

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～ 2008

課題番号：18590325

研究課題名（和文）

原発性胆汁性肝硬変における胆管消失発生の分子機構：胆管細胞老化の関与を中心に

研究課題名（英文）Pathogenesis of progressive bile duct loss in primary biliary cirrhosis: A possible involvement of cellular senescence

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

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学 再生医学 細胞老化 原発性胆汁性肝硬変 胆管上皮細胞 免疫組織化学

1. 研究計画の概要

本研究では、PBC における胆管消失発生の分子機構を胆管細胞老化の関与を中心に解明する。具体的には、①PBC の小型胆管と細胆管における胆管細胞老化の発生状況を検討する。細胞老化の指標として senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 発現, p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} の発現亢進, 細胞周期マーカー (cyclin D, cyclin A など) 発現の解析を用いる。②PBC における胆管細胞老化は、テロメア依存型 (replicative senescence) であるか、テロメア非依存型 (premature senescence) であるかについて、Q-FISH 法を用いて検討する。③PBC における胆管細胞老化の誘導因子について、酸化ストレスと polycomb group repressor: bmi1 の関与を中心に検討する。④胆管細胞の培養系で、酸化ストレスやサイトカイン付加、マクロファージとの共培養により胆管細胞の細胞老化誘導を試みる。また、細胞老化誘導の分子機構を検討してアポトーシス誘導機構との相互作用を検討する。さらに、老化胆管細胞の長期培養を行って、老化細胞の運命を検討する。⑤早老症, bmi1 欠損, 酸化ストレス高感受性マウスなどの候補マウスを用いて実験的に胆管炎を発生させることにより、胆管細胞老化による胆管消失モデルマウス作製を試みる。

2. 研究の進捗状況

本研究では、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における胆管消失発生の分子機構における胆管細胞老化の関与について検討を進めている。

①PBC の小型胆管と細胆管における胆管細胞

老化の検討:PBC と対照疾患肝, 正常肝の人体材料 (計 110 症例) を用いて、細胞老化の指標である SA- β -gal 発現, 老化関連 p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} の免疫組織化学的発現状況を検討した。PBC の障害肝内小型胆管では高率に細胞老化マーカーの発現を認めた。また、同部の胆管は cyclin D1 発現を示し、老化胆管細胞は明らかに G1 アレスト状態にあることが示された。

さらに、Q-FISH 法にて PBC と対照疾患肝の胆管細胞におけるテロメア長測定を行った。PBC では胆管炎部の傷害胆管において、非傷害胆管、対照疾患肝の小型胆管と比較して有意なテロメア長短縮を認めた。PBC の細胆管においても同様の傾向を認めた。傷害胆管におけるテロメア長短縮は、老化関連マーカー:p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} 発現亢進、DNA 損傷マーカー: γ H2AX の発現を概ね相関していた

②胆管細胞老化の分子機構: 培養胆管細胞を用いた検討: 当教室で株化したラット・マウス培養胆管細胞株を用いてコラーゲンゲル上 2 次元培養, コラーゲンゲル内 3 次元培養を行い、酸化ストレス (H₂O₂ 添加) や炎症性サイトカイン (TNF- α , IFN- γ など) の付加により細胞老化の誘導を試みた。酸化ストレスや炎症性サイトカイン付加により胆管細胞に細胞老化が誘導された。また、細胞老化誘導分子機構には p16^{INK4a} 発現抑制因子 bmi1 発現低下、ATM (ataxia-telangiectasia

mutated) /p53/p21 経路経路が関与することが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進捗している

(理由) 当初の研究計画の内、PBC と対照肝の人体材料を用いた検討で、PBC の小型胆管と細胆管には、各種のマーカーを用いた検討により、高率に細胞老化が認められること、酸化ストレスが細胞老化に関与することが明らかになった。また、培養胆管細胞を用いた検討では、酸化ストレスや炎症性サイトカインによる細胞老化誘導の分子機構の一端が明らかになった。

4. 今後の研究の推進方策

当初の研究計画の内、まだ十分に検討が進んでない以下の項目について検討を進める予定である。1) 炎症細胞との共培養による胆管細胞老化の誘導：マクロファージ、好中球などの炎症細胞と胆管細胞の共培養を行い、胆管細胞における酸化ストレス付加の状況と細胞老化の発生を検討する。2) 細胞老化誘導の分子機構とアポトーシス誘導機構との相互作用を検討する。3) 老化胆管細胞の長期培養を行って、老化細胞が細胞死に至る経路（アポトーシスか、アノイキスか、ネクローシスか）を検討する。

5. 代表的な研究成果

(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 8 件)

1. Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, et al. Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology* 2008;48:186-195. 査読有
2. Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, et al. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. *Free Radic Res* 2008;42:625-632. 査読有
3. Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y.

Activation of ATM signaling pathway is involved in oxidative stress-induced expression of mito-inhibitory p21^{WAF1/Cip1} in chronic non-suppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study. *J Autoimmun* 2008;31:73-78. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Sasaki M, et al. Cellular senescence of bile ductular cells may be involved in the pathophysiology in ductular reactions in chronic liver diseases. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (November 1st, 2008, San Francisco)
2. Sasaki M, et al. Cellular senescence of biliary epithelial cells characterizes the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (November 1st, 2008, San Francisco)