

原発性胆汁性肝硬変肝組織における Fas 発現の免疫組織化学的検討

貴 志 文 俊

キーワード：Fas, apoptosis, liver, primary biliary cirrhosis, immunoelectron microscopy

緒 言

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis; PBC) は中年女性に好発する慢性進行性胆汁うっ滞性肝疾患で、初期肝病変としては門脈域の小葉間胆管に分節状に発生する慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) が特徴的である。胆管障害の機序としては、抗ミトコンドリア抗体 (AMA) をはじめとする種々の自己抗体の出現、シェーグレン症候群のような自己免疫性疾患をしばしば合併することなどより、免疫学的機序が深く関与しているものと考えられている。すでに Gershwin ら¹⁾によって、AMA の主要対応抗原がミトコンドリア内膜に存在する 2 オキソ酸脱水素酵素複合体 (特に PDH-E 2) であることが明らかにされ研究の発展もみられてきているが、組織障害の機序はまだ明らかではない。近年、アポトーシスが免疫性疾患での組織破壊の一つのプロセスとして注目されている。PBC においても、以前より Bernuau ら²⁾が電顕的にアポトーシスを反映する胞体や核の濃縮像を示す胆管上皮細胞を見出し、細胞死の一つとしてアポトーシスがあることを示していたが、近年種々の検出法が開発されたこともあり、障害胆管上皮細胞での DNA 断片化細胞の検出^{3,4)}の報告など胆管細胞障害におけるアポトーシスの関与が注目されている。本研究では、アポトーシス誘導シグナルを直接細胞内へ伝達する分子として同定された Fas⁵⁾の PBC 症例肝組織における発現を免疫組織化学的に検討したので報告する。

対 象 と 方 法

対象は厚生省「難治性の肝炎」調査研究班の診断基準に基づいて診断した原発性胆汁性肝硬変患者10症例である。全例女性 (38-65歳) であり、Scheuer 分類⁶⁾による組織学的病期では、stage I 5例、stage II 4例、stage III 1例である。各症例について血液生化学検査および抗ミトコンドリア抗体を測定した。尚、いずれの患者も免疫抑制剤の投与を受けていない。また、対象としてB型およびC型慢性肝炎 (CH) 14例 (B型C型とも7例、minimal CH 3例、mild CH 7例、moderate CH 4例) の肝組織も用い、比較検討した。

腹腔鏡下肝生検にて得られた肝組織は、2つに分け、一方は10%中性ホルマリン固定後、通常光顕観察用とし、残りの一方は、2% periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定を行い免疫染色用としてO.C.T. compound に凍結包埋、保存した。PLP 固定の組織は、凍結切片作成後、酵素抗体間接法にて染色を行った。Isobe ら⁷⁾の方法もしくはH₂O₂加 methanolにて組織中の内因性ペルオキシダーゼを阻止した。1次抗体としてZB 4 (Fas)⁸⁾、Leu 2a (CD 8)、Leu 3a (CD 4)、Leu 15 (CD 11b)、HLA-DR (HLA-class II)、HLA-ABC (HLA-class I) を使用し反応させた。1次抗体反応後、2次抗体としてHRPO-labeled rabbit anti-mouse IgG (Fab') を反応させた⁹⁾。H₂O₂ 加 diaminobenzidine (DAB) にて反応、メチルグリーンにて核染色を行い脱水後包埋した。電顕用として、光顕と同様に2次抗体との反応後、glutaraldehydeにて後固定を行い、H₂O₂ 加 DAB にて発色した。Osmium 酸と反応後、Epon-araldite 樹脂包埋を行った。観察は、超薄切片を作成し、無染色にて電子顕微鏡 (H-700H) を用いて観察した。

