

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590775
 研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変の発症および病態形成に關与する自然免疫と獲得免疫の解析
 研究課題名(英文) Innate and acquired immunity for primary biliary cirrhosis

研究代表者
 下田 慎治 (Shimoda Shinji)
 九州大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：30279319

研究成果の概要：

生体肝移植時の摘出肝より樹立した胆管上皮細胞株においてCD40、HLA DRの発現はTLRリガンド3刺激で亢進した。またプロテインアレイでサイトカイン、ケモカインの産生を確認した結果、GCP-2、ENA-78、GRO-a、IL-8の産生を自発的に認め、TLRリガンド3で刺激した場合のみRANTES、MIP-1a、MIP-1b、IP-10の産生亢進を認めた。次に肝臓浸潤リンパ球と自己胆管上皮細胞株を共培養後、胆管上皮細胞株の細胞表面マーカーやサイトカイン、ケモカインの産生を再度検討した。その結果PBCでは対照と比較して有意にCD40、HLA DRの発現亢進を認め、TLRリガンド3で刺激した場合のRANTES、MIP-1a、MIP-1b、IP-10の産生亢進を認めた。

次にIL-2刺激を加えた単核球が自己胆管上皮細胞を標的細胞とした場合に細胞傷害活性を持つことを明らかとした。さらにこの細胞傷害活性が、IL-2に代えて、特定の2つのTLRリガンドを組み合わせた刺激でも代替可能であった。IL-2刺激を加えた末梢単核球分画のうち、イムノビーズでセルソーティングを行いCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞に分けて検討した結果、CD4陽性T細胞分画には傷害活性がないことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：免疫学、細胞組織、臨床、肝臓

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は主に中年女性に好発し胆道系酵素の上昇と特異的な抗ミトコンドリア抗体の出現、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で、現在本邦では症候性のPBCは難病指定となっている。また抗ミトコンドリア抗体の対応抗原としてミト

コンドリア内膜に存在するピルビン酸脱水素酵素E2コンポーネント(PDC-E2)やオキソグルタル酸脱水素酵素E2コンポーネント(OGDC-E2)などが同定されている。

一方自己免疫疾患の発症の機序として、古くから感染症との関係が示唆されてきた。すなわち顕性、不顕性を問わず、感染症発症後の病原体抗原と自己抗原との間に分子相同性(molecular mimicry)があるため、一旦病原体抗原に対して活性化された獲得免疫系が、その後分子相同性のある自己抗原の認識を開始するため自己免疫疾患が発症するという概念である。この概念に従っておもにT細胞の認識する多くの分子相同性のある病原体抗原エピトープと自己抗原エピトープが同定されてきた。

我々も、(1)自己抗原反応性CD4陽性T細胞はPDC-E2の163-176アミノ酸残基をHLA DR 53拘束性に認識すること(J.Exp.Med. 95 Shimoda et al)(2)PDC-E2 163-176に反応するT細胞は分子相同性の機序で多くの細菌をはじめとする外来抗原と交差反応性を示すこと(Hepatology 00 Shimoda et al)(3)PDC-E2 163-176に反応するT細胞は外来抗原のみならず、Gp210タンパクなどの核内の自己抗原とも交差反応性を示すこと(Gastroenterology 03 Shimoda et al)(4)大腸菌OGDC-E2に反応するT細胞がPBC患者の末梢や肝臓内に存在し、大腸菌OGDC-E2抗原反応性T細胞はヒトPDC-E2抗原やOGDC-E2抗原と交差反応性を示すこと(Journal of Autoimmunity 03 Tanimoto et al)など、PBCにおけるCD4陽性T細胞の自己抗原エピトープの探索を端緒として、外来抗原との交差反応性やPBCで見られる抗核抗体の対応抗原との交差反応性をT細胞レベルで示すことで、多彩な免疫反応を共通したCD4陽性T細胞が担っている可能性を報告してきた。しかし、自己免疫疾患モデル動物において自己抗原反応性T細胞を移入するだけでは自己免疫疾患は発症しにくく、ここに自然免疫の初動に働くToll-like receptor (TLR)からの刺激が加わることで自己免疫疾患が発症しやすくなることが明らかとなってきた(Nat. Med. 03 Eriksson U, et al、 Nat. Med. 05 Lang K S, et al、 J.I. 05

