

特集：多発性嚢胞腎—最新の知見と今後の課題

胆道感染と胆管嚢状拡張のメカニズム

Mechanism of cystic bile duct dilatation in relation to biliary infection

佐藤保則 任 香善 中沼安二

Yasunori SATO, Xiang Shan REN, and Yasuni NAKANUMA

はじめに

胆道形成異常をきたす疾患の一つとして、肝内胆管の進行性の多発性、嚢状拡張を示すカロリ (Caroli) 病がある。カロリ病は高率に先天性肝線維症 (congenital hepatic fibrosis : CHF) を合併し、常染色体劣性多発性嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease : ARPKD) の肝胆管病変としても知られる¹⁾。

Polycystic kidney (PCK) ラットは Crj : CD (Sprague-Dawley) ラットのコロニーから見出された突然変異動物であり、fibrocystin/polyductin をコードする *Pkhd1* に変異を有し、ARPKD の動物モデルとして確立されている²⁾。このラットの肝臓は肝内胆管の拡張と肝線維化を示し、カロリ病+CHF の病態をよく再現している³⁾。

PCK ラットを動物モデルとして、カロリ病の病態解明や治療を目的とした研究が進行している。現在まで、PCK ラットの胆管細胞は細胞増殖やアポトーシス、分泌、細胞外マトリックスとの相互作用などにおいてさまざまな異常を示すことが明らかとなっている⁴⁻⁹⁾。近年は胆管細胞に存在する primary cilia の異常が注目されており、多嚢胞性肝疾患における一連の病態は cholangiociliopathies として理解されつつある^{10,11)}。

カロリ病では胆道感染をしばしば合併し、それに関連して肝膿瘍や敗血症をきたす。胆道感染は胆管癌の合併や CHF に伴う門脈圧亢進症状とともに、カロリ病患者の生命予後を規定する重要な因子の一つである。しかし、胆道感染がカロリ病の主要な病態である進行性の肝内胆管拡張に及ぼす影響はこれまでよく知られていない。

本稿では、カロリ病の肝内胆管拡張における胆道感染の

関与に関する知見を、PCK ラットを用いたわれわれの最近の研究成果を中心に紹介する¹²⁾。

PCK ラット肝

発生の過程において、肝内胆管系は肝芽細胞に由来する胆管板 (ductal plate) のリモデリングによって形成される。カロリ病の肝内胆管拡張は、胎児期における胆管板のリモデリング異常 (ductal plate malformation : DPM) が深く関与していると考えられている¹³⁾。実際に、PCK ラットの胎児肝では胆管板の遺残と拡張が明瞭に観察される⁵⁾。

生後、PCK ラットの肝内胆管は多発性、分節性の嚢状拡張を示し、胆管拡張の程度はラットの週齢とともに進行する (図 1)。同時に CHF に相当する門脈域からの線維化が進行し、その肉眼像と病理組織像はカロリ病+CHF にきわめてよく類似する (図 1)。肝臓は腫大するが肝細胞の変化はほとんどなく、肝腫大は主に胆管拡張と肝線維化とに起因している。

胆管炎と胆管周囲毛細血管

1. 胆管炎

カロリ病は胆管内腔と交通性を有する胆管拡張症であり、胆道感染による化膿性胆管炎をしばしば合併する。病理組織学的に、拡張した胆管内腔に微小膿瘍状の好中球の集簇がみられ、胆管周囲に好中球、リンパ球を主体とする炎症細胞浸潤をみる。ときに、胆管内腔に粘液とともに細菌コロニーが認められる。また、カロリ病ではしばしば肝内結石症を合併する。肝内結石症では胆管壁内外での胆管周囲付属腺の増生を伴う慢性増殖性胆管炎を認めるが、カロリ病でもこの所見をみることがある。

