2 発現低下を認めた。また，siRNA を用いて AE2 発現をノックダウンすると，オートファジー異常，ミトコンドリア抗原異常発現，細胞老化が誘導された。

肝移植後肝生検や原因不明肝硬変においても，PBC の胆管病変でみられるオートファジー異常とミトコンドリア抗原の異常発現は PBC の病理診断マーカーとして有用であることが示された。さらに，PBC の胆管病変におけるオートファジー異常，ミトコンドリア抗原異常発現，細胞老化の発生機構には，AE2 発現の低下が密接に関連することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Sasaki M, Kuo FY, Huang CC, Swanson PE, Chen CL, Chuang JH, Yeh MM. Increased expression of senescence-associated cell cycle regulators in the progression of biliary atresia: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 2018 Feb 2. doi: 10.1111/his.13476. [Epub ahead of print] 査読あり

2. Sasaki M, Sato Y, Nakanuma Y. An impaired biliary bicarbonate umbrella

may be involved in dysregulated autophagy in primary biliary cholangitis. *Lab Invest.* 2018 doi: 10.1038/s41374-018-0045-4. [Epub ahead of print] 査読あり

3. Sasaki M, Nakanuma Y. Bile Acids and Deregulated Cholangiocyte Autophagy in Primary Biliary Cholangitis. *Dig Dis* 2017;35:210-216. doi: 10.1159/000450913. 査読あり

4. Sasaki M, Nakanuma Y. Stress-induced cellular responses and cell death mechanisms during inflammatory cholangiopathies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2017;41:129-138. doi: 10.1016/j.clinre.2016.08.002. 査読あり

5. Sasaki M, Hsu M, Yeh MM, Nakanuma Y. In recurrent primary biliary cirrhosis after liver transplantation, biliary epithelial cells show increased expression of mitochondrial proteins. *Virchows Arch.* 2015 Oct;467(4):417-25. doi: 10.1007/s00428-015-1819-3. 査読あり

6. Sasaki M, Yoshimura-Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of endoplasmic reticulum stress in biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2015 Sep;50(9):984-95 doi: 10.1007/s00535-014-1033-0. 査読あり

7. Nakanuma Y. Sasaki M, Hadara K. Autophagy and senescence in fibrosing cholangiopathies. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(4):934-45. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.027. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1. Sasaki M, et al. Impairment of anion exchanger 2 may be related to abnormal expression of mitochondrial antigens in primary biliary cholangitis. AASLD The Liver Meeting 2017 (Washington, November 11-15)

2. 佐々木素子ら, 「代謝性・先天性肝疾患」胆道閉鎖症の進展における胆管細胞老化の関与 第53回日本肝臓学会総会 (2017年6月8,9日, 広島)

3. Sasaki M, et al. Impaired biliary bicarbonate umbrella may play a central role in deregulated autophagy and cellular senescence in cholangiocytes in primary biliary cholangitis. AASLD The Liver Meeting 2016 (Boston, November 11-15)

4. Sasaki M, et al. Bile acids and cholangiocyte autophagy The XXIV International Bile Acid Meeting "Bile Acids in Health and Disease". (Düsseldorf, June17-18, 2016)

5. 佐々木素子ら, WS3-9 自己免疫性肝疾患の今後の展開: 原発性胆汁性肝硬変における胆管病変の発生進展機序: 胆管細胞老化, オートファジー異常, 重炭酸アンブレラ破綻の関与 第52回日本肝臓学会総会 (2016年5月19,20日千葉)

6. Sasaki M, et al. Increased expression of ORM1-like protein 3 (ORMDL3) in biliary epithelial cells may be related to the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. The Liver Meeting 2015 (2015.Nov 13-17, Moscone West Convention Center, San Francisco)

7. 佐々木素子ら, シンポジウム 1「PBC (原発性胆汁性肝硬変)」

原発性胆汁性肝硬変の胆管オートファジー異常発生における小胞体ストレスの役割
第 52 回消化器免疫学会総会 (2015 年 7 月 30 日～31 日, 京王プラザホテル, 東京)

8. 佐々木素子ら, 肝内小型胆管のミトコンドリア蛋白異常発現は原発性胆汁性肝硬変の移植後再発の有用な診断マーカーである。
第 51 回日本肝臓学会総会 (2015 年 5 月 21 日～22 日, ホテル日航熊本, 熊本)

9. 佐々木素子ら, 原発性胆汁性肝硬変の胆管上皮における ORM1-like protein 3(ORMDL3)発現とその意義. 第 51 回日本肝臓学会総会 (2015 年 5 月 21 日～22 日, ホテル日航熊本, 熊本)

[図書] (計 2 件)

1. Sasaki M. Chapter 10. Mucinous Cystic Neoplasm of the Liver and Pancreas => pp. 199-216. In: Nakanuma Y eds. Biliary Diseases with Pancreatic Counterparts: A New Disease Concept. Nova Science publishers. 2017. Hauppauge NY

2. Sasaki M. Cellular senescence and biliary disorders. In Nakanuma Y eds. Pathology of the bile duct. Springer, Singapore, 2017; 39-54

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 素子 (SASAKI MOTOKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号 : 70225895

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

佐藤 保則 (SATO YASUNORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号 : 30324073