

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590409

研究課題名(和文)オートファジー異常に着目した原発性胆汁性肝硬変の新たな解析

研究課題名(英文) Novel approach to primary biliary cirrhosis putting focus on deregulated autophagy

研究代表者

佐々木 素子 (Sasaki, Motoko)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70225895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原発性胆汁性肝硬変(PBC)の障害胆管細胞には細胞老化に先行してオートファジー異常が認められること、PBCの胆管病変では、オートファジー異常がミトコンドリア抗原の異常発現をおこし、ミトコンドリア抗原に対する免疫反応異常の要因になる可能性があることが明らかになった。培養胆管細胞を用いた検討でも、ストレスによるミトコンドリアのオートファジーが検証された。さらに、PBCにおけるオートファジー異常、細胞老化の発生には、小胞体ストレスが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that deregulated autophagy followed by cellular senescence in biliary epithelial cells (BECs) may be closely related to the abnormal expression of mitochondrial antigens and following autoimmune pathogenesis in primary biliary cirrhosis (PBC). Cell culture study using mouse biliary epithelial cells supported the immunohistochemical findings in human PBC livers, suggesting autophagy of the mitochondrial proteins. Furthermore, this study disclosed that endoplasmic reticulum stress may play a role in the pathogenesis of deregulated autophagy and cellular senescence in biliary epithelial lesions in PBC.

研究分野：人体病理学

キーワード：病理学 オートファジー 細胞老化 生体分子

### 1. 研究開始当初の背景

最近、細胞恒常性維持におけるオートファジーの生理学的意義と様々な疾患におけるオートファジー異常の重要な関与が明らかになりつつある。私どもは、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病態形成に細胞老化が関与することを世界で初めて明らかにした。さらに、老化胆管細胞は、ケモカインなどの産生を介して細胞周囲微小環境の調節を行うこと、PBC の胆管病変では、細胞老化に先行してオートファジーが発生していることを報告した。これらの世界に先駆けた研究成果は、胆管細胞のオートファジー異常が PBC の病態形成に重要な役割を持つ可能性を示唆している。しかし、今までにオートファジー異常という概念から PBC を含めた肝臓病を包括的に検討する試みは国内外において全くなされていない。そこで私たちは、「PBC では胆管細胞のオートファジー異常が、細胞老化の発生や免疫炎症機構の制御異常を介して病態形成に関与する」という仮説の検証と、オートファジー異常の原因解明とオートファジー異常の制御による新たな PBC 治療法の分子基盤の確立をめざして研究計画を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、オートファジー異常に着目して、PBC の病態解明と新たな治療法開発の基盤となる研究をめざした。具体的には、以下の検討を行う計画を立てた。(1) 人体材料を用いて PBC などの肝臓病における肝構成細胞のオートファジー異常の発生状況を検討する。オートファジー異常と胆管病変、細胞老化との関連を明らかにする。(2) オートファジー異常の発生機構を解明し、その制御法を探索する。(3) PBC におけるオートファジー異常とミトコンドリア抗原異常発現を検討して病態形成における役割を明らかにする。(4) 肝障害モデル動物、PBC モデル動物、オートファジー異常モデル動物を用いて肝臓病の病態形成におけるオートファジー異常の意義を明らかにする。さらに、オートファジー異常の制御による新たな肝臓病治療法の分子基盤の確立をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) 肝臓病の肝組織におけるオートファジー異常発生状況の解析

① オートファジー異常発生状況の解析: 人体材料を用いた免疫組織化学的手法で、オートファジー異常の発生状況を、オートファジーマーカー LC3、オートファジー異常マーカー p62/SQSTM1 (オートファジー不全状態で異常蓄積) を指標に検出した。オートファジー異常の発生状況と胆管病変、線維化などの病変、細胞老化、性差との関連を臨床病理学的に検討した。

