胆道閉鎖症の病態形成における胆道系自然免疫とepithelial-mesenchymal transition の関与

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/29615

肝
(1)

胆道閉鎖症の病態形成における胆道系自然免疫とepithelial-mesenchymal transitionの関与

原田 憲一　佐藤 保則　中沼 安二

金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学

要　旨：胆道閉鎖症の硬化性胆管炎を示す肝外胆管に，上皮系マーカーの消失および間葉系マーカーの発現を示す上皮を認め，胆管細胞のepithelial-mesenchymal transition (EMT) が示唆された。また，培養胆管細胞を合成2本鎖RNAで刺激した結果，bFGFの発現亢進とBambi (TGF-β1 pseudoreceptor) の発現低下を伴いつつEMTが誘導された。胆道閉鎖症の硬化性病変の病態形成に，レオウイルス科ウイルス (二本鎖RNAウイルス) に対する自然免疫応答によるEMTの関与が示唆された。

(消化器と免疫 45: 161 - 164, 2008)

Keywords: 胆道閉鎖症，胆管細胞，自然免疫，EMT

目　的

胆道閉鎖症は病態により先天型 (20%) と後天型 (80%) に分類され，後天型は新生児期における肝外胆管の硬化性胆管炎 (高度の炎症細胞浸潤，線維化，上皮の剥離など) と線維性閉塞が基本病態である。胆道閉鎖症の肝外胆管上皮では細胞増殖活性の亢進およびアポトーシスによる細胞死の亢進もみられ，細胞動態の不均衡により胆管閉塞をきたすと考えられている[1]。硬化性病変をきたす機序については不明であるが，近年胆管上皮でのEpithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 現象が，胆道閉鎖症を含め慢性肝胆道系疾患の病態形成に関与しているとの報告がある[2,3,4]。

1980年代より，実験動物にてレオウイルス感染が胆道閉鎖症様の胆管炎をきたすこと[5]や胆道閉鎖症の患者血清中に抗3型レオウイルス抗体が高頻度 (62%) に検出されることが知られていた[6,7]。また，近年，Kasai procedure (葛西手術) の際に採取される肝外胆管や肝組織の病理検体からレオウイルスやロタウイルス (ともに二本鎖RNAウイルス) の存在が証明され，胆道閉鎖症 (特に後天型) の病因としてウイルスの感染が想定されている。我々は，二本鎖RNAウイルスに対する胆管

細胞の自然免疫について検討し，胆管細胞は二本鎖RNAに対する自然免疫機構を有していることを明らかにした[8]。

EMTは，上皮系細胞が癌転移，創傷治癒，個体発生過程，疾患の病態形成において間葉系細胞へ形質転換し，細胞が移動する現象である。EMT誘導の代表的な因子として，Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) と basic fibroblast growth factor (bFGF) が報告されている[9]。また，TGF-β1 の pseudo-receptor である bone morphogenic protein and activin membrane-bound inhibitor (Bambi) の発現が自然免疫応答にて発現が低下し，TGF-β1 に対する感受性が亢進することも報告されており[10]，Bambi や TGF-β 受容体 (TGF-βR1) の発現変化も EMT の誘導に関与すると推測される。

今回，我々は胆管細胞の EMT 発生機序について，二本鎖RNAウイルスに対する自然免疫応答の観点から検討した。

方　法

(1) 免疫組織化学

胆道閉鎖症9例の葛西手術時に摘出された肝外胆管（索状物）のホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象に，二本鎖RNAウイルスの認識受容体である Toll 様受容体3 (TLR3)，TLR3の下流に存在する転写因子 NF-κB，胆管系上皮マーカー (CK19, E-cadherin)，間葉系マーカー (Vimentin)，EMT 誘導分子 (bFGF) の免疫染色を施行し，胆管上皮における発現を検討した。

(2) 培養

ヒト肝内胆管細胞培養株3株（胆道閉鎖症由来1株，転移性肝癌の背景肝由来2株）を対象に，TLR3リガンドとして合成2本鎖RNAである poly (I:C)，または EMT 誘導因子 (TGF-β1, bFGF) で刺激後，表現型分子 (CK19, E-cadherin, vimentin)，EMT 関連分子 (bFGF, TGF-β1, Bambi) の発現動態について real-time PCR 法にて定量比較した。

