

# Biliary innate immunity in the pathogenesis of biliary diseases

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/2297/20639">http://hdl.handle.net/2297/20639</a>

## 【総説】

### 第6回 金沢大学十全医学賞受賞論文

#### 論 文 胆管における自然免疫機構と病態形成の解析 Biliary innate immunity in the pathogenesis of biliary diseases

原田 憲一 (はらだ けんいち)

##### はじめに

胆道系疾患の原因または病態形成に感染症や微生物因子の関与が考えられており、現在まで様々な腸内細菌やウイルスが文献的に報告されている。特に胆道閉鎖症ではレオウイルスやロタウイルスが属するレオウイルス科ウイルスの感染が原因のひとつとして想定されており、また原発性胆汁性肝硬変 (PBC) では古くより細菌尿や膣炎の既往、肝組織における細菌成分の検出、さらに分子相同意による自己免疫機序の関与が報告されている。このような微生物因子が、胆道系疾患で出現する胆管炎や胆管消失、結石形成などの病態形成または増悪因子として直接的または間接的に関与していると考えられているが、その機序については長らく不明であった。また、リポポリサッカライド(LPS, エンドトキシン)、リボタイコ酸、腸内細菌由来DNAなどの細菌構成成分が胆道系疾患のみならず非胆道系疾患の胆汁からも検出され、生体内的胆管上皮はあらゆる腸内細菌由来の抗原に恒常に曝されていると考えられる。我々は、胆道系自然免疫において免疫担当細胞のみならず胆管細胞自身も免疫監視機構としての役割を担っており、さらに胆道系疾患の病態形成にも胆道系自然免疫が直接関与していることを明らかにしてきた。本総説では、PBCおよび胆道閉鎖症を研究対象とした我々の研究成果を中心に紹介し、胆道系自然免疫の意義について論じたい。

##### 胆管細胞における自然免疫関連分子の発現

自然免疫の分子標的は、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)と称される病原体の発生学的に変化に乏しい分子パターンである。このPAMPsを認識する受容体(Pattern Recognition Receptors, PRRs)の一つとして、Toll様受容体(TLR) familyがクローニングされ、自然免疫の病原体認識にかかるシグナル伝達の分子基盤が解明されつつある。現在、ヒトでは10種類のTLR (TLR1～TLR10)が確認され、TLR1,2,4,5,6は微生物のペプチド成分を認識し、TLR3,7,8,9は核酸成分を認識することが明らかとなった。その中でもTLR4はLPSを認識する受容体として最もよく知られており、myeloid differentiation factor 88 (MyD88)やIL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-1などの細胞内シグナル伝達アダプター分子を介して、核内転写因子であるnuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)を活性化し、抗菌物質や炎症性サイトカインの産生が誘導される。また、レオウイルス科ウイルスに代表される2本鎖RNAウイルス、また感染細胞内でウイルスが増幅する過程で出現する2本鎖RNAに対しては、TLR3の他、IFN-inducible helicase retinoic acid-induced protein I (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA-5)が認識受容体として自然免疫応答を担う。

我々はマウス胆管細胞、ヒト胆管細胞の培養株を樹立し、これらの胆管細胞培養株を用いた検討にて、胆管細胞は少なくともTLR1～TLR5, RIG-I, MDA-5を発現しており、関連する細胞内シグナル伝達分子も恒常に発現していることを明らかにした<sup>1-3</sup>。さらにヒト肝組織を用いた免疫組織化学的検討にて、胆道系上皮においてびまん性にTLR, MyD88, IRAK-1の発現が見られることを明らかにした<sup>1-3</sup>。また、培養胆管細胞をPam3CSK4 (TLR1/2リガンド)、ペプチドグリカン (TLR2リガンド)などのペプチド由来PAMPsで刺激すると、NF- $\kappa$ Bの活性化が見られることから機能的なTLR発現であることが証明された(図1)<sup>1-3</sup>。さらにTLRブロッキング抗体またはNF- $\kappa$ Bの阻害剤であるMG132の存在下ではPAMPs誘導性NF- $\kappa$ B活性化が抑制されることから、TLR及びNF- $\kappa$ B依存性の免疫応答であることが証明された<sup>1</sup>。さらに核酸由来PAMPsとして合成2本鎖RNAであるpoly(I:C)で刺激すると、NF- $\kappa$ Bに加えinterferon regulatory factor-3 (IRF-3)の転写因子も活性化され(図1)、胆管細胞は細菌のみならずウイルスに対しても自然免疫応答を示すことが示された<sup>3</sup>。

