

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590325

研究課題名（和文）

原発性胆汁性肝硬変における胆管消失発生の分子機構：胆管細胞老化の関与を中心に

研究課題名（英文）Pathogenesis of progressive bile duct loss in primary biliary cirrhosis: A possible involvement of cellular senescence

研究代表者

佐々木 素子（SASAKI MOTOKO）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70225895

研究成果の概要：

本研究では、原発性胆汁性肝硬変（PBC）における胆管消失に胆管細胞老化が関与することが明らかとなった。人体材料を用いた検討では、PBC の傷害肝内小型胆管では高率に細胞老化マーカー：SA- β -gal, p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} の発現、テロメア長短縮を認めた。さらに酸化ストレス、炎症性サイトカインにより培養胆管細胞に細胞老化が誘導され、その分子機構には p16^{INK4a} 発現抑制因子 bmi1 発現低下、ATM /p53/p21 経路経路が関与することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2007 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2008 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 420,000 | 3,520,000 |

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学 再生医学 細胞老化 原発性胆汁性肝硬変 胆管上皮細胞 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は、血清中抗ミトコンドリア抗体（AMA）の出現と破壊性胆管炎、胆管消失の進行を特徴とする臓器特異的自己免疫性疾患である。従来、PBC では胆管上皮での抗原提示への免疫病理学的アタックが研究の中心であり、CD8⁺細胞障害性 T 細胞（CTL）がそのエフェクター細胞として注目されている。しかし、過去 20 年以上におよぶ研究で、PBC における胆管破壊と消失の病態機序は依然として解明されていない。

肝内胆管細胞は本来、再生能、増殖能に富んでおり、薬剤性胆管障害や胆道感染症などの胆管傷害後に容易に再生・修復する。しかし、PBC や肝移植後拒絶反応などの肝内胆管消失症候群では免疫病理学的機序による胆管傷害が進行し胆管細胞の再生はみられず、胆管消失が不可逆性に進行する。私は、“PBC などの肝内胆管消失症候群の胆管消失発生には胆管の再生修復不全が関与する”と仮説を立てて、検討を進めて来た。この研究過程で、PBC や移植後拒絶肝の傷害胆管は“細胞の不

可逆的な増殖停止状態”と定義される細胞老化 (cellular senescence) の形質を高率に示す事を見いだした。PBC の傷害胆管にみられる胆管細胞老化は、胆管の再生修復不全による胆管消失の要因となる可能性がある。そこで本研究では、PBC における胆管消失発生の分子機構を胆管細胞老化の関与を中心に解明することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、PBC における胆管消失発生の分子機構を胆管細胞老化の関与を中心に解明することを目的とした。具体的には以下の検討を行った。①PBC の小型胆管と細胆管における胆管細胞老化の発生状況を検討する。細胞老化の指標として senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 発現, p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} の発現亢進, 細胞周期マーカー (cyclin D, cyclin A など) 発現の解析を用いる。②PBC における胆管細胞老化は、テロメア依存型 (replicative senescence) であるか、テロメア非依存型 (premature senescence) であるかについて、Q-FISH 法を用いて検討する。③PBC における胆管細胞老化の誘導因子について、酸化ストレスと polycomb group repressor: bmi1 の関与を中心に検討する。④胆管細胞の培養系で、酸化ストレスやサイトカイン付加、マクロファージとの共培養により胆管細胞の細胞老化誘導を試みる。また、細胞老化誘導の分子機構を検討してアポトーシス誘導機構との相互作用を検討する。さらに、老化胆管細胞の長期培養を行って、老化細胞の運命を検討する。

3. 研究の方法

①PBC の小型胆管と細胆管における胆管細胞老化の検討：人体材料を用いて、組織化学 (Dimri 法) と免疫組織化学を用いて細胞老化の指標である SA- β -gal 発現、老化関連 p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} の発現状況を検討した。また、細胞周期マーカー (cyclin D, cyclin A など) 発現の解析により、G1 アレストによる増殖停止を検証した。

②Q-FISH 法を用いた検討：Q-FISH 法により胆管細胞のテロメア長測定を行い、PBC と対照疾患肝の胆管病変、胆管細胞老化とテロメア長の関連性の検討を行った。この検討により、PBC における胆管細胞老化はテロメア

依存型 (replicative senescence) であるか、テロメア非依存型 (premature senescence) であるかを検証した。

③胆管細胞老化と酸化ストレスの関連性：人体材料を用いて、細胞老化誘導因子として酸化ストレスの関与に注目して検討した。酸化ストレス関連マーカー (8-OHdG など) の発現、酸化ストレスをきたす炎症細胞浸潤, p16^{INK4a} 発現抑制因子 bmi1 の発現と胆管の細胞老化やアポトーシスの関連性を検討した。