光顕レベルでの胆管上皮細胞ならびに肝細胞における Fas, HLA-DR, HLA-ABC の染色評価は、著者ならび

(平成14年1月17日受理)
指導：辻 孝夫教授 (岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学 内科学第一)
論文請求先：姫路赤十字病院 姫路市下手野 1-12-1
貴志文俊
電話：0792-94-2251 FAX：0792-96-4050

に共同研究者の2名で鏡検し、2+ ; strong, 1+ ; weak, +/- ; very weak or none の3段階で判定した。

結 果

酵素抗体間接法による光顕レベルでの観察では、FasはPBC症例の全例において小葉間胆管胆管上皮細胞ならびに肝細胞に発現が認められた。Fasは細胞膜と細胞質に発現し、細胞膜により強く発現していることが観察された。胆管上皮細胞での発現は慢性肝炎例と比較して、明らかに発現の増強が認められた (Fig. 1-A, B, Table 2)。一方、肝細胞での発現は慢性肝炎例に比して弱い傾

向にあった (Fig. 1-A, B, Table 2)。

Scheuer分類での病期別、あるいは肝生検時のAMA値や肝機能等の生化学検査と胆管上皮細胞におけるFas

Table 2 Expression of Fas in primary biliary cirrhosis

Intensity	Bile duct epithelial cells		Hepatocyte	
	PBC	CH	PBC	CH
2+	6	0	3	9
1+	3	2	4	3
+/-	1	12	3	2

PBC : primary biliary cirrhosis. CH : chronic hepatitis.

