

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461012

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の胆管細胞から明らかにする発症機序と治療への応用

研究課題名(英文) Clarification of the pathogenicity and the application of therapies from biliary epithelial cells in primary biliary cholangitis

研究代表者

下田 慎治 (Shimoda, Shinji)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30279319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆管細胞は自然免疫リガンドと疎水性胆汁酸の暴露により細胞内酸化ストレスが亢進するとともにAE2発現が低下し、IL-6やケモカインの産生が亢進した。胆管細胞でのAE2発現をsiRNAで落としても同様であった。またAE2発現が低下した胆管細胞周囲には自己免疫細胞が有意に遊走することも明らかになった。IFN-gの存在で更にAE2発現が減弱した。またこのようなPBC模倣環境では胆管細胞の老化を認め、一連の現象は細胞老化関連分泌現象であることが示唆された。病的に検討した結果、PBC胆管では酸化ストレスが亢進しAE2発現低下を認めた。またPBC胆管の中でも胆管炎活動性が高いほどAE2発現は低下していた

研究成果の概要(英文)：To address the role of AE2 in preventing PBC pathogenesis, we took advantage of our ability to isolate human BEC and autologous splenic mononuclear cells (SMC). We studied the influence of hydrophobic bile acids (GCDC), on AE2 expression in BEC and the subsequent impact on the phenotypes of BEC and local inflammatory responses. We demonstrate herein that GCDC reduces AE2 expression in BEC through induction of ROS, which enhances senescence of BEC. In addition, a reduction of AE2 levels upregulates the production of IL-6, IL-8 and CXCL10 from BEC in response to toll like receptor ligands.

研究分野：自己免疫

キーワード：原発性胆汁性胆管炎 anion exchanger 2 疎水性胆汁酸 IFN-g 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性胆管炎(PBC)は、胆管細胞を標的細胞とし周囲に自然免疫細胞・獲得免疫細胞の両者を攻撃細胞として認め、疾患特異的に抗ミトコンドリア抗体が出現する臓器特異的自己免疫疾患で、本邦での患者数は約5万人である。治療抵抗性に進行した場合肝臓移植でしか救命しえないため、症候性PBCは難病(特定疾患)に指定されている。PBCの病態解明や治療法確立に活用するためいくつかのモデル動物が作成されてきたが、病態発症の頻度や汎用性の高さ、PBCで通常見られない腹膜炎などの合併の問題があり、いまだ研究発展に寄与しうる理想的なモデルは確立されていない。我々はヒトPBC肝臓検体を用いて、その病態解明に成果を上げてきた。PBCでのミトコンドリア抗原内T細胞エピートープを同定し、肝臓においてミトコンドリア抗原反応性T細胞が増えIFN-gが過剰に産生される獲得免疫の異常メカニズムを明らかにした。さらに、PBCの患者単球の自然免疫刺激に対する反応性の亢進(Hepatology 2005)や、胆管細胞がToll様受容体(TLR)リガンド刺激によりケモカインを産生し、活性化NK細胞が自己胆管細胞を攻撃することなどによる自然免疫による臓器破壊を報告した。これらの研究では、独自に開発した肝移植時摘出肝由来の胆管細胞と肝臓浸潤単核球を共培養するモデルを用いて、自然免疫異常に由来する胆管炎の存在を証明し得た。しかし、未だ自然免疫異常が獲得免疫異常へと移行するメカニズムは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究ではこの問題を解決するために、PBCの基本病態である胆管周囲の持続的炎症を引き起こすメカニズムを、標的臓器側から明らかにすることを試みる。

関節リウマチなど一部の自己免疫疾患の

予後は、主としてサイトカインを標的とした生物学的製剤の使用により劇的な改善を認めている。一方、肝臓の自己免疫疾患であるPBCにおいては未だ有効な治療法が開発されていない。申請者は、ヒトPBC肝臓の解析により、傷害胆管の異常、すなわちToll様受容体およびHLAクラスI・II抗原の発現が亢進し、自然免疫異常から獲得免疫異常に移行していく過程を明らかにした。そこで本研究では1)生体肝移植時の摘出肝由来の胆管細胞・肝臓浸潤単核球を用いて実験室内でPBCの病変を再構築し、2)免疫異常の獲得過程とそれに関わる鍵分子を明らかにすることにより、PBCの病態進展を防ぐための新規治療法理論を確立する。