##### 胆道系自然免疫応答にて產生される液性因子

自然免疫の本来の役割は細菌やウイルス感染に対する防御機構であり、胆管細胞は粘膜上皮として最も基本的な感染防御機構である粘液産生や分泌型IgAの分泌に加え、lactoferrin, lysozymeなどの抗菌分子を产生することも以前より報告されている。さらに我々は、胆管細胞は細菌由来のPAMPsに対しては抗菌ペプチドであるディフェンシン、ウイルス由来の

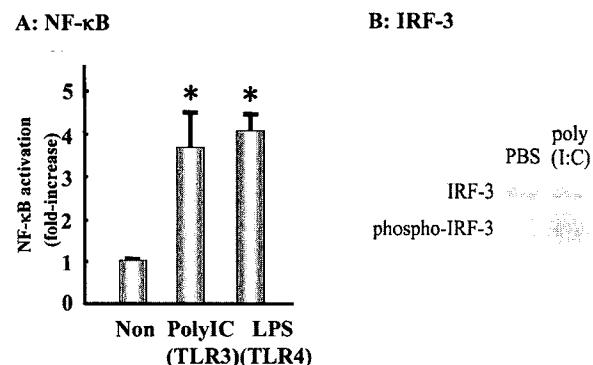


図1. LPS、合成2本鎖RNA poly(I:C)刺激による活性化NF- $\kappa$ B、IRF-3の検出。A:ヒト培養胆管細胞をLPS(1  $\mu$ g/ml), poly(I:C)(25  $\mu$ g/ml)で刺激後、NF- $\kappa$ Bの活性化をNF- $\kappa$ B-DNA binding assayで評価した結果、無刺激(Non)に較べて有意に活性化が亢進した。B: poly(I:C)刺激にてIRF-3のリン酸化がウエスタン法にて検出され、刺激によるIRF-3の活性化が確認できた。\* < 0.05。

PAMPsに対しては抗ウイルス作用を示すIFN- $\beta$ 1, MxAなどの液性因子も産生することを明らかにし、胆管細胞はPAMPsの由来に準じて適切な感染防御作用を示すことがわかった(図2)<sup>3,4</sup>。このような所見はマクロファージなどの免疫担当細胞の助けを借りることなく、胆管細胞自身が自然免疫応答を示し、病原体に対して即座に生体防御を作動させることを示唆する。さらに胆管細胞は自然免疫応答にて、抗微生物因子のみならず、IL-6, IL-8, fractalkine, CXCL16などの炎症性サイトカインやケモカインも産生し、胆管周囲におけるサイトカイン微小環境の形成と免疫担当細胞の動員により自然免疫から獲得免疫へと受け継がれると推測できる(図2)<sup>5-7</sup>。

ディフェンシンは細菌、真菌など広範囲に抗微生物活性を有する塩基性抗菌ペプチドであり、胆道系自然免疫機構の重要な分子のひとつである。特に $\beta$ 型ヒトディフェンシン(hBD)はhBD1-hBD6のサブタイプがあり、気道などの上皮細胞で产生され、粘膜としての重要な感染防御機構を担う。我々はヒト培養胆管細胞を用いてhBD1, hBD2について検討した結果、胆管細胞は無刺激の状態でもhBD1を発現していることがわかった。しかし、hBD2の発現は無刺激状態ではみられず、LPSなどの細菌由来のPAMPs刺激で初めて発現が誘導されることが明らかとなった<sup>4</sup>(図2)。また、ヒト肝組織を用いた免疫組織化学的検討にて、肝内胆管はびまん性にhBD1を発現しているが、hBD2の発現は肝内結石症や胆道感染症に見られる化膿性胆管炎を示す胆管上皮細胞にのみ見られ(図3)、これらのhBDは胆汁中からも検出された<sup>4</sup>。以上の結果より、hBD1, hBD2とともに抗菌ペプチドとして胆道系の感染防御にかかわっているが、hBD1は生理的状態下における感染防御に関与し、一方hBD2は胆道感染発生時に新たに胆管上皮から产生され、局所的な感染防御に関与していると推測された。

