

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890024

研究課題名（和文） 原発性胆汁性肝硬変モデルマウスにおける抑制性B細胞の同定と臨床応用への基礎検討

研究課題名（英文） Identification of regulatory B cells in a murine model of primary biliary cirrhosis and fundamental examination for clinical application

研究代表者

守時由起（Moritoki Yuki）

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：90585522

研究成果の概要（和文）：炎症抑制機能を有する可能性が示唆されているCD5陽性B細胞の局在を免疫組織化学的にCD20、CD5の二重染色を行い原発性胆汁性肝硬変患者およびC型慢性肝炎患者の肝臓組織にて検討した。両疾患において門脈域内の濾胞様細胞集簇におけるB細胞にはCD20CD5共陽性B細胞を認める一方、原発性胆汁性肝硬変患者にて見られる胆管浸潤B細胞にはCD20CD5陽性B細胞を認めなかったことから、原発性胆汁性肝硬変患者肝臓組織において胆管上皮傷害へのCD5陽性B細胞の直接的関与は否定的と考えられる結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Location of CD5 expressing B cells, supposed to have a regulatory function in an inflammatory condition, was examined using immunohistochemical double staining for CD20 and CD5 in the liver samples from the patients of primary biliary cirrhosis and chronic hepatitis C. Both liver samples demonstrated CD20 and CD5 double-positive B cells in follicle-like aggregations in the portal areas, while B cells were CD5 negative in ductal invasion, suggesting unlikely contribution of CD20 and CD5 double-positive B cells directly to biliary epithelial damage in the livers of primary biliary cirrhosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1230000	369000	1599000
2011年度	1130000	339000	1469000
年度			
年度			
年度			
総計	2360000	708000	3068000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：原発性胆汁性肝硬変、B細胞、CD20、CD5

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変は難治性の自己免疫性慢性肝臓疾患であり、日本では厚生労働省の「難治性肝疾患」に指定されている。現在有効な治療法は確立されておらず、ウルソデオキシコール酸の内服治療にて疾患の進行を遅らせるとのエビデンスが示されている

が、肝硬変への進展を阻止できるものではなく、疾患末期には肝移植以外の有効な治療法は存在しない。また肝移植後には免疫抑制剤の長期服用が必要であり、移植後5年間に30%程度のケースで原発性胆汁性肝硬変の再発が見られる。それ故、新たな治療法開発を最終目標として原発性胆汁性肝硬変の病

因、病態に関する研究が世界的に進められている。

原発性胆汁性肝硬変では90-95%の症例にて自己抗体である抗ミトコンドリア抗体が血清中に認められることから、B細胞の免疫異常が病態に大きく関与していると考えられている。原発性胆汁性肝硬変においてB細胞は病態の増悪と関連していると多くの研究者が推測していたため、我々は自然発症の原発性胆汁性肝硬変モデルマウス (dnTGF- β RIIマウス) における遺伝的B細胞除去による原発性胆汁性肝硬変の改善の可能性を想定した。しかし、B細胞除去により原発性胆汁性肝硬変様の肝臓炎症は増悪し、活性化CD4陽性、CD8陽性T細胞の割合も肝臓内で増加した。炎症抑制において重要な役割を担う制御性T細胞の割合も肝臓内で減少する一方、IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの上昇も伴っていた。また、腹腔内B細胞は抑制性T細胞を介した肝臓炎症抑制機能とは異なった機序での炎症抑制機能を有することが示唆され、アメリカ消化器病学会誌 Gastroenterology に報告している。

2. 研究の目的

モデルマウス肝臓炎症においてはB-1細胞、B-1a細胞による炎症抑制作用が考えられる。機能的にマウスB-1a細胞に匹敵するか否かは議論のあるところであるが、ヒトにおいてもCD5陽性B細胞が確認されており、炎症抑制機能を示唆する報告も近年みられる。原発性胆汁性肝硬変患者の肝臓組織におけるCD5陽性B細胞の局在から、CD5陽性B細胞と胆管傷害との関連を検討し、B細胞をターゲットとした新規療法開発への基礎検討を行うことを目的とした。

