先天性肝線維症+カロリ病の病理学的,分子生物学的検討: 動物モデルとの比較を中心に

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 中沼, 安二, Nakanuma, Yasuni
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034791

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

先天性肝線維症＋カロリ病の病理学的，分子生物学的検討

－動物モデルとの比較を中心に－

課題番号　　12470044

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金［ 基盤研究（B)(2)］研究成果報告書

平成 16 年 6 月

研究代表者

中沼　安二

（金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学）
・教授

0400-07358-7

先天性肝線維症＋カロリ病の病理学的，分子生物学的検討
－動物モデルとの比較を中心に－

課題番号　　12470044

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金［ 基盤研究（B)(2)］研究成果報告書

平成 16 年 6 月

研究代表者

中沼　安二

（金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学）
教授

はしがき

ヒト肝内胆管系は，胆管板（ductal plate）と呼ばれるスリット状の内腔を有する二層性の上皮性原基より発生すると考えられている。胆管上皮細胞と支持結合組織の過剰増殖を特徴とする肝線維嚢胞症（fibrocystic disease of the liver）は，この ductal plate の分化やリモデリング異常により生ずるとされ，ductal plate malformation とも呼ばれている。肝線維嚢胞症に属する代表的疾患として，肝内胆管の多発性，分節状の嚢状拡張を特徴とするカロリ病，ならびに門脈域結合組織の過剰増殖を特徴とする先天性肝線維症（congenital hepatic fibrosis，CHF）がよく知られており，これらは常染色体性劣性遺伝形式を示す。また，カロリ病や CHF では高率に常染色体劣性遺伝型多発性腎嚢胞症（autosomal recessive polycystic kidney disease，ARPKD）を合併する。これまでに多発性腎嚢胞症の病因，病態を検討した報告は数多くなされているが，肝線維嚢胞症に関する研究報告は非常に少なく，その肝胆管病変の成立機序については未だ不明な点が多い。

ヒト疾患の病因，病態を解明する上で，適切なモデル動物を用いた研究は極めて有用である。現在まで，多発性腎嚢胞症ならびに肝線維嚢胞症を発現する動物として，C57BL/6J-*cpk*/+マウスなどいくつかの系統のものが報告されている。しかし，これらの動物は肝胆管病変の程度が軽度であり，かつその発現頻度が低いため，その使用は主に多発性腎嚢胞症の研究に限られていた。恒常的もしくは高頻度にカロリ病や CHF 類似の肝線維嚢胞症を発現するモデル動物はこれまでに知られておらず，これが多発性腎嚢胞症と比較して肝線維嚢胞症の研究が立ち後れている大きな原因の一つであった。

しかし近年になり，日本チャールス・リバーが生産する Sprague-Dawley 系ラット（Crj:CD ラット）のコロニーから，多発性腎嚢胞および肝内胆管の多発性拡張を示す突然変異動物（常染色体性劣性遺伝形式を示す）が見出され，Katsuyama らにより polycystic kidney (PCK) ラットと称して報告された (Exp Anim 49: 51-55, 2000)。

本研究では，この新たに報告された PCK ラットを実験動物として使用し，病理組織学的および分子生物学的な観点を中心に，同ラットにみられる肝線維嚢胞症の特性やその成立機序に関する詳細な検討を行った。さらに，一連の検討結果をもとに，ヒト・カロリ病ならびに CHF の病因，病態の解明を試みた。以下，平成 12 年度，13 年度，14 年度に担当した科学研究費補助金［ 基盤研究（B）］「先天性肝線維症＋カロリ病の病理学的，分子生物学的検討－動物モデルとの比較を中心に－」（課題番号

12470044）に関する研究成果を，学会誌に掲載された論文を中心として現在投稿中の論文内容も併せて報告する。

研究組織

研究代表者　中沼　安二（金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学）・教授
研究分担者　佐々木素子（金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学）・助教授
研究分担者　原田　憲一（金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学）・講師

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合　計
平成 12 年度	7,300	0	7,300
平成 13 年度	2,900	0	2,900
平成 14 年度	600	0	600
総　計	10,800	0	10,800

研究発表

（1）学会誌等

1）T. Sanzen, K. Harada, M. Yasoshima, Y. Kawamura, M. Ishibashi, Y. Nakanuma. Polycystic Kidney Rat Is a Novel Animal Model of Caroli's Disease Associated with Conjenital Hepatic Fibrosis. Am J Pathol, 158 (5), 1605-1612, 2001

2）Y. Sato, K. Harada, Y. Nakanuma. ACTIVATION OF THE MEK5/ERK5 CASCADE IN BILIARY EPITHELIUM OF POLYCYSTIC KIDNEY RAT, AN ANIMAL MODEL OF CAROLI'S DISEASE. Hepatology (AASLD Abstracts), 38 (4), 679A, 2003