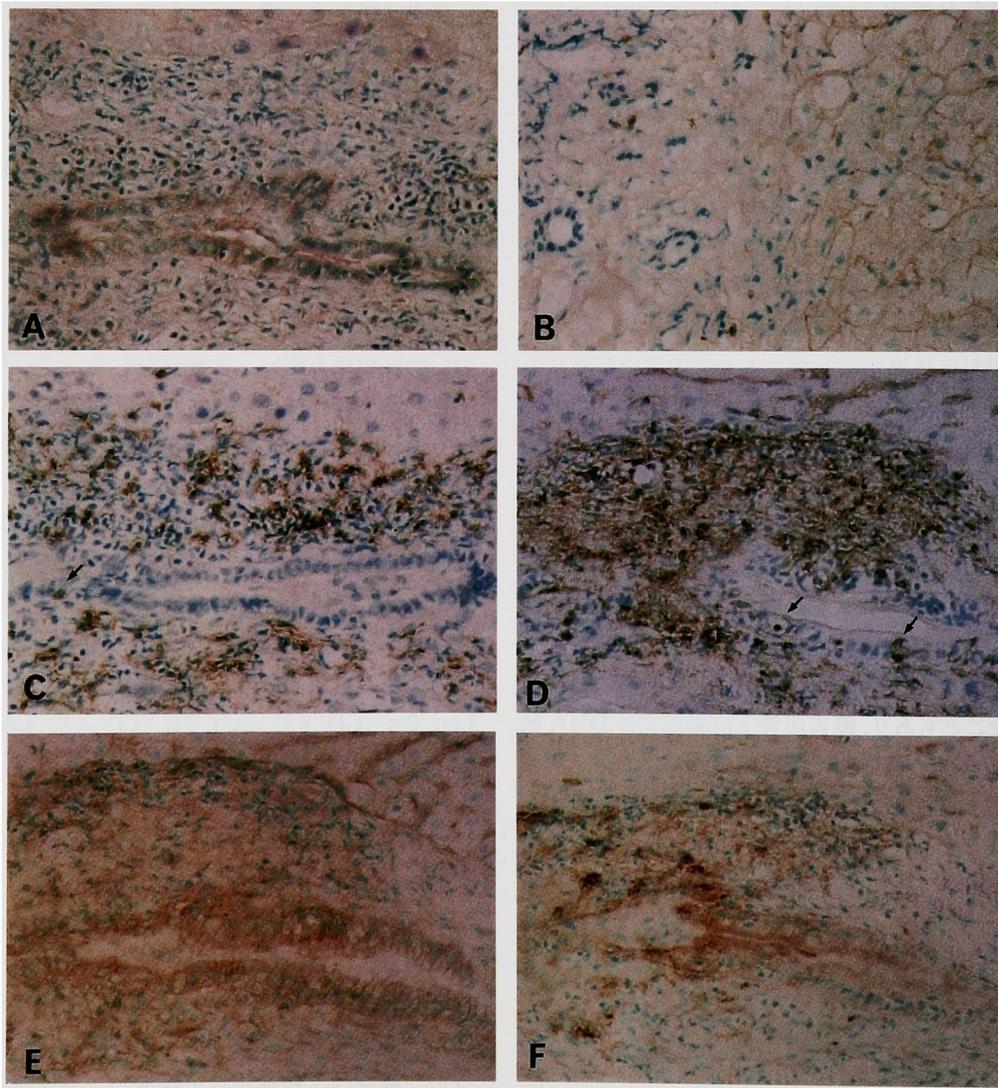


Fig. 1 Immunohistochemical staining of Fas (A), CD 8 (C), CD 4 (D), HLA-ABC (E), and HLA-DR (F) in serial sections of a PBC patient (Case 3 in Table 1). Bile duct epithelial cells show strong expression of Fas, HLA-ABC, and HLA-DR. Both CD 8 and CD 4 T cells accumulate around the bile duct and infiltrate in the intraepithelial space of the bile duct (arrows). In chronic hepatitis B (B), bile duct epithelial cells show weak expression of Fas (+/-).

の発現には特に相関は認められなかった (Table 1)。同一症例組織切片での検討でも観察されたほぼ全ての小葉間胆管に発現は認められ、CNSDC を認める障害胆管と非障害胆管では同様に Fas の発現増強が観察された。

連続切片での検討で、10例中 4 例の胆管上皮細胞内に CD 4 陽性リンパ球の浸潤が観察された。うち 1 例では 1 つの小葉間胆管の胆管上皮細胞内に CD 4 陽性リンパ球の著明な浸潤が観察された (Fig. 1-D)。その様な胆管上皮細胞では HLA-DR の新たな発現 (CH では殆ど発現を認めなかった) が観察され、Fas の発現も 2+ と増強が観察された (Fig. 1-A, F)。また、すべての症例で、胆管上皮細胞における HLA-ABC の発現がみられ (Fig. 1-E)、10例中 3 例の胆管上皮細胞内に CD 8 陽

性 CD 11 b 陰性の細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の浸潤が観察された (Fig. 1-C)。

電顕レベルでの観察では、Fas は胆管上皮細胞膜表面の basal 及び lateral に強く発現が認められ、apical には認められなかった (Fig. 2-A)。また胆管上皮細胞細胞質内小胞体にも Fas の発現が認められた (Fig. 2-B)。なお、観察した範囲ではアポトーシス小体は見出されなかった。

考 察

Fas は、アポトーシスのシグナルを細胞内に伝達する細胞膜蛋白で、TNF/NGF 受容体ファミリーに属する¹⁰⁾。Leithauser ら¹¹⁾は、Fas と同一分子である APO-1 の正

Table 1 Clinical data and immunohistochemical grading of 10 patients with PBC

No.	Age/sex	AMA	T. Bil	γ GTP	IgM	Histological stage	Expression in BECs		
							Fas	HLA-ABC	HLA-DR
1	49/F	40	0.97	145	815	I	+/-	2+	1+
2	65/F	320	0.47	130	501	I	1+	2+	+/-
3	54/F	160	0.49	98	329	I	2+	1+	1+
4	54/F	80	0.83	153	489	I	2+	2+	2+
5	56/F	320	0.86	202	1040	I	2+	1+	2+
6	40/F	320	0.68	237	886	II	1+	2+	2+
7	62/F	80	0.57	62	1041	II	2+	2+	1+
8	60/F	40	0.62	195	309	II	2+	2+	+/-
9	55/F	320	2.17	460	501	II	2+	2+	+/-
10	38/F	80	3.59	299	478	III	1+	2+	2+

AMA : antimitochondrial antibody. BECs : bile duct epithelial cells. Histological staging is according to Scheuer's criteria.