## 3. 研究の方法

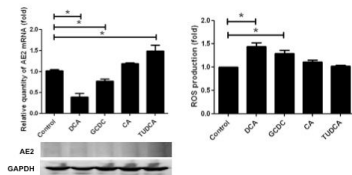
3名のPBC、8名のHCV肝硬変による生体肝移植時の摘出肝臓ならびに脾臓を検体として使用した。肝臓より密度勾配法で分離した単核球分画の中で壁付着細胞を選択し、CD326(EpCAM)抗体を用いたイムノビーズで胆管上皮細胞を回収した。脾臓は機械的に破碎し密度勾配法で単核球分画を分離した。疎水性胆汁酸、自然免疫リガンド、自己の脾臓単核球あるいはIFN-gで胆管細胞を刺激して、AE2、CD40、HLA DRのmRNA発現に加え、IL-6、IL-8、IP-10、CX3CL1のタンパクレベルでの発現をELISA法で確認した。また胆管細胞と自己脾臓単核球をtranswellで介して培養し、胆管細胞から産生されるケモカインによって遊走する単核球の数を計測した。また32名のPBC症例、12名のHCV肝炎、7名の転移性肝癌による正常部位を用いて免疫染色にて胆管細胞でのAE2発現を検討した。

## 4. 研究成果

疎水性胆汁酸刺激で、胆管細胞のAE2発現が低下した。またこのAE2発現低下に酸化スト

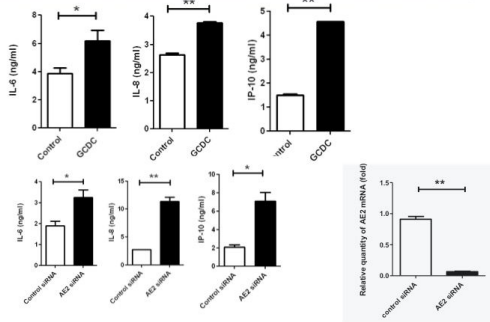
レスが関与していた。

疎水性胆汁酸は胆管細胞のAE2発現を低下させ、ROSの産生を亢進する

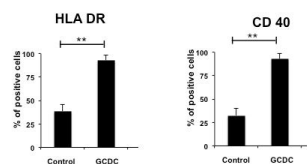


AE2 阻害剤あるいはAE2siRNAでAE2発現を低下させた胆管細胞ではIL-6、IL-8、IP-10の産生亢進とCD40、HLA DR発現亢進を認め、自己のリンパ球遊走能も亢進していた。

疎水性胆汁酸やAE2発現低下によって胆管細胞のサイトカイン・ケモカイン産生が亢進する

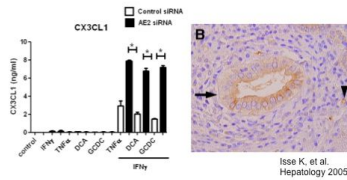


疎水性胆汁酸によって胆管細胞表面分子の発現が亢進する



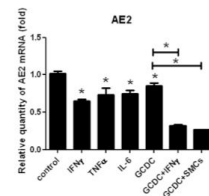
自己リンパ球の存在下で、胆管細胞はPBCを特徴づけるケモカインであるCX3CL1を産生し、AE2発現が低下した場合、胆管細胞からのCX3CL1産生は更に亢進した。自己単核球の代わりにIFN-g+疎水性胆汁酸刺激でも胆管細胞からのCX3CL1産生を認めた。

