

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590393

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変における性ホルモンの関与と治療戦略

研究課題名(英文) Significance of estrogen on biliary epithelial cells in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis

研究代表者

原田 憲一 (HARADA, KENICHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30283112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：原発性胆汁性肝硬変は中年女性の好発する自己免疫性肝疾患である。特に閉経後の女性に発症し、肝内の小型胆管が選択的に傷害を受け、消失する。胆管細胞はエストロゲン受容体を有しているため、胆管細胞に対するエストロゲンの関与について検討した結果、胆管細胞はエストロゲン受容体を介したエストロゲン作用の低下に加えて、エストロゲン関連受容体を介したエストロゲン作用の阻害も原発性胆汁性肝硬変の胆管傷害および消失に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Primary biliary cirrhosis mainly affects middle- and old-aged females, and the interlobular bile ducts are primarily damaged. Estrogen has been speculated to play important roles in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis, since biliary epithelial cells are known to express estrogen receptors. In primary biliary cirrhosis, the decreased estrogen effects caused by menopause and also the competitive inhibitory effect of estrogen-related receptors in biliary epithelial cells are associated with the pathogenesis of cholangiopathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：原発性胆汁性肝硬変 胆管 エストロゲン エストロゲン受容体 病理学 エストロゲン関連受容体

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は女性に好発する胆道系疾患で、ミトコンドリア抗体(AMA)の出現と肝内小型胆管の選択的傷害と消失を特徴とする。PBCの病態発生に、胆管に対する自己免疫の関与が想定されているが、特徴的な臨床病理像を呈するにもかかわらず、未だその病因および病態の詳細は不明である。特に、なぜ女性に好発するのか？なぜ胆管特異的な自己免疫現象が発生するのか？ミトコンドリアに対する臓器非特異的抗体が胆管特異的な病態形成にどのように関与するのか？などの重要な疑問が未解決のままである。近年、肝臓における性差または女性肝臓病学と称される研究域が注目されている。たとえば、肝細胞癌発生の性差(男性優位)の理由として、クッパー細胞での自然免疫応答とエストロゲンの抗炎症効果との関連性が明らかにされた。また、近年 endocrinology のカウンターパートとして intracrinology と称される標的組織局所での生物学的活性の高いホルモンに変える機構が注目されている。乳腺や生殖臓器などホルモン臓器ではホルモン受容体の発現はよく知られており、ホルモン依存性臓器の概念(endocrinology)が確立されているが、ホルモン非依存性と考えられてきた肝臓などの臓器におけるホルモン受容体の詳細は未だ不明であり、胆管や肝細胞におけるホルモン受容体の発現や罹患に性差を有する疾患での病態形成への関与および胆管における intracrinology について早急な解析が求められている。

2. 研究の目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、中年女性に好発し、胆管細胞を標的とする自己免疫性疾患で、胆管消失を特徴とする。胆管消失の機序として胆管細胞のアポトーシス促進が考えられており、傷害胆管における Fas や Bcl-2 などのアポトーシス関連分子の発現異常が報告されている。また、発症率に明らかな性差が存在することよりエストロゲンなどのホルモンの関与が示唆されており、ラット胆管細胞でのエストロゲン受容体(ER)の発現とエストロゲンによる細胞増殖活性の亢進が報告されている(Alvaro ら, *Gastroenterology*, 2000)。ER は ER $\alpha$  と ER $\beta$  のホモまたはヘテロダイマーを形成し、ER $\alpha$  は細胞増殖、ER $\beta$  はアポトーシス促進や分化促進に作用する。ER $\alpha$  の細胞増殖機序として、エストロゲン応答分子である estrogen-responsive finger protein (Efp)が細胞周期を負に調節する 14-3-3 sigma (G2 期に cdc/cyclinB1 複合体と結合し、複合体の細胞質から核への移行を阻止し不活性化させる)を分解することが明らかとなった。また、エストロゲン関連受容体(ER)は ER と高い相同性を示す受容体で、エストロゲン非依存性にエストロゲン様効果を示し、また ER