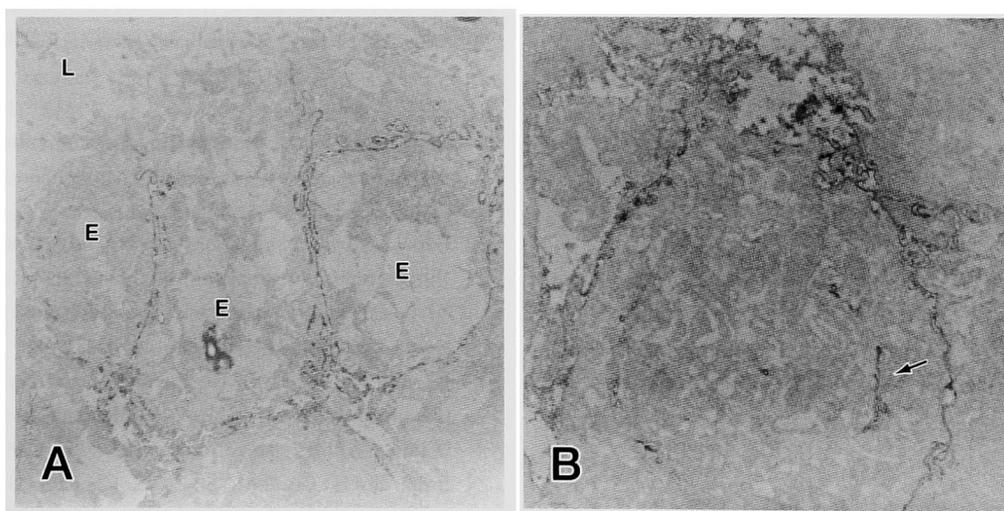


Fig. 2 Immunoelectron micrographs showing Fas expression. (A) Bile duct epithelial cells (E) express Fas at the basolateral membrane. L, lumen of the bile duct. $\times 3,600$. (B) Higher magnification shows Fas expression in the endoplasmic reticulum of a bile duct epithelial cell (arrow). $\times 6,400$.

常人臓器での発現について免疫組織学的に検討しており、肝臓では肝細胞と胆管上皮細胞の膜上の発現を報告している。我々¹²⁾はすでに脂肪肝を含む全ての肝疾患において、肝細胞膜に Fas が発現しており、慢性肝炎では炎症の強い症例に発現の増強が認められることを明らかにしている。PBC については黒木ら¹³⁾が、胆管上皮細胞の細胞質に強く発現し、同一胆管でも個々の細胞にて異なるとの結果を報告している。今回の我々の観察では、Fas は PBC の胆管上皮細胞、肝細胞の細胞膜及び細胞質に発現し、細胞膜により強く Fas の発現が認められたが、同一胆管の個々の細胞では発現の強さについては大きな違いを認めなかった。この理由として、我々は IgG 分画の Fas 抗体 (clone ZB 4[®]) を使用し、黒木らが使用した IgM 分画と異なることが一因かと考えられた。

また本研究では、免疫電顕による超微形態観察でも胆管上皮細胞膜上に Fas の発現を確認した。細胞膜の局在では、basal 及び lateral に強く発現が認められ、apical には認められなかった。さらに細胞質の小胞体にもその局在が確認されたことより、Fas が同部において産生されていることが明らかになった。しかし、電顕による観察では胆管上皮細胞においてアポトーシスに特徴的な形態は観察されなかった。実際、通常電子顕微鏡による PBC の障害胆管上皮細胞の観察では、いくつかの胆管上皮細胞がアポトーシスの形態を示していることが報告されているが、頻度としてはまれであり、それは恐らくできたアポトーシス小体が速やかに胆管内腔に脱落する為と考えられている²¹⁾⁴⁾¹⁵⁾。