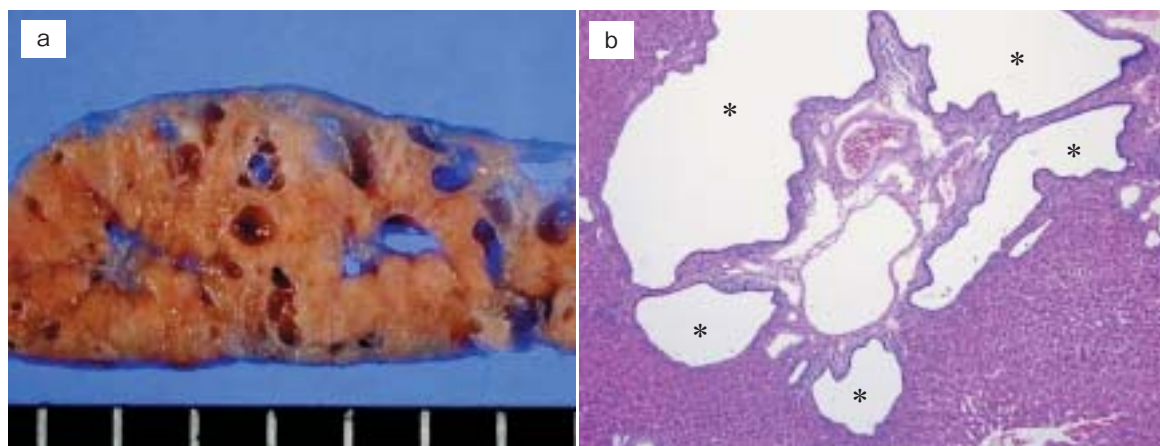


図 1 PCK ラット肝の肉眼像と病理組織像

PCK ラットの肝臓は肉眼像(a), 病理組織像(b)とも肝内胆管の拡張が明らかである。* : 胆管内腔, b : HE 染色

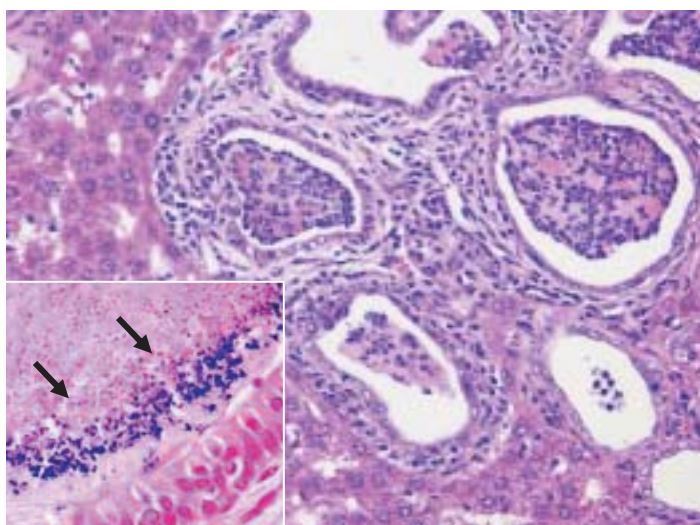


図 2 PCK ラットの化膿性胆管炎

PCK ラットでは胆管内腔に多核白血球の集簇を伴う化膿性胆管炎をしばしば認める。インセットは胆管内腔に認めるグラム陽性菌(矢印)。HE 染色。インセットはグラム染色

PCK ラットの肝内胆管でも慢性胆管炎や化膿性胆管炎を認める(図 2)。週齢の若いラットでは胆管炎は認めないが、6 週齢頃から胆管炎が出現するようになり、12 カ月齢ではほぼすべての個体に胆管炎を認めるようになる¹⁴⁾。

2. 胆管周囲毛細血管

一般に炎症巣では毛細血管の増生反応を伴うことが多いが、胆管炎を伴う PCK ラットの拡張胆管周囲では毛細血管が非常によく発達している。これはカロリ病でも同様である。肝組織標本で血管内皮マーカー(CD31)に対する免疫染色を行うと、正常ラットの小型胆管周囲には肝動脈の分枝である胆管の栄養血管(胆管周囲血管叢)を数個認めるの

