

## inflammatory cell infiltration

	IL-12 (-)	IL-12 (+)
<b>hepatocyte</b>		
fusion(-)	—	—
fusion(+)	—～+	—～+
<b>hepatoma cell</b>		
<b>hepa1-6 (well differentiated)</b>		
fusion(-)	±	+
fusion(+)	±～+	+++
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
<b>BNL (poorly differentiated)</b>		
fusion(+)	—	—

### AIH type2 患者のCYP2D6遺伝子型の解析

大阪市立大学・第三内科 黒木 哲夫

協同研究者：西口修平, 田中基晴

武田 正, 塩見 進

大阪市立大学・老年医学研究部門生態化学分野

小島典子, 今岡 進

船江良彦

大阪大学大学院・薬学研究科臨床薬効解析学分野

西田裕子, 福田剛史

東 純一

#### はじめに

Bufuralol, DebrisoquineはCYP2D6にて代謝される薬物である。LKM1抗体はCYP2D6に対する抗体であるため、LKM1抗体を持つ血清は肝ミクロゾームにおけるこれら薬物代謝を阻害することが予測される。ラット肝ミクロゾームを抗原としたELISA法にてLKM1抗体が陽性となった症例について、患者血清によるBufuralol, Debrisoquineの代謝活性への影響を検討した。またCYP2D6には多数の遺伝子変異が報告されており、これが薬物の代謝に強く影響を及ぼすことが報告されている<sup>1, 2)</sup>。上記にて代謝活性阻害を認めた症例はCYP2D6に

より代謝される薬物で薬剤性の肝障害を発症している。以上より本例はCYP2D6の遺伝子変異の存在が疑われ、遺伝子の検索を行った。

#### 対 象

国際自己免疫性肝炎スコア10点以上のprobable AIH 29例とHCV-RNA陽性C型慢性肝炎200例を対象とした。

#### 方 法

bufuralolを用いた代謝活性阻害についてヒト、ラット肝ミクロゾーム各0.2mgに患者血清を0.5および10 $\mu$ l加え室温で15分反応させた。buffer (0.1Mリン酸緩衝液, pH7.5), 5mM bufuralol 10 $\mu$ lを加え計500 $\mu$ lとして、NADPHを加えて反応を開始させた。37℃で10分間反応させ60%HClO<sub>4</sub>を加えて反応を停止させた。12000rpm 10分の遠心分離の後、上清を高速液体クロマトグラフィにかけた。<sup>3)</sup>

CYP2D6の遺伝子型の検索について 1) 常法により、ゲノムDNAを末梢血リンパ球より調製した。2) 2D6に特異的なプライマーを用いてlong PCR法 (Fig.2, 3)<sup>4)</sup>にて、2D6遺伝子を増幅させた。3) 既知の遺伝子変異に対して設定したプライマーを用いたPCR法<sup>5)</sup>にて、既知の遺伝子変異の有無を検討した。

4) 2)にて得られた2D6をpBluescriptに挿入し、ク

ローン化を行った。5) 4) の産物を用いて各エクソン、エクソン/イントロン結合部の塩基配列をsequence法にて解析した。

## 結 果

bufuralolを用いた代謝活性阻害をみると、AIHのLKM1抗体陽性者患者では血清5  $\mu$ lを加えた段階で代謝活性が対照群の6.7%まで著明に阻害されており、10  $\mu$ l加えてもほぼ横這いであった。一方、LKM1抗体陽性C型慢性肝炎患者においては、5  $\mu$ lで129.2%、10  $\mu$ lで134.2%と代謝活性阻害は全く認められなかった。別のC型慢性肝炎患者でも、121.0%、138.6%と同様な結果が得られた。DebrisoquineにおいてもAIHのLKM1抗体陽性者患者一名のみに抗CYP2D血清と同程度の強い活性阻害を認めた。以上の結果より、代謝活性阻害が明らかであったAIHの一例をAIH type2確信例とした。(Fig.1)

AIH type2確信例のCYP2D6の遺伝子型はdeletion typeのヘテロであることが、long PCR法 (Fig.1, 2) にて判明した。しかし残存対立遺伝子についてはPCR based genotypingでは既知の変異を認めなかった。残存対立遺伝子について、各1~9のexonを増幅させるprimerを用いてsequenseを行ったところ、報告されている配列に比べ<sup>5)</sup> 検索範囲内では、exon4にアミノ酸置換を伴うpoint mutationを見出した。具体的には3625のGからCへのmutationであり、グルタミンからグルタミン酸への置換を認めた。(Fig.4)

## 考 察

CYP2D6の遺伝子多型については、この分子種が臨床的に重要な様々な薬物の代謝に関与していることから盛んに研究が進められている。poor metabolizerでは常用量の薬物を投与しても血中濃度の高値が持続するため副作用をもたらすことがわかっている。これらのpoor metabolizerが欧米では7~8%であるのに対して日本人では0.8%にすぎない。さらに白人ではpoor metabolizerのほとんどが既知の遺伝子型で証明されるが、日本人においては未だわかっていない遺伝子型が想定されている。これらの事実は、白人と比べ、日本人には2型の自己免疫性肝炎患者が少ないことと符号し、興味深い。LKM1抗体の出現と遺伝子変異は無関係であるという報告もあるが<sup>6)</sup>、本例も欧米でよくみられる遺伝子変異型は有していなかった。それゆえに、本例で施行したように全塩基配列の決定が必要である。tielinic acidは薬剤性肝障害を契機にLKM2抗体を産生すると考えられているが本例でも同様の機序で、薬剤性の肝障害を起こし、これが契機となってLKM1抗体が生じたと想定される。しかし現時点ではLKM1抗体と自己免疫発症の関係については不

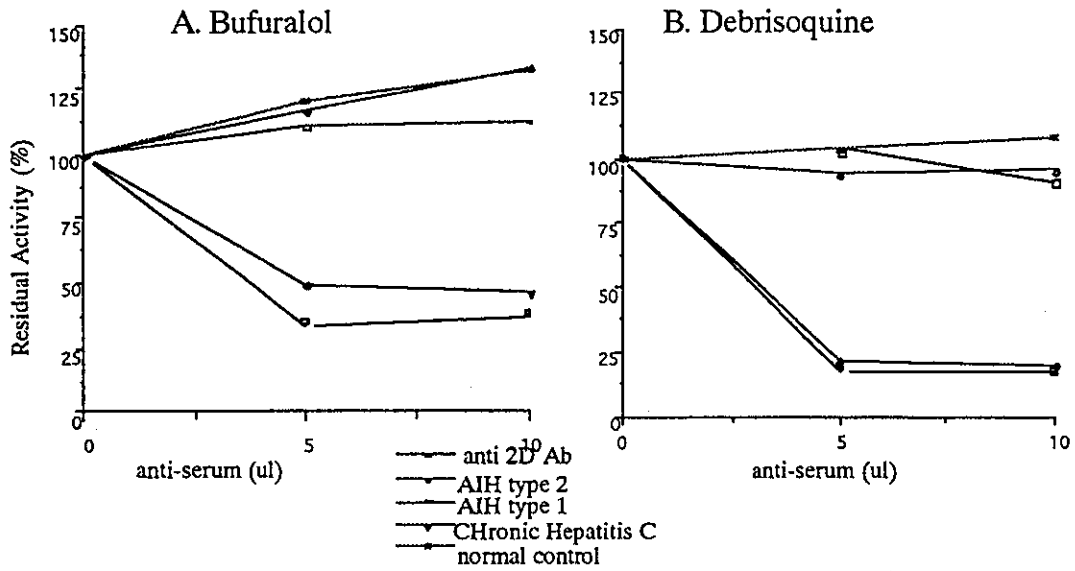
明である。両者の関連性をさらに検討するために、本例におけるCYP2D6の遺伝子型を解析した。

結果に示したように、long PCR法にて一方の遺伝子はCYP2D6遺伝子が完全に欠損しているタイプ、CYP2D6\*5 (D) であることが判明した。このtypeはホモでは酵素活性がなくなるが、wild typeとのヘテロでは酵素活性は保たれることが分かっている。そのため、残存対立遺伝子を検索したところ、今回検索し得た範囲内では(exon1, 7を除くexon2~6, 8, 9) exon4にpoint mutationを認めた。グルタミンからグルタミン酸への置換を認めたが、その意義については不明である。検索できなかった範囲についてはsequenceで再度検討を行うとともに、このpoint mutationが活性に影響を及ぼすか否かを調べていくこと、さらにはCYP2D6 geneの遺伝子変異がLKM1抗体産生やそれに引き続くAIH type2発症に関連しているかを見ていくことが今後の課題である。

## 参 考 文 献

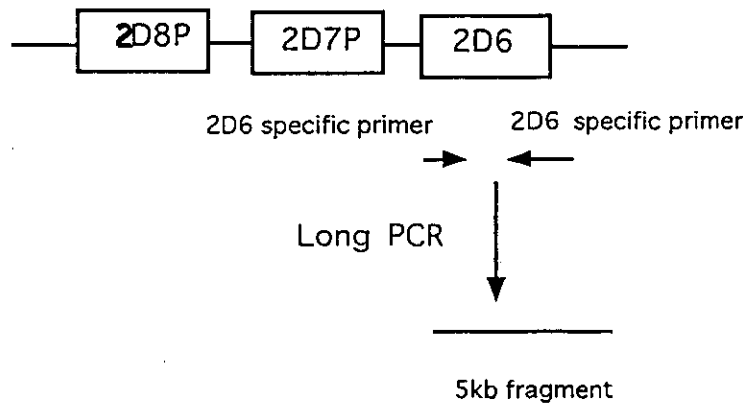
- 1) Daly AK: Nomenclature of human CYP2D6 alleles. Pharmacogenetics 1996; 6:193-201.
- 2) 横井 毅: 薬物代謝酵素の遺伝的多型; CYP2D6とCYP2A6の新規遺伝子変異の日本人における解析を中心として. 日薬理誌 1998; 112:5-14.
- 3) Vidar M. Steen: Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6 (D) gene deletion allele by long-PCR technology. Pharmacogenetics 1995; 5:215-223.
- 4) Inger Johansson: PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. Pharmacogenetic. 1996; 6:351-355.
- 5) Kimura S: The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus; sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and pseudogene. Am J Hum Genet 1989; 45:889-904.
- 6) Michael P. Manns Cytochromes P450 and Uridine Triphosphate-Glucuronosyltransferases; Model Autoantigens to Study Drug-Induced, Virus-Induced, and Autoimmune Liver Disease. HEPATOLOGY 1997; 26; 4: 1054-1066.

Fig.1 代謝活性阻害



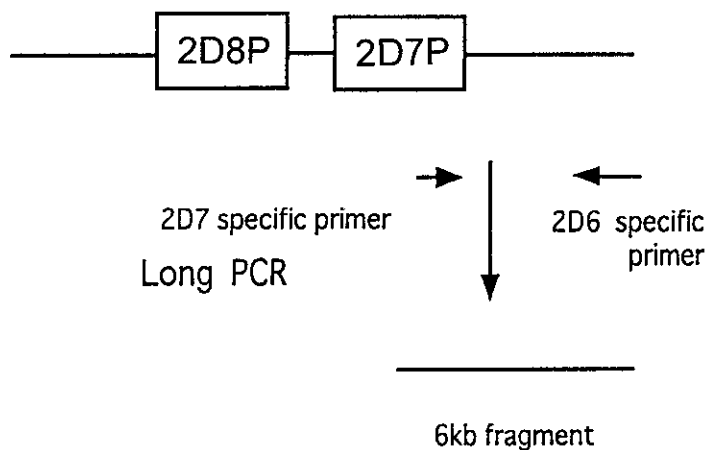
CYP2D6が司るbufuralol, debrisoquine代謝に対するLKM1抗体陽性血の影響を検討した。AIHのうちの一例のみが、代謝活性阻害を示し、本例をAIH type 2と診断した。

Fig.2 CYP2D6 geneの検出



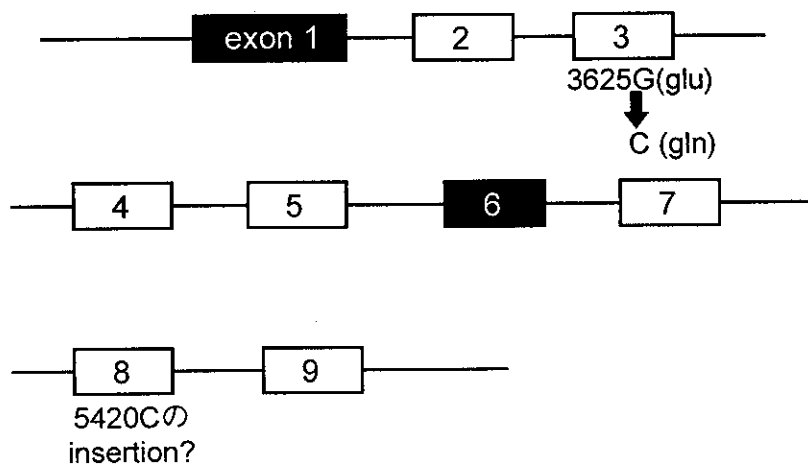
CYP2D6 geneが存在する場合、5kbのPCR産物が得られる。AIH type 2の一例では陽性であった。

Fig.3 long PCRによる2D6\*5 (D)の検出



CYP2D6 gene が欠損している場合は6kbのPCR産物が得られる。AIH type 2 の症例は陽性であった。

Fig.4 LKM1抗体陽性患者のCYP2D6の遺伝子変化



■ は未検策の範囲

AIH type 2症例では、exon 4 の3625番目にGからCへのpoint mutationがみられ、gluからglnへのアミノ酸置換を伴っていた。

# 自己免疫性肝炎患者のHLA-DR解析と治療

岡山大学医学部・第一内科 辻 孝夫  
協同研究者：坂口孝作, 東 俊宏  
山本和秀, 下村宏之

## はじめに

自己免疫性肝炎は自己抗体陽性、高IgG血症を特徴とする活動性慢性肝炎であり、その病態には自己免疫機序の関与が想定されている。自己免疫性肝炎の治療にはプレドニゾロン (prednisolone; PSL) が第一選択である。しかし、自己免疫性肝炎のなかにもPSL治療に抵抗を示す症例、あるいはPSL治療期間中に再燃する症例がある。これらの症例では多量のPSL投与量を必要とし、その副作用の出現が臨床問題となる。また、上記のような症例に限らず、自己免疫性肝炎では長期PSL服用に伴う副作用によりPSL治療を継続することが困難となる症例も存在する。自己免疫性肝炎の予後はPSL治療により比較的良好であるが、こうしたPSL治療に伴う問題が自己免疫性肝炎の治療予後、あるいは患者のquality of life(QOL)に影響すると考えられる。自己免疫性肝炎の治療効果あるいは予後を改善するためには、PSL治療に伴う問題点を改善していく必要がある。

PSLによる治療困難な症例に対してはアザチオプリン (azathioprine; AZP) が併用投与されることもある。1985年の全国調査では自己免疫性肝炎患者の12%においてPSLとAZPが併用投与され、84%の治療効果が報告されている<sup>1)</sup>。今回、前述したPSL治療に伴う問題点を改善するために、PSL治療抵抗症例、PSL治療により完全寛解したものの治療経過中に再燃した症例、副作用出現によりPSL治療継続が困難となった症例に対してAZPを併用投与し、その治療効果を検討した。さらに、PSL治療抵抗症例、再燃症例に関して、自己免疫性肝炎の病態との関連が報告されているHLA DR4, DR2, それぞれのサブタイプについて検討した。

## 対象および方法

### 1. 患者

1980年以降、岡山大学第一内科にて自己免疫性肝炎と診断され、PSL治療が行われた41症例を対象とした。41症例のうち男性2例、女性39例であり、年齢のMedian値は53歳 (16歳-71歳) であった。自己免疫性肝炎の国際基準スコア<sup>2)</sup>は10以上15以下が10例、16以上が31例であり、そのMedian値は17 (13-21) であった。対象とした41症例の観察期間は最短135日から最長6504日であり、その平均は1968±1580日であ

った。

### 2. PSL治療

41症例のいずれも初回治療では、PSLを投与し治療を開始した。初回投与量は15-40mg/day (15mg/day: 3例, 20mg/day: 8例, 30mg/day: 18例, 40mg/day: 12例)であり、平均投与量は29.2±8.2mg/dayであった。PSLの治療効果の評価は、完全寛解 (complete remission; CR): AST, ALT値が正常化した症例, 部分寛解 (partial remission; PR): AST, ALT値が治療前の1/2以下で正常上限以上で推移している症例, 無効 (not effective; NE): 肝機能検査上、治療効果の見られなかった症例, とした。

初回PSL治療で、41例中2例 (4.9%) がNE, 7例 (17.1%) がPR, 32例 (78.0%) がCRであった (表-1)。初回PSL治療においてはNEの2例とPRの7例の計9例をPSL治療抵抗症例とした。一方、初回PSL治療にてCRが得られた32例のうち、8例 (25.0%) でPSL治療経過中に再燃が認められた。これらの8例については6例でPSL減量、2例でPSLの自己中止が再燃の誘因となった。PSL治療により臨床問題となる副作用は41例中26例 (26.8%) (糖尿病: 7例, 大腿骨無腐性壊死: 2例, 肺真菌症: 1例, 食道カンジダ症: 1例, 精神症状: 1例) に認められた。これらの症例のうち、糖尿病と精神症状を合併した1例ではPSL治療でCRが得られたものの、PSL単独治療は困難であった。

### 3. PSL/AZP併用療法

PSL/AZP併用療法は、初回PSL治療の無効症例2例、部分寛解症例7例中5例、再燃症例8例中6例、またPSLの副作用出現ためPSL単独治療継続が困難となった1症例に対して行った (表-1)。AZPの投与は、原則としてAZP投与前のPSL投与量を継続したうえで、AZP100mg/dayあるいは50mg/dayを投与した。PSL/AZP併用療法によりAST, ALT値が低下した症例では、PSLの減量を開始した。AZPの維持量は50mg/dayとした。PSL/AZP併用療法の治療効果の評価は、PSL治療の治療効果と同様に行った。

### 4. HLA DR2, DR4の解析

自己免疫性肝炎患者のうち23例についてHLA DR2, DR4サブタイプを解析した。HLA DR2, DR4のサブタイプは、末梢血リンパ球よりRNAを分離し、HLA DR2およびDR4特異的primer set,

DR2: sense 5GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC3',  
anti sense 5CTGCACTGTGAAGCTCTCAC3';  
DR4: sense 5TCCTGTGGCAGCCATAGAG3',  
anti sense 5CTGCACTGTGAAGCTCTCCA3'

を用いたRT-PCRを行ったのち、PCR産物をdirect

sequence (dideoxynucleotide chain termination法) することにより解析した (アミノ酸; 6-92)。

## 結 果

### 1. PSL/AZP併用療法の治療効果

PSL/AZP併用療法は初回PSL治療抵抗症例の7例(無効症例2例:症例1, 2, 部分寛解症例5例:症例3-7), 再燃症例の6例(症例8-13), 副作用出現症例(症例14)の計14例に対して行った(表-2)。PSL/AZP併用療法を行うことによって, PSL治療抵抗症例7例中6例で完全寛解が得られ, 1例では部分寛解であった。再燃症例, 副作用出現症例では7例いずれも完全寛解が得られた。

PSL治療抵抗症例では維持量として, PSL投与量 $5.8 \pm 1.3$  mg/day, AZP投与量50.0mg/dayで治療可能であった。再燃症例はPSL投与量 $5.0 \pm 2.5$  mg/day, AZP投与量50.0mg/day, また副作用出現症例はPSL投与量2.5mg/day, AZP投与量50.0mg/dayで治療可能であった。PSL/AZP併用治療期間中, AZP投与に伴う副作用は認められなかった。

### 2. HLA DR2, DR4の解析

自己免疫性肝炎23例中19例(82.6%)でHLA-DR4陽性であった。HLA-DR4陽性者のうち, HLA-DRB10405が15例(78.9%)であり, HLA-DR4陽性自己免疫性肝炎患者ではHLA-DRB10405が主体であった(表-3)。HLA-DR2は7例(30.4%)に見られ, その主体はHLA-DRB11502であった(表-4)。PSL治療抵抗症例と寛解症例に分けて検討すると(表-5), 検討した7例のPSL治療抵抗症例では6例(85.7%)でHLA-DR4陽性であり, しかも6例ともHLA-DRB10405であった。HLA-DRB10405以外のHLA-DR4サブタイプは認められなかった。一方, 寛解症例には4例のHLA-DRB10405以外のHLA-DR4サブタイプを有する患者が含まれ, しかもこの4例はいずれも非再燃症例であった。すなわちHLA-DRB10405以外のサブタイプを有する自己免疫性肝炎患者にはPSL治療抵抗症例, 再燃症例は認められず良好なPSL治療効果を示した。HLA-DR2のサブタイプに関しては, PSL抵抗症例と寛解症例に差は見られなかった。

またHLA-DR4β鎖上のCD4に対する結合部位のアミノ酸の解析を行ったが<sup>3)</sup>, HLA-DR4サブタイプ特異的, あるいは疾患特異的アミノ酸配列は見出せず, すべてのHLA-DR4で同一のアミノ酸配列であった。

### 考案・結論

自己免疫性肝炎に対する第一選択薬剤はPSLである。わが国における平成7年度全国調査では, 自己免疫性肝

炎と診断された症例の77.6%にPSLが投与され, その有効率は89%と報告されている。しかし治療により変化の見られなかった症例が7.6%, 悪化した症例が3.5%存在したことも報告されている<sup>4)</sup>。我々の症例でも, 41例中9例(22.0%)は, PSL治療無効症例を含めたPSL治療抵抗症例であり, 32例の完全寛解症例のうち8例(25%)はPSL治療期間中に再燃した。

これらのPSL治療抵抗性あるいは治療期間中の再燃は自己免疫性肝炎の治療予後に影響を及ぼす。今回, 7例のPSL治療抵抗症例, 6例の再燃症例, 1例のPSL副作用によってPSL治療が継続困難となった症例に対してPSL/AZP併用治療を施行し, その有効性について検討した。これらの症例ではPSL/AZP併用療法により14例中13例で完全寛解がえられ, 1例で部分寛解がえられた。また, PSL治療抵抗症例であってもPSL/AZP併用療法ではAZP 50.0mg/day併用投与下にPSL維持量は $5.8 \pm 1.3$  mg/dayであり, 再燃症例においても, AZP 50mg/day併用投与ではPSL  $5.0 \pm 2.5$  mg/dayで治療可能であった。これらの結果から, PSL/AZP併用療法はPSL治療抵抗性自己免疫性肝炎あるいは自己免疫性肝炎の再燃症例に有効な治療法であり, PSL/AZP併用療法ではPSLの投与量を軽減できることが示された。

一方, HLA-DRのフェノタイプが自己免疫性肝炎の病態に関連する<sup>5)</sup>。日本人自己免疫性肝炎では, HLA-DR4陽性者が多く, HLA-DR4陰性者ではHLA DR2陽性者が多いことが知られている<sup>6)</sup>。我々の症例では, 23例中19例(82.6%)がHLA-DR4陽性であり, その78.9%はHLA-DRB10405であった。一方, PSL治療効果との関連を検討すると, HLA-DRB10405以外のHLA-DR4陽性患者は, 全例初回PSL治療で完全寛解症例であり, しかも非再燃症例であった。このことはHLA-DRB10405以外のHLA-DR4陽性自己免疫性肝炎患者はPSL治療に対する反応性がよく, 十分な治療効果がえられることが示唆された。この反応性の違いを説明するために, HLA-DR4上のCD4分子結合部位のアミノ酸解析を行ったが<sup>3)</sup>, HLA-DR4サブタイプに特異的なアミノ酸配列, あるいは疾患に特異的なアミノ酸配列は存在せず, 同一のアミノ酸配列であった。HLA-DRB10405以外のHLA DR4陽性自己免疫性肝炎患者でのPSL治療に対する反応性の相違が免疫学的に解明されれば, 今後HLA-DR4のサブタイプは自己免疫性肝炎の最適な治療法を選択するうえで参考となると考える。

### 参 考 文 献

- 1) Monna T, Kuroki T, Yamamoto S: Autoimmune hepatitis; the present status in Japan. Gastroenterol Jap 1985; 20:260-271.

- 2) Johson PJ, McFarlane IG, convenors: Meetin report: International autoimmune hepatitis group. Hepatology 1993; 18:998-1005.
- 3) Fleury S, Thibodeau J, Croteau G, et al: HLA-DR polymorphism affects the interaction with CD4. J Exp Med 1995; 182:733-741.
- 4) 戸田剛太郎, 銭谷幹男, 渡辺文時: 自己免疫性肝炎の全国集計結果および診断指針の改訂について。厚生省 難治性の肝炎調査研究班 自己免疫性肝炎分科会。平成7年度報告書, 1996; 7-8.

- 5) Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM et al: Susceptibility to autoimmune hepatitis: Human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. Hepatology 1991; 13:701-706.
- 6) Seki T, Kiyosawa K, Ota M: Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. Hepatology 1990; 12:77-96.

表1 自己免疫性肝炎におけるPSL治療効果とPSL/AZP併用療法施行症例数

	症例数 (%)	PSL / AZP 施行症例数
PSL初回治療無効症例 (NE)	2 (4.9)	2
PSL初回治療部分寛解症例 (PR)	7 (17.1)	5
PSL初回治療完全寛解症例 (CR)	32 (78.0)	
再燃症例	8 (25.0)	6
重篤な副作用出現症例	1 (3.1)	1

表2 PSL/AZP併用療法の施行症例と治療効果

症例	年齢	性	AIH スコア	PSL / AZP 併用療法						期間 (日)	効果
				前		開始		維持			
				PSL	ALT	PSL	AZP	PSL	AZP		
1	62	F	16	(2)	273	(2)	50	(0.5)	50	2203	CR
2	50	F	17	35	478	35	100	5	50	776	CR
3	28	F	19	12.5	122	30	100	7.5	50	1202	PR
4	31	M	15	15	226	15	100	5	50	279	CR
5	57	F	17	10	171	10	50	7.5	50	403	CR
6	55	F	17	20	78	20	100	5	50	111	CR
7	48	F	15	35	203	35	100	5	50	135	CR
8	41	F	20	5	168	5	50	2.5	50	1904	CR
9	53	F	16	2.5	394	5	50	5	50	503	CR
10	42	F	18	7.5	917	5	50	5	50	1148	CR
11	18	F	19	5	105	5	50	5	50	581	CR
12	47	F	21	5	104	30	50	10	50	343	CR
13	41	F	15	15	380	10	100	5	50	160	CR
14	50	F	13	25	27	25	50	2.5	50	146	CR

( ): Betamethasone

表3 HLA-DR4サブタイプ

	AIH 23	CH-C 56
Total		
DR4-negative	4 (17.4)	32 (57.1)
DR4-positive	19 (82.6)	24 (42.9)
HLA-DRB10401	1 (5.3)	
0402		
0403	2 (10.5)	
0404		1 (4.2)
0405	15 (78.9)	16 (66.6)
0406	1 (5.3)	5 (20.8)
0407		
0408		
0409		
0410		2 (8.3)

(%)

表4 HLA-DR2サブタイプ

	AIH 23
Total	
DR2-negative	16 (69.6)
DR2-positive	7 (30.4)
HLA-DRB11501	1 (14.3)
1502	5 (71.4)
HLA-DRB11601	1 (14.3)
1602	1 (14.3)

(%)

表5 PSL治療効果とHLA-DR4、DR2

	DR4	0405	non 0405	DR2	1502
治療抵抗症例 (7例)	6 (85.7)	6 (85.7)	0 (0)	1 (14.3)	1 (14.3)
寛解症例 (16例)	13 (81.3)	9 (56.3)	4 (25.0)	6 (37.5)	4 (25.0)
再燃症例 (6例)	5 (83.3)	5 (83.3)	0 (0)	2 (33.3)	1 (16.7)
非再燃症例 (10例)	8 (80.0)	4 (40.0)	4 (40.0)	4 (40.0)	3 (30.0)

(%)

# 自己免疫性肝炎における肝細胞傷害機構—リンパ球におけるbcl-2の発現およびcostimulatory分子の関与—

香川医科大学・第三内科 西岡 幹夫  
協同研究者：有馬啓治，谷内田美景  
黒河内和貴

## はじめに

我々は自己免疫性肝炎（AIH）における肝細胞障害機構を解明する手がかりとしてリンパ球のアポトーシスに注目し，その中でも特にアポトーシス抑制因子としてのbcl-2について解析した。Bcl-2陽性細胞はアポトーシスを免れて，自己応答性の獲得や免疫応答の維持に関与しているものと推測されている。今回は末梢血単核球（PBMC）および組織浸潤単核球（LIMC）においてbcl-2の発現を検討した。さらにbcl-2陽性細胞の形質，肝細胞障害や自己免疫現象との関連性についても解析した。Bcl-2の発現誘導という点に関連してはcostimulatory分子からのシグナルによって誘導される可能性に着目し，主にPBMCにおけるcostimulatory分子の発現を解析した。

## 対象と方法

自己免疫性肝炎18例を対象とし，疾患対照としてC型慢性肝炎20例を，またPBMCの解析では原発性胆汁性肝硬変20例，健常者10例も対照とした。PBMCを用いた解析ではflow cytometryを用いてbcl-2，CD4，CD8，CD19，CD28，CD40，CD40L（CD154），CD80，CD86の解析をし，さらにリンパ球の形質を知る目的で細胞内サイトカインとしてIFN-gamma，IL-4の染色を行った（Dako社製またはPharmingen社製）。Bcl-2，IFN-gammaおよびIL-4についてはFACS permeabilizing solution（Becton Dickinson社製）を用いたpermeabilization処理の後で染色を行って細胞内のbcl-2およびサイトカイン（IFN-gamma，IL-4）の発現を測定した。また末梢血中のbcl-2陽性細胞の発現強度とGPT値，IgG値や自己抗体力価など各種検査成績について比較検討した。

組織学的検索にはホルマリン固定パラフィン包埋の生検肝組織を用いて標準的なABC法にて免疫組織染色を行った。キシレン，エタノール系列による脱パラフィン化の後，内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングおよび正常血清による非特異的反応のブロッキングを前処理として行った。染色に使用したモノクローナル抗体はbcl-2，OPD4（CD45RO，memory T cell，mainly CD4），CD8（CTL），CD20（B cell）およびHLA class IIを用いた（Dako社製）。bcl-2，CD8を使用した場合は前処理として熱処理による抗原賦活化を実施した。染色は標準的

なABC法で行い，発色にはDABを用いた（Vector社製またはDako社製）。一部の症例ではbcl-2とOPD4，CD20またはCD8との二重染色を行った。

## 結 果

AIHではPBMCにおいて他の疾患および健常者に比し著明なbcl-2陽性細胞の増加，増強が認められた（表1）。そしてbcl-2陽性細胞の形質は主にCD4陽性であり，しかもほとんどがIFN-gamma産生能を有し，IL-4の発現はほとんど認めなかった（表2）。このことからPBMCにおいて認められるbcl-2陽性細胞はTh1タイプのCD4陽性T細胞と考えられた。検査成績との比較においてbcl-2の発現強度（intensity）とGOT値，GPT値には有意の相関が見られた。他のIgG値や自己抗体力価などとは有意な相関は認められなかった。また，bcl-2の発現は治療とともに末梢血レベルでは早期に低下した。末梢血でのbcl-2の発現の程度は疾患の活動性と関連があるものと考えられた。

門脈域浸潤リンパ球の免疫組織染色の結果（表3）はAIHではC型肝炎に比し著明なbcl-2陽性細胞の浸潤を認め，同様にOPD4陽性細胞すなわちCD4陽性memory T細胞の浸潤を強度に認めた。B細胞の強発現は認められなかった。CD8陽性のcytotoxic T細胞はAIHおよびC型肝炎とも同等に認められた。Bcl-2の発現は活動性の強い症例では広範囲に認められた。Bcl-2陽性細胞の分布はmemory T細胞（主にCD4陽性）の分布に一致し，それは二重染色でも確認された。LIMCでは治療後GPT値が正常化してもbcl-2陽性細胞の集団は存続している例が多かった。

PBMCでのリンパ球表面マーカーの解析からは一般的なCD4，CD8などのマーカーには健常者と差が見られなかったが，costimulatory分子のマーカーのうちT細胞に発現するマーカー（CD28，CD40Lなど）は著明に減少していた（表4）。特にCD8陽性T細胞における減少が顕著であった。この減少は発現が消失したということではなく，活性化され特異刺激を受けたCD8陽性T細胞が肝細胞内に浸潤している状態を反映しているものと考えられた（成績非呈示）。

## 考 案

AIHにおいてPBMCでもLIMCでもbcl-2陽性細胞が他疾患や健常者に比し著明に増強していることが明らかとなった。そしてこの細胞群が主にCD4陽性であり，しかもIFN-gamma産生能を有していることからTh1タイプのhelper T細胞が主体であることが判明した。そしてbcl-2陽性細胞がGPT値と相関関係にあることから，bcl-2の発現が肝細胞障害に主体となって関与していることは間違



いないと思われる。肝組織中ではbcl-2陽性細胞とHLA class II陽性細胞（主にKupffer細胞と思われる）やCD8陽性細胞とが密に連携している様子が窺え、CD4陽性T細胞がbcl-2を発現して免疫応答の中心的役割を果たし、CD8陽性T細胞などを誘導して肝細胞障害に関わっているものと考えられる。そしてPBMCにおけるCD8陽性T細胞に発現するcostimulatory分子の減少がLIMCでの増加を意味する（現在肝組織から得られた単核球をFACS解析を行っている）とすればcostimulatory分子からの特異的刺激を受けたCD4陽性T細胞はbcl-2を発現してアポトーシスを免れ、免疫応答の主役をなし、PBMCやLIMCで多数を占める。そして活性化されcostimulatory分子を強発現したCD8陽性T細胞はLIMCに移行し、そこで細胞障害に関わった後アポトーシスに陥ってしまうものと推測される。ただし、CD8陽性T細胞が実際のeffector細胞かどうか、CD4陽性T細胞の細胞障害活性はないのか、本当にbcl-2はcostimulatory分子を介して発現しているのかどうかなどまだ断定できない要素も多く、今後ともbcl-2陽性細胞に関係する種々の因子を解決していく必要はある。これまでの検討で明らかになったことはAIHではTh1タイプのCD4陽性細胞がbcl-2を発現してアポトーシスを免れ、免疫応答において主役を演じていることから、AIHも他の臓器特異的自己免疫疾患と同様な免疫応答をしている可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 西岡幹夫：自己免疫性肝炎におけるbcl-2の発現について。厚生省特定疾患難治性の肝疾患調査研究班。平成八年度研究報告 pp13-14, 1997.
- 2) 西岡幹夫：自己免疫性肝炎におけるbcl-2陽性リンパ球の形質と経時的変化について。厚生省特定疾患難治性の肝疾患調査研究班。平成九年度研究報告 pp18-19, 1998.
- 3) Yachida M, Kurokohchi K, Arima K, et al: Increased bcl-2 expression in peripheral blood mononuclear cells and its association with hepatocellular damage in patients with autoimmune hepatitis. Clin Exp Immunol 1999. (in press)
- 4) Parijs LV, Biuckians A, Abbas AK: Functional role of Fas and bcl-2 regulated apoptosis of T lymphocytes. J Immunol 160:2065-2071, 1998.
- 5) Patel T, Gores GJ: Apoptosis and hepatobiliary disease. Hepatology 21:1725-1741, 1995.
- 6) Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S: Effect of bcl-2 on fas antigen-mediated cell death. J Immunol 151:621-627, 1993.
- 7) Zdichavsky M, Schorpp C, Nickels A, et al: Analysis of bcl-2+ lymphocyte subpopulations in inflammatory synovial infiltrates by a double-immunostaining technique. Rheumatol Int 16:151-157, 1996.
- 8) Manganelli P, Quaini F, Andreoli AM, et al: Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjogren's syndrome. J Rheumatol 24:1552-1557, 1997.
- 9) Salmon M, Scheel-Toellner D, Hussoon AP, et al: Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. J Clin Invest 99: 439-446, 1997.
- 10) Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, et al: Fas and Fas ligand expression in salivary glands of patients with primary Sjogren syndrome. Arthritis Reum 40:87-97, 1997.

	mean bcl-2 fluorescence	P
AIH (n=15)	1.011 ± 0.295	a,b,c,d
PBC(Scheuer I, II) (n=14)	0.777 ± 0.235	e
PBC(Scheuer III, IV) (n=6)	0.634 ± 0.151	
CH-C (n=18)	0.650 ± 0.159	
normal control (n=10)	0.560 ± 0.117	

Table1. mean fluorescence intensity of bcl-2 expression in PBMC (statistical significance)

- a;P<0.05(AIH vs PBC(Scheuer I, II))  
 b;P<0.01(AIH vs PBC(Scheuer III, IV))  
 c;P<0.001(AIH vs CH-C)  
 d;P<0.0001(AIH vs normal control)  
 e;P<0.05(PBC(Scheuer I, II) vs normal control)

percent positive cells		
bcl-2(+)	52.2 ± 15.2	(100%)
CD4(+)	51.5 ± 15.9	(100%)
CD4(+)/bcl-2(+)	41.5 ± 14.1	(76.7%) (60.8%)
CD8(+)	27.4 ± 8.3	(100%)
CD8(+)/bcl-2(+)	10.3 ± 6.7	(37.6%) (22.5%)
CD19(+)	12.0 ± 3.8	(100%)
CD19(+)/bcl-2(+)	4.7 ± 1.6	(39.6%) (8.4%)

Table2. characterization of bcl-2 positive cells in AIH

	percent positive cells	bcl-2	CD45RO	CD8	CD20
AIH(n=21)	1-25%	19.0%	0%	23.8%	80.9%
	25-50%	38.1%	4.8%	52.4%	19.1%
	>50%	42.9%*	95.2%*	23.8%	0%
CH-C(n=22)	1-25%	63.6%	27.3%	36.3%	59.1%
	25-50%	27.3%	40.9%	45.5%	31.8%
	>50%	9.1%	31.8%	18.2%	9.1%

Table3. frequency of patients with liver infiltrating lymphocytes in portal area positive for monoclonal antibodies in AIH (statistical significance; \*:P<0.05 in bcl-2(AIH>50% vs CH-C>50%) and CD45RO(AIH>50% vs CH-C>50%))

monoclonal antibody	AIH	normal control	P
CD4	35.6 ± 12.9	39.7 ± 11.6	0.630
CD8	32.8 ± 16.2	30.8 ± 7.29	0.481
CD45RO	31.9 ± 9.95	28.7 ± 6.95	0.317
CD19	8.80 ± 4.96	13.4 ± 8.51	0.052
CD28	50.4 ± 16.0	71.3 ± 11.1	<0.0001
CD28(+)/CD4(+)	33.6 ± 13.2	40.6 ± 9.49	0.055
CD28(+)/CD8(+)	11.7 ± 6.46	25.2 ± 10.6	0.0004
CD80(B7-1)	23.1 ± 16.3	41.4 ± 7.04	0.0024
CD40	10.5 ± 10.9	8.59 ± 3.64	0.289
CD40L(CD154)	2.41 ± 3.62	6.95 ± 4.32	0.0009

Table4. flow cytometrical analysis of PBMC by using antibodies to surface marker in lymphocytes and costimulatory molecules in AIH

# 劇症肝炎モデルにおけるTNF- $\alpha$ による肝細胞死の抑制

大阪大学大学院医学系研究科・分子制御治療学

林 紀夫

協同研究者：佐々木裕, 巽 智秀

竹原徹郎

## はじめに

アポトーシスによる細胞死においては、細胞障害性T細胞より分泌されるperforin/granzyme BあるいはFasシステムを介した細胞障害メカニズムが重要な役割を果たしていることが明らかとなっている<sup>1)2)</sup>。特に肝疾患における肝細胞障害機序の一つとして、Fasを介した肝細胞のアポトーシスの重要性が指摘されている。劇症肝炎は肝細胞死とそれに引き続く肝再生を急激に繰り返す病態であると考えられるが、肝再生過程における肝細胞死といわゆるquiescentな肝細胞における死の異同については明らかにされていない。今回の検討では肝切除による肝再生モデルを用いて、再生肝と静止期の肝臓でのFasを介した肝細胞死の相違とその制御機構について検討した。

## 方 法

2/3肝切除あるいはsham手術を行った、Balb/cAマウスにJo2抗体 (agonistic anti-mouse Fas)を静注し、血清GPT値、肝の組織学的な検討、生存時間について検討した。肝組織におけるDNAの断片化はELIZAにて定量し、caspase-3 like活性はDEVD-AFCを基質とするfluorometric assayにより定量した。マウス肝細胞膜上のFasの発現はコラゲナーゼ還流法により肝細胞を分散し、PE標識Jo2抗体にて染色後FACSにて解析した。肝再生の早期のシグナルの一つであるTNF- $\alpha$ の関与の可能性を検討するために、中和活性のある抗TNF- $\alpha$ 抗体静注後に肝切除を行い、Fas刺激後のcaspase-3活性を検討した。

## 結 果

肝切除後2.5時間から48時間後のBalb/cAマウスにJo2抗体を投与すると、sham手術を行ったマウスに比べ、有意の生存時間の延長がみられた(図-1)。sham手術を行ったマウスはすべてJo2抗体投与後4時間以内に死亡した。それに対して、肝切除後2.5時間から48時間後にJo2抗体を投与すると、有意の生存の延長を認めしたが、96時間後にJo2抗体を投与した場合には生存期間の延長は認めなかった。また組織学的検討によって、肝細胞はアポトーシスの出現が形態学的に遅延していた事が明らかとなった。さらに、DNAのフラグメント化は、

sham手術を行ったマウスでは、Jo2抗体を投与後2時間以内に、特徴的なladderパターンを示したのに対し、肝切除を行ったマウスでは、Jo2抗体を投与後4時間以降にladderパターンを示した。また血清中のALTのレベルを検討したところ、sham手術を行ったマウスでは肝切除後のJo2抗体投与2時間後に血清ALTの上昇を認めた。一方肝切除を行ったマウスではJo2抗体を投与する前から基本的にALTの上昇を認めていたが、さらなる有意なALTの上昇は抗体投与後6時間より認められた(表-1)。

フローサイトメトリーによる検討では肝細胞膜上のFasレセプターの発現レベルはsham手術後と肝切除後とは全く同等であった。DEVD-AFCを基質とするfluorometric assayによる検討では、肝切除後の再生肝ではpro-caspase-3の発現レベルには差がなかったが、Jo2投与後のcaspase-3の活性化は有意に抑制されていた。この結果より、再生肝におけるapoptosisの抑制に、Fasを介したapoptosisのシグナルのうちcaspase-3より上流のレベルが関与していることが示唆された。

肝再生の早期のシグナルの一つであるTNF- $\alpha$ の関与の可能性を検討するために、中和活性のある抗TNF- $\alpha$ 抗体静注後に肝切除を行ったところ、Fas刺激後のcaspase-3活性の抑制の部分的な消失が見られた(図-2)。逆にTNF- $\alpha$ をあらかじめ無処置のマウスのマウスに静注すると、Jo2による致死効果が消失し、肝臓でのcaspase-3の活性化とアポトーシスは著明に抑制された(図-3)。

## 考案・結論

今回の検討ではFas刺激によって引き起こされるapoptosisは、再生肝での肝細胞は、静止期の肝細胞に比較して有意に遅延していた。部分肝切除後の肝細胞は数時間後からG1期に入り、約20時間後からはS期に入り、96時間後にはG0期に戻ることが明らかとなっている。<sup>3)</sup>肝切除後2.5時間から48時間までは生存期間が延長したことから細胞周期との関連が示唆されるが、今回の検討では細胞周期を検討していないことからその関連は明らかとはなっていない。

再生肝細胞表面のFas抗原の発現は変化がなかったが、Fasレセプター以降の変化を検討したところpro-caspase-3の発現には差がなかったが、caspase-3の活性化は有意に抑制されていた。以上の結果はFasレセプター以降でcaspase-3より上流のシグナルが肝切除によって抑制されており、このことが肝細胞のアポトーシスを遅延させる要因と考えられた。

肝再生過程は、多くサイトカインや成長因子によって複雑に制御された現象であることが明らかとなっている。TNF- $\alpha$ は肝再生過程に導く早期シグナルの重要な因子である<sup>4)5)</sup>。今回の検討では、TNF- $\alpha$ は肝再生におけ

