

機関番号：13301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590338
 研究課題名（和文） 胆道閉鎖症の病態解明－胆道系自然免疫から獲得免疫への連携と自己免疫現象の解析－
 研究課題名（英文） Pathogenesis of biliary atresia - Interaction between biliary innate immunity and acquired immunity -
 研究代表者
 原田 憲一（HARADA KENICHI）
 金沢大学・医学系・准教授
 研究者番号：30283112

研究成果の概要（和文）：

胆道閉鎖症の病態形成における 2 本鎖 RNA ウイルスに対する自然免疫の関与について検討した。2 本鎖 RNA 刺激にて胆管細胞の上皮間葉移行(EMT)が誘導され、また患児の肝外胆管では EMT を示唆する表現型の変化を認め、硬化性閉塞性胆管炎の発生機序として胆管細胞 EMT が示唆された。また、NK 機能不全を有する CD56⁻CD16⁺NK 細胞が胆道閉鎖症患児の肝組織中で増加しており、ウイルス感染に対する NK 機能不全が病態発生の宿主因子として関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Biliary innate immunity for double-stranded RNA virus was examined in the histopathogenesis of biliary atresia (BA). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of biliary epithelial cells induced by the stimulation with double-stranded RNA and EMT-like phenotypic changes of extrahepatic bile ducts in BA are closely associated with the histogenesis of sclerosing obliterative cholangitis. Moreover, the increased number of a unique subset of NK cells, CD56⁻CD16⁺NK cells was found in portal tracts of BA, suggesting that NK dysfunction against virus infection might be a host factor associated with pathogenesis of BA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：胆道閉鎖症、胆管、自然免疫、病理学、ウイルス、NK 細胞、上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は、新生児期における肝外胆管の硬化性胆管炎と線維性閉塞が基本病態で、閉塞性黄疸の持続により肝硬変へと病期が進展し、最終的に肝不全で死亡する予後不良な疾患である。胆道閉鎖症は病態により先天型と後天型に分類されるが、未だ病態生理については不明であり、病因に関する両者の異同についても不明である。しかし、葛西手術の普及に伴い、手術の際に採取される肝外胆管(biliary remnants)や肝組織の病理検体の解析から胆道閉鎖症の病態が明らかとなりつつある。近年、特に胆道閉鎖症の肝組織などからレオウイルス科ウイルス(二本鎖 RNA ウイルスでロタウイルスとレオウイルスがある)が検出され、またこのウイルスが新生仔マウスに胆道閉鎖症類似の病変を惹起することが明らかとなり、胆道閉鎖症(特に後天型)とレオウイルス科ウイルスの関連性が注目されているが、病態発生の機序については不明であった。

さて、病原体(細菌,真菌,ウイルス)に対する自然免疫応答は、病原体の発生学的に変化に乏しい分子パターン(PAMPs)を分子標的とする。近年、PAMPs を認識する受容体の一つとして、Toll-like receptor (TLR) family がクローニングされ、自然免疫の病原体認識にかかわるシグナル伝達系が明らかにされつつある。我々は、胆管上皮にも細菌に対する自然免疫機構が存在することを明らかにし、胆道系独自の生体防御機構を形成していることを報告した。さらに、ウイルスに対する胆道系自然免疫機構も存在することを確認し、胆道閉鎖症の病初期における胆管病変形成にウイルス感染が直接関与していることを報告した。そこで私は、胆道閉鎖症由来の胆管細胞培養株を用いて 2 本鎖 RNA ウイルスに対する自然免疫機構の疾患特殊性を見出し、胆道閉鎖症の胆管病変の成り立ちを解明すべく本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究は、胎児期から新生児期におけるウイルス感染が原因と推定されている胆道閉鎖症の病態を解明するため、ウイルスに対する胆道系自然免疫に起因する胆道閉鎖症特異的な胆管病変発生の機序および宿主側の因子について解析し、自

然免疫制御による治療応用への分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

① 胆道閉鎖症の検体の収集と培養胆管細胞の樹立：葛西手術や肝移植を行っている金沢大学附属病院、石川県立中央病院および東北大学小児外科より、胆道閉鎖症の肝外胆管(biliary remnant)、肝組織(楔状生検肝・摘出肝)、血清、胆汁を収集し、肝移植症例では当教室で開発した micro-explant 培養方法にて、肝内胆管の培養細胞株を樹立した。

