

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461015

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変(PBC)における肝繊維化の機序とサイトカインの検討

研究課題名(英文) Mechanism of hepatic fibrosis and cytokines in primary biliary cirrhosis (PBC).

研究代表者

津田 雅庸 (Tsuda, Masanobu)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70506683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-17などは自己免疫疾患に關与するサイトカインとして知られている。原発性胆汁性肝硬変(PBC)ではIFN- $\gamma$ とIL-17の増加が知られている。今回、PBCの人工産物(Xenobiotics：20A-BSA)動物実験モデルにおいて、IL-17の關与についての検討を行った。結果IFN- $\gamma$ 、IL-12p40の欠損マウスではPBC様病態の抑制が確認された。IL-17欠損マウスでも限定的ではあるが抑制が確認されまたAMAの産生も抑制された。これらの結果よりPBCの病態形成にはIL-12 / IFN- $\gamma$ の活性化が必要であり、さらにIL-17もその作用を増強することが解明された。

研究成果の概要(英文)：Increased expression levels of IFN- $\gamma$  and increased frequency of IL-17-producing lymphocytes in liver tissues had been reported from patients with primary biliary cirrhosis. In the present study, mice are immunized with 20A-BSA, to test the hypothesis that IL-17 potentiates Th1-mediated autoimmune cholangitis induced by 20A-BSA immunization. A complete suppression of cholangitis manifestations, including production of antimicrobial autoantibodies, portal inflammation, bile duct damage and granuloma formation, was observed in either IL-12p40 or IFN- $\gamma$  deficiency mice, but not in IL-17 deficiency mice immunized with 20A-BSA. While deletion of IL-17 significantly reduced portal cellular infiltrates and bile duct damage and decreased production of antimicrobial autoantibodies (AMA) at eight weeks after 20A-BSA immunization. These data suggest that autoimmune cholangitis requires activation of the IL-12/IFN- $\gamma$  pathway and IL-17 potentiates IL-12/IFN- $\gamma$ -mediated autoimmunity.

研究分野：免疫

キーワード：PBC IL-12 IL-17 サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は中等大の小葉間胆道・隔壁胆管にみられる慢性非化膿性破壊性胆管炎(CNSDC)を主体とする自己免疫疾患であり、中年以降の女性に好発し、皮膚掻痒症で初発することが多く、門脈圧亢進症状をきたし最終的には肝硬変となる難治性の肝疾患である。今回 PBC の動物実験モデルを使用し、PBC におけるサイトカインの関与を解析し治療へと結びつく病態解明を試みるべく新たな研究を行った。

### 2. 研究の目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は主に中年女性に好発しほぼ 100%の症例で抗ミトコンドリア抗体(AMA)が出現する。AMA の主たる対応抗原はミトコンドリア内膜のピルビン酸脱水素酵素複合体(PDC)の E2 subunit(PDC-E2)であり、AMA や抗 PDC-E2 抗体の出現は PBC の診断に極めて有用である。臨床的には皮膚掻痒症で初発することが多く、胆道系酵素の上昇と病理組織学的には小葉間胆管への慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする臓器特異的自己免疫疾患であり、病期が進行した場合肝臓移植の適応があり、現在本邦では難病指定となっている。治療は自己免疫疾患であるにもかかわらず、ステロイド治療は効果なく、根治的な治療が確立していない。

近年種々の疾患でゲノムワイド関連解析(genome-wide association study = GWAS)が可能となり、PBC 発症と関連する新たな疾患感受性遺伝子(IL-12A, IL-12 receptor beta 2(IL-12RB2), signal transducer and activator of transcription(STAT4)が同定された(Hirschfield GM et al: N Engl J Med 2009)が、このことも PBC においてサイトカイン、特に IL-12 が病態にとって重要な働きをしていることを示唆している。