肝内の小葉間胆管が主として障害される PBC において、Fas の発現が慢性肝炎に比較して、胆管上皮細胞に強く認められたことは、Fas を介するアポトーシスが PBC での胆管上皮細胞障害に関与している可能性が示唆される。上野ら¹⁶⁾は Graft-versus-host disease における胆管上皮細胞のアポトーシスが Fas を介した経路で生じると報告しているが、免疫学的異常を背景とした PBC の胆管障害でも Fas が関与する可能性を示したものである。また、PBC での Fas ligand の発現については、Ahmed ら¹⁷⁾が、門脈域ならびに小葉内での Fas ligand 陽性単核球の存在を明らかにしており、その内76%の胆管上皮細胞内に Fas ligand 陽性単核球が浸潤していること示している。

一方、胆管周囲及び胆管上皮細胞内には CD 4 あるいは CD 8 陽性リンパ球が多数浸潤している。どちらが優位なのかについては、現時点でも一定の見解はない¹⁸⁾¹⁹⁾が、

Colucci ら²⁰⁾は胆管周囲に CD 4 陽性細胞が多数観察される例を報告して、HLA-class II 拘束性細胞障害の存在を推測している。今回の検討でも CD 4 陽性リンパ球の胆管上皮細胞内への浸潤が目立つ症例を経験し、HLA-class II の PBC 胆管上皮での異常発現も認めた²¹⁾。Th 1 type の CD 4 陽性リンパ球が、Fas-Fas ligand システムを介して直接的に細胞障害に関わることも報告されており²²⁾、CD 4 陽性 CTL が Fas-Fas ligand を介した胆管細胞のアポトーシス誘導 (HLA-class II 拘束性) に関与していることも推測される。

今後、PBC 胆管上皮細胞における Fas 異常発現のトリガーを含めた機序を解明することにより、アポトーシスの PBC における役割を明らかにしていく必要があると思われる。

結 論

Fas は、PBC 全症例の細胆管あるいは小葉間胆管の胆管上皮細胞に発現が認められ、ウイルス性慢性肝炎例と比較して発現の増強が認められた。免疫電子顕微鏡的観察では、Fas は胆管上皮細胞の basal 及び lateral の細胞膜に強く発現が認められ、また細胞質内小胞体にも Fas の発現が認められた。これらの所見より、胆管での Fas 発現の増強が PBC の病態に関連があることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇切な指導とご校閲を賜った岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学 (内科学第一) 辻孝夫教授に深謀の謝意を表すとともに、直接御指導いただきました川崎医科大学附属川崎病院山田剛太郎副院長に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Gershwin ME and Mackay IR: Primary biliary cirrhosis: paradigm or paradox for autoimmunity. *Gastroenterology* (1991) **100**, 822-833.
- 2) Bernuau D, Feldmann G, Degott C and Gisselbrecht C: Ultrastructural lesions of bile ducts in primary biliary cirrhosis. A comparison with the lesions observed in graft versus host disease. *Hum Pathol* (1981) **12**, 782-793.
- 3) Harada K, Ozaki S, Gershwin ME and Nakanuma Y: Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* (1997) **26**, 1399-1405.
- 4) Ballardini G, Guidi M, Susca M, Ghetti S, Grassi A, Lari F, Fusconi M, Zauli D and Bianchi FB: Bile duct cell apoptosis is a rare event in primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis* (2001) **33**, 151-156.

