

# Pathological significance of ductular reactions of primary biliary cirrhosis with respect to a new histological staging and grading system

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/31505">http://hdl.handle.net/2297/31505</a>

## 原発性胆汁性肝硬変における細胆管反応の病理学的意義： 新しい組織学的病期分類・活動度分類を用いた検討を中心に

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻形態機能病理学

(旧講座名：病理学第二)

(主任：中沼安二教授)

向 宗 徳

本研究では、当教室が提唱した原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) の新しい病期分類・活動度分類を用い、細胆管反応 (ductular reaction, DR) の病理学的意義を検討した。病理組織学的にPBCと診断された40症例を対象とし、免疫組織化学的に検出したサイトケラチン (cytokeratin, CK) 19と神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) の発現を指標にしたDRと、新分類の病期・活動度スコア、病期の構成要素 [線維化, 胆管消失, オルセイン顆粒沈着 (orcein-positive granules, OPG)], 血液生化学データとの関連性を検討した。CK19陽性DRはPBCの病期スコア, 胆管消失, OPGと有意な負相関を示した。一方, NCAM陽性DRは, 病期スコア, 線維化, OPGと有意な正相関を示した。NCAM陽性DRは, 胆道系酵素や総ビリルビン値と正相関を示した。PBCの活動度スコア (胆管炎, 肝炎) とDRの程度に有意な相関はなかった。今回の検討より, CK19陽性の成熟細胆管を含むDRは病期の進展とともに減少し, 一方, NCAM陽性DRが病期の進行とともに増加し, 胆汁うっ滞の進展と深く関連することが示唆された。また進行期PBCのDRでは細胞老化マーカーp16, p21の発現を高率に認め, これらの老化DRから分泌される生物学的活性物質がPBCの病期進展, 特に線維化に関連する可能性が示唆された。

**Key words** 原発性胆汁性肝硬変, 細胆管反応, 細胞老化, 胆汁うっ滞, 線維化

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) は代表的な自己免疫性肝疾患であり, 主に中年女性が罹患する<sup>1)2)</sup>。PBC患者では, 血清学的には抗ミトコンドリア抗体 (anti-mitochondrial antibody, AMA) が高頻度で検出され, 血清IgM値は高率に上昇する<sup>3)</sup>。組織学的には肝内小型胆管 (主に小葉間胆管) が選択的に傷害を受け, 慢性非化膿性破壊性胆管炎 (chronic non-suppurative destructive cholangitis, CNSDC) を代表とする特徴的な慢性胆管炎像を呈する。傷害小葉間胆管は消失し, 広汎な胆管消失の結果, 慢性に経過する胆汁うっ滞が進行し, 胆汁性肝硬変へと進展する<sup>4)5)</sup>。PBCでの肝細胞傷害の機序としては, 胆管消失に関連した慢性胆汁うっ滞や後述のPBCにみられる肝炎性変化が知られており, これらの持続性肝細胞傷害の結果として, 肝線維化が発生, 進展すると考えられている<sup>1)2)</sup>。

慢性ウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) などの慢性進行性肝疾患の病態把握には組織学的評価が一般的に用いられており, 通常, 線維化と肝小葉構造の改変の程度が病期分類として, 肝細胞の壊死炎症の程度が活動度分類として用いられている<sup>6)~8)</sup>。従来, PBCの病期分類としてScheuer分類<sup>9)</sup>, Ludwig分類などが用いられてきた。ちなみにScheuer分類では, I期はCNSDC, II期が非定型的細胆管の増生であり, III期は線維性隔壁, 瘢痕形成で特徴付けられ, IV期は肝硬変である。一方, Ludwig分類では慢性肝炎の病期分類が応用されており, I期は門脈域の炎症性変化が中心であり, II期はインターフェース肝炎, III期が架橋性の肝細胞の壊死や架橋性を含む線維性隔壁の多発であり, 肝小葉は分断され, 肝小葉構造の乱れを伴う。IV期は肝硬変期である。これらの分類

平成24年1月18日受付, 平成24年3月15日受理

Abbreviations : ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AMA, anti-mitochondrial antibody; ANA, anti-nuclear antibody; AST, aspartate aminotransferase; CA, cholangitis activity; CK, cytokeratin; CNSDC, chronic non-suppurative destructive cholangitis; DAB, 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DR, ductular reaction;  $\gamma$ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase; EMT, epithelial-mesenchymal transition; HA, hepatitis activity; IL, interleukin; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NCAM, neural cell adhesion molecule; OPG, orcein-positive granules; PBC, primary biliary cirrhosis; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; SASP, senescence-associated secretory phenotype

では、胆管炎、細胆管増生、またインターフェイス肝炎などがスポット的に評価される。しかし、それらの病変はPBCの肝内では混在して出現することが知られており、またサンプリングエラーの多い点が指摘されてきた。さらに、これらの分類が提唱されてから40年近く経っておりこの間に臨床医学、治療医学が大きく展開しており、これらを反映した新しい病期、活動度分類が求められていた。

当研究室は最近、PBCの活動度として胆管炎、肝炎の程度をとりあげ、また線維化、慢性胆汁うっ滞、胆管消失の程度を総合的に評価する病期分類を考案し、PBCの新しい活動度、病期分類を提唱した<sup>10)11)</sup>(表1-3)。本分類では、病期を3つの指標で評価するのが特徴である。つまり、PBCの進展として線維化、慢性胆汁うっ滞を反映するオルセイン陽性顆粒 (orcein-positive granules, OPG) の沈着、さらに胆管消失をスコア化し、これらの合計点で病期を判断するのでサンプリングエラーが少なくなると考えられる。また、新たにPBCの活動度として胆管炎の程度、また肝実質炎の程度を取り上げた点が新しく特徴的である。

さて、細胆管反応 (ductular reaction, DR) は、さまざまな肝障害に伴って肝内の門脈域辺縁にみられる反応性病変で、病変部には小型の胆管細胞の増加、炎症性細胞の浸潤、さらに間質結合織成分の増生がみられる<sup>12)13)</sup>。DRは線維化、肝再生、さらには肝発癌に関連することが明らかになりつつあり、最近ではDRにおける肝ステム細胞の関与も注目されている<sup>12)~15)</sup>。DRは非特異的な反応であり、種々の疾患でみられるが、個々の疾患では肝疾患の種類やその病期によって多様な表現型がみられることが知られている<sup>12)~16)</sup>。細胆管では、いわゆる胆管上皮マーカーであるサイトケラチン (cytokeratin, CK) 7, CK19, OV-6 (oval cell marker), NCAMが高率に発現し、さらにサイトカインやケモカインの発現もみられることが知られている。DRでのこれらマーカーの発現は、病態や背景疾患によって一定していない<sup>12)~16)</sup>。

PBCでも各病期でDRがみられ、病態形成に深く関係することが知られている<sup>16)</sup>。炎症性に拡大した門脈域では小葉間胆管の障害に加え、小型小葉間胆管あるいは細胆管の増生がみられる。また、病期の進展した例では管腔の不明瞭な非定型的細胆管増生が種々の程度に出現し、Scheuer分類のⅡ期<sup>9)</sup>を特徴付けている。また、最近、細胞老化現象が肝を構成する細胞に発現し、肝胆道系疾患の病態形成に深く関連することが注目されている。当研究室の研究では、PBCに加え、非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) のDRでは細胞老化マーカーが発現し、種々のケモカインや生物学的活性物質を発現することが明らかとなっている<sup>15)16)</sup>。

そこで、今回、まず新しいPBCの活動度、病期分類に基づいてPBC症例を分類し、従来報告されている

Scheuer分類との対比を試みた。次いで、細胆管での形質発現、特にCK19とNCAMの発現に注目し、CK19陽性DRの出現程度、それにNCAM陽性DRの出現程度とPBCの活動度、病期、PBCの臨床データとの関連性を検討した。また、DRの細胞増殖動態、細胞老化との関連についても病期との関連性で検討した。得られた結果を基に、PBCの進行におけるDRの臨床病理学的な意義について解析を行った。

## 対象および方法

### I. 対象

PBCの臨床的、血清学的特徴を有し、組織学的診断基準<sup>12)</sup>を満たした40症例を対象にした (女性35人、男性5人、年齢38-90歳、平均年齢58歳)。これら症例は、当教室で経験された症例から選択した (1997年~2007年)。NAFLD、B型あるいはC型肝炎ウイルス陽性を同時に認めたPBC症例は除外した。

肝生検組織は、型の如く10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、その後、各ブロックから15枚以上の薄切切片 (4 $\mu$ m厚) を作製し、HE染色、アザン・マロリ染色、鍍銀染色、およびオルセイン染色を行った。線維化、胆管消失や慢性胆汁うっ滞 (OPGの程度で評価)、慢性胆管炎および肝炎の活動度を以下の新しい病期分類、活動度分類を用いて0-3の4段階に評価した。さらに残りの切片を用い、全例において、以下の免疫組織化学的検索に用いた。

### II. 新しいPBCの病期分類と活動度分類

#### 1. 病期分類

PBC肝にみられる肝線維化、胆管消失、およびOPGの沈着を指標とした慢性胆汁うっ滞の3項目を組合わせた新しい病期分類を用い、PBC症例の病期分類を行った (表1,2)<sup>10)11)</sup>。

肝線維化を3段階のスコアに分類した (表1)。すなわち、スコア0は殆ど線維化が観察されない状態、スコア1では門脈域の線維化を認め、少数の不完全な線維性隔壁を認めるものを含めた。スコア2は線維性に拡大した門脈域が相互に連結し、架橋性線維性隔壁を形成したもので肝小葉構造の改築を伴う。スコア3は肝硬変を指す。胆管消失のスコア評価は、PBCの標的組織である小葉間胆管を中心に行った<sup>5)17)18)</sup>。スコア0は標本上の全ての門脈域において胆管消失が見られないもの、スコア1, 2, 3はそれぞれ、胆管消失が標本上の1/3未満の門脈域、1/3~2/3の門脈域、2/3以上の門脈域に観察されるものである。肝細胞内のOPGはリソソーム内に隔離され、沈着した銅が結合する銅結合蛋白を染色しており、OPGの沈着は銅顆粒の沈着を意味しており、胆汁の慢性うっ滞の感受性の高い指標をされている<sup>10)11)19)</sup>。OPG沈着状態をスコア0, 1, 2で評価した。スコア0は門脈域辺縁の肝細胞にOPGの沈着が見られないものを指す。スコア1は少なくとも1つの門脈域で、門脈域辺縁の

