

原発性胆汁性肝硬変の胆管炎発生におけるPPAR γ 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/2297/29614

原発性胆汁性肝硬変の胆管炎発生における PPAR γ の関与

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) の病態形成における抗炎症作用分子ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR γ) の関与について検討した。免疫組織化学的検討にて、ヒト肝内胆管は恒常的に PPAR γ を発現していたが、PBC の障害胆管では発現の減弱が見られた。培養胆管細胞を用いた検討にて、IL-4 は胆管細胞の PPAR γ 発現を亢進させたが、IFN γ は緩徐に発現を減弱させた。また、PPAR γ リガンドは LPS 誘導性 NF- κ B の活性化を抑制した。以上より、PBC の胆管における PPAR γ の発現は胆管周囲のサイトカインネットワークによって制御され、胆管炎の発生または増悪に関与していることが示唆された。

Key words: Toll-like receptor, PPAR, 胆管細胞, 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]

要

背 景

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病態または病態形成に細菌感染症や菌体成分の関与が示唆されているが、細菌成分と胆管病変との関連性については不明である。近年、Toll-like receptor (TLR) を介した自然免疫機構はマクロファージなどの免疫担当細胞のみならず腸管上皮などの上皮細胞も有しており、特にクローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患では自然免疫の破綻または異常が病態形成に関与していることが明らかとなっている。我々は、胆管細胞が TLR4 を介して lipopolysaccharide (LPS) を認識し、nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化と transforming necrosis factor (TNF)- α の産生が誘導されることを報告しており、胆管系固有の自然免疫機構の存在が想定される¹⁾。さて、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ は、脂質代謝にかかわる転写因子であるが、リガンド刺激にて NF- κ B などの重要な

炎症関連転写因子を抑制することにより抗炎症作用を示す。今回我々は、PBC の胆管病変における PPAR γ の発現および PPAR γ の発現調節機構について検討し、PBC 胆管炎の発生と胆道系自然免疫との関連性について考察した。

方

方 法

1. 肝組織材料と免疫組織化学的染色

PBC (組織学的病期 1 ~ 3 期) 11 例、C 型慢性肝炎 (CH-C) 9 例、肝外閉塞性黄疸 5 例、正常肝 8 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象に、PPAR γ 抗体 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, 米国) を用いた Envision 法 (Dako Japan, 東京) にて免疫組織化学的染色を行った。評価は各切片から小葉間胆管 (PBC では障害胆管を含む) を 5 ケ選択後、各胆管における PPAR γ 発現を観察し、統計学的解析を行った。

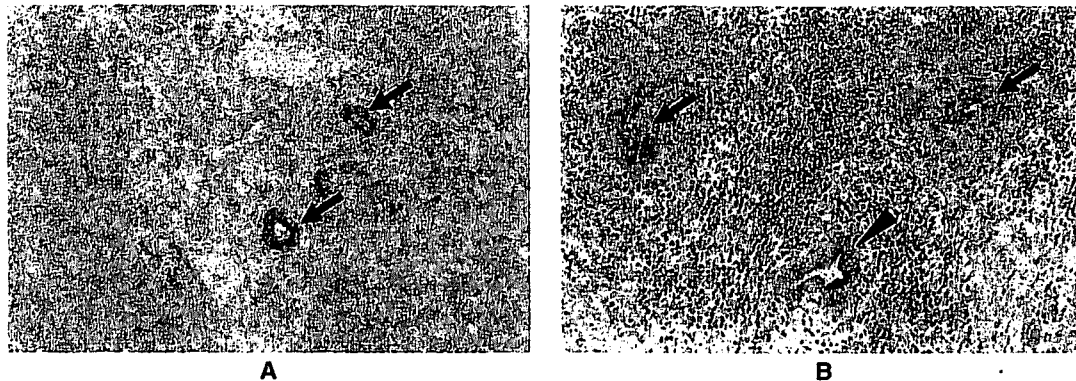


図1 PPAR γ の免疫染色

(A) 正常肝：小葉間胆管(矢印)に PPAR γ の発現を認める。
(B) PBC：PPAR γ 発現が比較的保たれている障害胆管(矢頭)と発現低下を示す障害胆管(矢印)を示す。

2. 培養細胞

ヒト肝内胆管癌細胞培養株 2 株 (CCKS1 と HuCCT1), ヒト正常胆管細胞培養株 1 株 (転移性肝癌の背景肝由来) を使用した。

3. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) 法

培養細胞における PPAR γ 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 PPAR γ mRNA を検出した。また, 定量はリアルタイム PCR にて行った。