3）木澤　和夫．カロリ病モデル PCK ラットからの肝内胆管上皮細胞の単離，培養ならびにその生物学的特性の検討 － 細胞増殖活性および細胞増殖関連遺伝子発現を中心に －．金沢大学十全医学会雑誌, 111 (2,3), 162-172, 2002

4）中沼　安二，佐藤　保則．肝内胆管の形成異常－多嚢胞性肝疾患と先天性肝線維症＋カロリ病を中心に－．肝臓, 44 (12), 619-631, 2003

（2）口頭発表

1）佐藤　保則，原田　憲一，中沼　安二．ヒト Caroli 病動物モデル（PCK ラット）の胆管病変の解析；培養胆管細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析．第 91 回日本病理学会総会　2002 年

2）八十島　満枝，木澤　和夫，三善　隆広，原田　憲一，中沼　安二．Caroli 病にみられる肝内胆管多発性嚢胞状拡張の発生機序；胆管基底膜構成蛋白の解析を中心に．第 38 回日本肝臓学会総会　2002 年

3）佐藤　保則，原田　憲一，中沼　安二．カロリ病モデル PCK ラットの培養

肝内胆管上皮細胞における MAPK シグナル伝達機構の解析．第 39 回日本肝臓学会総会　2003 年

（3）出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

本研究で得られた成果を以下に要約する。

1）PCK ラットにみられる多発性肝嚢胞の病理組織学的ならびに分子生物学的特徴：

PCK ラットの肝臓を病理組織学的に検索した結果，本ラットにおける肝内胆管の拡張は多発性，分節状の嚢状拡張であり，胎齢期のラットでも肝内胆管に拡張がみられ，成長に従い拡張の程度が進行することが明らかとなった。拡張した胆管内に門脈域が浮遊する central dot サインも認められた。これら PCK ラットの肝臓の病理組織学的特徴は，ヒトでの CHF を伴うカロリ病に極めて類似しており，PCK ラットが CHF を伴うヒト・カロリ病の有用なモデル動物となりうることが示された。さらに PCK ラットの肝内胆管拡張の発生と進行には，肝内胆管上皮細胞の増殖とアポトーシスの不調和が関与していることを明らかにした。

2）PCK ラットの胆管拡張の発生機序－胆管基底膜構成蛋白の解析を中心に：

細胞外基質は組織の形成や維持に重要な役割を担っており，ヒト正常肝の肝内胆管では基底膜部にラミニンやⅣ型コラーゲンが発現している。PCK ラットにおける肝内胆管周囲でのラミニン，Ⅳ型コラーゲンの発現と分布を検討したところ，胎齢期および新生児期の PCK ラットの肝内胆管周囲でのラミニン，Ⅳ型コラーゲンの発現は，対照ラット肝と同様の態度を示した。しかし，生後数週間経過した PCK ラットでは，拡張した肝内胆管の基底膜でラミニン，Ⅳ型コラーゲンの断裂や消失が認められた。さらに，生後 10 ヶ月齢の PCK ラットでは，一部の拡張胆管周囲に線維性の硬化がみられ，同部の肥厚した基底膜におけるラミニンの発現は消失していた（Ⅳ型コラーゲンの発現はみられた）。こうした基底膜構成蛋白の発現異常が，上皮細胞の増殖や性状に何らかの影響を及ぼしていると思われ，PCK ラットの肝内胆管拡張の発生と進行に重要な役割を担っている可能性が考えられた。

3）化学発癌物質投与 PCK ラットの肝臓にみられる腸上皮化生の検討：

カロリ病患者は健常人よりも胆管癌の発生頻度が高く，嚢胞状に拡張した肝内胆管における胆汁うっ滞や慢性胆管炎が発癌過程に関与している可能性があると考えられている。また，ラットに発癌物質であるアゾ色素系癌原性物質（3'-Me-DAB）を投与すると oval cell hyperplasia，cholangiofibrosis が出現し，cholangiocarcinoma へと進展していくことが知られている。この 3'-Me-DAB を PCK ラットに連続投与したところ，肝臓には早期に oval cell hyperplasia が出現し，oval cell hyperplasia 内や拡張胆管内に腸型形質を有する上皮が出現した。さらに，腸型上皮には胆管系でのシグナル伝達系や腸上皮化生の転写因子である CDX2 の強い発現がみられた。この腸型形質を有する上皮が，カロリ病患者における intestinal type cholangiocarcinoma の発生母地となる可能性が示唆された。