#### 胆道系自然免疫の調節機構

自然免疫応答のトレランス：胆汁中にはあらゆる腸内細菌由来のPAMPsが含まれているにもかかわらず、生理的状態下では胆管上皮は自然免疫応答を来さず、いわゆるトレランス状態になっていると推測される。特にLPSに対する寛容はエンドトキシントレランスとして良く知られている。トレランス機構は、感染症発症時のショック回避のみならず、腸内細菌叢を有する腸管のホメオスタシス維持にも重要である。我々は、胆道系自然免疫のトレランス機構について検討した。ヒト培養胆管細胞を用いた検討にて、LPS刺激によるNF- $\kappa$ B活性化は時間の経過とともに減弱し、またLPSで前処理しておくと再刺激後の反応性は著明に抑制され、容易にトレランス状態を誘導することができた(図4)<sup>8</sup>。また、Pam3CSK4で前処理しても、LPSに対する反応性は有意に抑制され、いわゆるクロストレランスも誘導された(図4)<sup>8</sup>。次に、トレランス誘導の機序について検討した結果、細胞内シグナル伝達の抑制分子であるIL-1R-associated kinase (IRAK)-MがLPSやPam3CSK4刺激とともに発現が誘導され、さらにトレランス誘導状態でもIRAK-Mの発現亢進は維持されることから、IRAK-Mが胆道系トレランス誘導の重要な分子と考えられた<sup>8</sup>。したがって、腸管上皮細胞と同様、胆管細胞も自然免疫応答にともなって応答を負に制御する機構も作動し、過剰な免疫応答による高サイトカイン環境や組織障害を回避していると推測された。また、脂肪細胞分化や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の核内転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR)

は、NF- $\kappa$ Bレベルでシグナル伝達を抑制し、抗炎症因子として作用する。我々は、このPPAR $\gamma$ が培養胆管細胞で恒常的に発現していることを見出し、胆管細胞ではPPAR $\gamma$ もトレランス誘導因子として作用していると考えた<sup>9</sup>。また、免疫組織化学的検討にて、IRAK-M, PPAR $\gamma$ とも肝内胆管上皮で恒常的かつびまん性に発現していることがわかり、生理的状態下での細菌由来PAMPsに対するトレランス誘導および胆道系自然免疫の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられた<sup>8,9</sup>。

一方、2本鎖RNAウイルスに対するトレランスを検討した結果、細菌関連のPAMPsで見られたようなトレランスの誘導は見られなかった。培養胆管細胞をpoly(I:C)で2段階刺激しても、再刺激後のNF- $\kappa$ B活性化やIFN- $\beta$ 産生の抑制は全く見られず、むしろIFN- $\beta$ 産生は単独刺激よりもやや亢進していた(図4)<sup>10</sup>。また、LPS前処理後のpoly(I:C)刺激、poly(I:C)前処理後のLPS刺激、いずれにおいても2つめのPAMPs刺激によるNF- $\kappa$ B活性化に前処理の影響は全く見られず、TLR3とTLR4の間でのクロストレランスも存在しなかった(図4)<sup>10</sup>。前述のIRAK-Mによるシグナル伝達抑制効果はMyD88とIRAK1/4の間のシグナル伝達を阻害することによるが、TLR3の下流に存在する細胞内シグナル伝達はMyD88非依存性の系であるため、2本鎖RNAに対するトレランス機構が欠如している理由のひとつとして挙げられる

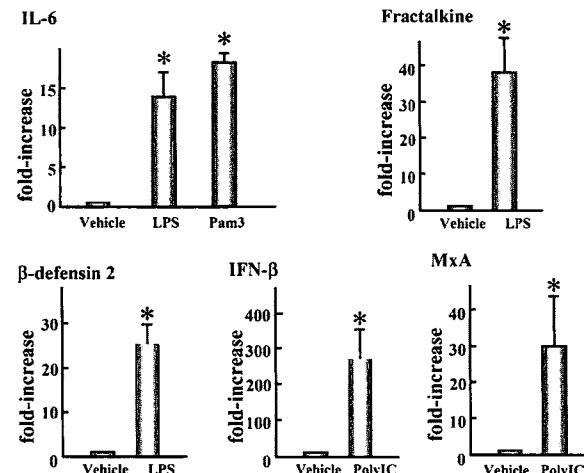


図2. 自然免疫応答にて培養胆管細胞から産生される液性因子。LPS(TLR4リガンド, 1  $\mu$ g/ml), Pam3CSK4 (Pam3, TLR1/2リガンド, 10  $\mu$ g/ml), poly(I:C)(TLR3リガンド, 25  $\mu$ g/ml)で刺激後、各液性因子のmRNAをリアルタイムPCRで定量した。\* < 0.05。