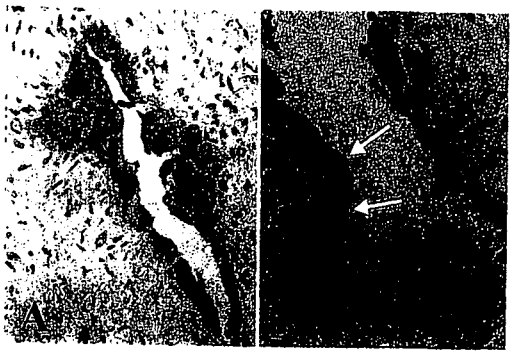


図1　胆道閉鎖症の肝外胆管における TLR3(A) と NF-κB (B) の免疫染色
A：胆管上皮に TLR3 の発現を認める。
B：細胞質での発現の他，活性型 NF-κB を示す核発現（矢印）も認める。

結　果

(1) 肝外胆管における自然免疫，EMT 関連分子の発現

胆道閉鎖症の肝外胆管および付属腺の被覆上皮に TLR3 の発現を認め，また活性型 NF-κB を意味する核発現を傷害胆管に散見した（図1）。CK19, E-cadherin, vimentin の発現は胆管により様々で，炎症や傷害像に乏しい胆管上皮では，CK19, E-cadherin などの上皮系マーカーは保たれており，vimentin の間葉系マーカーも認めなかった。しかし，胆管炎や傷害像を示す胆管上皮では，上皮系マーカーが減弱または消失し，vimentin を発現する細胞も散見された（図2）。さらに，傷害胆管では，軽度ながら bFGF の発現を示す胆管細胞や bFGF 強陽性を示す単核球の浸潤も認めた（図2）。

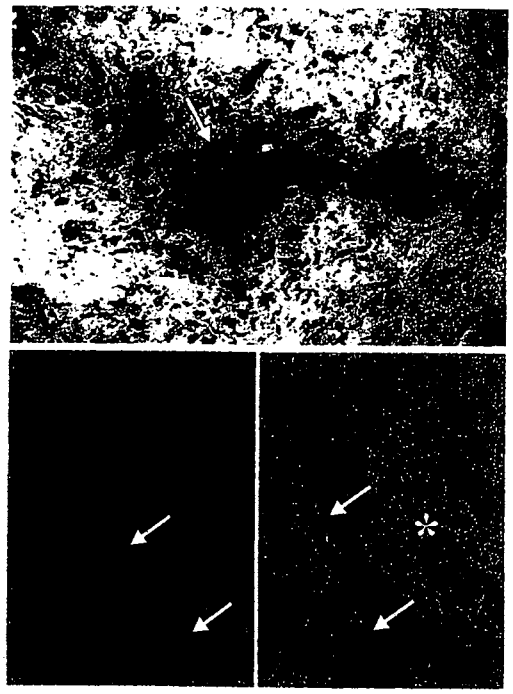


図2 胆道閉鎖症の肝外胆管におけるビメンチン(A), サイトケラチン19 (CK19) (B) と basic fibroblast growth factor (bFGF) (C) の免疫染色

A：ほぼ閉塞した肝外胆管（矢印）で，ビメンチンの強い発現を認める。

B：傷害胆管の被覆上皮にCK19発現の消失を認める（矢印）。

C：傷害胆管の上皮にbFGFの弱い発現を認め（矢印），またbFGF強陽性を示す単核球の浸潤を認める（＊）。

(2) 培養胆管細胞のEMT誘導

培養胆管細胞をpoly (I:C) 刺激したのち，CK19 mRNA量は刺激後3時間，8時間，24時間目で，各々93%，57%，15%になり，8時間と24時間目で有意に発現が低下した。E-cadherinは，110% (3時間)，69% (8時間)，38% (24時間) と発現が推移し，24時間目で有意な発現低下がみられた。また，poly (I:C) 刺激後3時間目でbFGF mRNAの発現が2倍に亢進し，24時間目ではBambiの発現が69%にまで有意に低下した。TGF-β1発現の有意な増減は認めなかった。また，EMT誘導分子であるbFGF，TGF-β1で刺激後24時間目で，CK19発現が各々39%，24%と低下し，E-cadherin発現も各々42%，35%と有意に低下した。逆にvimentin発現はbFGF，TGF-β1刺激後24時間目に，各々2.1倍，2.8倍と有意に亢進した。Bambi発現はbFGF刺激24時間後で59%と有意に発現が低下したが，TGF-β1刺激では明らかな発現の変化は認めなかった。

