

# 原発性胆汁性肝硬変での老化胆管細胞による免疫調整

著者	佐々木 素子, 宮腰 菜沙美, 佐藤 保則, 中沼 安二
雑誌名	消化器と免疫 = Digestive organ and immunology
巻	47
ページ	44-47
発行年	2010-01-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/31519">http://hdl.handle.net/2297/31519</a>

## 原発性胆汁性肝硬変での 老化胆管細胞による免疫調節

ささき もとこ みやこし まさみ さとう やすのり なかめま やすに  
佐々木素子 宮腰茉沙美 佐藤 保則 中沼 安二

金沢大学 医薬保健研究域医学系 形態機能病理学

**要 旨：** 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の障害胆管細胞は細胞老化を示すが、その意義は不明であった。今回の検討では、培養胆管細胞に老化を誘導すると、ケモカイン (CCL2, CX3CL1 など) の発現亢進、RAW264.7 単球細胞遊走の亢進がみられた。また、PBC の炎症性胆管では、PBC の非炎症性胆管、対照肝の小型胆管より有意に高率に CCL2, CX3CL1 発現を認めた。PBC では、老化胆管細胞は CCL2, CX3CL1 発現を介して炎症細胞を動員し、胆管病変の免疫病態形成に積極的に関与する可能性が示唆された。

(消化器と免疫 47: 44-47, 2010)

**Keywords:** 原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis),  
細胞老化 (cellular senescence),  
senescence-associated secretory phenotypes (SASP),  
CCL2, CX3CL1

### 背景と目的

私どもは原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の障害胆管細胞は細胞老化を示すこと、胆管細胞老化は胆管消失の要因となる可能性があることを報告してきた<sup>1,2,3)</sup>。細胞老化 cellular senescence は様々なストレスによって生じる不可逆的な細胞増殖停止と定義される<sup>4)</sup>。細胞老化は発癌と老化のバランスをとる機構として注目されている<sup>4)</sup>。また、炎症性疾患での細胞老化亢進も報告されている。細胞老化の要因はテロメア短縮、酸化ストレス、DNAダメージなどとされ、PBC における胆管細胞老化に

も酸化ストレスの関与が示唆された<sup>1,2,3)</sup>。最近、老化細胞は単なる細胞傷害の結果ではなく、senescence-associated secretory phenotypes (SASP) と総称される因子の分泌を介して、腫瘍形成促進、免疫誘導、線維化、血管新生など周囲微小環境を積極的に調節することが明らかになってきた<sup>5,6,7,8)</sup>。SASP には、免疫調節に関連する IL-6, CCL2/MCP-1 などの炎症性サイトカインや増殖因子など多彩な分子が含まれる。PBC の胆管病変では、単球、リンパ球をはじめとする炎症細胞浸潤がみられ、様々な免疫調節機構とその破綻が示唆されている。そこで今回、ケモカインを中心に PBC

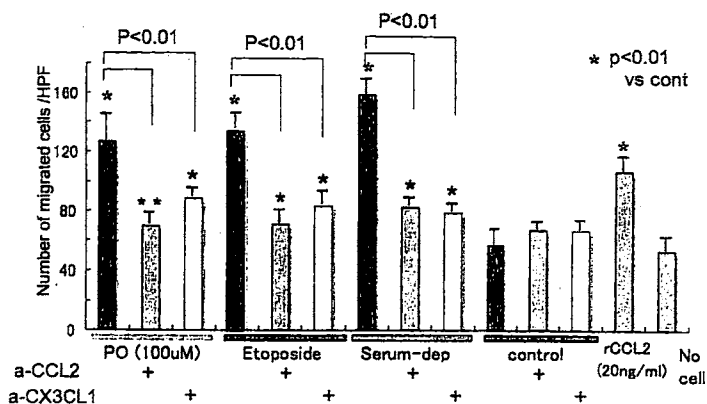


図1 老化胆管細胞は単球系細胞RAW164.7の遊走を誘導する  
a-CCL2, CCL2中和抗体; a-CX3CL1中和抗体

の老化胆管細胞におけるSASP発現とその意義を検討した。

## 方 法

### (1) 培養胆管細胞を用いた検討

過酸化水素添加 (100 µM, 2 hr) による酸化ストレス, エトポシド添加 (100 µM) によるDNA傷害, 血清除去により, 培養胆管細胞に細胞老化を誘導した。老化胆管細胞によるRAW264.7単球細胞遊走の誘導をBoyden chamber assayにより検討した。下槽に胆管細胞を培養して老化を誘導した後, 上槽に単球系細胞RAW264.7を入れて細胞遊走を検討した。この実験系におけるCCL2, CX3CL1中和抗体の効果も検証した。また, real-time PCR法により, 老化胆管細胞における10種類のケモカイン遺伝子 (CCL2-5, CX3CL1, CXCL1, 2, 9, 10, 16) のmRNA発現プロファイルを検討した。