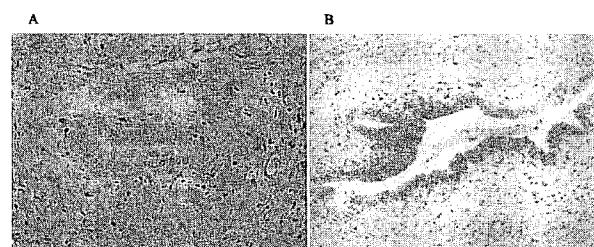


図3. ヒト $\beta$ ディフェンシンの免疫染色。A: 組織学的正常肝の隔壁胆管にヒト $\beta$ ディフェンシン1(hBD1)の発現を認める。B: 肝内結石症の肝門部大型胆管にヒト $\beta$ ディフェンシン2(hBD2)の発現を認める。

る。胆道閉鎖症の原因の一つとして2本鎖RNAウイルスであるレオウイルス科ウイルスの感染が想定されているが、胆管細胞では2本鎖RNAウイルスに対するトレランスが存在せず、ウイルスが完全に排除されるまで自然免疫応答が持続し、胆管病変も進行すると推測された。

**サイトカインによる自然免疫の感受性調節：**CD4陽性T細胞は、それら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与する。PBCの障害胆管周囲ではTh1型サイトカインが優位な状態であり、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と考えられている<sup>11)</sup>。前述の如く、胆管細胞は自然免疫応答にて獲得免疫形成に関与するサイトカインやケモカインも産生するが、胆管細胞自身も自らが発現しているサイトカイン受容体を介して胆管周囲のサイトカイン環境に反応することから、自然免疫と獲得免疫との相互の制御機構の存在が示唆される。ヒト培養胆管細胞を用いた検討にて、胆管細胞はTh1型サイトカインであるIFN- $\gamma$ 刺激でTLR2～TLR5の発現が亢進し、PAMPs刺激に対する反応性も亢進したが、Th2型サイトカインであるIL-4刺激では有意な変化は認めなかつた<sup>2)</sup>。事実、PBC患者の胆管ではTLR4の発現亢進が報告されており<sup>12)</sup>、PBC胆管周囲ではTh1型偏位による細胞性免疫亢進とともに胆道系自然免疫の感受性亢進（またはトレランスの破綻）も誘導されていることが示唆された。これらの所見は、胆管周囲でのサイトカイン環境が胆道系自然免疫の感受性を調節していると示唆され、自然免疫と獲得免疫の相互調節機構のひとつと考えられた。

#### 胆道系自然免疫応答と胆管病変

**細胞死：**胆道閉鎖症の基本病態は肝外胆管を主座とする硬化性胆管炎と線維性閉塞であり、肝外胆管の上皮細胞ではアポトーシスによる細胞死が亢進し、細胞動態の不均衡により胆管閉塞を来すと考えられている。上皮親和性を示すレオウイルス科ウイルスは腸管上皮細胞に対してアポトーシス誘導分子tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)およびNF- $\kappa$ B活性化を介してアポトーシスを誘導し、直接的に上皮傷害を来すことができる。我々は、poly(I:C)刺激による培養胆管細胞の細胞動態を検討した結果、腸管上皮細胞と同様、TRAILの発現亢進と30%のアポトーシスによる細胞死の誘導（生存率70%）が見られた<sup>3)</sup>。また、胆道閉鎖症患児の肝外胆管上皮には、2本鎖RNA認識受容体であるTLR3の発現に加え、2本鎖RNAに対する反応性を示唆するNF- $\kappa$ BおよびIRF-3の核発現、さらにTRAIL発現の亢進、アポトーシスが高率に見られた（図5）<sup>3)</sup>。胆道閉鎖症の原因のひとつとして考えられているレオウイルス科ウイルスは、胆管細胞への感染またはウイルス遺伝子のphagocytosisにより胆管細胞でのTRAIL発現を誘導し、autocrineまたはparacrine的にアポトーシスを誘導すると考えられ、ウイルス感染が胆道閉鎖症の胆管細胞消失に直接関与していると示唆された。また、前述の如く、2本鎖RNAに対する胆管細胞の自然免疫応答にはトレランス機構は存在しない。したがって、2本鎖RNA（ウイルス）が存在する限り自然免疫応答は持続し、TRAILを介したアポトーシス誘導もウイルスが完全に排除されるまで持続すると推測された。

**Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)：**EMTは上皮系細胞が間葉系細胞へ形質転換する現象であり、癌転移、創傷治癒、個体発生過程、疾患の病態形成などに関与する。EMT誘導因子

としてTransforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)が最も知られており、腎ではbasic fibroblast growth factor (bFGF)も報告されている。また、TGF- $\beta$ 1のpseudoreceptorであるbone morphogenic protein and activin membrane-bound inhibitor (Bambi)は自然免疫応答にて発現が低下し、その結果TGF- $\beta$ 1に対する感受性が亢進することも報告されており、Bambiの発現変化もEMTの誘導に関与すると推測される。近年このEMT現象が、慢性肝胆道系疾患の病態形成に関与しているとの報告がある。胆道閉鎖症の肝外胆管に見られる硬化性病変を来す機序として、我々は胆管細胞のEMT現象に注目し、ウイルスに対する自然免疫応答の観点から検討した。ヒト培養胆管細胞をpoly(I:C)で刺激した結果、生存した胆管細胞には胆管型サイトケラチンであるCK19と一般的な上皮系マーカーであるE-cadherinの発現が経時的に減弱し、上皮としての特徴を失いつつあることを見出した（図6）<sup>13)</sup>。また、胆管細胞はTGF- $\beta$ 1とその受容体であるTGF- $\beta$ R1を恒常に発現していたが、自然免疫応答による発現の変化は認めなかった<sup>13)</sup>。しかし、Bambiはpoly(I:C)刺激24時間後に発現が低下することがわかった、TGF- $\beta$ 1に対する感受性亢進を

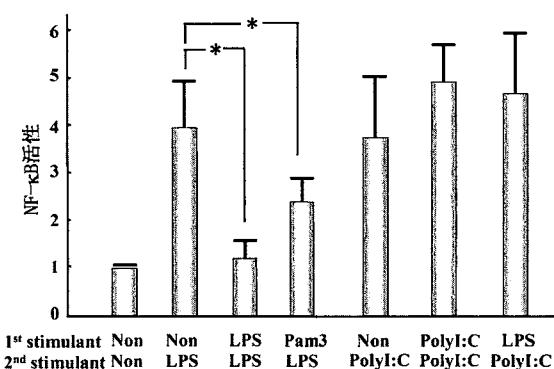


図4. 培養胆管細胞におけるトレランスの誘導。第1刺激としてLPS(TLR4リガンド, 1  $\mu$ g/ml)またはPam3CSK4(Pam3, TLR1/2リガンド, 10  $\mu$ g/ml)で刺激後、第2刺激としてLPS刺激した場合、第一刺激がない場合に比べて有意にNF- $\kappa$ Bの活性化が抑制され、トレランスの誘導が見られる。しかし、poly(I:C) (TLR3リガンド, 25  $\mu$ g/ml)刺激についてはトレランスの誘導は認めない。NF- $\kappa$ B-DNA binding assay. \* < 0.05.

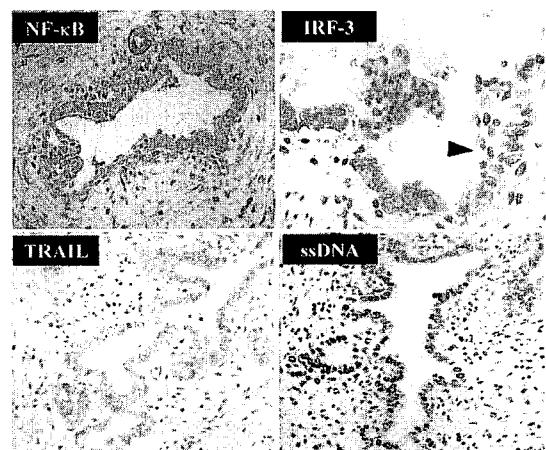


図5. 胆道閉鎖症の肝外胆管における転写因子、TRAIL、アポトーシスの免疫組織化学的検出。胆管細胞に活性型NF- $\kappa$ B、IRF-3を意味する核発現、細胞質にTRAILの発現、single-stranded DNA(ssDNA)陽性のアポトーシスを認める。