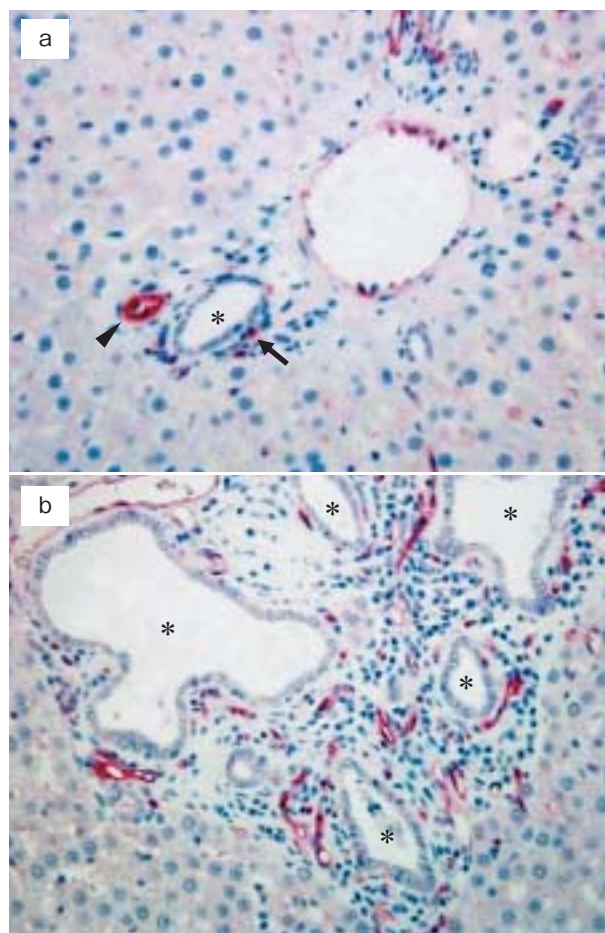


図 3 PCK ラットにおける胆管周囲毛細血管の発達
正常ラット(a)と比較して PCK ラット(b)では胆管周囲における毛細血管の発達が明らかである。
矢印：正常ラットの胆管周囲血管叢, 矢頭：正常ラットの小葉間胆管に伴走する肝動脈, * : 胆管内腔
血管内皮マーカー(抗 CD31 抗体)を用いた免疫染色(ペクターレッドによる発色)

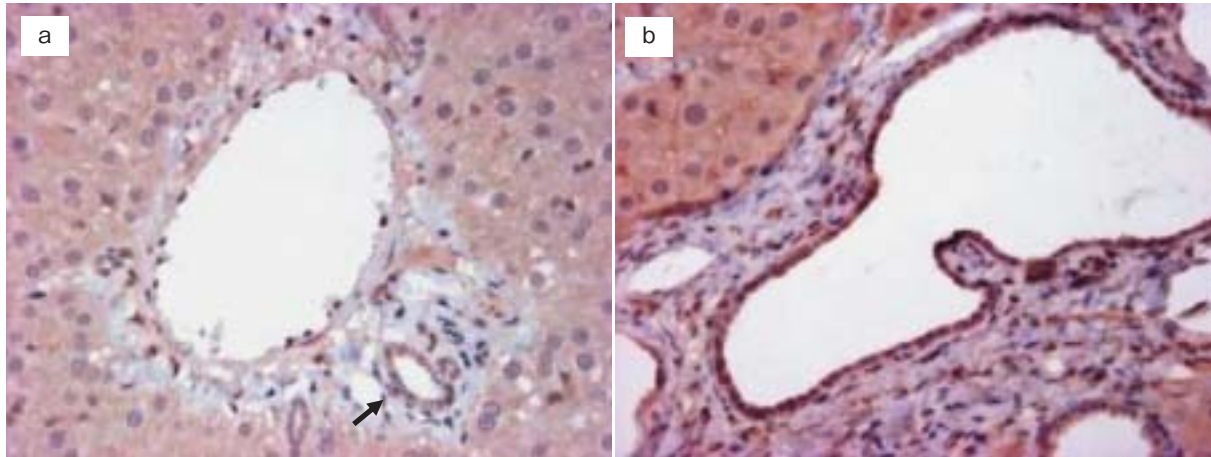


図4 PCK ラット胆管上皮における VEGF の発現亢進

正常ラット(a)と比較して PCK ラット(b)では胆管上皮細胞における VEGF の発現が亢進している。矢印：正常ラットの小葉間胆管。抗 VEGF 抗体を用いた免疫染色(DAB による発色)

みであるが(図 3a, 矢印), PCK ラットの胆管周囲には多くの毛細血管が認められる(図 3b)。この胆管周囲毛細血管は PCK ラットの週齢とともにその数が増加し, かつ胆管炎の程度が強い部位により多く観察される。