② 硬化性胆管病変の解析：胆道閉鎖症の硬化性胆管病変の病態形成における二本鎖 RNA ウイルスに対する胆道系自然免疫応答および上皮間葉移行(EMT)の関与について検討した。まず、胆道閉鎖症患児の葛西手術時に得られた肝外胆管索状物のホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象に、上皮系マーカー(CK19, E-cadherin)、間葉系マーカー(vimentin)、EMT 関連細胞内シグナル伝達分子(Smad3)、EMT 誘導分子とその受容体(TGF- β , basic FGF, TGF- β RI)の免疫染色を施行した。また、今回樹立した培養胆管細胞を用いて、合成 2 本鎖 RNA である polyI:C で刺激し、上皮系マーカーおよび間葉系マーカー、EMT 関連分子(S100A4, Snail)、EMT 誘導分子 TGF- β , basic FGF とそれらの受容体(FGFR1, TGF- β RI)および TGF- β 1 の偽受容体 Bambi の発現および変動について RT-PCR およびリアルタイム PCR、ウェスタン法にて検討した。

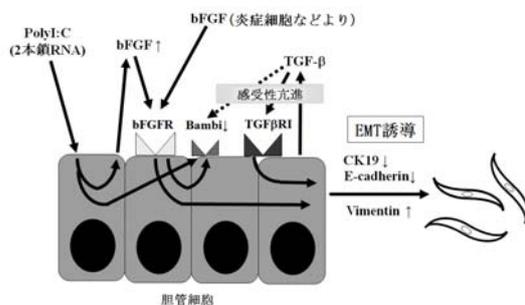
③ CD56⁻CD16⁺NK 細胞の解析：胆道閉鎖症を発生する宿主側の因子として、近年自然免疫不全の観点から同定された NK 機能不全を有する CD56⁻CD16⁺NK 細胞について検討した。胆道閉鎖症の楔状生検材料と対照疾患として HCV 関連慢性肝炎および組織学的正常肝の外科的切除肝または針生検を用いて、CD56, CD16 の多重免疫染色を施行した。なお、CD16 は NK 細胞のみならず組織球も発現しているため、CD56, CD16 に加

え CD68 の染色も施行し、CD56⁻CD16⁺NK 細胞は CD56⁻CD16⁺CD68⁻の細胞として同定した。

4. 研究成果

胆道閉鎖症の硬化性胆管病変における EMT の関与について検討した結果、胆道閉鎖症の肝外胆管病変部には、上皮系マーカー(CK19, E-cadherin)の減弱及び間葉系マーカー(vimentin)の異常発現が見られ、胆管における EMT を示唆する表現型の変化が見られた。さらに、EMT 関連細胞内シグナル伝達分子であるリン酸化 Smad3 の発現や TGF-β, basic FGF, TGF-βRI の発現も認められた。また、胆道閉鎖症由来の培養胆管細胞 1 株および対照疾患由来の培養細胞 2 株を用いて、合成 2 本鎖 RNA polyI:C で刺激した結果、EMT 誘導因子 basic FGF の発現亢進と TGF-β1 偽受容体 Bambi の発現低下、上皮系マーカーの減弱、さらに EMT 関連分子(S100A4, Snail)の発現亢進が誘導された。また、TGF-β1 と basic FGF の共刺激では、上皮系マーカーの減弱のみならず間葉系マーカーの発現亢進も認め、形態学的にも間葉系細胞への分化が誘導された。すなわち、胆管細胞は polyI:C 刺激により、basic FGF 産生と Bambi 発現低下による TGF-β1 に対する感受性亢進を来し、EMT が誘導されていると推測された(図 1)。したがって、胆管細胞は 2 本鎖 RNA ウイルスに対する自然免疫応答にて EMT 機序による間葉系細胞への形質転換を来し、胆道閉鎖症の閉塞性硬化性胆管炎の病態形成に関与していることが示唆された。

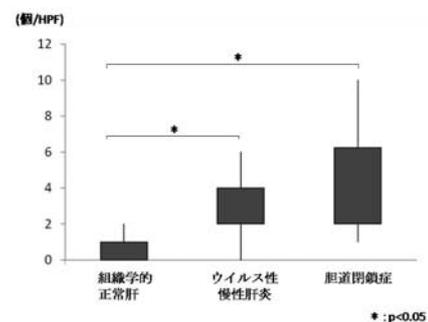
図 1 自然免疫応答による EMT 誘導機序



続いて、ウイルスに対する胆道閉鎖症患児の自然免疫不全の観点から解析した。特に NK 細胞は自然免疫に関わる重要な免疫担当細胞で、主なサブセットである CD56⁺NK 細胞と比較し、CD56⁻CD16⁺