1/3未満にOPGの沈着が見られるものを指す。スコア3は全ての門脈域において門脈域辺縁の2/3以上にOPGの沈着が見られるものを指す。スコア2はスコア1とスコア3の中間にあたる。

各々の標本で線維化、胆管消失、およびOPG沈着のそれぞれの項目のスコアを合計し、合計0が病期1(進行なし、または進行が最小限に留まっている)、1-3が病期2(進行が軽度)、4-6が病期3(進行が中等度)、7-9が病期4(進行が高度)と分類した(表2)<sup>10)11)</sup>。

Table 1. Scoring for the new histological staging of primary biliary cirrhosis

Score	Pathological findings
<b>Fibrosis</b>	
0	No portal fibrosis or fibrosis limited to portal tracts
1	Portal fibrosis with periportal fibrosis or incomplete septal fibrosis
2	Bridging fibrosis with variable lobular disarray
3	Liver cirrhosis with regenerative nodules and extensive fibrosis
<b>Bile duct loss</b>	
0	No bile duct loss
1	Bile duct loss in < 1/3 of portal tracts
2	Bile duct loss in 1/3 - 2/3 of portal tracts
3	Bile duct loss in > 2/3 of portal tracts
<b>Deposition of orcein-positive granules</b>	
0	No deposition of granules
1	Deposition of granules in several periportal hepatocytes in < 1/3 of portal tracts
2	Deposition of granules in variable periportal hepatocytes in 1/3 - 2/3 of portal tracts
3	Deposition of granules in many hepatocytes in > 2/3 of portal tracts

Table 2. New staging of primary biliary cirrhosis

Stage	Sum of score
1 (no progression)	0
2 (mild progression)	1-3
3 (moderate progression)	4-6
4 (advanced progression)	7-9

Table 3. New histological grading of necroinflammatory activity for primary biliary cirrhosis

Score	Activity
CA 0 (no activity)	No cholangitis, but mild duct epithelial damage may be present
CA 1 (mild activity)	One evident chronic cholangitis in the specimen
CA 2 (moderate activity)	More than two bile ducts with evident chronic cholangitis
CA 3 (marked activity)	At least one CNSDC in the specimen
HA 0 (no activity)	No interface hepatitis, and no or minimum lobular hepatitis
HA 1 (mild activity)	Interface hepatitis affecting 10 continuous hepatocytes in one portal tract or fibrous septa, and mild-moderate lobular hepatitis
HA 2 (moderate activity)	Interface hepatitis affecting 10 continuous hepatocytes in more than two portal tracts or fibrous septa, and mild-moderate lobular hepatitis
HA 3 (marked activity)	Interface hepatitis affecting 20 continuous hepatocytes in more than half of the portal tracts, and lobular hepatitis, or bridging or zonal necrosis

CA, cholangitis activity; CNSDC, chronic non-suppurative destructive cholangitis; HA, hepatitis activity.

## 2. 活動度分類

CNSDCを含む慢性胆管炎と慢性活動性肝炎様の変化がPBCの代表的な壊死炎症性病変と考えられている。新分類に従い慢性胆管炎の活動度(cholangitis activity, CA)は、標本における慢性胆管炎の程度と分布に従って4段階(CA0-CA3)にスコア化した(表3)<sup>10)11)</sup>。一方、肝炎の活動度(hepatitis activity, HA)はインターフェイス肝炎と肝小葉炎を中心に評価し、4段階(HA0-HA3)にスコア化した(表3)。

慢性胆管炎のスコア化に関しては、スコア0では胆管炎を認めない、または不明瞭な胆管傷害像を認める。軽度な胆管上皮傷害もスコア0に含まれる。スコア1では、標本内に明瞭な慢性胆管炎を示す傷害胆管を1個認める。スコア2では、標本内に明瞭な慢性胆管炎を示す2個以上の胆管を認める。スコア3では、他の型の胆管傷害の有無を問わず、CNSDCを示す傷害胆管を標本内に少なくとも1個認める。

肝炎の活動度のスコア化に関しては、インターフェイス肝炎を認めないか、インターフェイス肝炎を認めないが軽微な肝小葉炎を伴っている場合をスコア0と評価する。スコア1では、1箇所の門脈域または線維性隔壁に隣接する連続した10個の肝細胞を傷害するインターフェイス肝炎を認め、軽度～中等度の肝小葉炎も伴っている。スコア2では2箇所以上の門脈域または線維性隔壁で、連続した10個の肝細胞を傷害するインターフェイス肝炎を認め、軽度～中等度の肝小葉炎も伴っている。スコア3では半数以上の門脈域で、連続した20個の肝細胞を傷害するインターフェイス肝炎を認め、中等度の肝小葉炎も伴っている。架橋性または帯状の壊死が観察される場合もスコア3と評価した。

## III. 免疫組織化学によるDRの評価

### 1. CK19, NCAM発現DRの半定量的検討

胆管上皮のマーカーとしてCK19, NCAMを用いた。マウスモノクローナル抗CK19抗体(クローンRCK108, 100倍希釈, DAKO Cytomation, Carpinteria, USA), マウスモノクローナル抗NCAM抗体(クローン123C3, 50



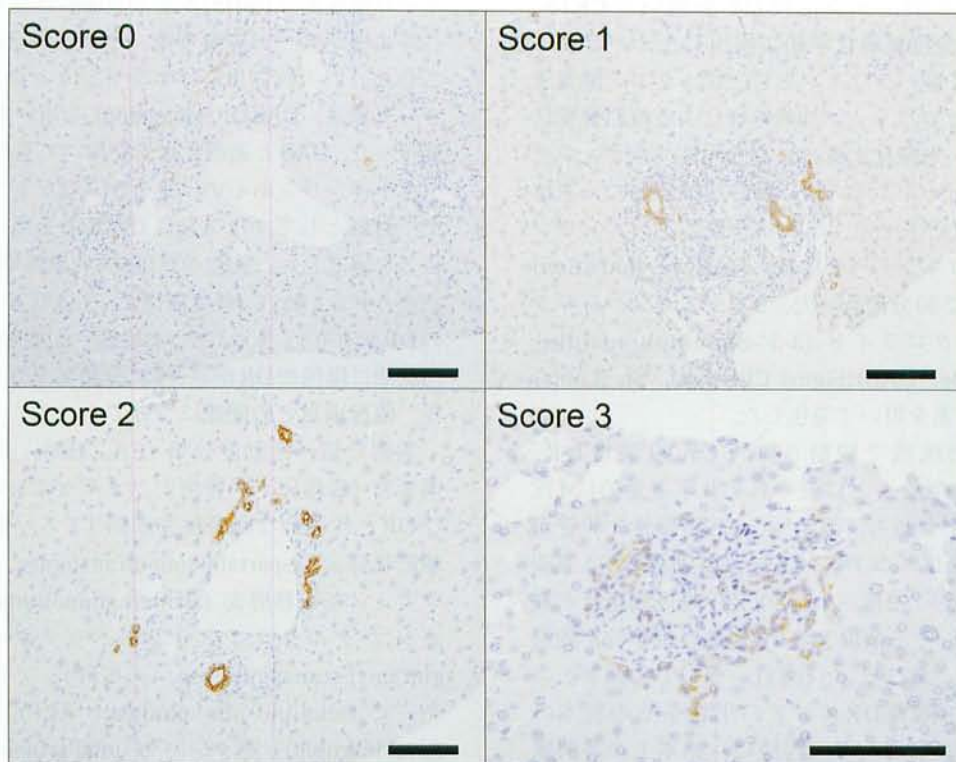


Fig. 1. Scoring of the extent of cytokeratin (CK) 19-positive ductular reaction. The extent of CK19-positive ductules were classified into four categories according to the number of positively CK19 stained ductules independent of the intensity of CK19 immunostaining at each discernible portal tract: score 0, negative; score 1, mild expression, only 1 positive ductule detected; score 2, moderate expression, 2-4 positive ductules detected; and score 3, marked expression, more than 4 positive ductules detected. Bar=100  $\mu$ m

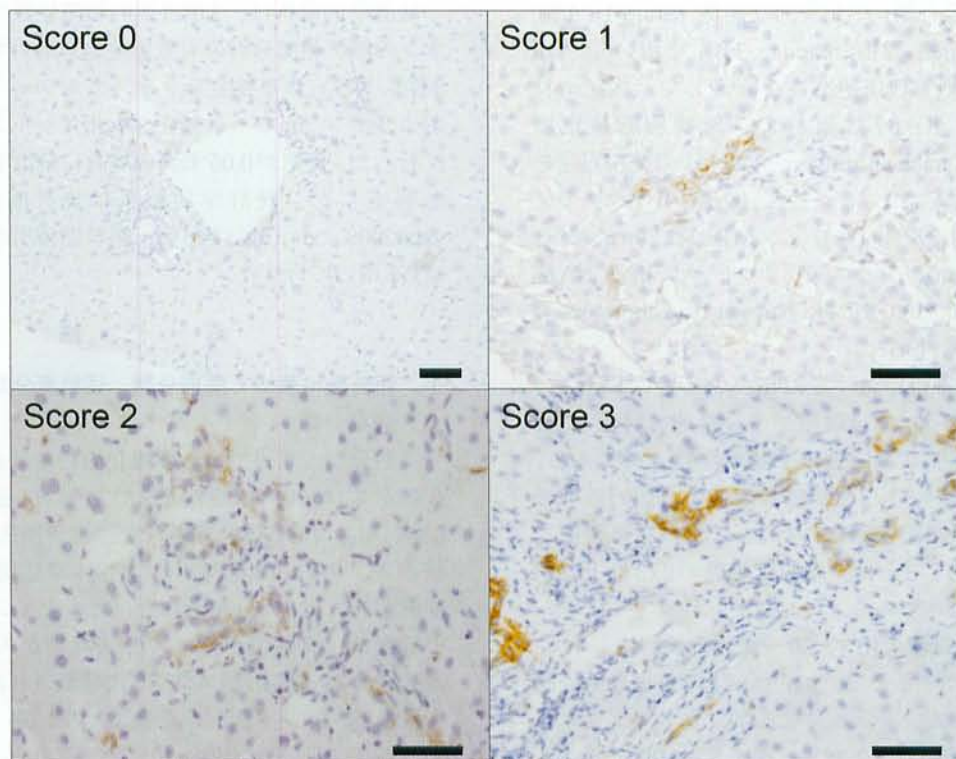


Fig. 2. Scoring of the extent of neural cell adhesion molecules (NCAM)-positive ductular reaction. The extent of NCAM-positive ductules were classified into four categories according to the number of positively NCAM stained ductules independent of the intensity of NCAM immunostaining at each discernible portal tract: score 0, negative; score 1, mild expression, only 1 positive ductule detected; score 2, moderate expression, 2-4 positive ductules detected; and score 3, marked expression, more than 4 positive ductules detected. Bar=50  $\mu$ m



倍希釈, インビトロジェン, 東京) を用いてCK19, NCAMの発現を免疫組織化学的に検出した. パラフィン切片を型の如く脱パラフィンをした後, クエン酸緩衝液 (pH 6.0)-マイクロウェーブ加熱処理による抗原性賦活化とメタノール・過酸化水素による内因性ペロキシダーゼ活性阻害を行った. その後, 切片を稀釈した一次抗体と4℃で一晩反応させた. 二次抗体反応は, エンビジョンキット (ペロキシダーゼ標識, DAKO Cytomation) を用いて, 室温で30分間行った. 3-3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)(Sigma Chemical, St. Louis, USA) と過酸化水素を用いて発色した.