3. 血管新生と VEGF

PCK ラットの胆管細胞は血管新生を促進する細胞増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) を過剰に発現している(図 4)。この PCK ラットでの VEGF の過剰発現は胆管周囲毛細血管と同様, 胆管炎の強い部位の胆管上皮でより顕著に認められ, 胆管上皮で産生された VEGF が周囲の血管新生を促進する機序が推測される。胆管細胞における VEGF の過剰発現はカロリー病でも報告されており, さらに, カロリー病の胆管上皮では VEGF レセプター(VEGFR-1, -2)の発現も亢進している¹⁵⁾。また, 常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant PKD: ADPKD)に合併する多嚢胞肝では, 肝嚢胞の内容液に高い濃度の VEGF が含まれることが報告されている¹⁶⁾。

In vitro でも, PCK ラットの培養胆管細胞は正常ラットと比較して VEGF を過剰に発現している。また, 血管新生を促進する basic fibroblast growth factor (bFGF) も PCK ラットの胆管細胞でその発現が亢進している⁶⁾。胆管細胞で産生された VEGF は細胞外へと分泌され, PCK ラット胆管細胞の培養上清は正常ラットより高濃度の VEGF を含んでいる。

胆道感染

1. 起炎菌

胆管炎を起こした PCK ラットでは, 病理組織学的に胆管内腔にグラム陽性菌や陰性菌を認めることがある(図 2, 矢印)。また, PCK ラットの胆汁を解析するとグラム陽性菌(*Corynebacterium*, *Enterococcus faecalis*)やグラム陰性菌(*Pasteurella pneumotropica*)が検出される¹⁴⁾。

2. 胆管上皮細胞と TLR

病原微生物が宿主の体内に侵入した際, Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)がその構成成分を特異的に認識し自然免疫応答を惹起する。細菌感染に関連したものとして, TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁に含まれるリポ蛋白質, TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(lipopolysaccharide: LPS)などをそれぞれ認識する。PCK ラットの胆管上皮細胞は TLR2, TLR4 を発現している。

3. 胆管上皮細胞に対する LPS の作用

LPS や TLR2 リガンド(peptidoglycans, LTA, Pam3Cys)は, PCK ラット胆管細胞に腸上皮化生を反映する蛋白質である MUC2 や CDX2 の発現を誘導する¹⁴⁾。PCK ラットの胆管上皮では胆管炎に伴って腸上皮化生がしばしば出現するが, この結果から腸上皮化生への細菌感染の関与が示唆される。

PCK ラット胆管細胞は VEGF を高発現しているが, LPS を作用させるとさらに VEGF の発現が亢進する。炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α)も LPS により胆管細胞での発現が誘導される。

PCK ラットの培養胆管細胞に LPS を作用させると

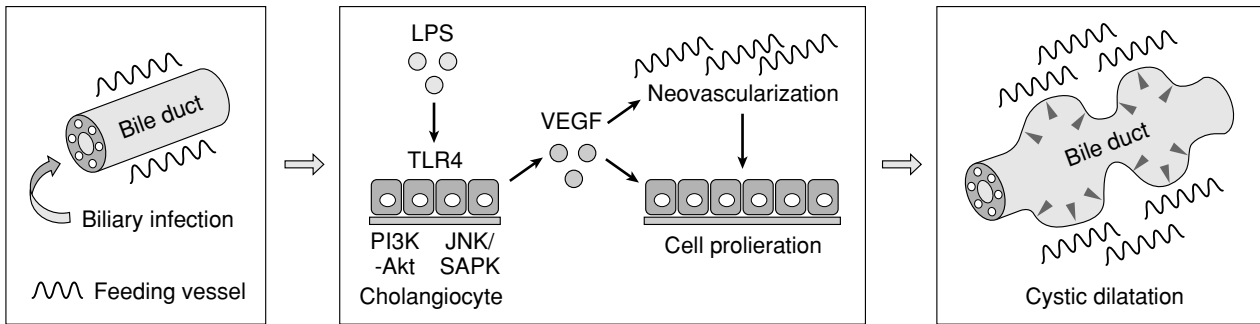


図 5 PCK ラットの肝内胆管拡張における胆道感染の関与

胆道感染に由来する LPS は胆管上皮細胞に発現する Toll 様受容体(TLR4)により認識され、胆管細胞で VEGF の発現が亢進する。分泌された VEGF は胆管細胞に対して細胞増殖を促進する因子として作用する。一方、VEGF は胆管周囲の血管新生を促進し、栄養血管の発達が胆管細胞の増殖をさらに促進させ、胆管拡張が増悪する。この過程には、PI3K-Akt あるいは JNK/SAPK を介した細胞内シグナル伝達系が関与する。

