原発性胆汁性肝硬変の肝内胆管上皮での菌体成分誘導性アポトーシス関連分子の発現: 培養胆管上皮細胞を用いた検討

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/2297/29616

原発性胆汁性肝硬変の肝内胆管上皮での菌体成分誘導性アポトーシス関連分子の発現：培養胆管上皮細胞を用いた検討

原田 憲一　一瀬久美子　中沼 安二

要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）に見られる胆管細胞アポトーシスと菌体成分との関連性について，PBCと正常肝由来の肝内胆管上皮細胞（HIBEC）培養株を用いて検討した。すべてのHIBEC細胞ともTLR1, TLR2, TLR4を恒常的に発現し，PAMPs刺激に対してNF-κBの活性化が誘導された。また，HIBEC細胞はFasを発現し，PAMPs刺激による発現の変化は乏しかった。Bcl-2も恒常的に発現しており，正常肝由来HIBEC細胞ではPAMPs刺激でBcl-2発現が亢進した。しかし，PBC由来HIBEC細胞ではPAMPs刺激でBcl-2発現が減弱し，胆管細胞アポトーシスの誘導に関与していることが示唆された。

Key words
アポトーシス，自然免疫，胆管上皮細胞，原発性胆汁性肝硬変

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〕

背　景

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の主たる胆管消失機序はアポトーシスによる胆管細胞死であり，PBCの傷害胆管にはアポトーシス誘導分子であるFasの異常発現と抑制分子であるBcl-2の発現低下がみられる[1,2]。近年，PBCの病態発生または病態形成に菌体成分の関与が示唆されている。我々は，ヒト胆管癌由来およびマウス正常胆管由来の培養胆管細胞を用いた検討にて，胆管細胞が菌体成分認識受容体であるToll様受容体（TLR）を発現し，リポポリサッカライド（LPS）などのpathogen-associated molecular patterns（PAMPs）刺激に対してNF-κB活性化が誘導されることを明らかにし，胆管系自然免疫機構の存在を証明した[3]。また，他臓器や上皮細胞における感染症とアポトーシスとの関連性が報告されていることから，今回我々はPBCの病態発生または病態形成における胆道系自然免疫の関与について明らかにするため，胆管系自然免疫と胆管細胞アポトーシスとの関連性について検討した。

方　法

1. 培養細胞

対象として，PBC 2例（肝移植時摘出肝，組織学的病期4期）および正常肝2例（外科的切除肝，転移性肝癌の非癌部を使用）の肝組織から樹立したヒト肝内胆管細胞（HIBEC）の培養株を使用した。

2. PAMPs

TLR1/TLR2ヘテロダイマーのリガンドであるリポ蛋白（Pam3CKS4）およびTLR4リガンドであるLPS（ultrapure, 大腸菌 0111: B4由来）をInvivogen（San Diego, CA, アメリカ）から購入した。

3. RT-PCR およびリアルタイム PCR 法

培養細胞における TLR1, TLR2, TLR3, Fas, Bcl-2 mRNAs の発現を検討するため，細胞から全 RNA を抽出し，型の如く RT-PCR 法にてこれらの mRNA を検出した。さらに，PAMPs 刺激後の培養細胞における Fas および Bcl-2 mRNAs 発現の動態をリアルタイム PCR で検討した。なお，プライマーはタカラバイオ（大津）より購入した。

4. NF-κB-DNA binding assay 法

PAMPs 刺激に対する培養細胞の反応性を，細胞内シグナルの主要伝達分子である NF-κB の活性化にて評価した。すなわち，Pam3CSK4 (300 ng/ml) または LPS (1 μg/ml) を培養上清中に添加し，1 時間後の培養細胞から核成分を抽出した。NF-κB の活性化は，TransAM™ NF-κB Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, アメリカ) を用いて，活性化 NF-κB とコンセンサス DNA との結合能にて測定した。

5. ELISA 法

上記 NF-κB -DNA binding assay 法で抽出した核成分サンプルを用いて，核蛋白中に存在する p53 を ELISA 法 (Human Total p53 DuoSet, Minneapolis, MN, アメリカ) にて測定した。

結　果

1. 培養細胞における TLR 発現

今回用いた HIBEC 細胞 4 株すべてから RT-PCR 法にて TLR1, TLR2, TLR4 mRNA が検出され，胆管細胞はこれらの TLR 分子を恒常的に発現していることが示された。なお，PBC 由来と正常肝由来の HIBEC 細胞との間に明らかな TLR 発現の差違は認めなかった。

2. PAMPs 刺激による NF-κB 活性の亢進

正常肝由来 HIBEC 細胞の NF-κB 活性は，無刺激と比較し LPS 刺激で 4.3 ± 0.6 倍（平均 ± 標準偏差）に亢進し，PBC 由来の HIBEC 細胞も同様に LPS 刺激で 4.4 ± 0.7 倍に亢進した。さらに Pam3CSK4 刺激でも正常肝由来 HIBEC 細胞で 2.9 ± 0.8 倍，PBC 由来 HIBEC 細胞で 3.2 ± 1.6 倍に NF-κB が活性亢進した。PBC 由来と正常肝由来の HIBEC 細胞との間に明らかな反応性の差違は認めなかった。

