

機関番号：32651
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20790515
 研究課題名（和文） PBCの病態形成には胆管上皮細胞のオートファジーによる自己抗原提示が関与する
 研究課題名（英文） The role of autoantigen presentation by autophagy of biliary epithelial cell in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis.
 研究代表者
 天野 克之（AMANO KATSUSHI）
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：70424645

研究成果の概要（和文）：

原発性胆汁性肝硬変症（PBC）の病態形成への、胆管上皮細胞（BEC）のオートファジーによる自己抗原提示の関与の有無を明らかにする目的で検討を行った。その結果、LPS、CpGDNA添加によりBECのオートファジーが誘導され、MHC class IIの発現はみられたがPDCE₂発現はみられなかった。またオートファジー細胞死BEC 貪食樹状細胞によるPDCE₂特異的寛容誘導はなかった。さらにPBC動物モデルの発症前にオートファジー細胞死BECを貪食させた樹状細胞を投与すると胆管病変は軽度改善したが有意差はなく、発症後の投与では胆管病変の改善は全く認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

The role of autoantigen presentation by autophagy of biliary epithelial cell (BEC) in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis was analyzed. Autophagy of BEC was induced by LPS or CpGDNA stimulation and the expression of MHC class II antigen on BEC was induced. PDCE₂ specific immunological tolerance was not induced in vitro by immunization of dendritic cell which take autophagy induced BEC. When dendritic cell which take autophagy induced BEC was administered to the animal model of PBC before the bile duct damage was take place, inflammation with bile duct damage was slightly improved compared with control. However, such improvement was not observed when dendritic cell which take autophagy induced BEC was administered after the bile duct damage was take place. ,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：PBC、胆管細胞、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変症（PBC）の病態はまだ不明な点が多い。これまでに疾患特異的自

己抗体の抗ミトコンドリア抗体がミトコンドリア内膜に存在するピルビン酸脱水素酵素 PDCE₂ を認識すること、肝内、末梢血に

における PDCE₂ 反応性 T 細胞の存在、胆管上皮細胞 (BEC) 表面における PDCE₂ の発現、などが明らかとなったが、PDCE₂ 反応性 T 細胞の活性化機序、ミトコンドリア内膜酵素の PDCE₂ が BEC 表面に発現する機序は不明である。

近年、細胞が感染やストレスなどに遭遇した際に生じる現象であるオートファジーの免疫反応への関与が注目されている。まず、オートファジーにより自己抗原を含む細胞質成分が MHC class II 分子を介して CD4 細胞へ抗原提示されることが明らかにされた。一方、細胞がおかれた環境によりオートファジーは細胞死を誘導するが、樹状細胞などがオートファジー死細胞を食食すると細胞成分に対する免疫寛容を誘導することが明らかにされた。このように、オートファジーは細胞がおかれた環境の差異により、抗原提示による免疫反応活性化、細胞死誘導とその食食を介した寛容誘導、という正反対の免疫応答を惹起し得る。

PBC の BEC には PDCE₂ および MHC class II の発現がみられるため、病態形成の初期過程で BEC が PDCE₂ を CD4 細胞に抗原提示している可能性が指摘されているが、その詳細な分子機序は明らかでない。

オートファジーは細胞が飢餓、感染などの環境変化に遭遇した際に、自らの恒常性維持のため細胞質タンパクを分解処理する現象だが、近年オートファジーの免疫反応への関与が明らかにされた。特に注目されているのが、オートファジーによる class II 分子を介した細胞内タンパクの CD4 細胞への抗原提示で、この興味深い現象はオートファジー誘導時にみられる細胞内タンパクの class II 分子結合の増強、オートファジー抑制による class II 分子による CD4 細胞へ抗原提示の減少などの事実により明らかにされた。

オートファジーにより抗原提示されるタンパクは主に半減期の長い内在性タンパクだが、細胞質タンパクのみならずミトコンドリアなどの細胞内小器官成分もオートファジーにより処理され抗原提示される。またオートファジーによる抗原提示は樹状細胞などの抗原提示細胞のみならず組織上皮細胞でも生じることが明らかにされた。さらにマクロオートファジーとともに抗原提示に関わるとされるシャペロン介在性オートファジーでは、シャペロン分子 hsc70 が認識する KFERQ モチーフ含有タンパクの抗原提示が報告されている。

こうした事実により、感染・炎症などの環境変化に遭遇して class II 分子発現が増強した BEC が、オートファジー誘導によりミトコンドリア内膜に存在する PDCE₂ を細胞表面に提示し、CD4 細胞を活性化し PBC の初期病態を形成するという仮説が提唱される。