nuclear factor(NF)- κ B の活性化、核内への移行を生ずる。この LPS による NF- κ B の核内への移行は NF- κ B 阻害薬である isohelenin により抑制されるが、isohelenin は PCK ラット胆管細胞における LPS による VEGF の発現誘導を抑制しない。したがって、LPS による VEGF の誘導における NF- κ B の関与は低いと考えられる。

LPS は PCK ラット胆管細胞で Akt と JNK/SAPK のリン酸化を促進する。PI3K 阻害薬(LY294002)と JNK 阻害薬(JNK inhibitor- I, -II)は LPS による VEGF の誘導を有意に抑制することから、PI3K-Akt と JNK/SAPK を介した細胞内シグナル伝達が VEGF の誘導に関与していると思われる。しかし、LPS がこの伝達系を介して直接的に VEGF を誘導しているかどうかは不明確であり、TNF- α の産生などを介して二次的に VEGF を誘導している可能性もある。

PCK ラット胆管細胞は TLR4 とともに VEGF レセプターを発現しているが、LPS と VEGF はいずれも PCK ラット胆管細胞に対して細胞増殖を亢進させる効果をもっている。この細胞増殖促進効果は、VEGF siRNA や VEGFR チロシンキナーゼ阻害薬(SU5614)によって有意に阻害される。LPS 自体が胆管細胞の増殖を直接促進するかどうかは不明であるが、LPS による胆管細胞の増殖促進効果の少なくとも一部は LPS により誘導される VEGF の作用によるものと言える。

4. 胆管上皮細胞と血管内皮細胞

PCK ラット胆管細胞の培養上清は高い濃度の VEGF を含んでいる。この培養上清をラット培養血管内皮細胞に反応させると、正常ラット胆管上皮細胞の培養上清を反応させた場合より血管内皮細胞の細胞増殖は有意に亢進する。さらに、血管内皮細胞の遊走および tube formation assay で

測定した血管内皮細胞の branching も、PCK ラット胆管細胞の培養上清の添加により有意に促進する。これらのことから、PCK ラットの胆管細胞で産生された VEGF は胆管周囲の血管新生に深く関与していると考えられる。

胆道感染と胆管囊状拡張のメカニズム

以上の PCK ラットを用いた検討結果から推測される、胆道感染に関連した肝内胆管の囊状拡張のメカニズムをシエマで示す(図 5)。胆道感染に由来する LPS は胆管細胞に VEGF の産生を誘導し、VEGF が胆管細胞の細胞増殖を促進し胆管の囊状拡張が進行する。さらに VEGF は胆管周囲の血管新生を促進し、栄養血管の増生が胆管細胞の増殖をさらに増悪させる。この過程には胆管細胞に発現する TLR4 を介した LPS の認識と、PI3K-Akt もしくは JNK/SAPK を介した細胞内シグナル伝達系が関与している。このように、胆道感染は PCK ラット、カロリ病の進行性の胆管拡張に対して増悪因子として働いている可能性が高いと考えられる。

おわりに

PCK ラットを用いた研究結果からは、胆道感染の治療や抗 VEGF 療法がカロリ病の胆管拡張の増悪の予防に有効であると思われる。しかし、例えば最近の ADPKD の動物モデルを用いた検討では、抗 VEGF 療法は腎嚢胞をむしろ増悪させることが報告されている¹⁷⁾。多嚢胞性肝疾患や多発性嚢胞腎の病態形成には多くの因子が複雑に関与しており、肝病変と腎病変の形成機序は必ずしも同一ではないと