来すと推測された。また、bFGFはpoly(I:C)刺激で発現が誘導され、その受容体(FGFR1)も恒常に発現していた。さらに胆管細胞はTGF- $\beta$ 1やbFGF刺激にて、上皮系マーカーの発現低下、間葉系マーカーの発現誘導が見られ、間葉系細胞に特徴的な紡錐形細胞への形質転換が確認できた<sup>13)</sup>。胆道閉鎖症患児の肝外胆管を用いた免疫組織化学的検討にて、傷害胆管の胆管上皮にはEMT関連の転写因子であるSmad3の活性型発現を散見し、また上皮系マーカー(CK19, E-cadherin)の減弱または消失、間葉系マーカー(vimentin)の異常発現、TGF- $\beta$ 1およびbFGFの発現を認めた<sup>13)</sup>。このような肝外胆管での表現型の変化、転写因子の活性化およびEMT誘導因子の発現は、培養胆管細胞で見られたEMT現象の妥当性を示唆する所見であり、胆道閉鎖症の硬化性病変の形成に胆道系自然免疫を介した胆管細胞EMTが関与していると推測された。前述の如く、胆管細胞での2本鎖RNAに対する自然免疫応答はトレランス機構が存在しないにもかかわらず、poly(I:C)刺激によるアポトーシス誘導は30%程度と完全な細胞死を誘導しない。EMT現象はアポトーシスの回避機序とも考えられていることから、胆管細胞EMTは胆道系ウイルス感染に対するアポトーシス回避機構と解することもできる。したがって、胆道閉鎖症の肝外胆管では、2本鎖RNA(ウイルス)に対する胆道系自然免疫応答の結果、TRAIL介在性アポトーシス誘導および生存細胞に対するEMT誘導により胆管細胞の消失かつ線維性閉塞を来すと考えられ、ウイルスに対する胆道系自然免疫が胆道閉鎖症の特徴的な胆管病変の病態形成に関わっていると推測された。

**慢性炎症：**Th1, Th2細胞に加え第3の病原性Th細胞としてTh17細胞が新たに分類され、自己免疫性疾患などでの慢性炎症への関与が注目されている。このTh17細胞は、IL-6, IL-1 $\beta$ (マウスではTGF- $\beta$ )の存在下で前駆T細胞から分化・誘導され、IL-23の作用により機能が維持され、分化後はIL-17などの炎症性サイトカイン産生を特徴とする。我々は、通常培養下のヒト胆管細胞ではこのようなサイトカインをほとんど発現していないが、細菌由来のPAMPs刺激にてIL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23 p19およびIL-23/IL-12 p40の発現誘導が見られることを見出し、その意義について検討した<sup>14)</sup>。免疫組織学的検討にて、IL-17陽性単核細胞をTh17細胞として評価した結果、PBCの傷害胆管周囲にIL-17陽性細胞が散見され、対照疾患として用いたウイルス性慢性肝炎に較べて、有意に多数浸潤していた<sup>14)</sup>。またIL-23 p19の発現は疾患に関係なく肝内胆管で恒常に認めだが、IL-6, IL-1 $\beta$ の発現はPBCの傷害胆管で亢進していた<sup>14)</sup>。PBCの胆管上皮では細菌由来のPAMPsに対する自然免疫応答によりIL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23が産生され、これらのサイトカインは胆管周囲での抗原提示細胞におけるTh17細胞分化誘導に関与すると推測された。また、Th17細胞から産生されるIL-17は上皮細胞、血管内皮、線維芽細胞に作用し、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, iNOSなどの炎症性メディエータやケモカインの誘導により慢性炎症に関与することが知られている。胆管細胞もIL-17受容体(IL-17RA, IL-17RC)を発現しており、IL-17刺激にてIL-6, IL-1 $\beta$ およびCXCL1などのケモカインの発現誘導も見られた<sup>14)</sup>。これらの所見より、自然免疫応答に加えて胆管周囲のTh17細胞からもIL-17依存性にTh17細胞の誘導が助長され、さらにケモカイン作用による炎症細胞動員も加わって炎症が持続すると推測された。胆道系自然免疫応答に起因するTh17細胞の誘導が、PBC胆管炎の持続に重要な機序と考えられた。