### (2) 病理組織学的検討

PBC 37症例(1, 2期, 27例; 3, 4期, 10例), 対照肝75症例(慢性ウイルス性肝炎 (CVH) 22例; 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 22

例; 閉塞性黄疸肝 (EBO) 10例; 正常肝 (NL) 21例) の肝組織切片を用いて, 免疫組織化学的にCCL2, CX3CL1発現を検出した。肝内小型胆管を炎症性 (非化膿性破壊性胆管炎, CNSDCの病変部など), 非炎症性の2群に分類して染色結果を半定量的に評価した。さらに2重免疫染色にてCCL2, CX3CL1発現と細胞老化マーカー (p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>) 発現局在の比較検討を行った。

## 結 果

### (1) 培養胆管細胞を用いた検討

老化を誘導した培養胆管細胞は, RAW264.7細胞遊走を有意に亢進させた ( $p < 0.01$ ) (図1)。CCL2, CX3CL1中和抗体はこの老化細胞による単球系細胞RAW264.7の遊走を部分的に抑制した ( $p < 0.01$ ) (図1)。老化胆管細胞はCCL2, CX3CL1などのケモカインを産生して, 炎症細胞遊走を亢進するといえる。ケモカイン遺伝子発現プロファイルの検討では, 老化胆管細胞ではCCL2, CX3CL1など検討したほとんどのケモカインmRNA発現亢進(対照の約3~40倍)を認めた ( $p < 0.01$ ) (結果未呈示)。それぞれのケモカイン発現亢進の程度は老化誘導

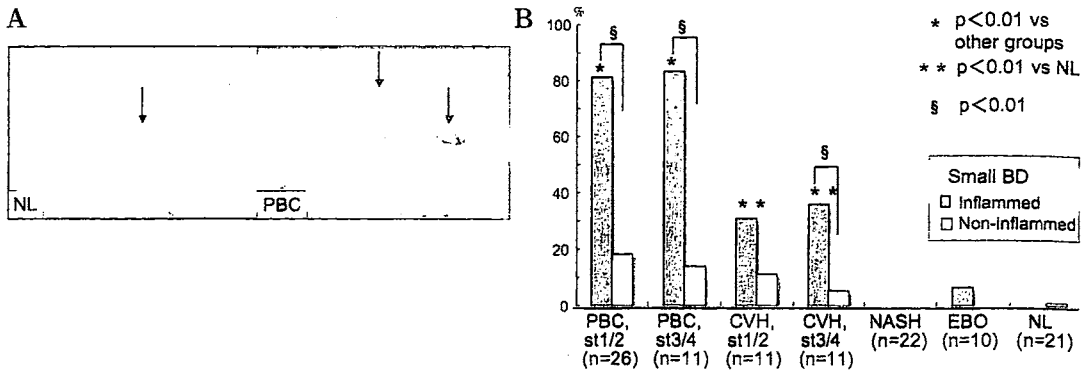


図2 PBCの炎症性胆管はCCL2発現亢進を示す

(A) CCL2発現は、正常肝(NL)の肝内小型胆管では陰性(左, 矢印)。PBCのCNSDC部では、障害胆管の細胞質と細胞膜にCCL2発現亢進をみる(右, 矢印)。

(B) CCL2発現の半定量的解析。Small BD, Inflamed, 炎症性胆管；Non-inflamed, 非炎症性胆管

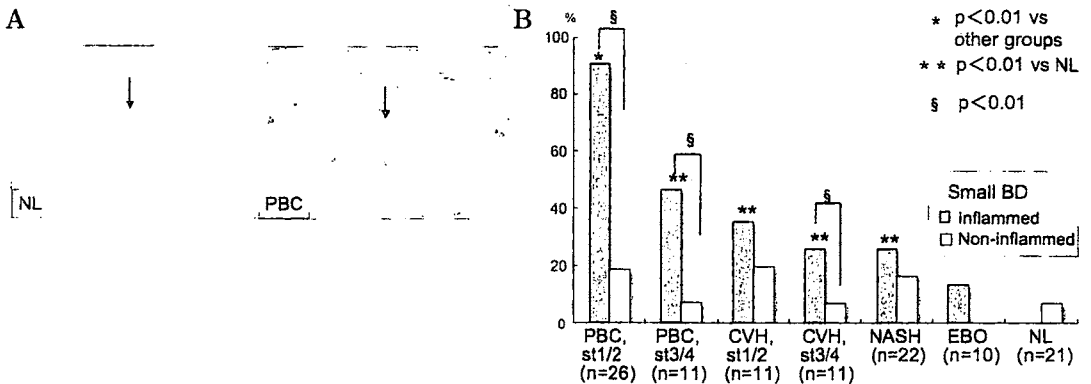


図2 PBCの炎症性胆管はCX3CL1発現亢進を示す

(A) CX3CL1発現は、正常肝(NL)の肝内小型胆管では陰性(左, 矢印)。PBCのCNSDC部では、障害胆管の管腔縁にCX3CL1発現亢進をみる(右, 矢印)。