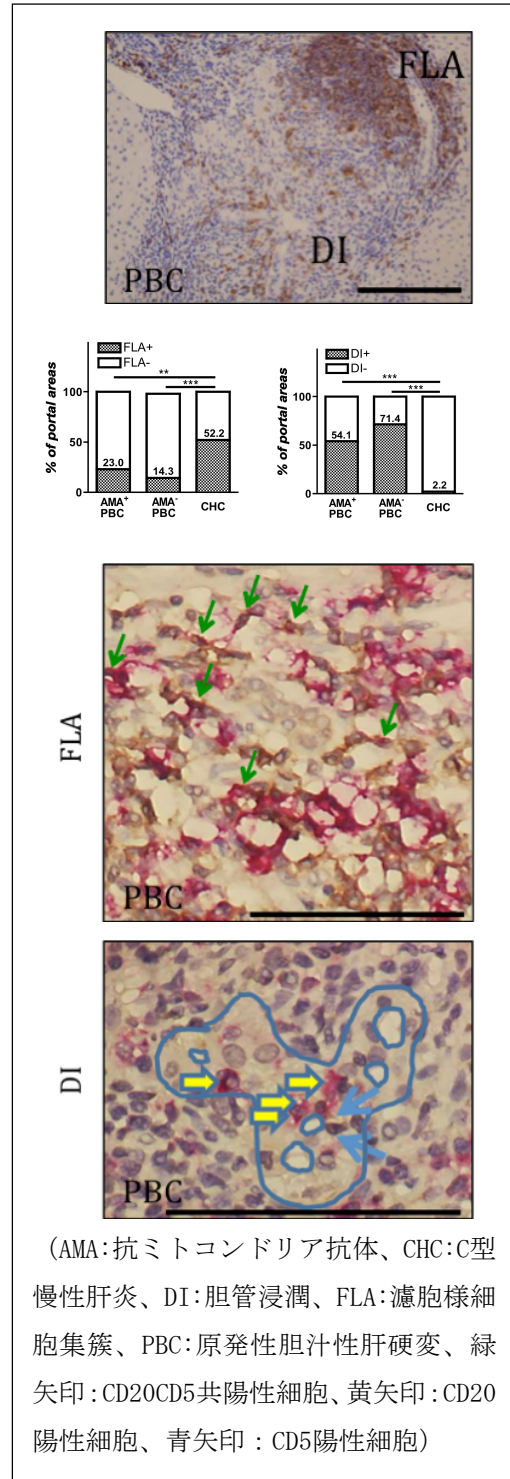
3. 研究の方法

炎症抑制機能を有する可能性が示唆されているCD5陽性B細胞の局在を、免疫組織化学的にCD20, CD5の二重染色を行い原発性胆汁性肝硬変患者およびC型慢性肝炎患者の肝臓組織にて検討した。また、原発性胆汁性肝硬変患者の抗ミトコンドリア抗体陽性群、陰性群において、B細胞、T細胞の肝臓内局在と浸潤強度、胆管傷害レベルについて比較検討した。

4. 研究成果

B細胞マーカーであるCD20の単一免疫組織化学染色にてB細胞の局在を原発性胆汁性肝硬変患者およびC型慢性肝炎患者の肝臓組織にて検討したところ、CD20陽性B細胞の門脈域浸潤強度の増加に伴って胆管傷害が重症化する関連性は認めなかった。そこでB細胞の門脈域浸潤様式を分類して検討したところ、原発性胆汁性肝硬変患者肝臓組織ではC

型慢性肝炎患者肝臓組織に比較して、B細胞の濾胞様細胞集簇が見られる門脈域の比率が有意に低かったが、血清抗ミトコンドリア抗体の有無による差は認めなかった。またB細胞の胆管浸潤はC型慢性肝炎患者の肝臓組織に比較して、原発性胆汁性肝硬変患者肝臓組織において有意に高かった。