④胆管細胞老化の分子機構；培養胆管細胞を用いた検討：当教室で株化したラット・マウス培養胆管上皮細胞株を用いて酸化ストレスやサイトカイン付加により細胞老化の誘導と関連分子機構の検討を行った。

I. 炎症細胞との共培養による胆管細胞老化の誘導：マクロファージなどの炎症細胞と胆管細胞の共培養を行い、胆管細胞における酸化ストレス付加の状況と細胞老化、アポトーシスの発生を検討した。さらに同条件下で抗酸化剤 (N-アセチルシステインなど) の添加による細胞老化誘導の抑制を検討した。

II. 胆管細胞老化誘導の分子機構の解析：胆管細胞老化の誘導と制御に関与するストレスシグナルの経路を明らかにする目的で、代表的なシグナル伝達系の各種阻害剤 (例: MAP キナーゼ系の MEK1 阻害剤 PD098059) や short interfering (si) RNA を用いて、p21^{WAF1/Cip}, p16^{INK4a} の制御機構を解析した。

III. 老化細胞の運命の検討：細胞老化誘導後の胆管細胞の運命を検討する目的で老化胆管細胞の長期培養を行い、老化細胞が細胞死に至る経路 (アポトーシスか、アノキスカ、ネクロシスカ) を検討した。老化細胞のみを選択して培養し、経時的に培養上清、培養液中の脱落細胞や老化細胞を採取して、LDH 値, cleaved caspase-3 発現, DNA フラグメンテーションを解析した。

4. 研究成果

① PBC の小型胆管と細胆管における胆管細胞老化の検討

PBC と対照疾患肝, 正常肝の人体材料 (計 110 症例) を用いて、細胞老化の指標である SA- β -gal 発現, 老化関連 p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} の免疫組織化学的発現状況を検討した。PBC の障害肝内小型胆管では高率に細胞老化マーカーの発現を認めたが、対照疾患肝, 正常肝の小型胆管には細胞老化は見られなかった。

また、PBC と対照疾患肝の細胆管と門脈域周囲肝細胞にも種々の程度に細胞老化マーカー発現を認めた。さらに PBC と対照疾患肝の胆管細胞における細胞周期マーカー (G1 期, cyclin D1; S 期, cyclin A) の発現と老化関連マーカー p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} 発現の関連を検討したところ、細胞老化をしめす PBC 胆管炎部の傷害胆管、細胆管は cyclin D1 発現を示し、cyclin A 発現はほとんど見られなかった。老化胆管細胞は G1 アレスト状態にあることが示された。

②PBC での胆管細胞老化は、replicative senescence か、premature senescence か? : Q-FISH 法を用いた検討

収集した肝組織材料を用いて Q-FISH 法にて PBC と対照疾患肝の胆管細胞におけるテロメア長測定を行った。PBC では胆管炎部の傷害胆管において、非傷害胆管、対照疾患肝の小型胆管と比較して有意なテロメア長短縮を認めた。PBC の細胆管においても同様の傾向を認めた。傷害胆管におけるテロメア長短縮は、老化関連マーカー : p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} 発現亢進, DNA 損傷マーカー : γ H2AX の発現を概ね相関していた。

③胆管細胞老化と酸化ストレスの関連性: 免疫組織化学的検討

PBC での細胞老化における酸化ストレスの関与を検討した。培養胆管細胞を用いた検討では酸化ストレスによる細胞老化の誘導と p16^{INK4a} 発現抑制因子 bmi1 発現低下が認められた。肝組織材料を用いた検討では、PBC の障害肝内小型胆管において bmi1 発現の低下が認められ、p16^{INK4a} 発現亢進と局在が一致した。酸化ストレスによる bmi1 低下が細胞老化の一因と考えられた。

④胆管細胞老化の分子機構: 培養胆管細胞を用いた検討

当教室で株化したラット・マウス培養胆管細胞株を用いてコラーゲンゲル上 2 次元培養, コラーゲンゲル内 3 次元培養を行い、酸化ストレス (H₂O₂ 添加) や炎症性サイトカイン (TNF- α , IFN- γ など) の付加により細胞老化の誘導を試みた。酸化ストレスや炎症性サイトカイン付加により胆管細胞に細胞老化が誘導された。また、酸化ストレスや炎症性サイトカインによる細胞老化の誘導は ATM (ataxia-telangiectasia mutated), p53 のリン酸化を介した p21 発現亢進が見られた。胆管細胞老化誘導の分子機構として

ATM/p53/p21 経路経路が関与することが明らかとなった。また、抗酸化剤 (N-アセチルシステイン) 前処理によって抑制され、老化誘導経路に ROS 産生が関与することが示唆された。さらに細胞老化誘導後細胞の長期培養により、老化細胞は 2 週間以上持続すること、老化細胞にはアポトーシスが見られないことが明らかとなった。

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 10 件)

1. Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, et al. Telomere shortening in the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis reflects ongoing cellular senescence. *Hepatology* 2008;48:186-195. 査読有
2. Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, et al. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. *Free Radic Res* 2008;42:625-632. 査読有
3. Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y. Activation of ATM signaling pathway is involved in oxidative stress-induced expression of mitoinhibitory p21^{WAF1/Cip1} in chronic non-suppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study. *J Autoimmun* 2008;31:73-78. 査読有
4. Sasaki M, Yamaguchi J, Itatsu K, et al. Over-expression of polycomb group protein EZH2 relates to decreased expression of p16 INK4a in cholangiocarcinogenesis in hepatolithiasis. *J Pathol* 2008;215:175-183. 査読有
5. Sasaki M, Ikeda H, Itatsu K, et al. The overexpression of polycomb group proteins Bmi1 and EZH2 is associated with the progression and

aggressive biological behavior of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2008;88:873-882.

査読有

6. Ikeda H, Sasaki M, Ohira S, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces the aberrant expression of mucus core protein-2 in non-neoplastic biliary epithelial cells via the upregulation of CDX2 in chronic cholangitis.

Hepatology 2008;38:1006-17. 査読有

7. Sasaki M, Ikeda H, Sawada S, et al. Naturally-occurring regulatory T cells are increased in inflamed portal tracts with cholangiopathy in primary biliary cirrhosis.

J Clin Pathol 2007;60:1102-1107. 査読有

8. Ikeda H, Sasaki M, Ishikawa A, et al. Interaction of Toll-like receptors with bacterial components induces expression of CDX2 and MUC2 in rat biliary epithelium in vivo and in culture. *Lab Invest* 2007;87:559-571. 査読有

9. Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, et al. Decreased expression of Bmi1 is closely associated with cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Am J Pathol* 2006;169:831-845. 査読有

10. Sasaki M, Ikeda H, Kataoka H, et al. Augmented expression of hepatocytes growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in intrahepatic small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch* 2006;449:462-471. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. Sasaki M, et al. Cellular senescence of bile ductular cells may be involved in the pathophysiology in ductular reactions in chronic

liver diseases. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (November 1st, 2008, San Francisco)

2. Sasaki M, et al. Cellular senescence of biliary epithelial cells characterizes the damaged small bile ducts in primary biliary cirrhosis. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (November 1st, 2008, San Francisco)

3. 佐々木素子ら, 自己免疫性肝疾患研究に創流を求めて 自己免疫性肝疾患の胆管病変 (PBC, PSC, AIP の胆管病変). 第 44 回日本肝臓学会総会 (2008 年 6 月 4 日, 松山)

4. 佐々木素子ら, 原発性胆汁性肝硬変の傷害胆管におけるテロメア長短縮とその意義. 第 44 回日本肝臓学会総会 (2008 年 6 月 3 日, 松山)

5. 池田博子, 佐々木素子ら, 慢性胆管炎の goblet cell metaplasia における MUC2 (腸型ムチン) 発現の分子機構 tumor necrosis factor (TNF)- α は CDX2 発現を介して MUC2 を誘導する. 第 44 回日本肝臓学会総会 (2008 年 6 月 3 日, 松山)

6. 佐藤保則ら, 肝障害と修復に関する研究の展開 肝線維化における endothelial to mesenchymal transition (EndMT) の関与. 第 44 回日本肝臓学会総会 (2008 年 6 月 3 日, 松山)

7. 佐々木素子ら, 老化機構解明のための病理学的アプローチ 肝疾患における細胞老化の関与 自己免疫性疾患から発癌まで. 第 97 回日本病理学会総会 (2008 年 5 月 14 日, 金沢)

8. 佐々木素子ら, 原発性胆汁性肝硬変の胆管細胞老化における ATM (ataxia-telangiectasia mutated)/p53/p21 経路の関与. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月 31 日, 東京)

9. 佐々木素子ら, 慢性肝疾患における肝細胞の細胞老化 (cellular senescence) とその意義. 第43回日本肝臓学会総会 (2007年5月31日, 東京)

10. Sasaki M. et al. ATM/p53/p21 pathway is involved in the oxidative stress -induced cellular senescence in biliary epithelial cell in primary biliary cirrhosis. 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), (November 2nd, 2006, Boston)

11. 佐々木素子ら, 酸化ストレスによる胆管細胞老化の制御機構 ATM(ataxia-telangiectasia mutated)/p53/p21 経路の関与を中心に. 第42回日本肝臓学会総会 (2006年5月25日, 京都)

12. 佐々木素子ら, 原発性胆汁性肝硬変における制御性T細胞(Treg)の肝内分布とその意義. 第42回日本肝臓学会総会 (2006年5月25日, 京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 素子 (SASAKI MOTOKO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号 : 70225895

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 保則 (SATO YASUNORI)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号 : 30324073

中沼 安二 (NAKANUMA YASUNI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 10115256