標本上の各門脈域で観察されたCK19陽性DR, NCAM陽性DRの数をもとに, それぞれ半定量的に4段階に評価した. すなわち, 門脈域にCK19陽性細胆管が認められない場合はスコア0, CK19陽性細胆管が1個観察された場合は1+, 2個~4個のCK19陽性細胆管が観察された場合は2+, 5個以上のCK19陽性細胆管が観察された場合は3+と判定した (図1). そして, 標本上の各門脈域のCK19陽性DRスコアの平均をその標本のCK19陽性DRスコアとした. 同様に, 標本上の各門脈域のNCAM陽性DRのスコアをCK19陽性DRと同様に, 0, 1+, 2+, 3+と判定し, 各標本での門脈域でのNCAM陽性DRスコアの平均をその標本のNCAM陽性DRスコアとした (図2).

## 2. DRにおける増殖活性の検討

PBC各病期 (新分類) の代表的な症例 (Stage1, 1例; Stage2, 2例; Stage3, 2例; Stage4, 1例) を用いて, DRにおける細胆管細胞の増殖活性を評価した. 増殖活性の指標として, Ki-67抗原および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の発現程度を免疫組織化学的に検討した. 一次抗体としてマウスモノクローナル抗Ki-67抗体 (クローンMIB-1, 200倍希釈, DAKO Cytomation), マウスモノクローナル抗PCNA抗体 (クローンPC10, 100倍希釈, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) を用いた.

DR内の細胆管細胞におけるKi-67, あるいはPCNAの核陽性像を以下のように4段階で半定量的に評価した. 0とは, 細胆管細胞に核陽性像を認めないものである. 1とは, 細胆管細胞の1/3未満に核陽性像を認めるものである. 2とは, 細胆管細胞の1/3~2/3に核陽性像を認めるものであり, 3とは, 細胆管細胞の2/3以上に核陽性像を認めるものである.

## 3. DRにおける細胞老化マーカー発現の検討

細胞老化マーカーとして, p16とp21の発現を免疫組織化学的に検討した. 一次抗体としてマウスモノクローナル抗p16<sup>INK4a</sup>抗体 (クローンJC8, 100倍希釈, Neomarkers, Fremont, CA), マウスモノクローナル抗p21抗体 (クローン70, 100倍希釈, BD Transduction, San Jose, CA) を用いた. すなわち, 抗原賦活処理とし

てホウ酸緩衝液 (pH8.0)-電気釜加熱処理を行い, 内因性ペロキシダーゼを処理後, 一次抗体を4℃で一晩反応させた. 二次抗体反応はエンビジョンキット (ペロキシダーゼ標識, DAKO Cytomation) を用いて, 室温で30分間行った. DABと過酸化水素を用いて発色した. その後, ヘマトキシリンあるいはメチルグリーンで核染色を行った. 対照としてマウスIgG (DAKO) を用いて陰性であることを確認した. 染色の評価は- (陰性で, 陽性のDRが認められない), 1 (軽度陽性で, 1/3以下の門脈域に陽性のDRが存在), それに2 (中等度~高度陽性, 1/3以上の門脈域に陽性のDRが存在) に分類し, 行った.

## IV. 臨床項目との関連について

病期分類, 活動度分類 (CA, HA), 病期分類の各構成要素 (線維化, 胆管消失, オルセイン顆粒沈着) およびDRと代表的な臨床検査成績 [アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate aminotransferase, AST), アラニンアミノ基転移酵素 (alanine aminotransferase, ALT), ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ (gamma-glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -GTP), アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP), 総ビリルビン (total bilirubin), 総タンパク (total protein), アルブミン (Albumin), 総コレステロール (total cholesterol), プロトロンビン時間 (prothrombin time),  $\gamma$ -グロブリン (globulin), IgG, IgA, IgM, AMA力価, ANA力価] との相関について検討を行った.

## V. 統計学的解析

統計学的解析は, 2項目間の相関係数の検定をスピアマンの順位相関分析の有意差検定を用いて行った. また, 3群以上の有意差検定をクラスカルウォーリス順位検定およびボンフェローニ補正マンホイットニー検定を用いて行った. P値が0.05未満の場合に統計学的有意差ありと判定した. 統計学的解析は統計演算プログラム ystat2008.xls (改訂第6版, 医学図書出版株式会社, 東京) を用いて行った.

## 成 績

### I. 新分類に基づく病期分類, 活動度分類 (表4)

#### 1. 病期分類

病期分類の項目では, 線維化の程度は40症例のうち7症例がスコア0, 19症例がスコア1, 11症例がスコア2, 3症例がスコア3に分類された. 胆管消失の程度は14症例がスコア0, 12症例がスコア1, 7症例がスコア2, 7症例がスコア3に分類された. オルセイン陽性顆粒沈着の程度は, 24症例がスコア0, 6症例がスコア1, 4症例がスコア2, 6症例がスコア3に分類された (表4). そして40症例のうち3症例が新分類での1期, 20症例が2期, 12症例が3期, 5症例が4期に分類された.

#### 2. 活動度分類

CAに関しては, 40症例のうち5症例がCA1, 15症例がCA2, 20症例がCA3であり, CA0は認められなかった.

Table 4. Summary of histological staging and grading of 40 needle biopsy specimens in primary biliary cirrhosis

<b>Scheuer Staging system</b>	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
No. cases (%)	18 (45)	13 (32.5)	9 (22.5)	0 (0)
<b>New Staging system</b>	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4
No. cases (%)	3 (7.5)	20 (50)	12 (30)	5 (12.5)
<b>Fibrosis: No. cases (%)</b>	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
	7 (17.5)	19 (47.5)	11 (27.5)	3 (7.5)
<b>Bile duct loss: No. cases (%)</b>	14 (35)	12 (30)	7 (17.5)	7 (17.5)
<b>Deposition of orcein-positive granules: No. cases (%)</b>	24 (40)	6 (15)	4 (10)	6 (15)
<b>Grading</b>	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
CA: No. cases (%)	0 (0)	5 (12.5)	15 (37.5)	20 (50)
HA: No. cases (%)	12 (30)	16 (40)	7 (17.5)	5 (12.5)

CA, cholangitis activity; HA, hepatitis activity.