4. NF- κ B 活性化の評価

グラム陰性菌の主要壁成分である LPS に対する反応性を細胞内シグナルの主要伝達分子である NF- κ B の活性化にて評価した。すなわち, 1 μ g/ml の濃度で LPS 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- κ B の活性化は, TransAMTM NF- κ B Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, 米国) を用いて, 活性化 NF- κ B とコンセンサス DNA との結合能にて測定した。

5. サイトカイン刺激

Th1 型サイトカインとして interferon (IFN) - γ , Th2 型サイトカインとして interleukin (IL) -4 を用い, 各 1,000 U/mL の濃度で培養上清に添加した (なお, 培養細胞はこれらのサイトカイン受容体を

有することを確認済み)。刺激後 3 ~ 24 時間目の培養細胞を回収し, リアルタイム PCR 法にて PPAR γ mRNA 発現を比較検討した。

6. PPAR γ リガンドによる前処置

PPAR γ の内因性リガンド 15d-deoxy-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) で, 4 時間前処置後, LPS に対する感受性の変化を NF- κ B の活性化にて評価した。

結 果

1. 肝組織内における PPAR γ の発現

正常肝における PPAR γ の発現は, 主に肝細胞と胆管細胞の細胞質にみられ, 肝細胞ではしばしば核にも発現を認めた (図1)。小葉間胆管における PPAR γ 発現は, 肝細胞に比し強くみられたが, PBC の障害胆管ではしばしば肝細胞より発現が低下していた (図1)。このような PPAR γ 発現の低下を示す小葉間胆管の頻度は, 正常肝で 5% (2/40), CH-C で 6.7% (3/45), 閉塞性黄疸で 12% (3/25) であったが, PBC では 34.5% (19/55) の胆管に PPAR γ の発現低下がみられ, PBC で有意に高率であった (<0.05)。

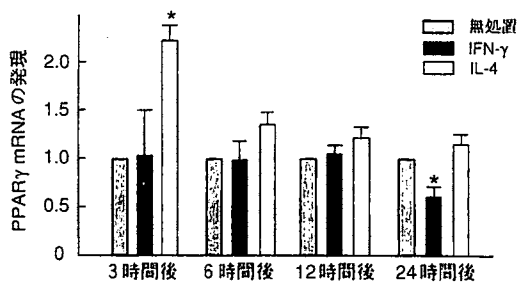


図2 サイトカイン刺激による PPAR γ 発現の変化
3種類の培養細胞に IFN- γ または IL-4 を添加後、経時的に PPAR γ mRNA をリアルタイム PCR で定量した。PPAR γ 発現は IL-4 添加後 3 時間目で 2.2 倍に亢進し、その後漸減した。IFN- γ 刺激では添加後 3～12 時間の間に明らかな発現の増減を示さなかったが、24 時間目で 61% にまで発現が減弱した。(Bars, 平均±標準誤差) (*, <0.05)

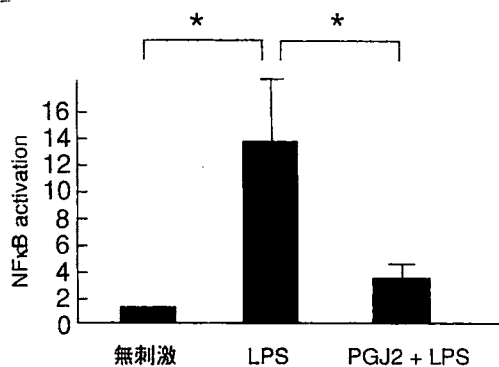


図3 PPAR γ リガンドによる LPS 誘導性 NF- κ B 活性の変化

3種類の培養細胞に LPS で刺激後 NF- κ B の活性化を検討した結果、無刺激に比べ 13.7 倍にまで活性が亢進した。しかし、PPAR γ リガンド (15d-PGJ2) で前処置後、LPS 刺激を行うと NF- κ B の活性化は 3.5 倍にまで抑制された。(Bars, 平均±標準誤差) (*, <0.05)

2. サイトカインによる PPAR γ 発現の変化

RT-PCR 法にて、今回用いたすべての培養細胞は恒常的に PPAR γ mRNA を発現していた。これらの培養細胞に IFN- γ または IL-4 を添加し、経時的に PPAR γ mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価したところ、IL-4 刺激後 3 時間目から PPAR γ mRNA 発現が亢進し、その後発現量が漸減した (図2)。IFN- γ 刺激では刺激後 12 時間まで明らかな変化を認めなかったが、24 時間後には有意に PPAR γ の発現低下がみられた (図2)。