IL-12 はナイーブ T 細胞をインターフェロン(IFN)- $\gamma$  を産生する Th1 へと分化させるのに必須のサイトカインであり、p35 サブユニットと p40 サブユニットから構成される。p40 サブユニットは IL-12 以外にも IL-23 の構成成分であり、IL-23 はナイーブ T 細胞の Th17 の増殖に必須のサイトカインと言われており、IL-17 と自己免疫疾患とは病態形成に密接に関与している。遺伝子改変動物を用いた自然発症モデルとしては増殖因子の一つである Transforming growth factor(TGF)- $\beta$  のシグナルが T 細胞に選択的に入らないように改変したモデル(dnTGF II マウス)で PDC-E2、BCOADC-E2、OGDC-E2 を抗原とする AMA をほぼ全例に認め、病理組織としては、門脈域への CD8<sup>+</sup> T 細胞を中心とするリンパ球浸潤、小葉間胆管障害を起こし、血清中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12p40、IL-6 の産生が更新する (Oertelt S et al: J Immunol 2000)。このマウスの解析では、肝臓に浸潤した T 細胞は dnTGF $\beta$ RII

マウスに比べ Th17 産生 T 細胞が優位に多く、また CD3/28 の刺激により IL-17 の産生が上昇していた。線維化の進行をもたらしただ原因の追求は PBC のみならず、他の肝疾患での線維化の原因解明と治療に非常に有用である。

そこで PBC の病態を解明すべく、人工産物(Xenobiotics)の免疫による獲得型モデルを使用し、Th17 の PBC 病態への関与を検証するため、また IL-17 の関連を検証するため今回の研究を計画した。

### 3. 研究の方法

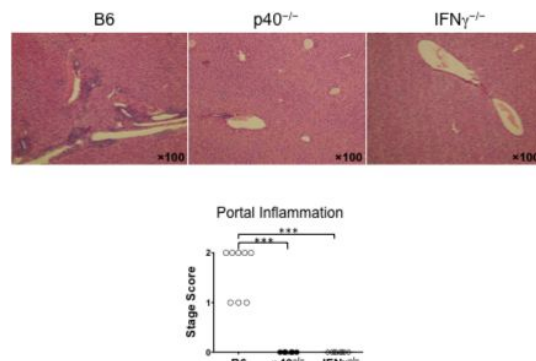
人工産物(Xenobiotics)の免疫による獲得型モデルで 2-octynoic acid(2-OA) 使用し PBC 類似病態を作り出すモデルマウスを使用した(図 1)。PBC の病理組織としては、門脈域への CD8<sup>+</sup> T 細胞を中心とするリンパ球浸潤、小葉間胆管障害を起こし、血清中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12p40、IL-6 の産生が更新することを見つけた(Oertelt S et al: J Immunol 2000)

まず Th1 へ分化する過程、IFN- $\gamma$ 、IL-12p40 の関与を検証するため、6~8 週齢の C57BL/6、p40 KO、IFN- $\gamma$  KO マウスに BSA と結合した 2-OA(100  $\mu$ g)、アジュバントとして Complete Freund's adjuvant(CFA)(50  $\mu$ g)、さらに pertussis toxin(PTX)(100ng)とともに腹腔内に投与を行う(Day0)と共に血液の採取を行う。コントロールとして C57BL/6 に BSA(100  $\mu$ g)、CFA(50  $\mu$ g)、PTX(100ng)の投与を行う。ここで使用する 2-OA は PDC の補因子として働くりポ酸と類似構造を持つ化粧品などに含まれる成分で、2-OA 自身は PBC 患者の抗 PDC-E2 抗体により効率良く認識される。

### 4. 研究成果

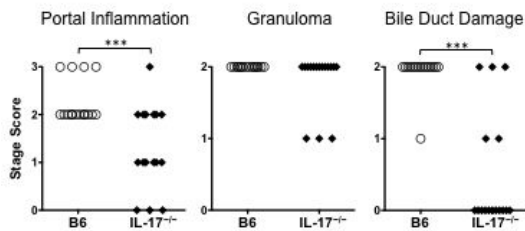
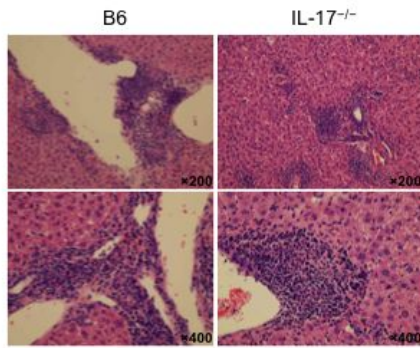
この実験ではコントロール群に比較し、両群とも完全に門脈域への炎症性細胞浸潤は抑制されていた。