介在性のエストロゲン応答を競合的に抑制することによりエストロゲン作用を調節する。我々は、ヒト培養胆管細胞を用いて、ERの発現とエストロゲン作用による細胞増殖およびアポトーシスに関する細胞動態について検討した。

3. 研究の方法

*in vitro study*: PBC の末梢肝より樹立したヒト培養胆管細胞を用いた。血清およびフェノール赤不含有の培養液で 1 日培養後、17 $\beta$ -Estradiol (E2, 100pg/ml), Bcl-2 阻害剤, Pan-caspase 阻害剤(Z-VAD-FMK)存在下における胆管細胞の増殖活性を DNA 合成量にて評価した。また、エストロゲン受容体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), 14-3-3 Sigma, Efp, エストロゲン関連受容体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ER $\gamma$ )、アポトーシス関連分子として Bcl-2 ファミリー分子の mRNA 発現を RT-PCR で検出し、さらに E2 刺激による発現の変化をリアルタイム PCR で定量した。また、ER $\gamma$  アゴニストとして、GSK4716 (10mM)で刺激後、エストロゲン関連転写因子である ER, AP-1, SP-1 の活性化を TransAM キット(Active Motif 社)にて測定した。さらに、Bcl-2 ファミリーのアポトーシス関連分子について、リアルタイム PCR にて mRNA 発現量の変化を定量評価した。

*in vivo study*: PBC (全例女性, 42-72 歳)および対照群の肝組織を用いて、ER $\beta$ , EFP, 14-3-3 sigma, ER $\alpha$ , ER $\gamma$  の免疫染色を施行し、傷害胆管および小葉間胆管における発現を観察した。

4. 研究成果

*in vitro study*: 培養ヒト胆管細胞は ER $\beta$  mRNA を発現していたが、明らかな ER $\alpha$  発現は認めなかった(図 1)。また、E2 刺激による明らかな細胞増殖活性の亢進は認めなかった。胆管細胞は Efp, 14-3-3 Sigma を恒常的に発現しており(図 1)、E2 刺激にて Efp 発現は 0.9 $\pm$ 0.1 倍(平均 $\pm$ 標準誤差)と有意な変化を示さなかったが、14-3-3 sigma は 2.7 $\pm$ 0.6 倍と有意に発現が亢進した。

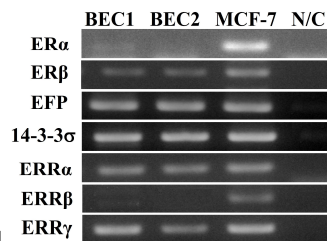


図 1

また、ヒト胆管細胞は ER $\alpha$  と ER $\gamma$  の発現を認めたが、明らかな ER $\beta$  の発現は認めなかった(図 1)。さらに E2 刺激にて ER $\gamma$  発現が 0.4 $\pm$ 0.17 倍と有意な発現低下を来したが、

ER $\beta$  や ERR $\alpha$  発現の変化は認めなかった。また、培養ヒト胆管細胞は ERR $\gamma$  アゴニスト刺激にて、SP-1 の活性化が見られたが、明らかな ER, API の活性化は認めなかった(図 2)。また、ERR $\gamma$  アゴニスト刺激にて、アポトーシス誘導分子である Bad, Bax の発現亢進が誘導されたが、アポトーシス抑制分子(Mcl-1, Bcl-XL, Bcl-2)の発現亢進は認めなかった(図 3)。