(B) CCL2発現の半定量的解析。Small BD, Inflamed, 炎症性胆管；Non-inflamed, 非炎症性胆管

方法により様々であった(結果未呈示)。

## (2) 病理組織学的検討

CCL2発現は、正常肝や慢性ウイルス性肝炎の肝内小型胆管では、発現がないか、弱い発現を示すのみであった(図2-A)。これに対して、PBCの炎症性胆管、特にCNSDC病変部の胆管では、細胞質と、特に細胞膜に強調されるCCL2発現を示した(図2-A)。半定量的解析では、PBCの炎症性小型胆管では、PBCの非炎症性胆管、対照肝の小型胆管より有意に高率にCCL2発現を認めた( $p < 0.01$ )(図2-B)。

CX3CL1発現も同様に、正常肝や慢性ウイルス性肝炎の肝内小型胆管では、発現がほとんどなかった(図3-A)。これに対して、PBCの炎症性胆管、特にCNSDC病変部の胆管では、主に管腔縁にCX3CL1発現の亢進を認めた(図3-A)。半定量的解析では、PBCの炎症性小型胆管では、PBCの非炎症性胆管、対照肝の小型胆管より有意に高率にCX3CL1発現を認めた( $p < 0.01$ )(図3-B)。2重免疫染色では、PBCの炎症性胆管において、CCL2、CX3CL1発現と細胞老化マーカー( $p21^{WAF1/Cip1}$ ,  $p16^{INK4a}$ )発現の局在は概ね一致した(結果未

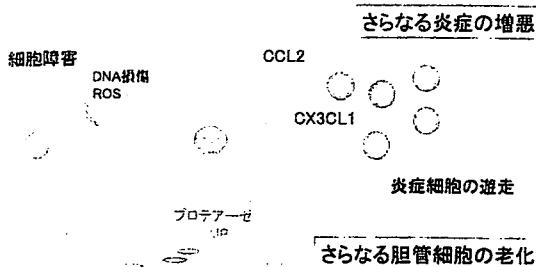


図4 シェーマ：PBCの老化胆管細胞は胆管周囲の炎症を増悪させる

呈示)。

## 考 察

今回の検討より、PBCの老化胆管ではケモカインCCL2、CX3CL1発現が亢進していることが明らかとなった。また、培養細胞に老化を誘導すると、老化胆管細胞にはケモカイン発現亢進が見られ、実際に単球系細胞の細胞遊走を亢進することが示された。今までにも、PBCの胆管病変を含めたヒト胆管系疾患や胆汁性線維症の動物モデルでは、胆管細胞がCCL2、CX3CL1などのケモカイン、IL-1、IL-6などのサイトカインや、線維化促進因子を発現し、炎症細胞や肝星細胞の動員や活性化を行うことが報告されている<sup>9,10)</sup>。今回の検討結果を踏まえると、これらのケモカイン、サイトカイン発現亢進は胆管細胞老化に伴うSASPである可能性がある。PBCの胆管病変では、CCL2、CX3CL1などのケモカインが炎症細胞の動員や活性化を引き起こし、さらなる炎症の増悪、老化の亢進を起こすと考えられる(図4)。PBCの胆管周囲では、このような老化の悪循環が、免疫病態の進展に関与している可能性が示唆される(図4)。胆管病変で生じている老化の悪循環を制御することで、PBCの発生、進展の抑制が可能になるかもしれない。

## 結 論

PBCでは、老化胆管細胞はケモカイン：CCL2、CX3CL1発現を介して炎症細胞を動員し、胆管病変の免疫病態形成に積極的に関与する可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Sasaki M, et al: Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. *J Pathol* 205: 451-9, 2005.
- 2) Sasaki M, et al: Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology* 48: 186-95, 2008.
- 3) Sasaki M, et al: Activation of ATM signaling pathway is involved in oxidative stress-induced expression of mito-inhibitory p21 (WAF1/Cip1) in chronic non-suppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis: An immunohistochemical study. *J Autoimmun* 31: 73-8, 2008.
- 4) Collado M, et al: Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130: 223-33, 2007.
- 5) Young AR, et al: SASP reflects senescence. *EMBO Rep* 10: 228-30, 2009.
- 6) Acosta JC, et al: Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133: 1006-18, 2008.
- 7) Kuilman T, et al: Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133: 1019-31, 2008.
- 8) Wajapeyee N, et al: Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132: 363-74, 2008.
- 9) Shimoda S, et al: Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis: the role of liver-infiltrating mononuclear cells. *Hepatology* 47: 958-65, 2008.
- 10) Tsuneyama K, et al: Monocyte chemotactic protein-1, -2, and -3 are distinctively expressed in portal tracts and granulomata in primary biliary cirrhosis: implications for pathogenesis. *J Pathol* 193: 102-9, 2001.

佐々木 素子

(金沢大学 医薬保健研究域医学系 形態機能病理学)  
〒920-8640 金沢市宝町 13-1  
TEL: 076-265-2197 / FAX: 076-234-4229