

氏 名 (本籍)	ま 眞	の 野	ゆたか 浩
学 位 の 種 類	博	士	(医 学)
学 位 記 番 号	医	第	3 1 7 1 号
学位授与年月日	平 成	11 年	9 月 8 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
最 終 学 歴	昭 和 63 年 3 月 31 日 東北大学医学部医学科卒業		
学位論文題目	Tumor necrosis factor α のラット肝内胆管上皮 細胞に対する影響		

(主 査)

論文審査委員	教授 豊 田 隆 謙	教授 大 井 龍 司
	教授 里 見 進	

論文内容要旨

【背景】

原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎患者の末梢血単核球では tumor necrosis factor α (TNF α) 産生が亢進している。TNF α は主にマクロファージにより産生される炎症性サイトカインで、様々な生理作用が知られている。一方、ラット実験胆管炎やヒトの慢性胆管炎では炎症の場である胆管周囲にマクロファージの浸潤が認められる。さらに胆管上皮細胞の細胞膜上には TNF α レセプターが発現している。しかし、現在まで胆管上皮細胞におよぼす TNF α の影響は知られていない。

【目的】

我々はラット肝より分離した初代培養の肝内胆管細胞を用いて肝内胆管モデルを報告した。そこで TNF α が胆管細胞に対しいかなる直接的影響を与えるかを in vitro の系で検討した。

【方法】

肝内胆管細胞の培養：雄性 Wistar ラット肝をコラゲナーゼで消化し portal tract residue とし、これをコラーゲンゲル中で7日間培養する。これをさらにコラゲナーゼ・ディスペーゼで消化、単離された細胞をコラーゲンゲル上で単層培養することにより肝内胆管細胞を得た。これらの細胞は γ GTP 陽性、サイトケラチン 19 陽性であった。細胞を透過性のある膜上で単層培養し、経上皮細胞間電気抵抗 (TER) 値がプラトーに達したものを以下の実験に用いた。

TNF α の影響：TNF α はヒトリコンビナント TNF α を用いた。まず細胞間接合部 (tight junction と adherens junction) への影響をみるため、TNF α 添加時の TER の変化を観察した。ここでは基底膜側に TNF α を 10, 50, 200U/mL の濃度となるよう添加し、経時的に TER を測定した。TER の最大変化がみられた時に horseradish peroxidase (HRP) を培地中に添加し、細胞間接合部の透過性を検討した。次に基底膜と同成分とされる Matrigel 上で胆管細胞を培養し、細胞接着に対する TNF α の影響を検討した。さらに剥離した細胞の viability を測定し細胞傷害性についても検討した。

【結果】

10~200U/mL の TNF α は一過性に TER を低下させた。TER は添加 120 分後に最も低下し、180 分後にはほぼ前値に回復した。この低下は濃度依存性を示した。200U/mL の時 TER は添加

120分後にTNF α 添加前値の約50%までに低下した。この時の細胞を電子顕微鏡で観察するとtight junctionを含め、細胞の形態は保たれていたが、HRPがtight junctionを透過しているのが観察された。TER低下は抗TNF α 中和抗体の同時添加により阻止された。アクチン線維はadherens junctionを構成する細胞内タンパクであり、細胞間接合部の透過性をコントロールしている。そこでアクチン線維の脱重合阻止作用のあるファラシジンで前処理し、同様の検討をしたがTERの低下は影響を受けなかった。一方、TNF α (200U/mL)を培地に添加120分後の接着細胞数はコントロールと差がなかった。また、剥離細胞のトリパンブルー排除能からみた細胞生存率にも有意差はなく、培地中LDH値も共に測定感度以下であった。

【考 察】

本研究よりTNF α による胆管上皮細胞の一過性のTER低下は細胞変性やadherens junctionの変化によるものではなく、tight junctionの機能的な変化による透過性亢進を反映したものと考えられた。胆管細胞は隣接する胆管細胞とtight junctionを形成して胆管となり、組織傷害性のある胆汁から肝組織を隔離するバリアーとなっている。そのtight junctionの透過性が一過性にせよ亢進するということは、胆汁中物質が肝組織に浸透することを意味し、局所的に胆汁による炎症を引き起こす可能性を示唆する。

【結 論】

TNF α は10~200U/mLの濃度ではラット胆管上皮細胞に対し、細胞傷害性や基底膜からの剥離作用は示さないが、細胞間のtight junctionの透過性を一過性に亢進させる可能性がある。

審査結果の要旨

胆汁は潜在的に組織傷害性を持つと考えられるが、肝内胆管は常時、高濃度の胆汁に接し、これを肝組織より隔絶するバリアーとして重要な働きをしている。慢性胆汁うっ滞性疾患である原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎では、肝内胆管周囲の炎症と胆管細胞の変性や脱落、胆管消失といった特徴的病理所見がみられ、肝不全に至ることがある。しかし、肝内胆管細胞は肝臓に約3%しか存在していないため単離が困難とされ、その重要性にも関わらず解明が進んでいなかった。

一方、tumor necrosis factor α (TNF α) はマクロファージなどによって産生される代表的な炎症性サイトカインである。マクロファージは原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎などで肝内胆管周囲への浸潤がみられ、さらにこれらの患者の末梢血単核球では TNF α 産生の亢進が報告されている。また肝内胆管細胞の細胞膜上には TNF α レセプターが発現していることが報告されている。以上のことから TNF α がこれらの疾患の病態に関与していると考えられていたが、直接的に胆管に対しどのような影響を及ぼしているかは不明であった。

本研究は、ラット肝臓より単離した肝内胆管細胞を用いて in vitro の胆管モデルを作製し、TNF α がどのような影響を及ぼすかを検討したものである。特に、胆管のバリアー機能を検討した報告は従来なかったものである。その結果、TNF α は10~200U/ml の範囲では、直接的な細胞傷害性や基底膜からの剥離作用は示さないが、胆管細胞同士の接合部、すなわち tight junction の透過性を一過性かつ、濃度依存的に亢進させる可能性を見出した。これは胆管のバリアー機能の可逆的な障害を意味し、胆汁中物質が胆管周囲へ漏出する可能性を示唆したものである。

本研究は胆管炎時における胆汁中物質の肝内胆管周囲での局所的炎症惹起の可能性を示している。この知見は胆管炎一般の病態理解のみならず、原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎など原因不明の慢性胆管炎の病態や病因を考える上で極めて示唆に富むものであり、学位論文に十分に値する。