4）PCK ラットの培養肝内胆管上皮細胞株の樹立：

PCK ラットにおける生物学的特徴，ならびに肝内胆管拡張の発生機序を *in vitro* で明らかにするため，PCK ラットの肝臓から肝内胆管上皮細胞を単離し，継代培養可能な細胞株を樹立した。PCK ラットの肝臓を経門脈的にコラゲナーゼで潅流し，肝実質除去後に得られた胆管樹から肝内大型胆管を分離し，これをⅠ型コラーゲンゲル上に移植，培養した。この肝内胆管組織片から，コラーゲンゲル上をシート状に増殖する胆管上皮細胞をコラーゲンゲルごと採取して継代培養した。継代を経て得られた培養細胞は，コラーゲンゲル上で単層の細胞層を形成し，その遊離縁には酸性糖蛋白の発現がみられ，さらに胆管上皮細胞の特異的なマーカーであるサイトケラチン７および γ－グルタミルトランスペプチダーゼの発現がみられ，胆管上皮細胞としての形質を保持していた。こうして，間質細胞の混入のない PCK ラットの肝内胆管上皮細胞株を樹立した。以上の方法により得られた胆管上皮培養細胞株を用いた検討により，以下５）に記す成績を得た。

5）PCK ラットの培養肝内胆管上皮細胞の生物学的特徴ならびに肝内胆管拡張の発生機序に関する検討：

PCK ラット培養肝内胆管上皮細胞の倍加時間は２３時間であり，対照ラットの７７時間に比べて短く，PCK ラットの肝内胆管上皮細胞で増殖活性の亢進がみられた。cDNA マイクロアレイ法を用いて，PCK ラット培養肝内胆管上皮細胞における遺伝子発現を対照ラットと比較した結果，代表的な上皮系細胞の細胞増殖因子である EGF の細胞内シグナル伝達系（MAPK シグナル伝達系）に含まれる MEK５，ならびに細胞増殖や線維化に関与する bFGF，TGF-β３および TGF-βⅠ型受容体の遺伝子の発現亢進がみられた。また，EGF 受容体阻害剤の投与は，PCK ラットの培養胆管上皮細胞の過剰な増殖を有意に抑制した。さらに，*in vivo* でも PCK ラットに EGF 受容体阻害剤を投与すると肝嚢胞形成の抑制がみられた。PCK ラットでは，遺伝子レベルでの細胞増殖制御の不調和があり，それによる肝内胆管上皮細胞の異常増殖が肝内胆管拡張の発生に関与している可能性が示された。

6）ヒト・CHF/カロリ病の肝胆管病変の病理組織学的検討：

ヒト・CHF（カロリ病合併例を含む）の複数症例の肝組織標本について，病理組織学的な検討を行った。CHF 全例で門脈域の密な線維化と小葉間胆管および細胆管増生がみられた。これら門脈域病変はカロリ病非合併例に比べ，カロリ病合併例で軽度であった。門脈域内で拡張し増生した小葉間胆管は，胎生期に出現する胆管板を模倣しており，胆管板の遺残と考えられた。この胆管板構造は種々の程度の拡張を示し，特にカロリ病合併例で拡張が目立った。カロリ病を特徴づける拡張した肝内大型胆管も胆管板の形態を模倣していた。対照肝（ウイルス性肝炎，閉塞性黄疸等）と比較すると，CHF では線維化巣での炎症細胞浸潤が軽度であり，また，対照群では門脈域線維化巣に接する肝実質での類洞の毛細血管化や肝細胞の胆管上皮化生が高率にみられたが，CHF ではこれらは殆どなかった。CHF では遺残胆管板が門脈域内にしばしばみられ，これが胆管病変（増生と拡張）の基礎病変と考えられた。

7）ヒト・CHF/カロリ病での胆管基底膜構成蛋白の解析と肝線維化の発生機序：

CHF/カロリ病の拡張胆管の基底膜部ではラミニンの消失がしばしばみられ，同部ではⅣ型コラーゲンの発現も弱く，部分的な消失も認められた。一方，拡張を伴わない部位では，基底膜部にラミニンとⅣ型コラーゲンの発現が明確に認められた。PCKラットと同様に，CHF/カロリ病でも基底膜構成蛋白の発現異常が肝内胆管拡張の発生と進行に関与している可能性が示唆された。

CHF での肝線維化巣では，膠原線維の沈着はあるが弾力線維の沈着は殆どみられなかった。CHF/カロリ病では，拡大した線維性間質において，線維芽細胞の増殖や細胞接着に深く関与する connective tissue growth factor（CTGF）が多く分布していた。また，heparan sulfate proteoglycan（HSPG）は肝硬変例では線維性隔壁の辺縁部にその沈着が目立ったが，CHF/カロリ病では広汎にその沈着がみられた。TGF-βは C 型慢性肝炎では増生細胆管と伊東細胞に強い発現を認めたが，CHF では殆ど発現していなかった。慢性肝炎やアルコール性肝疾患にみる肝線維化は，CHF とはその線維形成機序が異なることが考えられた。