Visser L, et al、 J.Clin.Inv. 06 Prinz M, et al、 など)。すなわち自己免疫疾患の発症には分子相同性の機序で活性化された自己抗原反応性T細胞の存在に加えて自然免疫自体が活性化されることが重要なのであるということが明らかとなりつつあった。

現在までに PBC での自然免疫の関与を報告した論文として PBC では対照との比較で(1)TLR リガンド刺激により末梢 B 細胞の IgM 産生が亢進(Kikuchi K, Gastroenterology. 2005)(2)TLR リガンド刺激により末梢単核球のサイトカイン産生が亢進(Mao TK, Hepatology 2005)(3)胆管上皮細胞ではTLR2,3,4の発現を認めるがPBCでの傷害胆管ではTLR3の発現が亢進(Takii Y, Lab Invest. 2005)などがあり、PBCにおいても自然免疫自身がPBC発症や病態の一端を担っている可能性が示唆されてきた。

2. 研究の目的

PBCにおける自然免疫と獲得免疫の関係

3. 研究の方法

(1)胆管上皮細胞の分離、継代培養。培養後のTLRリガンドで刺激した際のCD40、HLA DR発現の変化やサイトカイン・ケモカインの測定。自己単核球と共培養後のCD40、HLA DR発現の変化やサイトカイン・ケモカインの測定。

胆管上皮細胞の分離、継代培養は、肝臓移植時に摘出した新鮮な肝臓検体を無菌的にミンス、2時間1mg/dlの1型コラゲナーゼで処理後、比重勾配法で単核球分画を分離し、ダイナビーズ付の上皮特異的抗体を用いて免疫磁氣的に胆管上皮細胞を分離する。単核球分画は凍結保存し後の研究に使用する。回収した胆管上皮細胞は専用メディアウムで培養増殖後、順次凍結し、実験の必要に応じて解凍して使用する。CD40、HLA DRの発現はRT-PCR法を用いてGAPDHとの比較で測定する。胆管上皮細胞の産生するサイトカイン・ケモカインはまず174種の識別ができるプロテインアレイで網羅的に解析後、対象とするサイトカイン・ケモカインを絞り込み後に各々をELISAで検討する。次に先に凍結していた自己単核球を解凍後胆管上皮細胞と共培養し、CD40、HLA DRの発現やサイトカイン・ケモカイン産生の変化を測定する。

(2) 自己胆管上皮細胞に対する自己リンパ球による細胞傷害活性の検討

自己の胆管上皮細胞に対して細胞傷害活性を認める自己リンパ球を探索する目的で、自己単核球を用いて、(1)そのままの分画を用いて検討、(2)この分画から regulatory T細胞分画(CD4陽性CD25陽性細胞)をイムノビーズで省いて検討、(3)regulatory分画を省いた後抗CD3抗体で細胞を増やして検討、(4)regulatory分画を省いた後IL-2で細胞を刺激して検討を行う。(1)から(4)の検討の系に胆管上皮細胞はあらかじめIFN- γ 刺激でHLA class IIの発現も亢進させていると傷害活性が出やすいか否かを観察する。また(1)から(4)のアッセイ系に自然免疫の関与を考慮してTLRリガンドの刺激も同時に添加して検討する。

上記の検討で細胞傷害活性が認められた場合、どの細胞集団が傷害活性を行っているのか、主に細胞表面マーカーでCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、CD56陽性細胞(主にNK細胞)にわけて検討する。