### 分子標的治療として胆道系自然免疫の制御

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り、胆道系でも自然免疫の異常、特にトレランスの破綻による胆管病変の発生が推測される。前述の如く、胆道系自然免疫の負の制御因子としてPPAR $\gamma$ があり、PBCの傷害胆管ではこのPPAR $\gamma$ の発現低下(図7)およびTLR4の発現亢進が見られ、PBC胆管ではPAMPsに対する感受性亢進(またはトレランスの破綻)を来していると考えられる。そこで、我々はPPAR $\gamma$ のリガンドにて胆道系自然免疫の感受性亢進を抑制できないかと考え、in vitroでの基礎的検討を行った。PPAR $\gamma$ リガンドとして、thiazolidinedione誘導体であるトログリタゾンやピオグリタゾン、またprostaglandin Dの代謝産物である15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2(15d-PGJ2)が知られている。特に15d-PGJ2は内因性のPPAR $\gamma$ リガンドであり、NF- $\kappa$ B活性化の抑制分子であるI- $\kappa$ Bのリン酸化を阻害する。ヒト培養胆管細胞を15d-PGJ2で前処理し、LPSで刺激すると、15d-PGJ2非存在下に較べ、24%にまでNF- $\kappa$ Bの活性化が抑制された(図7)<sup>9</sup>。しかし、PPAR $\gamma$ アンタゴニストであるGW9662の存在下では15d-PGJ2によるNF- $\kappa$ B抑制効果の阻害は完全ではなかった<sup>9</sup>。15d-PGJ2によるNF- $\kappa$ B抑制効果はPPAR $\gamma$ 非依存性の系も存在することが報告

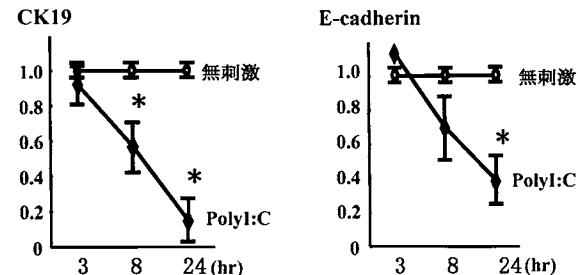


図6. poly(I:C)刺激による表現型の変化。ヒト培養胆管細胞をpoly(I:C)(25  $\mu$ g/ml)で刺激後、経時的に上皮系マーカーであるCK19, E-cadherinのmRNA発現をリアルタイムPCRで定量。経時的に上皮系マーカーの減弱が見られる。\* < 0.05.

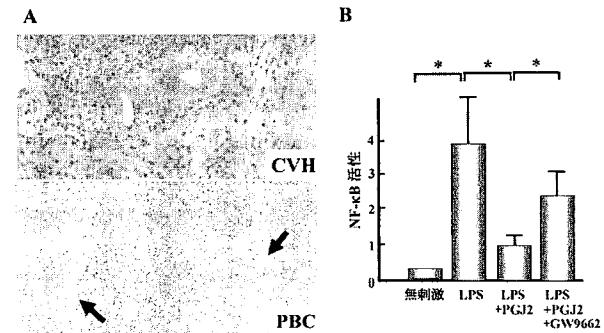


図7. A: PPAR $\gamma$ の免疫染色。ウイルス性慢性肝炎(CVH)の小葉間胆管ではPPAR $\gamma$ の発現を認めるが、原発性胆汁性肝硬変(PBC)の傷害胆管では発現の低下を認める(矢印)。B: PPAR $\gamma$ リガンド(15d-PGJ2)によるNF- $\kappa$ B抑制効果。培養胆管細胞におけるLPS(TLR4リガンド, 1  $\mu$ g/ml)誘導性NF- $\kappa$ Bの活性化は、15d-PGJ2(PGJ2, 20  $\mu$ mol/L)の存在下で有意に抑制される。さらに、PPAR $\gamma$ アンタゴニストであるGW9662の添加にて15d-PGJ2によるNF- $\kappa$ B抑制効果の阻害を認めるが、その効果は完全ではない。\* < 0.05.