感染・炎症時に増強する IFN γ などの Th1 サイトカイン、TLR シグナルによるオートファジー誘導増強の事実は、この仮説の可能性を裏付けている。

2. 研究の目的

本研究では、「PBC の病態形成への BEC のオートファジーの関与」の解明を目的に以下の検討を行った。

1) BEC がオートファジーにより抗原提示細胞として機能する可能性の検討

BEC がオートファジーにより PDCE₂ を抗原提示し CD4 細胞を活性化する可能性を、ヒト PBC の肝内での BEC のオートファジー動態の解析、オートファジーを誘導したマウス BEC による PDCE₂ 特異的免疫応答誘導の解析、により検討する。

2) BEC がオートファジーにより抗原提示または免疫寛容を引き起こす細胞外環境の検討

サイトカイン、TLR 刺激などのオートファジー誘導因子で BEC を刺激した際の、BEC による PDCE₂ 提示および (細胞死誘導を介した) 寛容誘導動態を検討し、いかなる細胞外環境が BEC のオートファジーを介した抗原提示または寛容誘導を惹起するか明らかにする。

3) BEC によるオートファジー細胞死を介した寛容誘導を応用した免疫制御療法の検討

PBC 自然発症動物モデル (NOD.c3c4 マウス) を用い、オートファジー細胞死した BEC による *in vivo* での寛容誘導と病態改善を検討し、新たな免疫制御療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト PBC における BEC のオートファジー動態の検討

① PBC 症例の肝生検組織を用いた BEC のオートファジー動態の形態学的検討

* 電子顕微鏡による形態学的検討

オートファジーが生じた細胞内では二重膜構造体のオートファゴソームが特徴的に認められるため、ヒト PBC の BEC 内におけるオートファゴソームの存在を検討する。

* LC3 をマーカーに用いた免疫電子顕微鏡による検討

ユビキチン類似タンパク LC3 はオートファジーで出現する隔離膜、オートファゴソーム内膜に特異的に結合するためオートファジーのマーカーとなる。そこで抗ヒト LC3 モノクローナル抗体 (MBL 社) を用いた免疫電顕法により、BEC における LC3 発現を検討する。

(2) オートファジーを誘導した BEC による PDCE₂ 抗原提示動態の検討

① マウス BEC の分離

5 週齢の雄性 NOD マウスの門脈からコラゲナーゼ含有培養液を注入し還流した肝臓を

ホモジナイズし、比重密度遠心法と HEA125 抗体を用いたイムノビーズ法により BEC を分離する。

②BEC のオートファジー誘導

通常のオートファジー誘導法である培養液からの血清・アミノ酸除去、IFN γ の添加、TLR4 リガンド LPS の添加、TLR9 リガンド CpGDNA の添加による、BEC のオートファジー誘導を検討する。

オートファジー誘導は、免疫電顕法を用いた LC3 発現検討により定性的に、ウエスタンブロットによるオートファジーで誘導されるオートファゴソーム膜分画タンパク LC3-II (発現量とオートファゴソーム量に正の相関有り) の発現検討により半定量的に評価する。

③オートファジーを誘導した BEC の細胞表面における MHC class II、PDCE₂ 発現動態

FACS 解析により、細胞表面における MHC class II、PDCE₂ の発現動態を検討する。

④オートファジーによる PDCE₂ 細胞表面発現誘導の分子機序

シャペロン介在性オートファジー (CMA) の関与を明らかにするため、まず PDCE₂ タンパクのアミノ酸シークエンスにおけるシャペロン分子 hsc70 が認識する KFERQ モチーフの存在を検討する。ついで CMA による抗原提示に不可欠な hsc70、Lamp2a の抑制性モノクローナル抗体投与による、オートファジーを介した PDCE₂ 細胞表面発現誘導の阻害を検討する。

⑤オートファジーを誘導した BEC による PDCE₂ 特異的免疫応答誘導

オートファジー誘導 BEC と混合培養したナイーブ CD4 細胞の PDCE₂ および OVA に対する増殖反応、サイトカイン産生を ³H-Thymidine assay、マイクロビーズアッセイにより検討し、PDCE₂ 特異的免疫応答誘導を検討し、MHC class II 阻害抗体添加による反応阻害も検討する。さらにオートファジー抑制因子 3-methyl adenine (3MA) 添加によりオートファジー誘導を抑制した BEC と混合培養したナイーブ CD4 細胞を用い同様の検討を行い、オートファジーの関与を確認する。

(3) オートファジー細胞死 BEC による PDCE₂ 特異的免疫寛容誘導の検討

①オートファジー細胞死を誘導する因子の検討

オートファジー細胞死は、過度のオートファジーが生じる環境や薬剤により誘導されるとされている。そこで「オートファジー誘導」実験で用いた IFN γ 、LPS、CpGDNA の高濃度刺激、オートファジー誘導作用を有するラパマイシン、血管内皮細胞のオートファジー細胞死を誘導するエンドスタチン、口腔上皮細胞のオートファジー細胞死を誘導する 5-FU を単独および併用刺激による BEC のオー

トファジー細胞死について検討する。

オートファジー細胞死誘導の評価は、電顕による観察でオートファジー細胞の特徴に加え細胞膜 Blebbing を確認するとともに、sucrose sequestration test により定量的に行う。

②オートファジー細胞死 BEC 貪食樹状細胞による PDCE₂ 特異的寛容誘導の検討

骨髓細胞より MACS 分離キットを用い未熟樹状細胞を分離、分離後すみやかにオートファジー細胞死 BEC と混合培養してオートファジー細胞死 BEC を貪食させる。なお、混合培養前にオートファジー細胞死 BEC をホスファチジルセリン処理し、樹状細胞による貪食の増強をはかる。

ついでオートファジー細胞死 BEC 貪食樹状細胞と、あらかじめ *in vitro* でナイーブ CD4 細胞を PDCE₂ または OVA で刺激して得た PDCE₂ 特異的 CD4 細胞、OVA 特異的 CD4 細胞をそれぞれ混合培養し、増殖反応、サイトカイン産生を ³H-Thymidine assay、マイクロビーズアッセイにより測定し、オートファジー細胞死 BEC 貪食樹状細胞による PDCE₂ 特異的寛容誘導を検討する。

(4) オートファジー細胞死 BEC 投与による PBC モデルの治療効果の検討

①治療効果の検討

T 細胞依存性胆管細胞障害を認め樹状細胞の異常がない NOD.c3c4 マウス PBC 自然発症モデル (米・UC デービス校 Garshwin 教授より供与を受ける) に、*in vitro* でオートファジー細胞死を誘導した BEC またはオートファジー細胞死 BEC を貪食させた樹状細胞を、胆管病変発症前の 5 週齢、発症後の 12 週齢時に腹腔内投与し、胆管病変の評価により治療効果を検討する。

②治療効果発現機序の解析

このモデルでは肝内 CD4、CD8 細胞浸潤を認め、脾臓 CD3 細胞の NOD-scld マウスへの受身移入により胆管病変が誘導できる。そこで上記の検討で治療効果が見られた場合は、治療を施したマウスの肝内浸潤 T 細胞の動態、脾臓 CD3 細胞の NOD-scld マウスへの受身移入による胆管病変誘導の有無を解析し、治療による胆管細胞障害を惹起する T 細胞の抑制を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト PBC における BEC のオートファジー動態の検討

①PBC 症例の肝生検組織を用いた BEC のオートファジー動態の形態学的検討

* 電子顕微鏡による形態学的検討

オートファジーが生じた細胞内では二重膜構造体のオートファゴソームが特徴的に認められるため、ヒト PBC の BEC 内におけるオートファゴソームの存在を検討したとこ

る、わずかに二重膜構造体の存在が認められた。しかし障害を受けていない BEC では二重膜構造体はほとんどみられなかった。

*LC3 をマーカーに用いた免疫電子顕微鏡による検討

ユビキチン類似タンパク LC3 はオートファジーで出現する隔離膜、オートファゴソーム内膜に特異的に結合するためオートファジーのマーカーとなる。そこで抗ヒト LC3 モノクローナル抗体を用いた免疫電顕法により BEC における LC3 発現を検討したが、LC3 は同定されなかった。

(2) オートファジーを誘導した BEC による PDCE₂ 抗原提示動態の検討

① BEC のオートファジー誘導

通常のオートファジー誘導法である培養液からの血清・アミノ酸除去、IFN γ の添加、TLR4 リガンド LPS の添加、TLR9 リガンド CpGDNA の添加による、BEC のオートファジー誘導を検討したところ、LC3 発現がみられ、ウェスタンブロットによるオートファジーで誘導されるオートファゴソーム膜分画タンパク LC3-II 発現でも同様の結果が得られた。

② オートファジーを誘導した BEC の細胞表面における MHC class II、PDCE₂ 発現動態

FACS 解析により、細胞表面における MHC class II、PDCE₂ の発現動態を検討したところ、オートファジーをおこした BEC においては MHC class II の発現はみられるものの、PDCE₂ の発現はみられなかった。

(3) オートファジー細胞死 BEC による PDCE₂ 特異的免疫寛容誘導の検討

① オートファジー細胞死を誘導する因子の検討

オートファジー細胞死は、過度のオートファジーが生じる環境や薬剤により誘導されるため、IFN γ 、LPS、CpGDNA の高濃度刺激、オートファジー誘導作用を有するラパマイシン、血管内皮細胞のオートファジー細胞死を誘導するエンドスタチン、口腔上皮細胞のオートファジー細胞死を誘導する 5-FU を用いて胆管上皮細胞 (BEC) のオートファジー細胞死について検討した。電顕による観察でオートファジー細胞の特徴に加え細胞膜 Blebbing を確認するとともに、sucrose sequestration test により定量的に評価したところ、LPS によるオートファジー誘導が最も顕著で、エンドスタチンでも軽度のオートファジー誘導が見られるが、IFN γ 、CpGDNA、ラパマイシン、5-FU ではオートファジーは誘導されなかった。

② オートファジー細胞死 BEC 貪食樹状細胞による PDCE₂ 特異的寛容誘導の検討

MACS 分離キットを用い未熟樹状細胞を分離、分離後すみやかにホスファチジルセリン処理し、樹状細胞による貪食の増強をはかっ

たオートファジー細胞死 BEC と混合培養し、オートファジー細胞死 BEC を貪食させ、ついでオートファジー細胞死 BEC 貪食樹状細胞と、あらかじめ in vitro でナイーブ CD4 細胞を PDCE₂ または OVA で刺激して得た PDCE₂ 特異的 CD4 細胞、OVA 特異的 CD4 細胞をそれぞれ混合培養し、増殖反応、サイトカイン産生を ³H-Thymidine assay、マイクロビーズアッセイにより測定し、オートファジー細胞死 BEC 貪食樹状細胞による PDCE₂ 特異的寛容誘導を検討したが、CD4 細胞の増殖やサイトカイン産生はみられなかった。

(4) オートファジー細胞死 BEC 投与による PBC モデルの治療効果の検討

① 治療効果の検討

T 細胞依存性胆管細胞障害を認め樹状細胞の異常がない NOD.c3c4 マウス PBC 自然発症モデル (米・UC デービス校 Garshwin 教授より供与を受けた) に、in vitro でオートファジー細胞死を誘導した BEC またはオートファジー細胞死 BEC を貪食させた樹状細胞を、胆管病変発症前の 5 週齢、発症後の 12 週齢時に腹腔内投与し、胆管病変の評価により治療効果を検討した。

発症前にオートファジー細胞死 BEC を貪食させた樹状細胞を投与すると胆管病変は軽度改善したが有意差はなく、発症後の投与では胆管病変の改善は全く認めなかった。また、血清中の胆道系酵素、抗ミトコンドリア抗体の抗体価は、オートファジー細胞死 BEC を貪食させた樹状細胞の投与時期にかかわらず、全く変化を示さなかった。

② 治療効果発現機序の解析

このモデルでは肝内 CD4、CD8 細胞浸潤を認め、脾臓 CD3 細胞の NOD-scid マウスへの受身移入により胆管病変が誘導できる。そこで上記の検討で、有意差はないものの発症前にオートファジー細胞死 BEC を貪食させた樹状細胞を投与すると胆管病変は軽度改善したため、治療を施したマウスの肝内浸潤 T 細胞の動態、脾臓 CD3 細胞の NOD-scid マウスへの受身移入による胆管病変誘導の有無を解析した。しかしながら、治療を施したマウスの肝内浸潤 T 細胞の動態は未治療のマウスのそれとほとんど同一であった。また、治療を施したマウスの肝内浸潤 T 細胞、脾臓 CD3 細胞を受身移入しても、いずれの場合も胆管細胞障害の惹起は抑制されなかった。

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 1 件)

① Saeki C, Nakano M, Takahashi H, Zeniya M, et al. (以下 5 名③番目): Accumulation of functional regulatory T cells in actively

inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. Clin Immunol 135:156-166.2010

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① Takahashi H et al. Insulin resistance was involved in the pathogenesis of autoimmune hepatitis without the relation to prednisone therapy. 60th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease. 2010 年 10 月 31 日 Boston, USA
- ② Takahashi H et al. Serum ALT in normal level of healthy individuals positively and independently correlates to the markers of metabolic syndrome. 45th Annual Meeting of European Association for the Study of Liver Disease. 2010 年 4 月 18 日 Vienna, Australia
- ③ Saeki C, et al. Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. 59th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease. 2009 年 11 月 4 日 Boston, USA
- ④ Saeki C et al. Increased intrahepatic Foxp3 + Treg may participate in the natural occurring recovery of experimental autoimmune hepatitis. 58th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease. 2008 年 11 月 2 日 San Francisco, USA
- ⑤ Takahashi H et al. Reciprocal changes of Tr1 and Th17 are involved in the pathogenesis of autoimmune liver diseases. 58th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease. 2008 年 11 月 2 日 San Francisco, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 克之 (AMANO KATSUSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：7 0 4 2 4 6 4 5