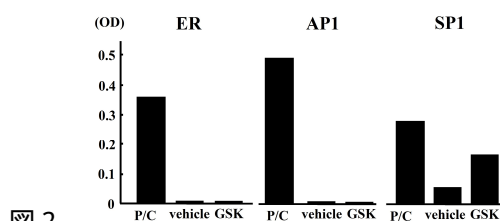


図 2

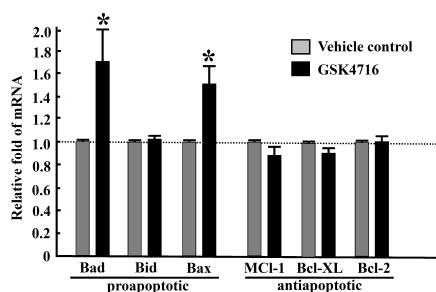


図 3

**in vivo study:** 肝組織の小葉間胆管は ER $\beta$ , EFP, 14-3-3 sigma を恒常的に発現していた。胆管における ER の発現は主として核に認められた。EFP, 14-3-3 sigma の発現は細胞質に見られ、EFP は強い発現、14-3-3 sigma は弱い発現であったが、ともに恒常的に発現しており、明らかな男女差や疾患群間での相違は認めなかった。また、ERR $\alpha$ , ERR $\gamma$  の発現は PBC の傷害胆管で亢進していた。

以上の結果より、ヒト胆管細胞を用いた検討では、エストロゲンによる細胞増殖活性の明らかな亢進は認めなかった。しかし、胆管細胞は Efp, 14-3-3 Sigma を恒常的に発現していることからエストロゲン依存性の細胞増殖誘導が示唆されたが、エストロゲン刺激にて 14-3-3 sigma 発現が亢進し、エストロゲン誘導性細胞増殖亢進の抑制機構として作用していると推測された。また、ヒト胆管細胞は E2 刺激でアポトーシス促進関連の Bcl-2 ファミリー分子の発現が亢進したことより、エストロゲン存在下の胆管細胞は Bcl-2 ファミリー分子を介したアポトーシス誘導の感受性が亢進していると示唆された。

ERR $\alpha$  は ER $\alpha$  と競合し、エストロゲン作用を低下させる。今回の検討より、PBC の傷害胆管特異的に活性化型を示唆する ERR $\alpha$  の核発現を認め、ER $\alpha$  との競合によりエストロゲン作用を更に低下させている可能性もある。すなわち閉経によるエストロゲン作用の低下

に加えて、胆管細胞における ERR $\alpha$  活性化が胆管におけるエストロゲン作用を更に減弱させて、細胞増殖低下による再生不全が胆管消失に寄与している可能性が示唆された。

## 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. Harada K, Hirohara J, Ueno Y, Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, Ichida T, Nakanuma Y. Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. *Hepatology* 2013 May;57(5):1942-9 査読有
2. Harada K, Hirohara J, Ueno Y, Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, Ichida T, Nakanuma Y. Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. *Hepatology* 2013 May;57(5):1942-9 査読有
3. Harada K, Hsu M, Ikeda H, Zeniya M, Nakanuma Y. Application and Validation of a New Histologic Staging and Grading System for Primary Biliary Cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2013, 47(2):174-81 査読有
4. Kakuda Y, Harada K, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, sato Y, Sasaki M, Okafuji H, Mizukosi E, Terasaki S, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Kaizaki Y, Kaneko S, Nakanuma Y. Evaluation of a new histologic staging and grading system for primary biliary cirrhosis in comparison with classical systems. *Hum Pathol* 2013; 44(6): 1107-17 査読有
5. Nozaki Y, Harada K, sanzen T, Nakanuma Y. PPAR $\gamma$  ligand attenuates portal inflammation in the MRL-lpr mouse: a new strategy to restrain cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2013. 2013 26:153-159 査読有
6. 原田憲一、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の新しい病期分類・活動度分類 病理と臨床 2013;31(2):210-12 査読有
7. Harada K, Shimoda S, Ikeda H, Chiba M, Hsu M, Sato Y, Kobayashi M, Ren X S, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y. Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2011;31(2):245-53. 査読有

[学会発表](計13件)

1. Harada K, Kakuda Y, Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of serum fractalkine and its regulation by ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. AASLD Annual