されており、胆管細胞における15d-PGJ2の抑制効果はPPAR $\gamma$ 依存性および非依存性の双方の系が関与していることが示唆された。この双方の系が存在することは、PPAR $\gamma$ 発現が保持された胆管のみならず、PBCの傷害胆管のようなPPAR $\gamma$ 発現が低下した胆管細胞にも15d-PGJ2の抗炎症効果が期待でき、PBC治療において有利な点と考えられる。事実、PBC患者の肝病変に対するトリグリタゾンの有効性を示した症例報告もある。今後、動物モデルを用いたPPAR $\gamma$ リガンドの有効性を検証する必要があるが、未だPBC動物モデルがなく、更なる時間を要すると思われる。

#### おわりに

本稿では、胆管上皮における自然免疫の分子機構と胆道系疾患の病態形成における関与について述べた。胆管は単なる胆汁排泄の導管としての役割だけではなく、あらゆる免疫応答を示す粘膜としてとらえるべきである。また、胆道系の解剖学的特性および胆道系自然免疫の存在が胆管における炎症や病態の場を規定し、胆道系疾患の病態形成に深くかかわっていることもわかつてきた。しかし、自然免疫は病態発生の初段階においてinitiationとして関与するだけで、臨床的に病気が発症する病期では微生物の存在は必須ではないと推測している。原因不明とされている胆道系疾患の病態解明には、自然免疫から獲得免疫への移行機序、さらには自己免疫現象の発生機序についても解析する必要があると思われる。

#### 謝 詞

平成21年度(第6回)金沢大学十全医学会賞受賞にあたり、本賞の運営に携わっておられます皆様に厚く御礼申し上げます。本研究遂行にあたり、終始ご指導を賜りました恩師金沢大学医学系研究科形態機能病理(旧 第二病理)中沼安二教授に深謝いたします。また、長きにわたり肝胆道系疾患の研究に携わってこられました同門の先輩ならびに現医局員の方々に感謝申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) Harada K, Ohira S, Isse K, et al. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. *Lab Invest* 83:1657-67, 2003
- 2) Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Interferon gamma accelerates NF-kappaB activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligand interaction. *J Clin Pathol* 59:184-90, 2006
- 3) Harada K, Sato Y, Itatsu K, et al. Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology* 46:1146-1154, 2007
- 4) Harada K, Ohba K, Ozaki S, et al. Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree. *Hepatology* 40:925-932, 2004
- 5) Isse K, Harada K, Zen Y, et al. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the recruitment of intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts. *Hepatology* 41:506-16, 2005
- 6) Isse K, Harada K, Nakanuma Y. IL-8 expression by biliary epithelial cells is associated with neutrophilic infiltration and reactive bile ductules. *Liver Int* 27:672-80, 2007
- 7) Sawada S, Harada K, Isse K, et al. Involvement of Escherichia coli in pathogenesis of xanthogranulomatous cholecystitis with scavenger receptor class A and CXCL16-CXCR6 interaction. *Pathol Int* 57:652-63, 2007
- 8) Harada K, Isse K, Sato Y, et al. Endotoxin tolerance in human intrahepatic biliary epithelial cells is induced by upregulation of IRAK-M. *Liver Int* 26:935-42, 2006
- 9) Harada K, Isse K, Kamihira T, et al. Th1 cytokine-induced downregulation of PPARgamma in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 41:1329-38, 2005
- 10) Harada K, Sato Y, Isse K, et al. Induction of innate immune response and absence of subsequent tolerance to dsRNA in biliary epithelial cells relate to the pathogenesis of biliary atresia. *Liver Int* 28:614-21, 2008
- 11) Harada K, Van de Water J, Leung PS, et al. In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* 25:791-6, 1997
- 12) Wang AP, Migita K, Ito M, et al. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25:85-91, 2005
- 13) Harada K, Sato Y, Ikeda H, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. *J Pathol* 217:654-64, 2009
- 14) Harada K, Shimoda S, Sato Y, et al. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 157:261-270, 2009

#### Profile



略歴：平成3年3月	金沢大学医学部医学科 卒業
平成6年11月	米国カルフォルニア大学デービス校リウマチアレルギー、臨床免疫学教室 客員研究員
平成8年3月	金沢大学医学部大学院 病理専攻 卒業
平成8年4月	金沢大学医学部医学科 助手
平成9年6月	金沢大学医学部医学科 講師
平成19年2月	金沢大学大学院医学系研究科 准教授