NK 細胞は IFN-α や perforin 産生による NK 活性が低下している。今回、CD56⁻CD16⁺NK 細胞を CD56⁻CD16⁺CD68⁻の細胞として同定した結果、正常肝では CD56⁻CD16⁺NK 細胞はほとんど認めなかったが、疾患肝では CD56⁻CD16⁺NK 細胞を認め、特に胆道閉鎖症ではより多数の CD56⁻CD16⁺NK 細胞を認めた(図 2)。胆道閉鎖症では機能不全 NK 細胞が増加しており、レオウイルス科ウイルス感染に対する胆道系自然免疫不全をもとに、胆管病変および不適切な獲得免疫現象の発生が胆道閉鎖症の病態に関与している可能性が示唆された。

図 2 門脈域内の CD56⁻CD16⁺NK 細胞数



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Harada K, (他 11 名). Monocyte chemoattractant protein-1 derived from biliary innate immunity contributes to hepatic fibrogenesis. J Clin Pathol. 2011; in press, 査読有り.
2. Harada K, (他 11 名). Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3α in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Liver Int. 2011; 31(2): 245-53, 査読有.
3. Harada K, Nakanuma Y. Biliary Innate Immunity: Function and Modulation. Mediators Inflamm 2010; 2010; Article ID 373878, 査読無.
4. Harada K, Nakanuma Y. Biliary Innate Immunity in the Pathogenesis of Biliary Diseases. Inflamm Allergy Drug Targets 2010; 1; 9(2):83-90, 査読無.
5. Nakanuma Y, Harada K, (他 3 名). Recent progress in the etiopathogenesis of pediatric biliary disease, particularly Caroli's disease

with congenital hepatic fibrosis and biliary atresia. *Histol Histopathol* 2010; 25(2): 223-35, 査読無.

6. Harada K. (他 5 名). Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 157(2): 261-70, 査読有.
7. Harada K. (他 10 名). Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. *J Pathol.* 2009; 217(5): 654-64, 査読有.
8. 原田憲一 (他 3 名). 胆汁うっ滞の線維化進展 -肝の線維化を探る-. *肝胆膵* 2008; 57(2), 259-267, 査読無.

[学会発表] (計 10 件)

1. 原田憲一、岡村敦、中沼安二. 胆道系自然免疫を介した硬化性胆管炎の病態発生機構. 第 100 回日本病理学会総会. 2011 年 4 月 30 日, 横浜パシフィコ (神奈川県)
2. 岡村敦、原田憲一、中沼安二. 胆道閉鎖症における CD56-CD16+NK 細胞の関与. 第 100 回日本病理学会総会. 2011 年 4 月 28 日, 横浜パシフィコ (神奈川県)
3. 原田憲一、佐藤保則、中沼安二. 胆道系自然免疫応答による線維化機構-胆道閉鎖症の病態形成への関与について-. 第 13 回日本肝臓学会大会. 平成 21 年 10 月 15 日. 国立京都国際会館(京都府)
4. K. Harada, Y. Nakanuma. Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. The 60th Anniversary Yanbian University Serial Conferences International Congress of Molecular Oncology. 2009年8月7日. 延吉大学 (中国).
5. 原田憲一、佐藤保則、中沼安二. 肝線維化進展における胆管細胞由来 MCP-1 の関与について. 平成 21 年 7 月 24 日. 松山 ANA ホテル(愛媛県).
6. 原田憲一. 胆管における自然免疫機構と病態形成の解析. 金沢大学十全医学会総会・学術集. 平成 21 年 7 月 9 日. 金沢大学 (石川県).
7. 原田憲一. 胆道系自然免疫と病態形成への関与:胆道閉鎖症を中心に. 第 54 回日本病理学会秋期特別総会. 平成 20 年 11 月 20 日. 松山市コミュニティセンター (愛媛県)
8. K. Harada (他 6 名). Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity

contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. 59th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2008 年 11 月 2 日. Moscone West San Francisco (USA)

9. 原田憲一、佐藤保則、中沼安二. 胆道閉鎖症の病態形成における胆道系自然免疫の関与. 第 40 回日本臨床分子形態学会. 平成 20 年 10 月 3 日. アクロス福岡(福岡県)
10. 原田憲一、佐藤保則、中沼安二. 胆道閉鎖症の硬化性胆管病変の形成における胆道系自然免疫と epithelial-mesenchymal transition の関与. 第 45 回日本消化器免疫学会総会 平成 20 年 7 月 3 日. メルパルク京都(京都府).

[図書] (計 1 件)

書籍

1. K. Harada, Y. Nakanuma. Mechanisms of the Sclerosing Cholangiopathy in Biliary Atresia: Association with Biliary Innate Immunity and Epithelial-Mesenchymal Transition (Ed, Akira Matsui) *Biliary atresia*, 26-29, Kodansha Shuppan Service Center, 2009年, 26-29頁.

[その他]

ホームページ等:

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med10/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 憲一 (HARADA KENICHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 30283112