- Meeting 2013. 2013 年 11 月 19 日 Washington DC, USA
2. Harada K, Nakanuma Y. Alteration of energy metabolism and subsequent oxidative stress in the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. AASLD Annual Meeting 2013. 2013 年 11 月 19 日 Washington DC, USA.
  3. 原田憲一、中沼安二. シンポジウム：肝胆道疾患と免疫. 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序：エネルギー代謝の変化と細胞死の関与. 第 50 回日本消化器免疫学会総会 2013 年 8 月 1-2 日 ホテルグランドヒル市ヶ谷 東京都
  4. 相葉佳洋、原田憲一、小森敦正、阿比留正嗣、長岡進矢、右田清志、伊東正博、中沼安二、八橋弘、中村稔. 原発性胆汁性肝硬変の肝局所における TL1A 産生機構の解明 第 50 回日本消化器免疫学会総会 2013 年 8 月 1-2 日 ホテルグランドヒル市ヶ谷 東京都
  5. 原田憲一、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の胆管における endocytosis 関連蛋白の発現. 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 7-8 日 ロイトン札幌 北海道
  6. 角田優子、原田憲一、岡藤啓史、池田博子、佐藤保則、水腰英四郎、金子周一、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)肝生検における治療反応性・予後予測の可能性. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6-7 日、京王プラザホテル 東京都
  7. 原田憲一、佐藤裕英、中村稔、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変における Fractalkine 発現と ursodeoxycholic acid による発現制御. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6-7 日、京王プラザホテル 東京都
  8. 原田憲一、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管と細胞内エネルギー代謝の関連. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6-7 日、京王プラザホテル 東京都
  9. 小林水緒、角田優子、原田憲一、池田博子、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)にみられるインターフェイス肝炎の免疫組織学的、組織学的検討. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6-7 日、京王プラザホテル 東京都
  10. 吉田真理子、太田肇、羽柴智美、矢野正明、丹尾幸樹、丸川洋平、川島篤弘、角田優子、原田憲一、中沼安二. 各種自己抗体および新病期分類から見た原発性胆汁性肝硬変の治療反応性. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013 年 6 月 6-7 日、京王プラザホテル 東京都
  11. 原田憲一、中沼安二. パネルディスカッション：「自己免疫性肝疾患の現状と問題点」. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝の変化. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 21-23 日 城山観光ホテル 鹿児島県

12. 角田優子、原田憲一、北村星子、池田博子、佐藤保則、佐々木素子、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の診断時肝生検における予後予測. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 21-23 日 城山観光ホテル 鹿児島県
13. 小林水緒、角田優子、原田憲一、池田博子、中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)にみられるインターフェイス肝炎の免疫病理学的相違に関する検討. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 21-23 日 城山観光ホテル 鹿児島県

〔図書〕(計 2 件)

- ・ 1. 原田憲一. 肝臓を診る医師のための肝臓病理テキスト (南江堂 2013 年 5 月、総ページ数 315 頁) 章：非腫瘍疾患 B. 自己免疫性肝炎 (P89-94), 2. 原発性硬化性胆管炎 (P143-7) b. IgG4 関連硬化性胆管炎 (IgG4 関連炎症性偽腫瘍も含む) 3. その他の二次性硬化性胆管炎、胆管系疾患 (P148-50)
- ・ 2. 原田憲一、中沼安二. キーワードとアルゴリズムで捉える：肝胆膵の実践病理診断 (文光堂 2013 年、総ページ数:240 頁). 第 2 章 非腫瘍性胆管・胆嚢疾患 (P41-64) . 総論：診断アプローチ A. 胆管硬化 B. 胆管拡張と嚢胞 C. 胆石症 D. 胆管周囲付属腺 E. Rokitansky-Aschoff 洞(RA 洞), . 各論：代表的な疾患 A. 硬化性胆管炎 B. 胆管拡張症と嚢胞性疾患 C. 胆嚢炎 D. 腺筋腫症 E. 膵胆管合流異常 F. 乳頭部炎

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 憲一 (HARADA KENICHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30283112

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：