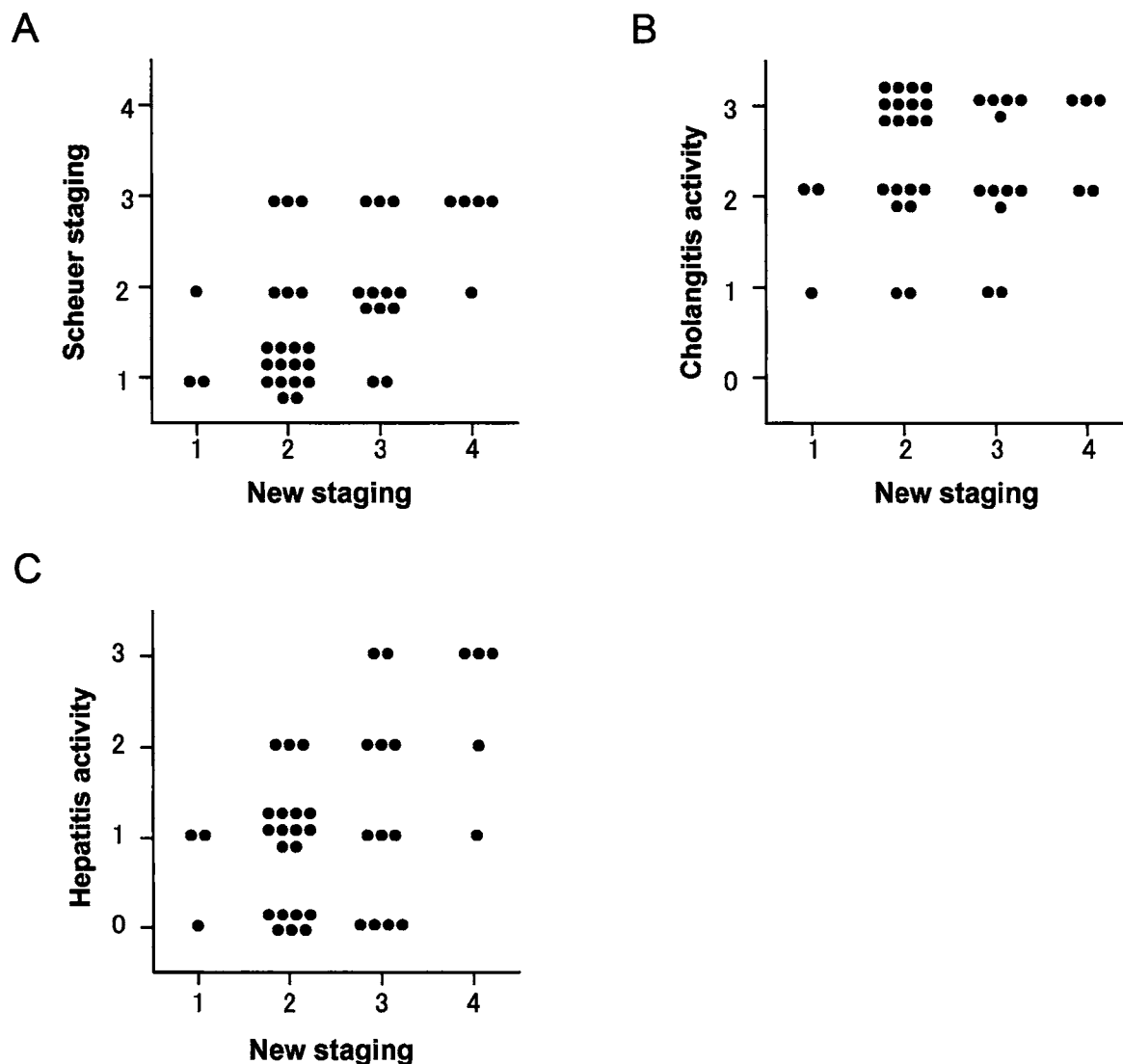


Fig. 3. Correlation between a new staging system and Scheuer staging system, scores of individual components of a new grading system. (A) Correlation between a new staging system and Scheuer staging system ( $r_s = 0.580$ ,  $P < 0.01$ ). (B) Correlation between a new staging system and score of cholangitis activity (CA score) ( $r_s = 0.163$ , NS). (C) Correlation between a new staging system and score of hepatitis activity (HA score) ( $r_s = 0.473$ ,  $P < 0.01$ ). A black circle represents one PBC case.

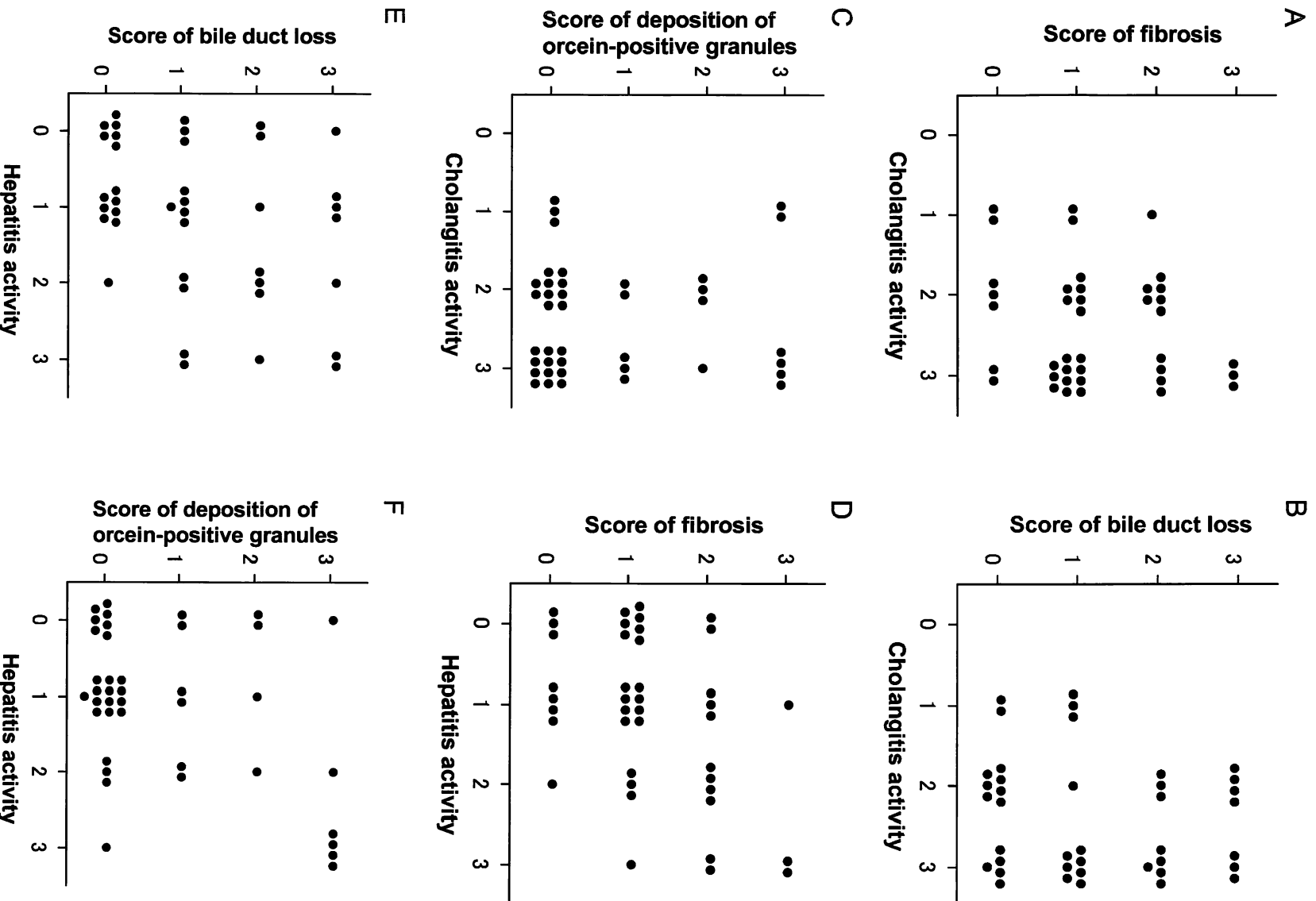


Fig. 4. Correlation between scores of individual components of a new grading system and scores of individual components of a new staging system.

(A) Correlation between CA score and score of fibrosis ( $r_s = 0.139$ , NS). (B) Correlation between CA score and score of bile duct loss ( $r_s = 0.126$ , NS). (C) Correlation between CA score and score of deposition of orcein-positive granules (OPG) ( $r_s = 0.00259$ , NS). (D) Correlation between HA score and score of fibrosis ( $r_s = 0.481$ ,  $P < 0.01$ ). (E) Correlation between HA score and score of bile duct loss ( $r_s = 0.293$ , NS). (F) Correlation between HA score and score of OPG ( $r_s = 0.314$ ,  $P < 0.05$ ). A black circle represents one PBC case.



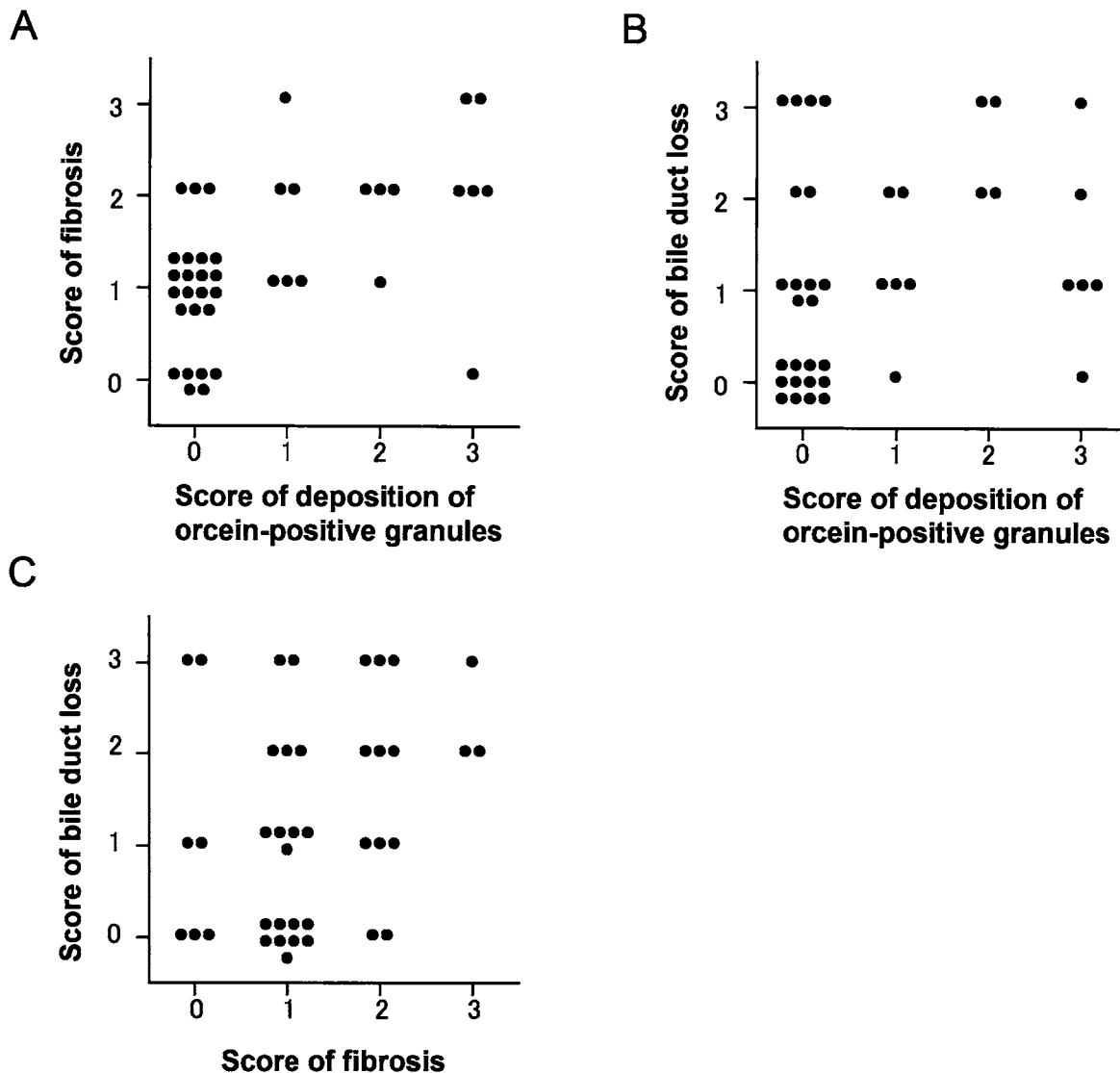


Fig. 5. Correlation between scores of individual components of a new staging system. (A) Correlation between score of fibrosis and score of deposition of orcein-positive granules (OPG) ( $r_s = 0.610, P < 0.01$ ). (B) Correlation between score of bile duct loss and score of OPG ( $r_s = 0.333, P < 0.01$ ). (C) Correlation between score of fibrosis and score of bile duct loss ( $r_s = 0.255, NS$ ). A black circle represents one PBC case.