3. アポトーシス関連因子の発現と PAMPs 刺激による発現動態

今回用いた全ての HIBEC 細胞から RT-PCR 法にて Fas mRNA が検出された。リアルタイム PCR にて PAMPs 刺激による Fas 発現の動態を検討した結果，正常肝由来 HIBEC 細胞の Fas mRNA 発現は無刺激と比較して LPS 刺激で 1.3 ± 0.1 倍，PBC 由来の HIBEC 細胞でも 1.4 ± 0.2 倍とやや Fas mRNA の亢進を認めた。しかし，無刺激と LPS 刺激との間，また正常肝と PBC との間にも統計学的有意差は得られなかった（図 1)。Pam3CSK4 刺激では正常肝由来 HIBEC 細胞で 0.95 ± 0.18 倍，PBC 由来 HIBEC 細胞で 0.9 ± 0.2 倍とやや Fas mRNA の発現低下を認めたが，無刺激と Pam3CSK4 刺激との間および正常肝と PBC との間にも統計学的有意差は得られなかった (図 1)。

RT-PCR 法にて全ての HIBEC 細胞から Bcl-2 mRNA の増幅がみられ，正常肝由来の HIBEC 細胞では Pam3CSK4, LPS 刺激で Bcl-2 発現の増加がみられた。しかし，PBC 由来の HIBEC 細胞では，Pam3CSK4, LPS 刺激で Bcl-2 発現が減少する傾向があり，PAMPs 刺激に対する Bcl-2 発現の挙動が正常肝由来と PBC 由来の HIBEC 細胞との間で異なっていた。リアルタイム PCR で Bcl-2 mRNA を定量した結果，LPS 刺激で正常肝由来の HIBEC 細胞では 2.5 ± 2.3 倍，PBC 由来の HIBEC 細胞では 0.54 ± 0.37 倍であった（図 2)。正常肝と PBC の間で統計学的検討を行った結果，危険率 <0.1 ながら有意差が得られた（Welch's t-test)。Pam3CSK4 刺激で正常肝由来の HIBEC 細胞では 2.5 ± 1.6 倍，PBC 由来の HIBEC 細胞では 0.85 ± 0.64 倍であり，危険率 <0.1 ながら両者に有意差が得られた (Welch's t-test) (図 2)。