4. 研究成果

生体肝移植時の摘出肝よりこれまで当研究室で樹立した胆管上皮細胞株においてCD40、HLA DRの発現はTLRリガンド3の刺激で亢進、TLRリガンド2,4,5の刺激では変化なかった。またリガンド刺激前後でPBCと対照においても有意差を認めなかった。次に胆管上皮細胞株1株を例にとりプロテインアレイでTLRリガンド刺激前後でのサイトカイン、ケモカインの産生を確認した結果、GCP-2、ENA-78、GRO- α 、IL-8の産生を刺激前から認め、TLRリガンド3で刺激した場合のみRANTES、MIP-1a、MIP-1b、IP-10の産生亢進を認めた。次に上記恒常的に産生されるケモカイン4種とリガンド刺激で産生されるもの4種についてPBCと対照で差をみとめるかELISAで検討したが有意差を認めなかった。以上よりPBCでの標的細胞である胆管上皮細胞はTLRリガンド3刺激に感受性はあるもののPBCで特に有意に動く細胞表面マーカーやサイトカイン、ケモカインは認めなかった。次に胆管上皮細胞株を樹立する際に生体肝移植時の摘出肝より同時に採取し凍結保存していた肝臓浸潤リンパ球と同一症例より樹立した胆管上皮細胞株を共培養後、胆管上皮細胞株の細胞表面マーカーやサイトカイン、ケモカインの産生を再度検討した。その結果PBCでは対照と比較して有意にCD40、HLA DRの発現亢進を認め、TLRリガンド3で刺激した場合のRANTES、MIP-1a、MIP-1b、IP-10

の産生亢進を認めた。以上の結果より、胆管上皮細胞はPBCの場合、自己リンパ球から刺激をうけてより標的細胞としての特性を獲得し、かつ攻撃細胞を引き寄せる働きを持つことが明らかとなった。

次にIL-2刺激を加えた単核球が自己胆管上皮細胞を標的細胞とした場合に細胞傷害活性を持つことを明らかとした。細胞傷害活性は通常のCrリリースアッセイで確認した。さらにこの細胞傷害活性が、IL-2に代えてTLRリガンドの刺激で代替できるかを検討した。その結果単独で細胞傷害活性を認めたTLRリガンドはなかったが、特定の2つのリガンドを組みあわせて刺激を行っても細胞傷害活性を認めた。他のリガンドの組み合わせでは細胞傷害活性は認めなかった。最後にIL-2刺激を加えた末梢単核球分画のうち、イムノビーズでセルソーティングを行いCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞に分けて検討した結果、CD4陽性T細胞分画には傷害活性がないことが明らかとなった。

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3件)

- A. Kawano, Shimoda S et al. Peripheral Tolerance and the Qualitative Characteristics of Autoreactive T Cell Clones in Primary Biliary Cirrhosis. The Journal of Immunology 2007. 3315-3324.
- B. Shimoda S, et al. CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. J Autoimmun. 2008. 110-115
- C. Shimoda S, et al. Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis: the role of liver-infiltrating mononuclear cells. Hepatology. 2008. 958-965

[学会発表](計6件)

- (1)下田慎治 他。原発性胆汁性肝硬変(PBC)における自然免疫の関与。第43回日本肝臓学会総会。2007年5月31日。東京。
- (2)下田慎治 他。原発性胆汁性肝硬変における自然免疫の関与についての解析。第93回日本消化器病学会総会。2007年4月21日。青森。

(3) 下田 慎治。原発性胆汁性肝硬変における自己反応性 T 細胞の末梢寛容と質的特長。2007 日本免疫学会総会。2007 年 11 月 22 日。東京。

(4) 下田 慎治。原発性胆汁性肝硬変の発症機構と病態。第 44 回日本肝臓学会総会。2008 年 6 月 6 日。松山。

(5) 下田 慎治。原発性胆汁性肝硬変から樹立した培養胆管細胞の解析。第 94 回日本消化器病学会総会。2008 年 5 月 10 日。福岡。

(6) 下田 慎治。REDEFINING AMA NEGATIVE PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS。第 59 回アメリカ肝臓学会(AASLD)。2008 年 11 月 1 日。San Francisco。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 慎治 (SHIMODA SHINJI)
九州大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30279319

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：