HAに関しては、12症例がHA0、16症例がHA1、7症例がHA2、5症例がHA3に分類された。

## II. Scheuer分類と新分類との関連性

従来のScheuer分類<sup>9)</sup>では、40症例のうち18症例がstage I、13症例がstage II、9症例がstage IIIに分類された。なお、Stage IVに分類される症例は含まれていなかった。新病期分類とScheuer分類は有意な正の相関を示した ( $P < 0.01$ ) (図3A)。なお、Scheuer分類ではI期の症例が40例中18例であったが、新病期分類ではI期の症例が3例であり、またScheuer IV期の症例は見られなかったが、新分類では5例が4期に分類された。

## III. 新分類での病期分類と活動度分類との関連性

新分類での病期分類と慢性胆管炎の活動度 (CAスコア) とは有意な相関を示さなかった ( $P > 0.05$ ) (図3B)。またCAスコアは、病期分類の構成要素 (線維化、胆管

消失、およびオルセイン陽性顆粒の沈着) とも有意な相関を示さなかった ( $P > 0.05$ ) (図4A-C)。一方、肝炎の活動度 (HAスコア) と病期分類とは有意に相関した ( $P < 0.01$ ) (図3C)。またHAは、線維化の程度 ( $P < 0.01$ ) (図4D) およびOPG沈着の程度 ( $P < 0.05$ ) (図4F) と有意な相関を示した。なお、HAと胆管消失の程度とは有意な相関を示さなかった ( $P > 0.05$ ) (図4E)。これらの成績より、HAが病期の進展に関与し、また肝線維化の進展にはOPGの沈着やHAが関連することが示された。

病期分類を構成する3つの病変相互の相関性を検討すると線維化の程度はOPG沈着の程度と有意な相関を示した ( $P < 0.01$ ) (図5A)。胆管消失の程度もOPG沈着の程度と有意な相関を示した ( $P < 0.05$ ) (図5B)。なお、線維化の程度と胆管消失の程度は有意な相関を示さなかった ( $P > 0.05$ ) (図5C)。

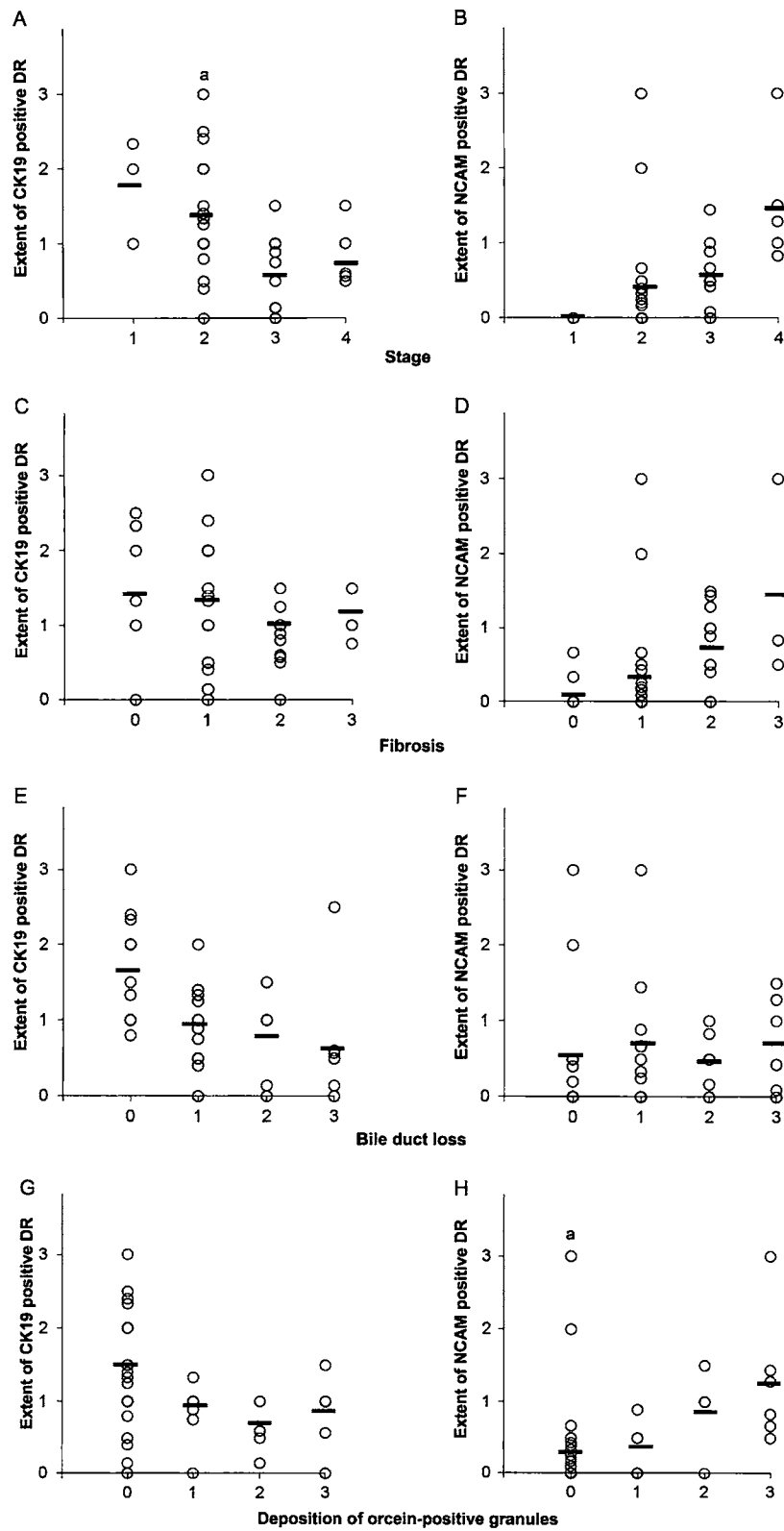


Fig. 6. Correlation between the extent of ductular reaction (DR) and a new staging system, scores of individual components of a new staging system.

(A) Correlation between the extent of CK19-positive (CK19+) DR and Stage ( $r_s = 0.477, P < 0.01$ ). a,  $P < 0.05$  vs primary biliary cirrhosis, stage 3. (B) Correlation between the extent of NCAM-positive (NCAM+) DR and Stage ( $r_s = 0.555, P < 0.01$ ). (C) Correlation between the extent of CK19+ DR and score of fibrosis ( $r_s = 0.181, NS$ ). (D) Correlation between the extent of NCAM+ DR and score of fibrosis ( $r_s = 0.527, P < 0.01$ ). (E) Correlation between the extent of the CK19+ DR and score of bile duct loss ( $r_s = 0.470, P < 0.01$ ). (F) Correlation between the extent of NCAM+ DR and score of bile duct loss ( $r_s = 0.181, NS$ ). (G) Correlation between the extent of CK19+ DR and score of deposition of orcein-positive granules (OPG) ( $r_s = 0.453, P < 0.01$ ). (H) Correlation between the extent of NCAM+ DR and score of OPG ( $r_s = 0.459, P < 0.01$ ). a,  $P < 0.05$  vs score 3. A white circle represents one PBC case.

Table 5. Main clinical and laboratory data of 40 patients with primary biliary cirrhosis

Patients	Number (%)
Total	40
Female	35 (87.5)
Male	5 (12.5)
AMA or AMA-M2	
Positive	34 (85)
Negative	6 (15)
ANA	
Positive	21 (52.5)
Negative	19 (47.5)
Clinical data	$\bar{X} \pm SD$ (normal range)
Age (years)	58.1 $\pm$ 10.7
AST (IU/l)	66.2 $\pm$ 68.2 (9-42)
ALT (IU/l)	70.5 $\pm$ 85.2 (2-39)
$\gamma$ -GTP (IU/l)	278.9 $\pm$ 207.9 (8-391)
ALP (IU/l)	694.6 $\pm$ 416.9 (86-272)
Total bilirubin (mg/dl)	1.12 $\pm$ 0.60 (0.2-1.3)
Total protein (g/dl)	7.78 $\pm$ 0.57 (6.6-8.1)
Albumin (g/dl)	4.17 $\pm$ 0.46 (3.9-4.9)
Total cholesterol (mg/dl)	196.8 $\pm$ 40.8 (140-219)
Prothrombin time (%)	87.6 $\pm$ 26.4 (70-120)
$\gamma$ -globulin (g/dl)	1.98 $\pm$ 0.38 (0.6-1.3)
IgG (mg/dl)	2213 $\pm$ 1090 (1300-1774)
IgA (mg/dl)	322.8 $\pm$ 247.0 (178-355)
IgM (mg/dl)	692.0 $\pm$ 575.8 (79-200)

AMA, anti-mitochondrial antibody; ANA, antinuclear antibody; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase;  $\gamma$ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase.

Table 6. Spearman's rank differentiation correlation analysis between scores of histological staging, grading, CK19+ ductular reaction, NCAM+ ductular reaction and clinical and laboratory data in primary biliary cirrhosis

Data	Stage	CA	HA	Fibrosis	Bile duct loss	Deposition of OPG	CK19+DR	NCAM+DR
Age	0.0638	0.0441	0.233	0.0922	0.00629	0.0279	0.0601	0.191
AST	0.19	0.168	0.198	0.18	0.0422	0.28	0.226	0.358*
ALT	0.141	0.00458	0.223	0.0851	0.0722	0.208	0.0793	0.252
$\gamma$ -GTP	0.146	0.0874	0.047	0.215	0.121	0.235	0.0981	0.397*
ALP	0.394*	0.325	0.177	0.206	0.341	0.397*	0.244	0.480**
Total bilirubin	0.491	0.185	0.487	0.435	0.442	0.411	0.261	0.598*
Total protein	0.468	0.0207	0.123	0.342	0.103	0.31	0.32	0.33
Albumin	0.499	0.181	NA	0.671	0.408	0.437	0.582	0.437
Total cholesterol	0.548	0.139	0.156	0.259	0.33	0.533	0.441	0.484
Prothrombin time	0.894	0.447	0.602	0.775	0.775	0.947	NA	0.775
$\gamma$ -Globulin	0.25	0.369	0.0246	0.384	0.0229	0.0825	0.408	0.222
IgG	0.13	0.875	0.16	0.155	0.199	0.196	0.142	0.179
IgA	0.0167	0.0212	0.312	0.259	0.0116	0.158	0.36	0.468
IgM	0.0555	0.0146	0.204	0.205	0.196	0.207	0.25	0.147
AMA titre	0.055	0.259	0.12	0.0905	0.104	0.0338	0.0829	0.268
ANA titre	0.0246	0.262	0.0524	0.0576	0.434*	0.116	0.028	0.127

CK, cytokeratin; NCAM, neural cell adhesion molecule; CA, cholangitis activity; HA, hepatitis activity; OPG, orcein-positive granules; DR, ductular reaction; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase;  $\gamma$ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase; ALP, alkaline phosphatase; AMA, anti-mitochondrial antibody; ANA, anti-nuclear antibody; \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; NA, not available.