4. 培養細胞における p53 の発現

HIBEC 細胞から抽出した核蛋白サンプルを用い

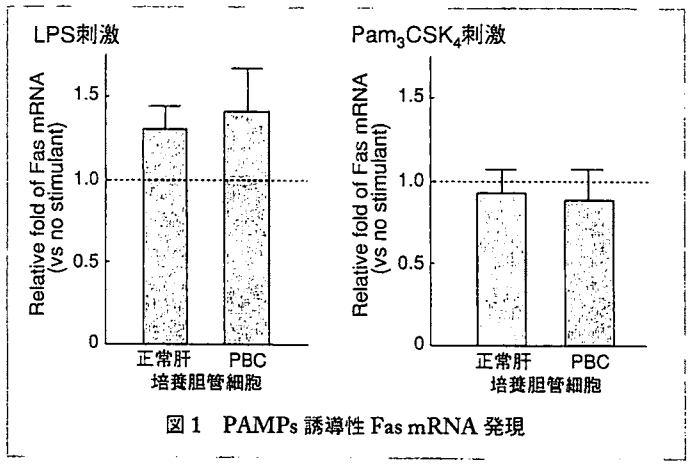

図1　PAMPs 誘導性 Fas mRNA 発現

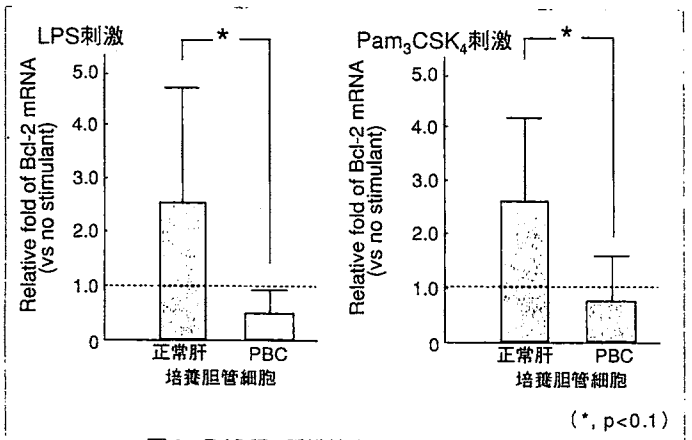

図2　PAMPs 誘導性 Bcl-2 mRNA 発現

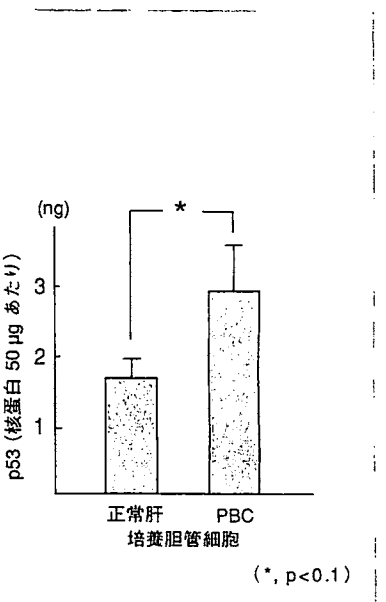

図3　p53 蛋白の発現

て p53 蛋白量を ELISA 法にて測定した結果，正常肝由来の HIBEC 細胞では核蛋白 50 μg あたり p53 蛋白量が 1.7 ± 0.3 ng であったが，PBC 由来の HIBEC 細胞では 2.9 ± 0.6 ng であり，PBC 由来の HIBEC 細胞では p53 蛋白の発現が強い傾向があった（図3）(Welch's t-test, 危険率 <0.1)。

考　察

近年，我々はマウス胆管細胞培養株およびヒト胆管癌由来の培養細胞株を用いて，胆管細胞が TLR を発現し LPS などの PAMPs 刺激に対して NF-κB 活性化が誘導されることを明らかにし，胆管系自然免疫機構の存在を証明してきた[3]。今回我々は，正常肝および PBC 肝由来のヒト肝内胆管上皮細胞（HIBEC）培養株を樹立し検討した結果，いずれの HIBEC 細胞とも TLR1, TLR2, TLR4 の発現があり，さらに TLR1/TLR2 ヘテロダイマーのリガンドである Pam3CSK4 や TLR4 のリガンドである LPS の存在下で NF-κB の活性化がみられ，また正常肝と PBC との間に明らかな差違は認めなかった。これらの所見より，非癌由来のヒト胆管細胞においても機能的な TLR1, TLR2, TLR4 を発現していることが明らかとなり，さらに PBC 胆管上皮における TLR1, TLR2, TLR4 に関する自然免疫の異常があるとは考えにくいことが示唆された。

PBC の傷害胆管にみられるアポトーシスの発生に，胆管におけるアポトーシス誘導分子 Fas の異常発現とアポトーシス抑制分子 Bcl-2 の発現低下が関与していることが報告されている[1,2]。今回樹立した HIBEC 細胞では Fas, Bcl-2 共に RT-

PCRで検出でき，通常の培養条件下でのHIBEC細胞はFasおよびBcl-2を恒常的に発現しているものと考えられた。HIBEC細胞におけるFas発現はTLR1, TLR2, TLR3に対するPAMPs刺激で明らかな変化はみられず，Fas発現の制御に少なくともこれらTLRによる自然免疫機構は関与していないものと推測された。しかし，HIBEC細胞でのBcl-2の発現に関しては，PAMPs刺激で発現の挙動がみられた。すなわち，正常肝由来のHIBEC細胞ではPAMPs刺激でBcl-2発現が誘導された。今回用いたPAMPsであるPam3CSK4（リポ蛋白），LPSは各々一般細菌およびグラム陰性菌の主たる壁成分である。このような主要な細菌構成成分の存在下で胆管細胞のBcl-2発現亢進がみられたことは，細菌成分の暴露にて抗アポトーシス作用が増強することが示唆され，感染に対する生体防御機構の1つと考えられた。しかし，PBC由来のHIEBC細胞では，PAMPs刺激でBcl-2発現の減弱傾向がみられた。この所見は，*in vivo*でのPBC胆管におけるBcl-2発現低下を反映している可能性があり，アポトーシス刺激に対する感受性亢進がPBCの胆管細胞アポトーシスの発生に関与していることが示唆された。

Bcl-2発現の低下に関する機序として，Aokiら[4]は血管内皮細胞を用いた検討で，低酸素状態による酸化ストレスがNF-κBを活性化させ，p53発現の発現亢進からBcl-2の発現を低下させる機序を報告している。我々は，*in vivo*の検討にて，PBCの傷害胆管では野生型p53の発現が亢進していることを報告している[5]。さらに今回のHIBEC細胞を用いた検討にて，PBC肝由来のHIBEC細胞は正常肝由来と比較し，p53蛋白の発現が亢進していた。この結果より，培養細胞の状態でもPBCの胆管細胞はp53が亢進しており，PAMPs誘導性のBcl-2の発現低下に関与していることが示唆された。しかし，なぜ通常の培養条件下でもPBC肝由来HIBEC細胞のp53発現亢進が維持されているのかは不明であり，今後の検討課題と考えられた。

文献

1) Harada K, et al: Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. Hepatology 26: 1399-1405, 1997.
2) Kuroki T, et al: Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. Virchows Arch 429: 119-129, 1996.
3) Harada K, et al: Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. Lab Invest 83: 1657-1667, 2003.
4) Aoki M, et al: Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. Hypertension 38: 48-55, 2001.
5) Harada K, et al: Increased expression of WAF1 in intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis relates to apoptosis. J Hepatol 34: 500-506, 2001.