3. PPAR γ リガンドによる TLR 感受性の変化

培養細胞を LPS (1 μ g/mL) で刺激後 NF- κ B の活性化を検討した結果、無刺激細胞に比べ約 13.7 倍に NF- κ B が活性化していた (図3)。しかし、PPAR γ リガンド (15d-PGJ2, 20 μ M) で 4 時間前処置したところ、LPS 刺激に対する NF- κ B の活性化は約 26% (13.7 \rightarrow 3.5 倍) にまで抑制された (図3)。

考 察

PPAR γ は、脂肪細胞分化と糖代謝に関わるステロイドホルモン核内受容体スーパーファミリーに属する核内転写因子である。PPAR γ は脂肪組織に高発現しているが、肝臓などの免疫系臓器や膵臓、腸管にも分布している。リガンドは、糖尿病治療薬として以前使用されたチアゾリジン誘導体 (Troglitazone) の他、内因性リガンドとしてアラキドン酸カスケードの prostaglandin 代謝産物 (15d-PGJ2) が知られている。これらのリガンドはマクロファージ、単球、上皮細胞に作用して、NF- κ B, mitogen activated protein kinase (MAPK) や activator protein-1 (AP-1) などの細胞内転写因子の活性化を抑制することにより抗炎症作用を示す。近年、潰瘍性大腸炎の腸管上皮で PPAR γ 発現の低下がみられることが報告され、PPAR γ による抗炎症作用の低下が疾患の病態形成に関与していると推測されている²⁾。今回我々は、PBC の胆管病変における PPAR γ の発現について検討したところ、正常肝を含めた対照群の肝内胆管には恒常的に PPAR γ の発現がみられたが、PBC 胆管では PPAR γ の発現低下が多くみられた。すなわち、PBC の胆管では PPAR γ による抗炎症作用が低下しており、PBC 特異的な胆管炎の発生に加担していると推測された。

サイトカインは、炎症反応、T 細胞および B 細胞の活性化と分化、抗体産生などに関与し、特に自己免疫性疾患の発生、進展に重要な役割を果たす。近年、CD4 陽性 T 細胞はその産生するサイトカインパターンにより Th1 型と Th2 型に大別され、

Th1/Th2 バランスの異常が自己免疫疾患の病態形成に関連していることが明らかとなっている。PBCの障害胆管周囲ではTh1型サイトカインが優位な状態と考えられており、Th1型サイトカインが細胞障害性T細胞の分化・誘導を促し、胆管障害に関与していることが示唆されている³⁾。今回我々は、ヒト肝内胆管癌および正常胆管細胞由来の培養細胞を用いてPPAR γ 発現について検討した結果、胆管細胞は恒常的にPPAR γ を発現していた。また、Th2型サイトカインであるIL-4刺激にてPPAR γ の発現が増強し、さらにTh1型サイトカインであるIFN- γ 存在下では緩徐なPPAR γ 発現の減弱がみられた。このことよりPBC胆管におけるPPAR γ 発現の減弱の1つの要因として、PBC胆管周囲微小環境における異常なTh1型サイトカインへの偏位が考えられた。したがって、PBC胆管周囲でのTh1への偏位は、胆管細胞における菌体成分に対する感受性を亢進させ、NF- κ Bの活性化を介した炎症性サイトカインの産生亢進が胆管炎の発生に加担していると推測された。

近年、腸炎や関節リウマチの実験動物モデルを用いた検討で、PPAR γ リガンドがこれらの動物の症状を軽減することが報告されている⁴⁾⁵⁾。今回、内因性PPAR γ リガンドである15d-PGJ2を培養胆管細胞に作用させたところ、菌体成分刺激(LPS)に対するNF- κ Bの活性化が顕著に抑制された。この所見よりPPAR γ リガンドがPBCの胆管炎を軽減させることが示唆され、PBCの新たな治療薬として利用できる可能性が挙げられた。

結 論

今回の検討より、ヒト肝内胆管系における自然免疫機構の制御に胆管周囲のサイトカインネットワークおよびPPAR γ が関与していることが示唆され、異常な自然免疫現象がPBCの胆管病変形成に加担していると推測された。また、PPAR γ リガンドがPBCの新たな治療薬として期待された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Dubuquoy L, et al: Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124: 1265-1276, 2003.
- 3) Harada K, et al: In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* 25: 791-796, 1997.
- 4) Kawahito Y, et al.: 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 106: 189-197, 2000.
- 5) Wada K, et al: PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med* 7: 329-331, 2001.