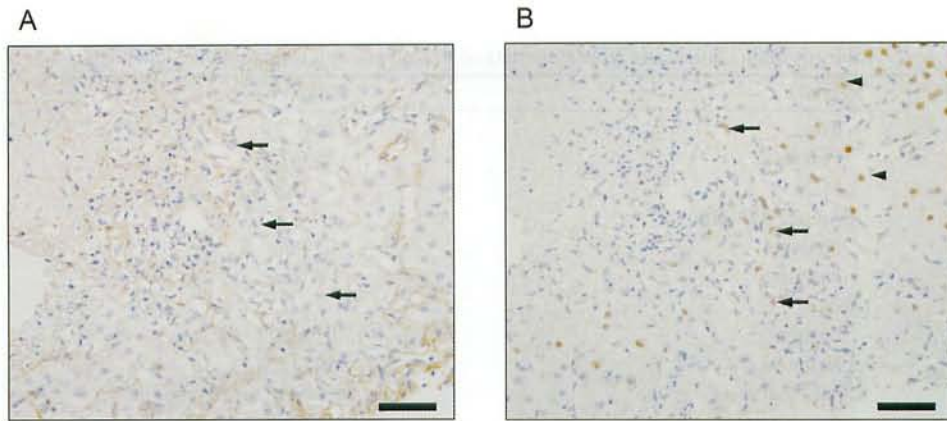


Fig. 7. The expression of the cell proliferation markers in ductular reaction (DR) in primary biliary cirrhosis (PBC). (A) There are no Ki-67-labeled ductular cells (arrows) (score 0) in DR in PBC, stage 4. (B) There are several PCNA-labeled ductular cells (score 2) (arrows) in DR and hepatocytes (arrow heads) in PBC, stage 4. Bar=50  $\mu$ m

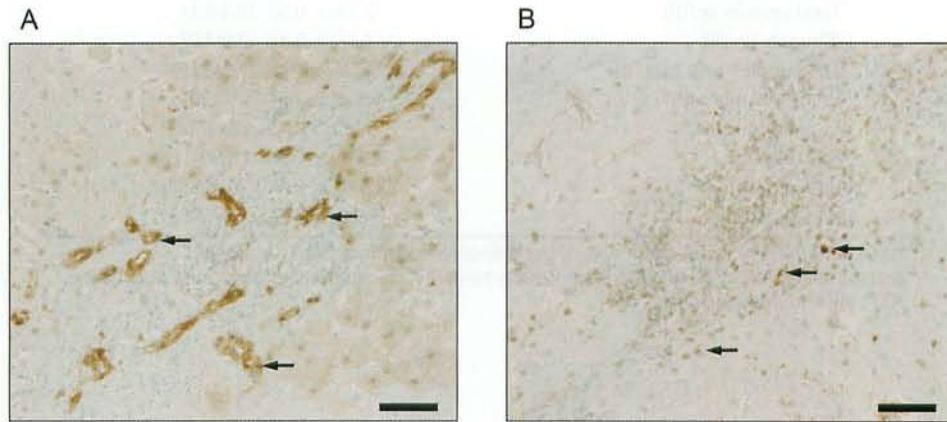


Fig. 8. The expression of senescence-associated markers in ductular reaction (DR) in primary biliary cirrhosis (PBC). (A) The expression of p16<sup>INK4a</sup> is seen in the cytoplasm and nucleus of ductular cells (arrows) in DR in PBC. (B) The expression of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> is seen in the nucleus of ductular cells (arrows) in DR in PBC. Bar=50  $\mu$ m

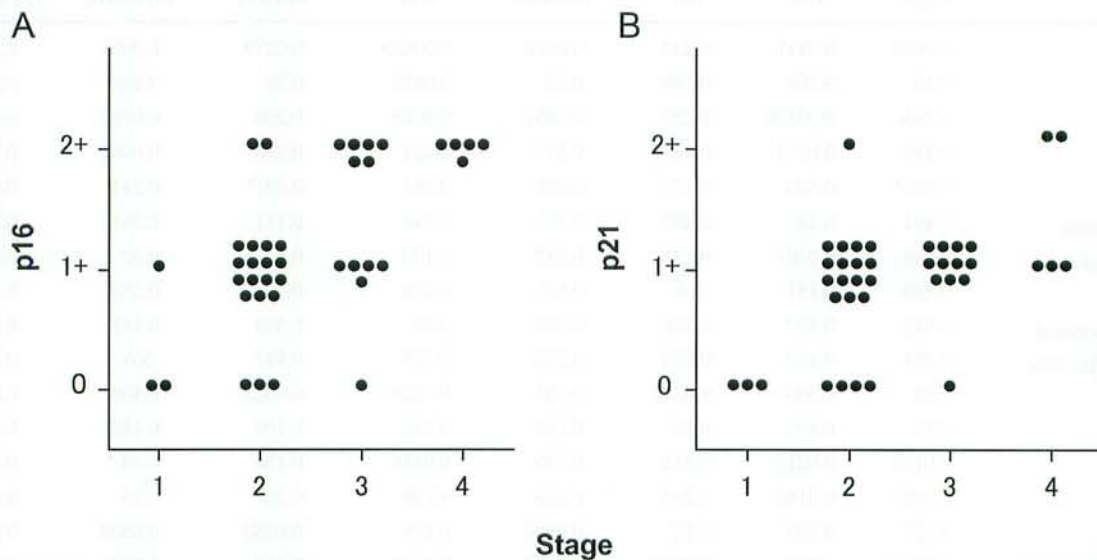


Fig. 9. Correlation between the expression of senescence-associated markers in ductular reaction (DR) in primary biliary cirrhosis (PBC) and a new staging system. (A) Correlation between the expression of p16<sup>INK4a</sup> in DR in PBC and Stage ( $r_s = 0.659, P < 0.01$ ). The expression of p16<sup>INK4a</sup> was significantly more frequent in DR in PBC, stage 4, when compared to stage 2 ( $P < 0.05$ ). (B) Correlation between the expression of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> in DR in PBC and Stage ( $r_s = 0.359, P < 0.05$ ). A black circle represents one PBC case.

#### IV. DRでのCK19, NCAM発現と病期分類, 活動度分類との関連性

##### 1. CK19陽性DR, NCAM陽性DRとPBCの病期分類と各構成要素との関連性

CK19はDRの胞体に発現し, これらのDRは門脈域辺縁で増加しており, 管腔形成が比較的明瞭であった(図1). CK19発現DRの程度は, 病期分類, 胆管消失の程度, およびOPG沈着の程度と有意な負相関を示した( $P < 0.01$ )(図6A, 6E, 6G). CK19陽性DRの程度は線維化の程度とは有意な相関を認めなかった( $P > 0.05$ )(図6C).

NCAMは胆管細胞の細胞膜に発現がみられ, これら陽性DRは門脈域辺縁で不明瞭な管腔形成や不規則な形状を呈して増殖していた(図2). NCAM陽性DRの程度は, 病期分類, 線維化の程度, およびOPGの沈着の程度と有意な正の相関関連を示した( $P < 0.01$ )(図6B, 6D, 6H). 胆管消失の程度とは有意な相関を認めなかった( $P > 0.05$ )(図6F).

##### 2. CK19陽性DR, NCAM陽性DRとPBCの活動度(CA, HA)

CK19陽性DRの程度は, CAスコアやHAスコアとは有意な相関を示さなかった(それぞれ $rs=0.158$ ,  $P=0.330$ ;  $rs=0.0964$ ,  $P=0.554$ ). また, NCAM陽性DRの程度もCAスコアやHAスコアとは有意な相関を示さなかった(それぞれ $rs=0.0937$ ,  $P=0.565$ ;  $rs=0.274$ ,  $P=0.0869$ ).

#### V. 病期分類, 活動度分類(CA, HA), 病期分類の各構成要素および細胆管反応と臨床成績との関連性

今回検討を行ったPBC40症例の血液生化学データを表5に示す.

##### 1. 新しい病期分類, 活動度分類と主な血液生化学データとの関連性

これらの相関を表6に示す. 病期分類はALP値と有意な正相関を示した( $P < 0.05$ ). また, CA, HAと臨床項目の間には有意な相関を認めなかった( $P > 0.05$ ).

##### 2. 病期分類の各構成要素と臨床成績との関連性

胆管消失の程度はANA力価と有意な正相関を示した( $P < 0.05$ ). OPG沈着の程度はALP値と有意な正相関を示した( $P < 0.05$ ). また, 線維化の程度と臨床項目の間には有意な相関を認めなかった( $P > 0.05$ ).

##### 3. DRの程度と臨床成績との関連性

CK19陽性DRの程度と臨床データには有意な相関を認めなかった( $P > 0.05$ ). NCAM陽性DRの程度はAST値,  $\gamma$ -GTP値, 総ビリルビン値およびALP値とそれぞれ有意な正相関を示した(それぞれ $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ および $P < 0.01$ ).

#### VI. 細胆管反応での増殖期細胞マーカーの検討

Ki-67による細胞増殖活性の検討では, DRを構成する細胆管細胞に明瞭な核陽性所見は得られなかった. すなわち, 早期症例3例(病期1, 1例; 病期2, 2例)および進行期症例3例(病期3, 2例; 病期4, 1例)はそれぞれス

コア0と評価された(図7A). 一方, PCNAによる検討では, いずれの病期の症例においてもDR構成の細胆管の1/3~2/3の細胞の核に陽性像を認めた. すなわち, 早期症例(病期1と2)3例および進行期症例(病期3と4)3例はそれぞれスコア2と評価された(図7B). PCNAによる検討では, DRを構成する細胆管細胞における核陽性所見は割合および強度ともに同程度であり, 病期による明らかな差は認められなかった.

#### VII. DRでの細胞老化マーカー発現

細胞老化マーカーであるp16<sup>INK4a</sup>とp21<sup>WAF1/Cip1</sup>の発現程度を病期毎に比較した. p16<sup>INK4a</sup>は細胆管の胞体および核に発現した. 一方, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>は細胆管の核に発現がみられた(図8A, 図8B). 図9に示す如く, p16<sup>INK4a</sup>とp21<sup>WAF1/Cip1</sup>の発現は病期の進行と有意に相関して亢進していた(それぞれ $P < 0.01$ および $P < 0.05$ ).

#### 考 察

今回, PBC40例の生検組織を用い, 当教室で新たに提唱されたPBC新分類を用いて検討した. 結果を以下の3つの項目で考察する.

##### I. 病期分類の応用

今回の検討を要約すると以下の様になる. 新分類は, 今回検討した40例のPBC症例(いずれも針生検)で応用可能であり, 実施上の問題点はなかった. 新病期分類とScheuer分類は有意な正の相関を示した. 慢性胆管炎の活動度(CAスコア)は新病期分類および病期分類の構成要素(線維化, 胆管消失, およびOPGの沈着)と有意な相関を示さなかった. 肝炎の活動度(HAスコア)は新病期分類, 線維化の程度, およびOPG沈着の程度と有意な相関を示した. OPG沈着の程度は線維化の程度, 胆管消失の程度と有意な相関を示した. HAスコア, 胆管消失, および線維化と胆汁うっ滞を示唆する所見であるOPG沈着との間に有意な相関が見られた.

これらの所見より, 病期の進展にはHAが関与していることが示唆される. また肝線維化の進展には, 胆汁うっ滞を反映するOPGの沈着やHAが関連することが示された. PBCにおいては, 胆管消失に関連した慢性胆汁うっ滞や肝炎に関連した肝細胞壊死が持続性の肝細胞傷害を発生させ, 肝線維化の発生進展および終末状態としての胆汁性肝硬変に関連すると考えられている. 今回得られた成績は, この肝細胞傷害の機序を反映したものとして矛盾しない. さらに, 病期分類やその構成要素(胆管消失, OPGの沈着)と臨床データとの間に有意な相関が得られたこともPBCにおける肝細胞傷害の機序を反映するものと考えられる.

また, 新病期分類とScheuer分類は有意な正の相関を示した. このことは, 新病期分類が従来用いられてきたScheuer分類とは根本的に異なるものではないことを意味している. Scheuer分類ではI期の症例が40例中18例であったが, 新病期分類では1期の症例が3例であり,

またScheuer IV期の症例は見られなかったが、新分類では5例が4期に分類された。新病期分類では症例が病態に応じて分散しており、臨床的な応用に優れていると言える。今後、この新分類を用いた臨床的、病理学的な解析により、PBCの病態が解明されることを期待したい。

## II. 細胆管反応の病理学的意義

新分類を用いDRの意義をCK19およびNCAM発現を中心に検討した結果は以下のように要約される。CK19陽性DRの程度は、病期、胆管消失の程度およびOPG沈着の程度と有意な負相関を示した。NCAM陽性DRの程度は、病期、線維化の程度およびOPG沈着の程度と有意な正相関を示した。CK19陽性DRの程度、NCAM陽性DRの程度はいずれもCA、HAの程度と有意な相関性を示さなかった。NCAM陽性DRの程度は、AST、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビンおよびALP値とそれぞれ有意な正相関を示した。

今回の研究では、病期の進行、胆管消失の増加、およびOPG沈着で評価した慢性胆汁うっ滞の進行とDRに関して、CK19陽性DRとNCAM陽性DRでは異なった傾向を示した。つまり、OPG沈着スコアの増加に伴って、CK19陽性DRが有意に減少することが示された。CK19と同じく胆管上皮細胞系のマーカーであるCK7を用いた今までの報告では、PBC、慢性C型肝炎およびNAFLDでは、病期の進行に従ってCK7陽性DRが増加することが報告されている<sup>15)16)20)21)</sup>。通常、成人の肝内胆管では正常状態で、胆管細胞にCK7、CK19の強い共発現をみる<sup>12)</sup>。しかし、発生過程の胎児肝、胆管癌、DRではCK7、CK19発現は必ずしも一致せず、発現様式が不均一であることが知られる<sup>12)13)15)</sup>。最近の当研究室からのNAFLDに関する検討では、病期の進行に伴ってCK7陽性、CK19陰性細胆管の増加が認められ、細胆管細胞でのCK19発現の減弱が示唆された<sup>15)</sup>。DRは肝疾患の種類やその病期によって多様な性質を示すことが知られている<sup>12)~16)</sup>。今回の結果は、NAFLDと同様、PBCにおいても胆管消失と慢性胆汁うっ滞の進行に伴って、細胆管細胞でCK19発現が減弱することを示している。PBC、原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC)、アルコール性肝硬変のDR構成細胞では、サイトケラチン、上皮細胞の形質であるE-カドヘリンの発現が減弱するという報告がある<sup>21)</sup>。今回の検討で認められたPBCの細胆管細胞におけるCK19発現減弱も、E-カドヘリン発現の減弱と同様に上皮細胞形質の減少傾向を示すと考えられる。

CK19陽性DRの動態とは対照的に、今回の研究では、病期の進行、線維化の進行、および慢性胆汁うっ滞の進行に従って、NCAM陽性DRが有意に増加していくことが示された。NCAMは神経などで発現する細胞接着因子で、いくつかの臓器では形態形成、再構築および遊走促進の役割を担うとされる<sup>12)14)22)</sup>。DRにおけるNCAM発

現は以前よりさまざまな肝疾患で報告されている<sup>12)~16)23)</sup>。以前に当研究室よりPBCおよびNAFLDの進行期では、早期と比してNCAM陽性DRが増加することを報告している<sup>15)16)</sup>。今回の検討は、より詳細に新しいPBCの病期分類、活動度分類とDRの動向を検討したものであるが、今回の検討結果もNCAM陽性DRの亢進については従来との結果と合致している。

一般に、肝幹細胞の局在部位は門脈域と肝実質の境界部のHering管周辺と推測されている<sup>12)~14)</sup>。DRはHering管周辺の肝幹・前駆細胞が反応性に増殖したものとする考え方から、NCAMは肝幹・前駆細胞マーカーとみなす報告も多い<sup>12)~14)</sup>。しかし、肝幹・前駆細胞マーカーとしてのNCAMの意義については不明な点も残る。

今回の検討で認められた病期の進行に伴うCK19陽性DRの減少とNCAM陽性DRの増加は、線維化に関連することから、特に上皮-間葉系転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を反映している可能性がある。慢性疾患での線維化におけるEMTの役割について多くの臓器で報告されており<sup>22)24)~27)</sup>、最近のいくつかの論文では肝線維化の過程でのEMTの関与が報告されている<sup>22)25)~27)</sup>。しかし一方、動物モデルを用いた研究では肝線維化におけるEMTの関与が確認できなかったとする報告もあり、議論の残る所である<sup>28)29)</sup>。以前に当研究室より様々な肝疾患で細胆管細胞に間葉系マーカーであるビメンチン (vimentin) の発現がみられることを報告している<sup>30)</sup>。本研究でのCK19陽性DRの減少とNCAM陽性DRの増加はこのvimentin発現の動向と一致している。本研究では、CK19陽性DRの程度と線維化には有意な相関を認めなかったが、線維化の程度を構成要素とする病期の進行、胆管消失、OPGの沈着で示される慢性胆汁うっ滞と伴にCK19陽性DRが有意に減少した。一方、線維化の進行、病期の進行と伴に、NCAM陽性DRが有意に増加した。この結果は、CK19陽性DRは胆汁うっ滞の進行と伴に減少し、慢性胆汁うっ滞および線維化の進行と伴にNCAM陽性DRが増加しており、NCAM陽性DRがPBCでの線維化の進展に関与していることを示している。

DRを構成している細胆管上皮細胞と線維化に関して、EMTを介して直接的に、または肝内の他の細胞を活性化することによって間接的に肝線維化を誘導する役割を担っていると示唆する報告がある<sup>22)31)32)</sup>。Rygielら<sup>22)</sup>は、胆管上皮のEMTが門脈域の線維化に関与していることを明瞭に証明している。彼らの研究では、慢性肝疾患では小型~中型サイズの胆管やDRを構成している細胞がEMTを起こし、線維芽細胞の著明な増生を引き起こすことが証明されている。また、いくつかの研究は、DRを構成している胆管細胞が線維形成を誘導する因子を分泌していることを示唆している<sup>31)32)</sup>。胆管線維化の過程において、DRを構成している胆管上皮細胞は線維結合織の成長を促す因子を分泌している有力な細胞であると



する文献も見られる<sup>31)32)</sup>。線維化の進行と共に増加するNCAM陽性DRはこれらの報告と同様、PBCにおける線維化誘導に関与していることが推測される。

本研究では、NCAM陽性DRの程度は総ビリルビン値、AST値、 $\gamma$ -GTP値およびALP値とそれぞれ有意な正相関を示した。NCAM陽性DRの程度は病期の進行、OPG沈着で評価した慢性胆汁うっ滞の進行、線維化と有意に正相関しており、これら臨床データとの相関もNCAM陽性DRとPBCの進行との関連を反映した結果と考えられる。以前に当教室の平松<sup>10)</sup>は188症例のPBC肝生検材料を用いてPBCの代表的な17項目の病理学的所見と臨床データとの相関を検討している。今回の検討結果と平松らの結果には若干の差がみられる。この理由としては、対象検体と検体数が異なることが考えられる。平松らの結果では、管腔が不明瞭な細胆管(非定型的細胆管)が総ビリルビン値などに臨床データと有意な相関を示しており、本研究で見られたNCAM陽性DRの結果と矛盾しない。