疎水性胆汁酸やAE2発現低下に加えてIFN-g刺激で胆管細胞のCX3CL1産生が亢進する



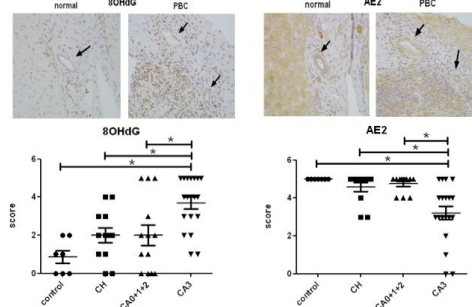
またこの環境ではさらに胆管細胞からのAE2発現が低下していた。

疎水性胆汁酸に加えてIFN-g刺激で胆管細胞AE2発現が低下する



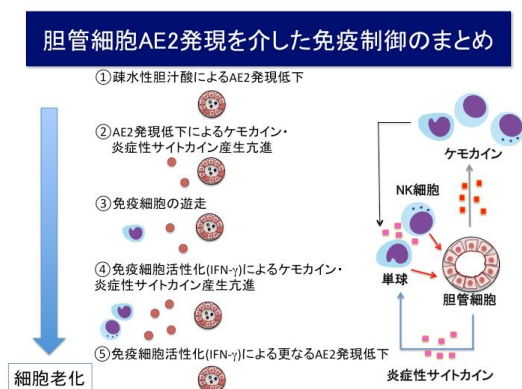
免疫染色による病理学的検討では、PBC胆管炎の活動性が亢進すると酸化ストレスが出現しAE2発現は低下することが明らかになった。

PBC胆管では炎症に比例して酸化ストレスが亢進し、AE2発現が低下する



以上の結果から疎水性胆汁酸による曝露を起点として胆管細胞はAE2発現を低下させ、ケモカイン、サイトカイン産生を亢進させ、誘導されたリンパ球の働きやその時点での周囲環境によって更にAE2発現が低下し、さらに胆管周囲に炎症環境が形成される、AE2

を起点とした負のスパイラルの存在が明らかになった。



## 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 24件)

(1) Kawashima M, et al, Shimoda S, et al. Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. Hum Mol Genet. 2017 Feb 1;26(3):650-659. (査読有)

(2) Ogawa E, et al., Shimoda S, Kajiwara E, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study(KULDS) Group. Effectiveness and safety of daclatasvir plus asunaprevir for patients with hepatitis C virus genotype 1b aged 75 years and over with or without cirrhosis. Hepatol Res. 2017 Mar;47(3):E120-E131. (査読有)

(3) Hisamoto S, Shimoda S, et al. Hydrophobic bile acids suppress expression of AE2 in biliary epithelial cells and induce bile duct inflammation in primary biliary cholangitis. J Autoimmun. 2016 Dec;75:150-160. (査読有)

(4) Ogawa E, et al, Shimoda S, Kajiwara E, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Effectiveness and safety of sofosbuvir plus ribavirin for HCV genotype 2 patients 65 and over with

or without cirrhosis. Antiviral Res. 2016 Dec;136:37-44. (査読有)

(5) Bae SK, et al, Shimoda S, Eto T, Takahashi K. The impact of hepatitis B core antibody levels on HBV reactivation after allogeneic hematopoietic SCT: an 11-year experience at a single center. Bone Marrow Transplant. 2016 Nov;51(11):1496-1498. (査読有)

(6) Ogawa E, et al, Shimoda S, Kajiwara E, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group.. NS5A resistance-associated variants undermine the effectiveness of ledipasvir and sofosbuvir for cirrhotic patients infected with HCV genotype 1b. J Gastroenterol. 2016 Dec 2. (査読有)

(7) Bekki Y, Yoshizumi T, Shimoda S, et al. Hepatic stellate cells secrete WFA<sub>4</sub>-M2BP; its role in biological interactions with Kupffer cells. J Gastroenterol Hepatol. 2016 Dec 22. doi: 10.1111/jgh.13708. (査読有)

(8) Bae SK, Shimoda S, et al. Risk factors for hepatitis B virus recurrence after living donor liver transplantation: A 17-year experience at a single center. Hepatol Res. 2015 (査読有)

(9) Ogawa E, et al, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Comparative safety study on severe anemia by simeprevir- versus telaprevir-based triple therapy for chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 2015(査読有)

(10) Kawano A, et al, Shimoda S, Kotoh K, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Bacterial Infection as an Adverse Effect of Telaprevir-based Triple Therapy for Chronic Hepatitis C

Infection. Intern Med.  
2015;54(6):567-72. (査読有)