INF を抑制することにより PBC 類似病態の抑制が得られ、さらに Th1 細胞への分化に必須である IL-12P40 を抑制することでも PBC 類似病態の発症は抑制された。



この P40 は IL-23 にも共通のサブユニットとして存在し、IL-23 は Th17 細胞の分化を誘導する。このため Th17 の関与を明確にするため次に同様の実験を IL-17A KO マウスを用い

て同様に行った。結果コントロールマウスに比べて、門脈域への炎症細胞浸潤、胆管破壊像のある程度の抑制効果を認めた。



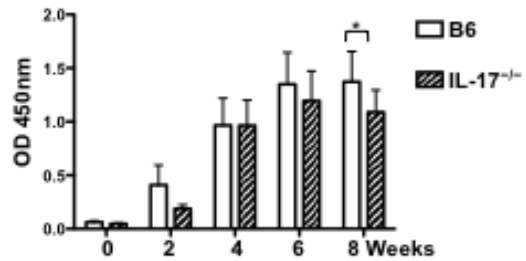
さらに IL-17 の病態への関与を明らかにすべく、肝臓は Phosphate Buffered Saline (PBS) で灌流した後、ホモジェナイズし比重遠心法でリンパ球を抽出。同時に脾臓も同様にして単核球の抽出を行った。単核球は flow cytometer を使用し CD8a、CD4、NK1.1、CD19、TCR、CD44、CD62L で細胞表面マーカーの染色を行った。

脾臓ではコントロール群、IL-17KO 群とも細胞浸潤に差はなかったが、肝臓では細胞浸潤に差を認めた (図 5)。また CD4T 細胞、CD8T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞数を確認したところ、IL-17KO マウスの幹細胞でのみ、NKT 細胞と NK 細胞数の低下を認めた。

さらに細胞の機能を検査するため肝臓に浸潤した単核球を RPMI に 10% fetal bovine serum (FBS) を加えた培養液の中で CD3/28 で刺激し 72 時間培養を行う。共培養後には培養上清を回収し Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) あるいは cytometric bead array (CBA) kit を使用し各種サイトカインの測定を行った。IL-17KO マウスではコントロールマウスに比べ、INF、IL-6、IL-10 の産生が低下していた。

マウス血清は Day0、2 週、4 週、6 週、8 週にそれぞれ recombinant PDC-E2 を使用し ELISA 法で力価の測定を行ったところ、IL-17KO マウスでは 8 週に抗 PDC-E2 抗体の産生が低下していた。

Anti-PDC-E2 Ab



昨今自己免疫に重要な IL-12 / INF - Th1 に至る経路が PBC モデルマウスでも重要な働きがあり、この研究では INF 経路を遮断することにより PBC 類似病態は完全にブロックされ、その Th1 反応に当たる IL-12p40 を欠損させることにより同様の結果となった。さらに IL-12p40 は IL-23 のサブユニットでも有り、IL-17 の OBC 類似モデルで検討したところ、他の自己免疫疾患でも必要な働きを示す IL-23 / IL-17 経路が PBC モデルマウスでも IL-17 によりその作用が増強されることが証明された。今後さらに IL-23 が単独でどのように病態形成するのか確認する必要がある。

今回の研究では繊維化の機序までは確かめることはできなかったが、今後繊維化の機序についてもさらなる検討を行う予定としている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

津田 雅庸 (TSUDA Masanobu)  
愛知医科大学医学部 教授  
研究者番号：70506683

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )