

### 第三部 肝内結石症の発生、進展にかかわる分泌型低分子ホスホリパーゼA<sub>2</sub>とムチン遺伝子の発現

#### 研究目的

肝内結石症は良性疾患でありながら、遺残結石や結石再発のため難治性となりやすく、その治療ならびに再発防止のためには結石の成因解明が待たれる状況である。肝内結石症の成因においては、従来より胆汁うっ滞と細菌感染が結石形成の重要な因子であるとされてきたが（文献1）、最近ではその他の因子であるコレステロール過飽和胆汁生成をきたす肝コレステロール・胆汁酸の代謝異常（文献2）や胆管炎（文献3）ならびにそれに関連した胆管上皮からのムチン過分泌（文献4）の病態も結石形成、増大に重要であることが明らかとなりつつある。分泌型低分子ホスホリパーゼA<sub>2</sub>（以下PLA<sub>2</sub>）は局所における炎症の進展に関与することが知られており、我々は分泌型低分子PLA<sub>2</sub>のうちIIA型PLA<sub>2</sub>が、胆嚢多発コレステロール結石における胆嚢炎を増悪し、さらに胆汁組成の変化を引き起こす重要な病態因子の一つであることを見出し報告した（文献5）。一方、ムチンは主として上皮組織より発現する巨大分子の糖蛋白質であり、そのムチン分子はコアペプチドおよび糖鎖より構成される。ムチンは、正常および癌組織において発現していることが知られているが、慢性炎症あるいは癌化により、すなわち細胞のトランスフォーメーションによりムチン分子の発現がさまざまなレベルで正常組織と比較して変化することが明らかになりつつある（文献6）。肝内結石症における胆汁中ムチンでは硫酸ムチンの発現が、結石形成に深く関与することが報告されてる（文献7）。最近の分子生物学の進歩により、ムチン分子のコア蛋白発現に関与するMUC1よりMUC8までの9種類の遺伝子がクローニングされているものの（文献6）、肝内結石症において胆管より分泌される硫酸ムチンの発現にかかわるムチンコア蛋白遺伝子は未だ同定されていない。そこで今回は肝内結石症の成因解明のため、本症の胆管における分泌型低分子PLA<sub>2</sub>およびムチンコア蛋白遺伝子の発現の解析を行った。またその結果を本症における胆汁組成の異常と対比することにより、これら遺伝子の発現ならびにその変動の意義を検討した。

#### 対象および方法

肝内結石21例（ビリルビンカルシウム石20例、コレステロール石1例）、総胆管結石17例、胆嚢結石24例を対象とし、手術時に得られた胆管胆汁および胆管組織について解析した。

分泌型低分子PLA<sub>2</sub>であるIIA型PLA<sub>2</sub>について、胆汁中IIA型PLA<sub>2</sub>濃度は抗ヒト脾臓IIA型PLA<sub>2</sub>モノクローナル抗体を用いたRIA法（文献5, 8）にて測定し、また胆管組織におけるIIA型PLA<sub>2</sub>mRNAの発現は既報<sup>5</sup>にもとずきRT-PCR法にて解析した。

ムチンコア蛋白遺伝子（MUC）（文献9-15）のmRNAの発現はRT-PCRあるいはノーザンブロット法にて解析した。

胆汁組成として、胆汁中総ムチン濃度は蛍光標識法（文献16）にて、また胆汁中リゾホスファチジルコリン濃度は高速液体クロマトグラフィー質量分析計にて測定した（文献5）。また胆汁中ならびに胆管組織における硫酸ムチンの発現はヒト大腸の硫酸ムチンを認識するモノクローナル抗体（91.9H）（文献17）を用いて解析した。

## 成績

### 胆汁中 I I A 型 P L A<sub>2</sub> 濃度および胆汁組成の変化

肝内結石症ならびに総胆管結石症における胆管胆汁中 I I A 型 P L A<sub>2</sub> 濃度は、結石を認めない胆嚢結石症における胆管胆汁に比して有意に高値であった。また肝内結石症においては、肝胆汁であってもまた総胆管胆汁であっても、結石側における胆汁中 I I A 型 P L A<sub>2</sub> 濃度は非結石側に比して有意に高値であった。

胆管における I I A 型 P L A<sub>2</sub> の m R N A 発現量を R T - P C R 法にて解析したところ、その発現量は図 4 に示すように肝内結石症の結石存在部位の胆管では対照あるいは結石非存在部位の胆管に比して著しく増加していた。また興味あることは、肝内ビリルビンカルシウム石に比して肝内コレステロール石では胆管における I I A 型 P L A<sub>2</sub> の m R N A 発現量は対照と同程度であった。

I I A 型 P L A<sub>2</sub> の胆汁組成に与える影響を検討する目的で、胆汁中総ムチン濃度ならびにリゾホスファチジルコリン濃度を測定したところ、総ムチン濃度およびリゾホスファチジルコリン濃度ともに肝内結石症の結石側胆管胆汁においては対照あるいは非結石側胆汁に比して有意に高値であった。

### 胆汁および胆管における硫酸ムチンの発現

肝内結石症の胆管組織および胆汁には、9 L、9 H により認識される高分子の硫酸ムチンの発現が亢進していた。

### 胆管におけるムチンコア蛋白遺伝子の発現

肝内結石症の結石存在部位の胆管におけるムチンコア蛋白遺伝子 (MUC 1, MUC 2, MUC 3, MUC 5 A C, MUC 5 B, MUC 6) の 6 種類についてそれらの m R N A 発現量について解析した。その結果、肝内結石症の胆管では MUC 5 B および MUC 6 の発現量が対照あるいは閉塞性黄疸の胆管に比して増加していた。

## 考察

慢性増殖性胆管炎は原発性肝内結石症では病理学的に必発の所見であり (文献 3)、同部位においては胆管内外で付属腺、特に粘液腺が著しく増生し、シアロムチンあるいは硫酸ムチンの酸性ムチンが大量に染色される (文献 4)。このことよりこれら胆管炎ならびにそれに関連した胆道上皮からのムチン過分泌は、肝内結石症の成因に重要な役割を演じていると考えられる。本症の成因解明のためには、胆管炎ならびにムチン過分泌に関する病態因子の解析が必須であると考えられる。

今回の解析結果より、肝内結石症の胆管胆汁ではアラキドン酸代謝の活性化により炎症の進展に重要な役割を演じていると考えられている分泌型低分子 I I A 型 P L A<sub>2</sub> 濃度が増加しており、結石存在部位の胆管 (慢性増殖性胆管炎) では I I A 型 P L A<sub>2</sub> m R N A の発現量が著しく増加していた。それに伴い総ムチン濃度ならびに胆汁中リゾホスファチジルコリンも増加していた。また胆汁中ムチンでは硫酸ムチンが特に増加していた。同部位の胆管におけるムチンコア蛋白遺伝子では、MUC 1, MUC 2, MUC 3, MUC 5 A C, MUC 5 B, MUC 6 のすべての発現が増加していたが、特に MUC 5 B および MUC 6 の増加が顕著であった。

胆汁うっ滞、細菌感染、異常肝胆汁の生成（コレステロール過飽和胆汁）などの病態において、胆管上皮にて誘導発現されたI I A型PLA<sub>2</sub>を始めとする分泌型低分子PLA<sub>2</sub>は胆汁中に分泌され、胆汁中リン脂質を加水分解し、アラキドン酸およびリゾホスファチジルコリンを産生します。遊離したアラキドン酸は胆嚢上皮に吸収され、プロスタグランジン合成のための基質となる。このようにして産生されたプロスタグランジンおよび胆汁中リゾホスファチジルコリンは胆嚢上皮の炎症機転に関与し、その結果、血中あるいは胆管由来の蛋白の胆汁中への流入、ムチン産生の増加の病態を引き起こすと推測された。これらの長期間にわたる慢性炎症の変化は胆管上皮の細胞トランスフォーメーションを促進し、硫酸ムチンの発現増加をきたすムチンコア蛋白遺伝子の発現異常を生じさせている可能性が推測された。

## 文献

1. Maki T. Pathogenesis of calcium bilirubinate stone: role of E. coli,  $\beta$ -glucuronidase and coagulation by inorganic ions, polyelectrolytes and agitation. *Ann Surg* 1966;164:90-100.
2. Shoda J, He B-F, Tanaka N, Matsuzaki Y, Yamamori S, Osuga T. Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patients with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995;108:1534-1546.
3. Nakanuma Y, Terada T, Nagakawa T, et al. Pathologic features of hepatolithiasis in Japan. *Human Pathol* 1988;9:1181-1186.
4. Terada T, Nakanuma Y. Morphological examination of intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis. *Virchow Archiv A* 1988;414:167-176.
5. Shoda J, Ueda T, Ikegami T, et al. Increased biliary group II phospholipase A<sub>2</sub> and altered gallbladder bile in patients with multiple cholesterol stones. *Gastroenterology* 1997;112:2036-2047.
6. Kim YS, Gun JR Jr. Diversity of mucin genes, structure, function, and expression. *Gastroenterology* 1995;109:999-1013.
7. Nagashima H, Masubuchi M, Yoshizawa Z. Sulfated glycoproteins capable of coagulating calcium carbonate isolated from pathological human bile. *J Biochem* 1974;75:779-786.
8. Ueda A, Misaki A, Yamauchi A, et al. Immunoradiometric assay for group II phospholipase A<sub>2</sub>. *Jpn J Clin Chem* 1993;22:180-184.
9. Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T, et al. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987;84:6060-6064.

10. Lan MS, Batra SK, Qi W, et al. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* 1990;265:15294-15299.
11. Gum JR, Hicks JW, Toribara NW, et al. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. *J Biol Chem* 1994;269:2440-2446.
12. Duperat VG, Audie JP, Debailleul V, et al. Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cystein-rich domain for 11p15 mucin genes? *Biochem J* 1995;305:211-219.
13. Desseyn JL, Guyonnet-Duperat V, Porchet N, et al. Human mucin gene MUC5B, the 10.7-kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. *J Biol Chem* 1997;272:3168-3178.
14. Toribara NW, Robertson AM, Ho SB, et al. Human gastric mucin. *J Biol Chem* 1993;268:5879-58855.
15. Gum JR, Hicks JM, Swallow DM, et al. Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:407-415.
16. Miquel JF, Gröen AK, van Wijland MJA, et al. Quantitation of mucin in human gallbladder bile: a fast, specific and reproducible method. *J Lipid Res* 1995;36:2450-2458.
17. Irimura T, Wynn DM, Harger LG, et al. Human colonic sulfomucin identified by a specific monoclonal antibody. *Cancer Res* 1991;51:5728-5735.