そこで、濾胞様細胞集簇および胆管浸潤のB細胞においてCD5の発現を検討するため、CD20, CD5の二重染色を行ったところ、

原発性胆汁性肝硬変患者およびC型慢性肝炎患者肝臓組織では濾胞様細胞集簇におけるB細胞にCD20CD5共陽性細胞を認めたが、胆管浸潤B細胞ではCD5陽性B細胞を認めなかった。原発性胆汁性肝硬変患者肝臓組織において胆管上皮傷害に対するCD5陽性B細胞の直接的関与は否定的と考えられる結果を得た。

また、原発性胆汁性肝硬変患者では、傷害胆管においてCD5陰性B細胞およびT細胞の胆管浸潤が見られる。抗ミトコンドリア抗体陽性群においては、陰性群に比較して、胆管浸潤T細胞を認める門脈域の割合が小さかった。しかし、抗ミトコンドリア抗体の有無に関わらず、胆管傷害の進展に伴ってB細胞が減少する一方、T細胞は傷害胆管部位に残存する傾向が有意に強かったことから、実質的な胆管傷害にはT細胞の寄与が大きいと考えられた。これらの結果に、他の検討も加えて、共同研究者らと共にアメリカ肝臓学会誌 *Hepatology* に論文(発表論文1)を発表した。また、本研究課題とは異なる検討であるが、ウルソデオキシコール酸内服治療への反応不十分な原発性胆汁性肝硬変患者に対する抗CD20抗体リツキシマブによるB細胞除去療法においては、血清アルカリフォスファターゼ値の改善、CD4陽性細胞での制御性T細胞マーカーFoxp3、炎症抑制性サイトカインであるIL-10、TGF- β の遺伝子発現上昇が見られること、さらに、モデルマウスによってはB細胞全体では炎症促進的な役割を演じることを、共同研究者らと共に *Hepatology, Cellular Immunology* に論文(発表論文2, 4)を報告している。

以上より、原発性胆汁性肝硬変患者においては胆管上皮傷害へのCD5陽性B細胞の直接的関与は否定的であり炎症抑制機能を有する可能性が示唆される一方、B細胞全体では、炎症促進的な役割を演じる状況が考えられる。B細胞をターゲットとした新規療法開発としては、炎症促進的B細胞の除去および炎症抑制的B細胞の誘導が共に重要と考えられ、今後も更なる検討を進める。

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5件)

1. Jin Q, Moritoki Y, Lleo A, Tsuneyama K, Invernizzi P, Moritoki H, Kikuchi K, Lian ZX, Hirschfield GM, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME, Niu J. Comparative analysis of portal cell infiltrates in antimitochondrial autoantibody-positive versus antimitochondrial autoantibody-negative primary biliary

cirrhosis. *Hepatology*.

2012;55:1495-506. (査読あり) doi: 10.1002/hep.25511.

2. Tsuda M, Moritoki Y, Lian ZX, Zhang W, Yoshida K, Wakabayashi K, Yang GX, Nakatani T, Vierling J, Lindor K, Gershwin ME, Bowlus CL. Biochemical and immunologic effects of rituximab in patients with primary biliary cirrhosis and an incomplete response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 2012;55:512-21. (査読あり) doi: 10.1002/hep.24748.
3. Tsuneyama K, Moritoki Y, Kikuchi K, Nakanuma Y. Pathological Features of New Animal Models for Primary Biliary Cirrhosis. *International Journal of Hepatology*. 2011;2012:1-7. (査読あり) <http://www.hindawi.com/journals/ijhep/2012/403954/>
4. Moritoki Y, Tsuda M, Tsuneyama K, Zhang W, Yoshida K, Lian ZX, Yang GX, Ridgway WM, Wicker LS, Ansari AA, Gershwin ME. B cells promote hepatic inflammation, biliary cyst formation, and salivary gland inflammation in the NOD.c3c4 model of autoimmune cholangitis. *Cell Immunol*. 2011;268:16-23. (査読あり) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874911000153>
5. Ueno Y, Ambrosini YM, Moritoki Y, Ridgway WM, Gershwin ME. Murine models of autoimmune cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26:274-9. (査読なし) doi: 10.1097/MOG.0b013e32833755aa