- 5) Yonehara S, Ishii A and Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* (1989) **169**, 1747–1756.
- 6) Scheuer PJ: Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med* (1967) **60**, 1257–1260.
- 7) Isobe Y, Chenm ST and Nakane PK: Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium: Improvement in the peroxidase labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem Cytochem* (1977) **10**, 161–171.
- 8) Yonehara S, Nishimura Y, Kishil S, Yonehara M, Takazawa K, Tamatani T and Ishii A: Involvement of apoptosis antigen Fas in clonal deletion of human thymocytes. *Int Immunol* (1994) **6**, 1849–1856.
- 9) Nakane PK and Kawaoi A: Peroxidase-labeled antibody: A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* (1974) **22**, 1084–1091.
- 10) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y and Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* (1991) **66**, 233–243.
- 11) Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH and Moller P: Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* (1993) **69**, 415–429.
- 12) Takatani M, Yamada G, Tsugeno H, Kishi F, Doi T, Yonehara S and Tsuji T: Immunohistochemical observation of Fas in the human liver: light and electron microscopic observation by immuno-peroxidase method. *Int Hepatol Commun* (1996) **4**, 334–342.
- 13) Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani K, Hisa T, Kitada T and Sakaguchi T: Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic non-suppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch* (1996) **429**, 119–29.
- 14) Nakanuma Y, Ohta G, Kono N, Kobayashi K and Kato Y: Electron microscopic observation of destruction of biliary epithelium in primary biliary cirrhosis. *Liver* (1983) **3**, 238–248.
- 15) Bianchi L: Necroinflammatory liver disease. *Semin Liver Dis* (1986) **6**, 185–198.
- 16) Ueno Y, Ishii M, Yahagi K, Mano Y, Kisara N, Nakamura N, Shimosegawa T, Toyota T and Nagata S: Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease. *Hepatology* (2000) **31**, 966–974.
- 17) Ahmed AF, ohtani H, Nio M, Funaki N, Shimaoka S, Nagura H and Ohi R: CD 8 + T cells infiltrating into bile ducts in biliary atresia do not appear to function as cytotoxic T cells: a clinicopathological analysis. *J Pathology* (2001) **193**, 383–389.
- 18) Yamada G, Hyodo I, Tobe K, Mizuno M, Nishihara T, Kobayashi T and Nagashima H: Ultrastructural immunocytochemical analysis of lymphocytes infiltrating bile duct epithelia in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* (1986) **6**, 385–391.
- 19) Hashimoto E, Lindor KD, Homburger HA, Dickson ER, Czaja AJ, Wiesner RH and Ludwig J: immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clin Proc* (1993) **68**, 1049–1055.
- 20) Colucci G, Schaffner F and Paronetto F: In situ characterization of the cell-surface antigens of the mononuclear cell infiltrate and bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol Immunopathol* (1986) **41**, 35–42.
- 21) Nishimoto H, Yamada G, Mizuno M and Tsuji T: Immunoelectron microscopic localization of MHC class 1 and 2 antigens on bile duct epithelial cells in patients with primary biliary cirrhosis. *Acta Med Okayama* (1994) **48**, 317–322.
- 22) Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* (1997) **88**, 355–365.

Immunohistochemical Study of Fas in Primary Biliary Cirrhosis

Fumitoshi KISHI

Department of Medicine and Medical Science, Okayama University

Graduate School of Medicine and Dentistry

Okayama 700-8558, Japan

(Director : Prof. T. Tsuji)

The expression of Fas on the epithelial cells of bile ducts was examined in liver specimens from 10 patients with primary biliary cirrhosis (PBC), and 14 patients with chronic hepatitis by both light and electron microscopy using the indirect peroxidase-labeled antibody method. In all patients with PBC, Fas was observed on the surface of epithelial cells of interlobular bile ducts.

By electron microscopy, electron-dense reaction products of Fas were detected on the basolateral plasma membrane of the bile duct epithelial cells, as well as on some membranes of the endoplasmic reticulum. Fas was expressed more strongly on the surface of the epithelial cells of interlobular bile ducts in PBC than of those in chronic hepatitis. These findings suggest that increased expression of Fas on such bile ducts may play some role in the pathogenesis of PBC.