② オートファジー異常と細胞老化の関連の検討: 細胞老化の指標 SA- $\beta$ -Gal, p16<sup>INK4a</sup> と

p21<sup>WAF1/Cip1</sup> の発現を組織化学的、免疫組織化学的に検出して、オートファジー異常の発生状況との関連を検討した。

(2) オートファジー異常とミトコンドリア抗原異常の病態形成における意義の検討

① 病理組織学的検討: 人体材料を用いた免疫組織化学的手法で、PBC と対照肝のミトコンドリア抗原 (pyruvate dehydrogenase complex-E2 component [PDC-E2], cytochrome c oxidase [CCO]) の発現状況を免疫組織化学的に検討した。LC3 や p62/SQSTM1 で検出したオートファジー異常の発生状況との関連を 2 重蛍光免疫染色法で解析した。

② 培養細胞を用いた検討: マウス培養胆管細胞に細胞ストレスと各種阻害剤 (ライソゾーム阻害剤 bafilomycin A など) を加えてオートファジー異常を誘導し、PDC-E2 などのミトコンドリア抗原の発現局在、オートファゴソームとの関連を検討した。2 重蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) オートファジー異常の発生機構の解明: 小胞体ストレスの関与の検討

① 病理組織学的検討: 免疫組織化学的手法で、PBC と対照肝の胆管細胞における小胞体ストレス関連分子 glucose-regulated protein 78 (GRP78) and protein disulfide isomerases (PDI)、オートファジー関連分子 LC3, p62, 老化指標 p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> の発現と胆管病変との関連を検討した。

② 培養細胞を用いた検討: マウス培養胆管細胞に小胞体ストレス誘導剤 Tunicamycin (TM)、胆汁酸 GCDCA、過飽和脂肪酸などを加え、小胞体ストレス、オートファジー、細胞老化の発生状況を検討した。さらに、Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) 前処理の効果を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 肝臓病の肝組織におけるオートファジー異常発生状況

PBC の胆管病変部胆管では、疾患特異的に LC3 の小胞状発現、p62/SQSTM1 陽性沈着物を示すオートファジー異常が生じていた。

(2) オートファジー異常とミトコンドリア抗原異常の病態形成における意義

PBC の胆管病変部胆管では、特異的に、ミトコンドリア抗原の顆粒状発現が見られた。2 重免疫蛍光染色の結果では、ミトコンドリア抗原の顆粒状発現は、異常蓄積したオートファゴソーム内のミトコンドリアによることが示唆された。飢餓状態などの細胞ストレスによって培養胆管細胞にはオートファジーが誘導された。さらに、ライソゾーム阻害剤によるオートファジー機構の障害によってミトコンドリア抗原の顆粒状発現、胆管細胞表面のミトコンドリア蛋白の

異常発現がみられた。

これは、PBCの胆管病変にはオートファジー異常が関与すること、オートファジー異常がミトコンドリア抗原の異常発現をおこし、ミトコンドリア抗原に対する免疫反応異常の要因になる可能性を世界で初めて明らかにするものである。PBCの胆管病変では、オートファジー異常によるミトコンドリア抗原の異常発現が生じており、抗ミトコンドリア抗体(AMA)などのミトコンドリア抗原に対する自己免疫反応の発生に関与する可能性が示唆された。

さらに、PBCでは、単球系細胞や形質細胞にもオートファジー異常とミトコンドリア抗原の異常発現が生じており、免疫病態形成に関与する可能性が示唆された。

(3) オートファジー異常の発生機構の解明：  
小胞体ストレスの関与の検討

PBCの肝内小型胆管では、胆管炎部を中心に、高率に、PDI、GRP78発現亢進、オートファジー亢進と異常、細胞老化指標p16<sup>INK4a</sup>、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>発現亢進を示した。

GCDC、TMなどを加えた培養胆管細胞には、小胞体ストレス指標mRNA発現の亢進、オートファジー亢進と異常、細胞老化誘導を認めた。TUDCA前処理によって、小胞体ストレスの有意な抑制、細胞老化の抑制が見られた。

PBCにおけるオートファジー異常、細胞老化の発生には、小胞体ストレスが関与することが示された。また、TUDCAは小胞体ストレス抑制を介してオートファジー異常、胆管細胞老化を抑制し、胆管障害や胆管を中心とする免疫病態を軽減する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Sasaki M, Yoshimura-Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of endoplasmic reticulum stress in biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol*. 2015 Jan 1. [Epub ahead of print] 査読有