[学会発表] (計10件)

1. Yuki Moritoki, Masanobu Tsuda, Koichi Tsuneyama, Weici Zhang, Katsunori Yoshida, Zhe-Xiong Lian, Guo-Xiang Yang, William M. Ridgway, Linda S. Wicker, Aftab A. Ansari, and M. Eric Gershwin. A critical role of B cells in biliary disease and sialadenitis in the NOD.c3c4 model of autoimmune cholangitis. *Immunology* 2011, May 13-17, 2011. San Francisco, US.
2. Masanobu Tsuda, Yoko Ambrosini, Yuki Moritoki, Katsunori Yoshida, Weici Zhang, Guo-Xiang Yang, Yugo Ando, Guanghua Rong, Toshio Nakatani, Christopher Bowlus, Aftab Ansari, Zhe-Xiong Lian, and M. Eric Gershwin. CD45ROhighCD57+CD8high T cells in primary biliary cirrhosis. *Immunology*

- 2011, May 13-17, 2011. San Francisco, US.
3. **守時由起**、常山幸一、M. E. Gershwin. 自己免疫性胆管炎モデルNOD. c3c4マウスにおける胆管炎および唾液腺炎に対するB細胞の炎症促進的役割. 第15回日本肝臓学会大会 (第19回日本消化器病関連学会週間). 2011. 10. 20-21. 福岡
 4. 菊池健太郎、常山幸一、**守時由起**、細谷直美、梶山祐介、高井敦子、根岸雅嗣、原眞純、水口國雄、宮川浩. PBC患者体内におけるIgM産生の場についての検討. 第47回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2-3. 東京
 5. 川村梨那子、松崎恒一、吉田勝紀、常山幸一、**守時由起**、井口亮輔、村田美樹、山口隆志、仲野俊成、廣原淳子、関寿人、岡崎和一. 原発性胆汁性肝硬変におけるTGF- β シグナル伝達機構の解析. 第47回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2-3. 東京
 6. 吉田勝紀、Long Qing, 松崎恒一、常山幸一、**守時由起**、Zhe-Xiong Lian, Junqi Niu, 井口亮輔、村田美樹、川村梨那子、山口隆志、関寿人、岡崎和一. 核酸アナログ治療後、B型慢性肝疾患の線維化・癌化シグナルは回帰する. 第47回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2-3. 東京
 7. **Y. Moritoki**, Z. Lian, K. Tsuneyama, W. Zhang, K. Yoshida, K. Wakabayashi, G. Yang, Y. Ueno, M. Gershwin. Disease course dependent opposite roles of B cells to pathogenesis and pathophysiology of autoimmune cholangitis in dnTGF- β RII mice. 14th International Congress of Immunology, August 23-27, 2010. Kobe Japan.
 8. **守時由起**、Zhe-Xiong LIAN、常山幸一、Weici Zhang、菊池健太郎、宮川浩、上野義之、M. Eric GERSHWIN. 抗CD20抗体療法による自己免疫性胆管炎の改善および腸炎の増悪. 第46回日本肝臓学会総会. 2010. 5. 27-28. 山形
 9. 梶山祐介、河井敏宏、高井敦子、本田宗宏、細谷直美、**守時由起**、宮川浩、菊池健太郎. C型慢性肝炎患者における血清B cell activating factor (BAFF)濃度と橋本病の関連および血清Estrogenの影響. 第46回日本肝臓学会総会. 2010. 5. 27-28. 山形
 10. 高井敦子、梶山祐介、河井敏宏、根岸雅嗣、藤本誠、細谷直美、蔵野信、**守時由起**、常山幸一、原眞純、塚本和久、宮川浩、菊池健太郎. Monosodium Glutamate投与NASHモデルマウスにおけるメタボリックシンドロームの検討. 第46回日本肝臓学会総会. 2010. 5. 27-28. 山形

[その他]

ホームページ等

http://www.crc.akita-u.ac.jp/researchers/researcher_detail.php?idx=820

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守時由起 (Moritoki Yuki)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：90585522

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし