

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月24日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590739

研究課題名（和文） 原発性胆汁性肝硬変における胆管破壊機序の解明とその治療基盤の構築

研究課題名（英文） The mechanism of bile duct destruction in Primary Biliary Cirrhosis

研究代表者

下田 慎治 (SHIMODA SHINJI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30279319

研究成果の概要（和文）：

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は慢性非化膿性破壊性胆管炎を病理学的特徴とする臓器特異的自己免疫疾患である。今回胆管上皮細胞破壊における Toll 様受容体(TLR)リガンドとNK細胞の役割を明らかにした。TLR3 リガンド刺激で単球から産生される IFN- α の存在下で、TLR4 リガンドで刺激されたNK細胞が、自己の胆管上皮細胞を破壊する事が明らかになった。実際に肝臓由来の単球からの IFN- α 産生はPBCにおいてその他の疾患対照群と比較して亢進していた。また免疫染色の結果から破壊された胆管周囲にCD56陽性のNK細胞がPBCでより多く散在している事が明らかとなった。

次にマウスモデルを用いて、病初期の免疫誘導にNK細胞のような自然免疫攻撃細胞の果たす役割を明らかにした。NK細胞を除去すると抗ミトコンドリア抗体の産生や自己抗原反応性T細胞からのサイトカイン産生が抑制された。しかし門脈域の炎症は対照群と比較して大きな差は認められなかった。これらの結果は、PBCの病因病態は多段階あり、NK細胞は免疫寛容の破綻に関与している事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Primary biliary cirrhosis (PBC) is characterized by chronic nonsuppurative destructive cholangitis (CNSDC) associated with destruction of small bile ducts. We examined the role of Toll-like receptors (TLRs), their ligands, and natural killer (NK) cells in modulating cytotoxic activity against biliary epithelial cells (BECs). We demonstrate that Toll-like receptor 4 ligand (TLR4-L)-stimulated NK cells destroy autologous BECs in the presence of interferon alpha (IFN- α) synthesized by TLR 3 ligand (TLR3-L)-stimulated monocytes (Mo). Indeed, IFN- α production by hepatic Mo is significantly increased in patients with PBC compared to disease controls. These data are supported by the immunohistochemical observation of an increased presence of CD56-positive NK cells scattered around destroyed small bile ducts more frequently in liver tissues from PBC patients than controls.

To clarify the role of innate immune effector cells, such as natural killer (NK) cells, was studied in the mouse model based on the hypothesis that early events during immunization play an important role in the breakdown of tolerance. Following in-vivo depletion of NK cells, there is a

marked suppression of anti-mitochondrial autoantibodies and cytokine production from autoreactive T cells. However, there was no change in the clinical pathology of portal inflammation compared to controls. These data support the hypothesis that there are probably multiple steps in the natural history of PBC, including a role of NK cells in initiating the breakdown of tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

キーワード：原発性胆汁性肝硬変、自然免疫、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変(PBC)では疾患特異的に抗ミトコンドリア抗体の出現を認めることから、ミトコンドリア抗原を細胞表面に自己抗原として提示する胆管上皮細胞を獲得免疫系のT細胞が破壊する機序が想定されていた。

2. 研究の目的

PBCは慢性非化膿性破壊性胆管炎を病理学的特徴とする臓器特異的自己免疫疾患であるため、自己の胆管細胞を破壊攻撃する免疫細胞の同定を主に自然免疫担当細胞を用いて行い、獲得免疫以外の病態を詳細に明らかにする事で次世代への治療基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 当院消化器外科で施行される非代償性肝硬変での生体肝移植の際に、摘出肝臓より胆管上皮細胞と肝臓浸潤単核球を分離採取した。TLR2リガンド(LTA)、3リガンド(poly I:C)、4リガンド(LPS)、5リガンド(Flagellin)、7/8リガンド(R848)、9Aリガンド(ODN2216)、9Bリガンド(ODN2006)といった複数のTLRリガンドを組み合わせて肝臓浸潤単核球を刺激し、自己胆管上皮細胞への攻撃を⁵¹Cr リリースアッセイで検討した。

(2) 14名のPBC症例ならびに対照として健常肝臓6名、PBC以外の肝疾患22名における胆

管周囲でのNK細胞の浸潤を、NK細胞特異的細胞表面マーカーであるCD56を免疫染色した。

(3) ヒトのex vivoで得られた事象をin vivoで検証する目的でPBCモデルマウスを用いてNK/NKT細胞の関与を検討した。

4. 研究成果

(1) TLR3リガンドとTLR4リガンドの組み合わせで肝臓浸潤単核球を刺激すると自己胆管上皮細胞が傷害されることが明らかとなった。TLR3リガンドとTLR4リガンド刺激肝臓浸潤単核球よりMiltenyi Biotec社のNK細胞アイソレーションキット、CD3+CD56+NKT細胞アイソレーションキット、単球アイソレーションキット、Pan T細胞アイソレーションキットを用いて、NK細胞、NKT細胞、単球、T細胞分画を各々分離後、自己胆管細胞傷害活性を確認した結果、胆管傷害はNK細胞が行っていることが明らかとなった。TLR4リガンドで刺激されたNK細胞がTLR3リガンドで刺激された肝臓浸潤単核球の存在下で自己胆管細胞を傷害していた。TLR3リガンドで刺激された肝臓浸潤単核球からNK細胞を刺激するIFN- α が大量に産生されることが明らかとなり、これは肝臓浸潤単核球の中の単球に由来するものであった。またこのNK細胞上のTRAILが胆管上皮細胞障害に関与していることが明らかとなった。

(2) PBCでは対照と比較して有意に門脈内の小細胆管周囲にNK細胞の浸潤を認めること

が明らかとなった。次に TLR3 リガンドで刺激された肝臓浸潤単球の産生する IFN- α の産生量を PBC 症例 8 名と対照肝疾患 14 名で ELISA を用いて確認した。PBC では対照と比較して有意に単球が IFN- α を産生することが明らかとなった。

(3) NK/NKT 細胞除去群はコントロールとした PBC 発症マウスと比較したが、病初期の病理像では炎症が軽微であり NK/NKT 細胞除去群と PBC 発症マウスを比較することは困難であり、また病態が完成してからの病理像を比較した場合、両群ともに同等の病理像を呈していた。しかし、PBC 発症マウスにおいて NK/NKT 細胞除去群はコントロールと比較して、抗ミトコンドリア抗体の出現やミトコンドリア抗原に反応する T 細胞からのサイトカイン産生が遅れることが明らかになった。

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 11 件)

(1) Migita K, Ilyassova B, Kovzel EF, Nersesov A, Abiru S, Maeda Y, Komori A, Ito M, Yano K, Yatsushashi H, Shimoda S, Ishibashi H, Nakamura M: Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC. Clin Immunol. Feb;134(2):217-25, 2010(査読有)

(2) Shimoda S, Harada K, Niino H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. Hepatology. Feb;51(2):567-75, 2010(査読有)

(3) Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Horie H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Shimoda S, Ishibashi H; PBC Study Group in NHOSLJ*. Analysis of HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with primary biliary cirrhosis (PBC): The HLA-DRB1 polymorphism determines the

relative risk of antinuclear antibodies for disease progression in PBC. Hepatol Res. May;40(5):494-504, 2010(査読有)

(4) Kainuma M, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Shimono J, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study Group. Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for older patients with chronic hepatitis C. World J Gastroenterol. Sep 21;16(35):4400-9, 2010(査読有)

(5) Mitchell MM, Lleo A, Zammataro L, Mayo MJ, Invernizzi P, Bach N, Shimoda S, Gordon S, Podda M, Gershwin ME, Selmi C, LaSalle JM. Epigenetic investigation of variably X chromosome inactivated genes in monozygotic female twins discordant for primary biliary cirrhosis. Epigenetics. Jan;6(1):95-102, 2011(査読有)

(6) Harada K, Shimoda S, Ikeda H, Chiba M, Hsu M, Sato Y, Kobayashi M, Ren XS, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y: Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3 α in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Liver Int. Feb;31(2):245-53, 2011(査読有)

(7) Chen Y, Guo G, Guo S, Shimoda S, Shroyer KR, Tang Y, Wu Y. Intracellular B7-H4 suppresses bile duct epithelial cell apoptosis in human primary biliary cirrhosis. Inflammation. Dec;34(6):688-97, 2011(査読有)

(8) Shimoda S, Harada K, Niino H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. Apr;53(4):1270-81, 2011(査読有)

(9) Hashimoto N, Shimoda S, Kawanaka H, Tsuneyama K, Uehara H, Akahoshi T, Kinjo N, Taketomi A, Shirabe K, Akashi K, Lleo A, Ansari AA, Gershwin ME, Maehara Y. Modulation of CD4⁺ T cell responses following splenectomy in hepatitis C virus-related liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. Aug;165(2):243-50, 2011(査読有)

(10) Tsuda M, Ambrosini YM, Zhang W, Yang GX, Ando Y, Rong G, Tsuneyama K, Sumida K, Shimoda S, Bowls CL, Leung PS, He XS, Coppel RL, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME: Fine phenotypic and functional characterization of effector cluster of differentiation 8 positive T cells in human patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. Oct;54(4):1293-302, 2011(査読有)

(11) Shimono N, Hayashi J, Matsumoto H, Miyake N, Uchida Y, Shimoda S, Furusyo N, Akashi K. Vigorous cleaning and adequate ventilation are necessary to control an outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Infect Chemother*. Jun;18(3):303-7, 2012(査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 原発性胆汁性肝硬変における CX3CL1 産生の機序 日本消化器病学会総会
2010年4月23日
- (2) 原発性胆汁性肝硬変における胆管 CX3CL1 発現に必要な TNF α は、主に TLR4 リガンドで単球から産生される 日本肝臓学会総会
2010年5月27日
- (3) 原発性胆汁性肝硬変(PBC)における免疫異常の基礎とそれに基づく予後予測について 日本肝臓学会大会
2010年10月13日
- (4) 原発性胆汁性肝硬変における胆管破壊に関する新規知見 日本肝臓学会総会
2011年6月2日
- (5) 原発性胆汁性肝硬変における病因病態の解析 日本肝臓学会大会
2011年10月20日
- (6) 原発性胆汁性肝硬変の病態解明と新規治療の可能性 日本消化器病学会
2011年5月13日
- (7) 原発性胆汁性肝硬変モデルマウスにおける NK/NKT 細胞の役割 日本消化器病学会
2012年4月19日
- (8) 原発性胆汁性肝硬変における胆管上皮の疾患特異的的自己抗原発現条件の探索 日本肝臓学会総会
2012年6月7日

(全て筆頭演者)

[図書] なし

[産業財産権] なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 慎治 (SHIMODA SHINJI)

九州大学・大学病院 講師

研究者番号：30279319

(2)研究分担者
なし。

(3)連携研究者
なし。