2. Nakanuma Y, Sasaki M, Harada K. Autophagy and senescence in fibrosing cholangiopathies. *J Hepatol*. 2015 Apr; 62(4):934-945. doi: 10.1016/j.jhep. 2014.11.027. 査読有

3. Sasaki M, Nakanuma Y. Cellular senescence in biliary pathology. Special emphasis on expression of a polycomb group protein EZH2 and a senescent marker p16INK4a in bile ductular

tumors and lesions. *Histol Histopathol*. 2015 Mar;30(3):267-275. 査読有

4. Sasaki M, Kakuda Y, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Infiltration of inflammatory cells expressing mitochondrial proteins around bile ducts and in biliary epithelial layer may be involved in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol*. 2014 Jun;67(6):470-6. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201917. 査読有

5. Kobayashi M, Kakuda Y, Harada K, Sato Y, Sasaki M (他4名) Clinicopathological study of primary biliary cirrhosis with interface hepatitis compared to autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 7;20(13):3597-608. doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3597. 査読有

6. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Chemokine-chemokine receptor CCL2-CCR2 and CX3CL1-CX3CR1 axis may play a role in the aggravated inflammation in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2014 Feb; 59(2):358-64. doi:10.1007/s10620-013-2920-6. 査読有

7. Kakuda Y, Harada K, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Sato Y, Sasaki M (他9名). Evaluation of a new histologic staging and grading system for primary biliary cirrhosis in comparison with classical systems. *Hum Pathol*. 2013 Jun;44(6): 1107-17. doi: 10.1016/j.humpath.2012.09.017. 査読有

8. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Increased expression of mitochondrial proteins associated with autophagy in biliary epithelial lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver Int*. 2013 Feb;33(2):312-20. doi: 10.1111/liv.12049. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1. Sasaki M, et al. A possible involvement of endoplasmic reticulum stress in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. The 65<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (2014年11月8-12日, Boston, USA)

2. 佐々木素子ら, WS4: 自己免疫性肝障害の病態と治療をめぐる問題点: 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変発生機序における小胞体ストレス, オートファジー, 細胞老化の関与. 第 50 回日本肝臓学会総会 (2014 年 5 月 29-30 日, ホテルニューオータニ, 東京)

3. Sasaki M. et al. Infiltration of macrophages and plasma cells with coarse granular expression of mitochondrial proteins around bile ducts and intraepithelial layer may be involved in the pathogenesis of bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (2013 年 11 月 1-5 日, Washington, DC)

4. 佐々木素子ら, パネルディスカッション: 自己免疫性肝疾患の基礎・臨床の最前線: 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変における autophagy 異常, ミトコンドリア蛋白発現亢進と細胞老化の関与. 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9-10 日, 東京グランドプリンスホテル新高輪, 東京)

5. 佐々木素子ら, ミトコンドリア蛋白陽性炎症細胞と原発性胆汁性肝硬変の胆管病変との関連. 第 49 回日本肝臓学会総会 (2013 年 6 月 6 日-7 日, 京王プラザホテル, 東京)

6. Sasaki M. et al. Infiltration of inflammatory cells expressing mitochondrial proteins around bile ducts and intraepithelial layer may be involved to the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. 102nd Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology (2013 年 3 月 4 日, Baltimore, USA)

7. Sasaki M. et al. Intraepithelial infiltration of ORM1-like protein 3 (ORMDL3)-expressing cells may be closely related to the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2012 年 11 月 13 日, Boston, USA)

8. Sasaki M. et al. Chemokines CCL2 and CX3CL1 as senescence-associated secretory phenotypes may play a role in aggravated inflammation in primary biliary cirrhosis. 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2012 年 11 月 13 日, Boston, USA)

[図書] (計 1 件)

Sasaki M., Nakanuma Y. Pathogenesis of Bile Duct Lesions in Primary Biliary Cirrhosis: Role of Autophagy Followed by Cellular Senescence. Hayat MA, editor. AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. Volume 2. Elsevier Inc., Amsterdam, 2014, p293-303

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 素子 (SASAKI MOTOKO)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号: 70225895

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

佐藤 保則 (SATO YASUNORI)  
金沢大学・医学系・講師  
研究者番号: 30324073

中沼 安二 (NAKANUMA YASUNI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号: 10115256