### Ⅲ. DRでの細胞増殖マーカーの発現と老化現象

DRでの細胞増殖マーカーと細胞老化マーカーの発現と病期との関連性の結果は、以下の如く要約出来る。DRを構成する細胆管細胞におけるPCNA陽性所見は、病期による明らかな差は認められなかった。DRでの細胞老化マーカーp16とp21の発現は、病期の進行した症例で高率であった。

最近、細胞老化現象が種々の肝胆道系疾患の病態形成に深く関係することが注目されている<sup>10)16)33)</sup>。細胞老化は、細胞が増殖能力の消失した状態と定義され、老化細胞はG1期で不可逆的に細胞周期が停止状態にあり、細胞外からの種々の刺激に反応しない。しかし、最近の研究では、これらの老化細胞は代謝的に活性化しており、多くのケモカインやサイトカインなどの生物学的活性物質を分泌し、肝胆道系疾患の病態形成に深く関係することが報告されている<sup>33)~35)</sup>。老化細胞はテロメラーゼの短縮、老化関連の $\beta$ -galactosidaseの発現上昇などの種々の特徴的な表現型を示す。これらの形質の中で、p16とp21の発現が一般的な標本でも観察可能であり、汎用されている。Sasaki<sup>15)16)</sup>は最近、いくつかの疾患でのDRには細胞老化の形質の発現がみられることを報告し、肝疾患の病態形成に深く関係することを報告している。

そこで今回、DRでの細胞増殖状態と細胞老化状態を検討し、PBCでのDRの意義を検討した。まずKi-67を用いた検討では、PBCのDR内の細胆管細胞は早期でも進行期でもほとんど陽性所見を認めなかった。一方、PCNAを用いた検討では、DR内の細胆管細胞は早期、進行期ともに広範に陽性となった。Ki-67とPCNAはいずれも増殖マーカーとされるが、一般にKi-67の方が増殖活性をより正確に反映するとして病理診断の補助にもよく用いられている<sup>36)</sup>。一方、PCNAは細胞周期G0期以外のG1, S, G2, M期の全ての細胞に陽性となる<sup>36)</sup>。

また、PCNAは核内でDNA修飾に関与する蛋白であり、細胞傷害や癌化によって発現動態は大きく影響を受けるとされる<sup>36)</sup>。後述の如く、PBCのDRを構成する細胆管細胞には細胞増殖の停止を示す細胞老化が見られている。従って、今回の検討でみられたDRでのKi-67陰性、PCNA陽性は、G1アレスト状態を示していると考えられる。

次に、DRにおいて、細胞老化マーカーとして知られているp16とp21の発現を検討した。今回の検討で、病期の進展したDRにはp16とp21の細胞老化マーカーの発現が高率にみられた。病期の進展と共に、細胞老化マーカーを発現するDRが多くなっており、これらの細胞が線維化などの病的現象の形成に関係していることを示している。最近、老化細胞はsenescence-associated secretory phenotype (SASP)の発現を介して、老化細胞の存在する微小環境を変化させ、病態形成に深く関係することが報告されている<sup>33)</sup>。代表的なSASPとして、インターロイキン(interleukin, IL)-6やIL-1などのサイトカイン、またIL-8や単球走化因子(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)などのケモカインが知られており<sup>33)~35)</sup>、炎症性細胞や類洞壁に存在する線維形成細胞(肝星細胞)の病変部への遊走に関係している。また種々の増殖因子や線維形成因子などが知られている。これらの所見や報告などより、PBCでは病期の進展と共にDRにp16やp21等のマーカーが発現することから、これらの細胞が細胞老化に陥り、線維形成に関連する走化因子や増殖因子を分泌し、PBCの病期進展、特に線維化に関連すると考えられた。

PBCでの線維化の機序に関して、上述したNCAM陽性のDRが関連したEMTを介した線維化の可能性、さらにはp16, p21陽性の細胞老化に陥ったDRが関連する線維化の可能性を述べた。PBCは進行性の線維化が患者の予後を決定する重要な因子であり、線維化進展の解析は重要と思われる。今後、その他の線維化機序を含めた詳細かつ具体的な検討が必要と思われる。

## 結 論

本研究では、当教室で提唱されたPBCの新分類を用い、肝生検での病態解析、特にDRを中心とした検討を行った。PBCに出現するDRは、病期の進展に伴いCK19とNCAM発現パターンに違いがみられた。CK19陽性DRは、病期、胆汁うっ滞の進展と共に減少し、逆にNCAM陽性DRは、病期、線維化、胆汁うっ滞の進展と共に増加した。また病期の進展したDRでは細胞増殖活性が低下し、細胞老化マーカーであるp16とp21の発現が亢進し、これらの細胞老化になったDRが種々の物質を分泌し、PBCの線維化や病期進展に関連する可能性が示唆された。今後、NCAM陽性DRの出現機序、またDRでの細胞老化の発生機序の解析がPBCの病態解明やその治療に寄与すると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学 中沼安二教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関し、終始直接の御指導をいただきました佐々木素子准教授に心から感謝いたします。さらに本研究の遂行に多大な御助言と御協力をいただきました金沢大学形態機能病理学の諸先生方に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis: past, present, and future. *Gastroenterology* 123: 1392-1394, 2002
- 2) Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 10<sup>th</sup> edn. Oxford: Blackwell Science: 239-252, 1997
- 3) He XS, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Gershwin ME. New insights to the immunopathology and autoimmune responses in primary biliary cirrhosis. *Cell Immunol* 239: 1-13, 2006
- 4) Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 17: 35-47, 1997
- 5) Nakanuma Y, Ohta G. Histometric and serial section observations of the intrahepatic bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 76: 1326-1332, 1979
- 6) Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22: 696-699, 1995
- 7) Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19: 1513-1520, 1994
- 8) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-2474, 1999
- 9) Scheuer PJ. Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med* 60: 1257-1260, 1967
- 10) Hiramatsu K, Aoyama H, Zen Y, Aishima S, Kitagawa S, Nakanuma Y. Proposal of a new staging and grading system of the liver for primary biliary cirrhosis. *Histopathology* 49: 466-478, 2006
- 11) Nakanuma Y, Zen Y, Harada K, Sasaki M, Nonomura A, Uehara T. Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens. *Pathol Int* 60: 167-174, 2010
- 12) Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39: 1739-1745, 2004
- 13) Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* 54: 1853-1863, 2011
- 14) Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G, Rogler CE. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* 45: 716-724, 2007
- 15) Chiba M, Sasaki M, Kitamura S, Ikeda H, Sato Y, Nakanuma Y. Participation of bile ductular cells in the pathological progression of non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Pathol* 64: 564-570, 2011
- 16) Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Bile ductular cells undergoing cellular senescence increase in chronic liver diseases along with fibrous progression. *Am J Clin Pathol* 133: 212-223, 2010
- 17) Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 38: 552-570, 1997
- 18) Crawford AR, Lin XZ, Crawford JM. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 28: 323-331, 1998
- 19) Nakanuma Y, Karino T, Ohta G. Orcein positive granules in the hepatocytes in chronic intrahepatic cholestasis. Morphological, histochemical and electron X-ray microanalytical examination. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 382: 21-30, 1979
- 20) Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* 133: 80-90, 2007
- 21) Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 41: 809-818, 2005
- 22) Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 88: 112-123, 2008
- 23) Roskams T, Van Den Oord JJ, De Vos R. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *Am J Pathol* 137: 1019-1025, 1990
- 24) Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *Am Soc Nephrol* 15: 1-12, 2004
- 25) Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Riederer F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282: 23337-23347, 2007
- 26) Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 118: 3331-3342, 2008
- 27) Omenetti A, Bass LM, Anders RA, Clemente MG, Francis H, Guy CD. Hedgehog activity, epithelial-mesenchymal transitions, and biliary dysmorphogenesis in biliary atresia. *Hepatology* 53: 1246-1258, 2011
- 28) Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 53: 1685-1695, 2011
- 29) Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA. Genetic labeling does not detect epithelial-to-

mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 139: 987-998, 2010

30) Nakanuma Y, Kono N. Expression of vimentin in proliferating and damaged bile ductules and interlobular bile ducts in nonneoplastic hepatobiliary diseases. *Mod Pathol* 5: 550-554, 1992

31) Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Exp Rev Mol Med* 11: e7, 2009

32) Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 158: 1239-1244, 2001

33) Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Modulation

of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 53: 318-325, 2010

34) Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133: 1006-1018, 2008

35) Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133: 1019-1031, 2008

36) Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* 8: 216, 2006

**Pathological significance of ductular reactions of primary biliary cirrhosis with respect to a new histological staging and grading system** Munenori Mukai, Department of Human Pathology, Graduate School of Medical science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 *Juzen Med. Soc.*, **121**, 2 – 17 (2012)

**Key words** primary biliary cirrhosis, ductular reaction, cellular senescence, cholestasis, fibrosis

#### Abstract

I examined the pathologic significance of ductular reaction (DR) in primary biliary cirrhosis (PBC) by analyzing the association between DR and a new staging and grading system for PBC. Forty liver biopsies taken from the patients with PBC were evaluated using the new staging and grading system. I also evaluated the extent of DR using the immunohistochemical staining for cytokeratin (CK) 19, and neural cell adhesion molecule (NCAM), and its association with stage, grade, components of stage (bile duct loss, orcein-positive granules (OPG), fibrosis), and clinical laboratory data. The extent of CK19-positive DR correlated negatively with the staging score, the extent of bile duct loss and the extent of cholestasis. In contrast, the extent of NCAM-positive DR correlated positively with the staging score, the extent of cholestasis and the extent of fibrosis. The extent of NCAM-positive DR also correlated positively with the levels of AST, ALP,  $\gamma$ -GTP and total bilirubin. There was no association between the activity score (cholangitis and hepatitis) and the extent of CK19-positive or NCAM-positive DR. These findings suggest that CK19-positive DR including mature bile ductules decreases along with the progression of PBC. Whereas, NCAM-positive DR increases along with the progression of PBC and is closely associated with the progression of cholestasis. DR frequently showed the expression of senescent markers (p16 and p21) in the advanced stages of PBC. Therefore, bioactive factors secreted by such senescent DR may be related to the progression of PBC, especially the progression of fibrosis.