- (11) Ogawa E, et al., Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Effectiveness of triple therapy with simeprevir for chronic hepatitis C genotype 1b patients with prior telaprevir failure. *J Viral Hepat.* 2015 Dec;22(12):992-1001. (査読有)
- (12) Ikezaki H, et al., Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Efficacy of interferon-beta plus ribavirin combination treatment on the development of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2016 Mar;46(3):E174-80. (査読有)
- (13) Eriguchi Y, et al, Shimoda S, et al. Decreased secretion of Paneth cell  $\alpha$ -defensins in graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis.* 2015 Oct;17(5):702-6. (査読有)
- (14) Sumida K, et al, Shimoda S, et al. Risk Factors Associated with *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia: A Matched Case-Control Study. *PLoS One.* 2015 Jul 24;10(7):e0133731. (査読有)
- (15) Shimoda S, et al. Natural killer cells regulate T cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2015 Dec;62(6):1817-27. (査読有)
- (16) Miyake N, et al, Shimoda S, Akashi K. A dramatic increase in the positive blood culture rates of *Helicobacter cinaedi*: the evidence of differential detection abilities between the Bactec and BacT/Alert systems. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Nov;83(3):232-3. (査読有)
- (17) Hiramane S, et al, Shimoda S, Hayashi J. Importance of virological response in the early stage of telaprevir-based triple therapy for hepatitis C. *World J Hepatol.* 2015 Nov 18;7 (26): 2688-95. (査読有)

- (18) Aiba Y, et al., Shimoda S, et al.. Systemic and local expression levels of TNF-like ligand 1A and its decoy receptor 3 are increased in primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2014; 34(5): 679-88. (査読有)
- (19) Ogawa E, et al, Shimoda S, Hayashi J; The Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Influence of low-density lipoprotein cholesterol on virological response to telaprevir-based triple therapy for chronic HCV genotype 1b infection. *Antiviral Res.* 2014; 104:102-9. (査読有)
- (20) Chong Y, Shimoda S, et al. Clinical Impact of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Fecal Flora of Hematological Patients with Neutropenia and Levofloxacin Prophylaxis. *PLoS One.* 2014; 9(1):e85210. (査読有)
- (21) Harada Y, et al, Shimoda S. Nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with  $\beta$ -lactam-inducible arbekacin resistance. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 5):710-4. (査読有)
- (22) Ogawa E, et al., Shimoda S, Akahoshi T, Maehara Y, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Efficacy and safety of splenectomy in telaprevir-based triple therapy for chronic hepatitis C patients with thrombocytopenia and advanced fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(9):1728-35. (査読有)
- (23) Selmi C, et al., Shimoda S, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation, copy number variation, and gene expression in monozygotic twins discordant for primary biliary cirrhosis. *Front Immunol.* 2014;5:128. (査読有)

(24) Nakamura M, et al, Shimoda S, et al. Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Hepatol Res. 2014(査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

2016 年

(1) アメリカ肝臓学会 (Boston 11/11) Hydrophobic Bile Acids Suppress Expression of AE2 in Biliary Epithelial Cells and Induce Bile Duct Inflammation in primary biliary cholangitis Shinji Shimoda, et al.

(2) JDDW(神戸 11/3) 胆管細胞でのanion exchanger 2(AE2)発現低下は酸化ストレス・細胞老化を誘導しPBC胆管炎を模倣する 下田 慎治 他

(3) 日本肝臓学会(千葉 5/19) PBCにおけるNK細胞によるT細胞制御機構の解明 岩坂 翔 他

(4) PBC胆管炎を模倣したAE2発現低下による胆管細胞での慢性炎症の誘導 下田 慎治 他

(5) 日本消化器病学会(東京 4/21) PBCでの胆管細胞AE2発現低下は慢性炎症性変化を亢進させる 下田 慎治 他

2015 年

(6) アメリカ肝臓学会(San Francisco 11/14) Natural killer cells regulate T cell immunity in primary biliary cirrhosis Shinji Shimoda, et al.

(7) JDDW(東京 10/10) 原発性胆汁性肝硬変におけるNK細胞による胆管細胞傷害機序の解析 下田 慎治 他

(8) 日本肝臓学会(熊本 5/21) 原発性胆汁性肝硬変をモデルとした臓器特異的自己免疫疾患における自然免疫異常から獲得免疫

異常へ移行するメカニズムの解析 下田 慎治 他

(9) 原発性胆汁性肝硬変における胆管細胞でのAE2の役割 下田 慎治 他

(10) 日本消化器病学会(仙台 4/25) 胆管細胞から明らかにするPBCの病態 下田 慎治 他

〔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  
下田 慎治 ( SHIMODA, Shinji )

九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：30279319

(2) 研究分担者  
なし  
(4) 研究協力者  
なし