考　察

近年，胆道閉鎖症の組織学的特徴である硬化性胆管炎の組織発生に胆管上皮のEMT現象が関与しているとの報告がある[4]。我々は，培養胆管細胞を用いて，胆管細胞はTLR3などの二本鎖RNA認識受容体を有しており，poly (I:C) 刺激にてNF-κBやIRF-3の転写因子が活性化し，IFN-βなどの抗ウイルス因子の産生がみられることを報告しており，レオウイルス科ウイルス感染が胆道閉鎖症の病態形成に直接関与していることを示唆した[8]。また，今回の検討により，胆道閉鎖症の肝外胆管にはTLR3の発現があり，さらに傷害胆管では活性型NF-κBの発現もみられ，TLR3を介した自然免疫応答が作動していることが示唆された。さらに，ヒト培養胆管細胞を用いてEMT現象を検討した結果，poly (I:C) 刺激で胆管型サイトケラチンであるCK19と一般的な上皮系マーカーであるE-cadherinの発現が経時的に減弱し，上皮としての特徴を失いつつあることが示唆された。

EMT誘導の最も代表的な因子はTGF-β1であり，また尿細管上皮においてbFGFによるEMT誘導も報告されている[9]。今回の検討にて，胆管細胞は恒常的にTGF-β1を発現していたが，合成poly (I:C) 刺激にてTGF-β1発現の明らかな変化は認めなかったが，

TGF-β1のpseudoreceptorとして作用するBambiが刺激後24時間目で発現の低下がみられたことより，TGF-β1に対する感受性が亢進すると推測された。また，胆管細胞はTGF-β1刺激にて，上皮系マーカーの発現低下，間葉系マーカーの発現誘導がみられ，TGF-β1は胆管細胞のEMTに関与していると推測された。また，bFGFも合成二本鎖RNA刺激にて発現が誘導された。さらにbFGF刺激にて，刺激直後から上皮系マーカーの発現低下，間葉系マーカーの発現誘導がみられ，また24時間後にはBambiの発現低下も認めた。この所見は，bFGFによる直接的なEMT誘導のみならずTGF-β1によるEMT誘導も助長し，さらにEMTを促進していることが示唆された。また，胆道閉鎖症では，bFGF発現を示す胆管上皮に加え，bFGF強陽性を示す単核球浸潤も胆管内および胆管周囲に認めたことより，胆道閉鎖症の生体内では胆管細胞から産生されてautocrine的に作用するbFGFのみならず，胆管周囲から供給されるbFGFもEMT誘導に重要と考えられた。

結　語

胆道閉鎖症の組織学的特徴である硬化性胆管炎の病態形成に，肝外胆管や胆管付属腺を構成する胆管細胞からのEMTの関与が示唆された。特に二本鎖RNAウイルスに対する胆管細胞の自然免疫応答の結果，bFGF産生が誘導され，さらにBambi発現低下によるTGF-β1に対する感受性が亢進することにより，EMTが誘導されていると推測された。

文献

1) Funaki N, et al: Apoptosis and cell proliferation in biliary atresia. J Pathol 186: 429-33, 1998
2) Nakanuma Y, et al: Expression of vimentin in proliferating and damaged bile ductules and interlobular bile ducts in nonneoplastic hepatobiliary diseases. Mod Pathol 5: 550-4, 1992
3) Rygiel KA, et al: Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. Lab Invest 88: 112-23, 2008
4) Diaz R, et al: Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. Hum Pathol 39: 102-15, 2007
5) Bangaru B, et al: Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. Lab Invest 43: 456-62, 1980
6) Morecki R, et al: Biliary atresia and reovirus type 3 infection. N Engl J Med 307: 481-4, 1982
7) Glaser JH, et al: Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. J Pediatr 105: 912-5, 1984
8) Harada K, et al: Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. Hepatology 46: 1146-54, 2007
9) Strutz F, et al: Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney Int 61: 1714-28, 2002
10) Seki E, et al: TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. Nat Med 13: 1324-32, 2007

原田　憲一
(金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学)
〒920-8640 石川県金沢市宝町13-1
TEL: 076-265-2199 / FAX: 076-234-4229