思われる。また、動物実験から期待される治療効果がヒトでは得られないこともある。胆管拡張と腎嚢胞の両方を抑制・改善する有効な治療法を見出すため、さらに研究を継続していく必要がある。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Nakanuma Y, Terada T, Ohta G, Kurachi M, Matsubara F. Caroli's disease in congenital hepatic fibrosis and infantile polycystic disease. *Liver* 1982 ; 2 : 346-354.
2. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 2002 ; 30 : 259-269.
3. Sanzen T, Harada K, Yasoshima M, Kawamura Y, Ishibashi M, Nakanuma Y. Polycystic kidney rat is a novel animal model of Caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Am J Pathol* 2001 ; 158 : 1605-1612.
4. Nakanuma Y, Harada K, Sato Y, Ikeda H. Recent progress in the etiopathogenesis of pediatric biliary disease, particularly Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis and biliary atresia. *Histol Histopathol* 2010 ; 25 : 223-235.
5. Sato Y, Ren XS, Nakanuma Y. Caroli's disease : Current knowledge of its biliary pathogenesis obtained from an orthologous rat model. *Int J Hepatol* 2012 (in press)
6. Sato Y, Harada K, Kizawa K, Sanzen T, Furubo S, Yasoshima M, Ozaki S, Ishibashi M, Nakanuma Y. Activation of the MEK5/ERK5 cascade is responsible for biliary dysgenesis in a rat model of Caroli's disease. *Am J Pathol* 2005 ; 166 : 49-60.
7. Sato Y, Harada K, Furubo S, Kizawa K, Sanzen T, Yasoshima M, Ozaki S, Isse K, Sasaki M, Nakanuma Y. Inhibition of intrahepatic bile duct dilation of the polycystic kidney rat with a novel tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *Am J Pathol* 2006 ; 169 : 1238-1250.
8. Sato Y, Harada K, Ozaki S, Furubo S, Kizawa K, Sanzen T, Yasoshima M, Ikeda H, Sasaki M, Nakanuma Y. Cholangiocytes with mesenchymal features contribute to progressive hepatic fibrosis of the polycystic kidney rat. *Am J Pathol* 2007 ; 171 : 1859-1871.
9. Yasoshima M, Sato Y, Furubo S, Kizawa K, Sanzen T, Ozaki S, Harada K, Nakanuma Y. Matrix proteins of basement membrane of intrahepatic bile ducts are degraded in congenital hepatic fibrosis and Caroli's disease. *J Pathol* 2009 ; 217 : 442-451.
10. Kaimori JY, Nagasawa Y, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Deng J, Imai E, Onuchic LF, Guay-Woodford LM, Germino GG. Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 : 942-956.
11. Masyuk T, Masyuk A, LaRusso N. Cholangiociliopathies : genetics, molecular mechanisms and potential therapies. *Curr Opin Gastroenterol* 2009 ; 25 : 265-271.
12. Ren XS, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Yoneda N, Lin ZH, Nakanuma Y. Biliary infection may exacerbate biliary cystogenesis through the induction of VEGF in cholangiocytes of the polycystic kidney (PCK) rat. *Am J Pathol* 2011 ; 179 : 2845-2854.
13. Desmet VJ. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts : variations on the theme "ductal plate malformation". *Hepatology* 1992 ; 16 : 1069-1083.
14. Ikeda H, Sasaki M, Ishikawa A, Sato Y, Harada K, Zen Y, Kazumori H, Nakanuma Y. 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.
15. Fabris L, Cadamuro M, Fiorotto R, Roskams T, Spirlì C, Melero S, Sonzogni A, Joplin RE, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Effects of angiogenic factor overexpression by human and rodent cholangiocytes in polycystic liver diseases. *Hepatology* 2006 ; 43 : 1001-1012.
16. Nichols MT, Gidey E, Matzakos T, Dahl R, Stieglmann G, Shah RJ, Grantham JJ, Fitz JG, Doctor RB. Secretion of cytokines and growth factors into autosomal dominant polycystic kidney disease liver cyst fluid. *Hepatology* 2004 ; 40 : 836-846.
17. Raina S, Honer M, Krämer SD, Liu Y, Wang X, Segerer S, Wüthrich RP, Serra AL. Anti-VEGF antibody treatment accelerates polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011 ; 301 : F773-783.