るFasを介したシグナルを部分的に抑制する作用があることが明らかとなった。

以上の結果から肝疾患における肝再生過程においてはFasを介したアポトーシスが抑制されており、このことは肝細胞の修復には有利だがウイルス感染細胞の除去には不利に働く可能性があると考えられた。さらにTNF- $\alpha$ の肝障害に対する治療への可能性が示唆された。

### 参考文献

- 1) Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al.: Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265:528-530.
- 2) Lowin B, Hahne M, Mattmann C, et al.: Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways *Nature* 1994; 370:650-652.
- 3) Steer CJ.: Liver regeneration. *FASEB J.* 1995; 9:1396-1400.
- 4) Diehl AM, Rai RM: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* 1996; 10:215-227.
- 5) Taub R.: Transcriptional control of liver regeneration *FASEB J.* 1996; 10:413-427.

図1 The effect of liver regeneration on times of death after Jo2 injection.

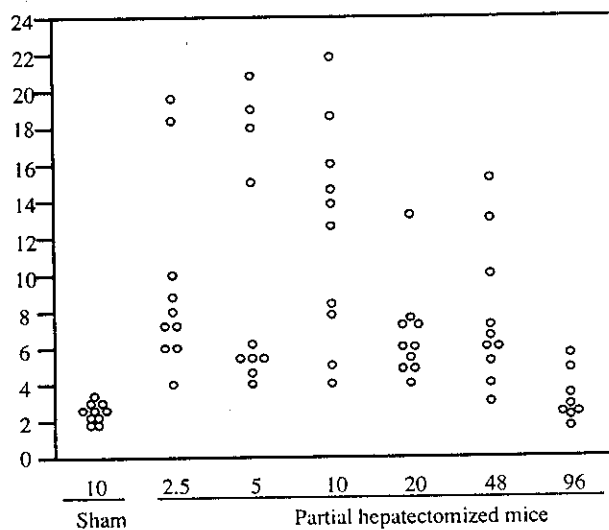
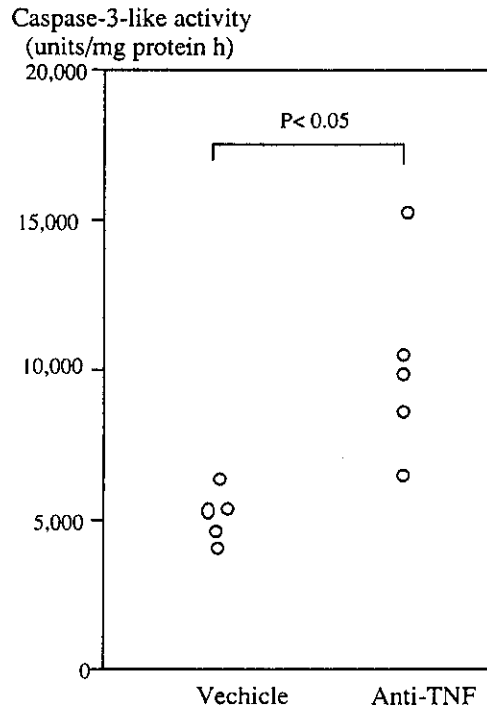


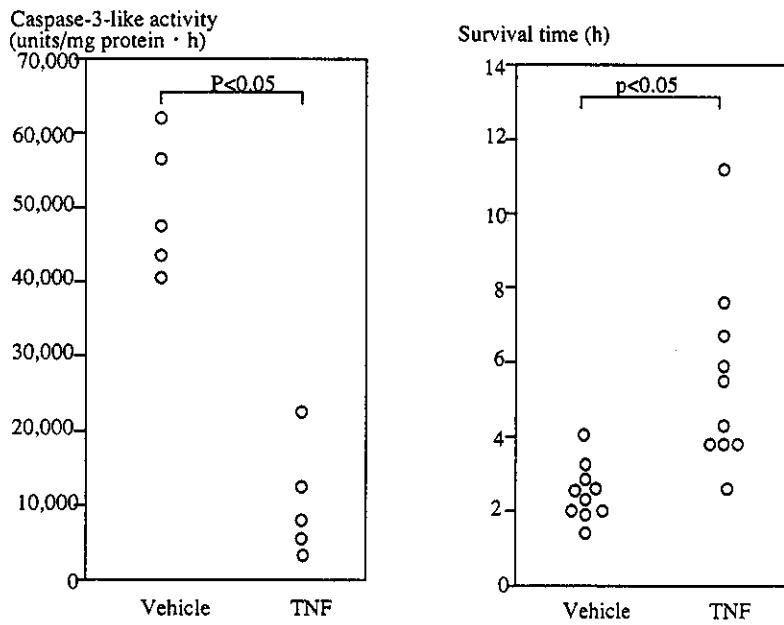
表1 Jo2抗体投与後の血清ALT値

Time after Jo2 injection (h)	ALT(IU/L)	
	Sham-operated mice	Hepatectomized mice
0	40±7	5650±1090
1	35±5	5260±400
2	1440±1030	6170±630
3	ND	5050±460
4	ND	7130±3920
6		14600±3440
8		12290±2860
10		17490±1950
12		23410±7920

☒ 2 Effect of treatment of anti-TNF  $\alpha$  before partial hepatectomy on activation of caspase-3 like protease after Jo2 injection.



☒ 3 Caspase-3-like activity and survival after Jo2 injection in TNF  $\alpha$ -treated o



# B型肝炎ウイルストランスジェニックマウスにおけるHBs抗原特異的CTLの免疫学的寛容と骨髄由来樹状細胞による活性化

富山医科薬科大学医学部・第三内科 渡辺 明治  
協同研究者：清水幸裕，樋口清博  
岡田和彦

## はじめに

B型慢性肝炎の患者末梢血リンパ球は、種々のHBV由来蛋白に対して免疫学的に寛容状態となっており、*in vitro*における刺激によってもHBV特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)は誘導されない。一方、B型急性肝炎患者では、broadなCTL反応が誘導されることから、HBVの排除にCTL反応が重要な役割を果たしていることが推測されている<sup>1)・2)</sup>。HBV transgenicマウスはB型慢性肝炎患者と同様、HBs抗原特異的CTLは寛容状態(あるいは胸腺での負の選択により除去)となっており、recombinant vaccinia virusやDNA plasmidを用いたimmunizationなどでも活性化されない<sup>3)</sup>。一方、樹状細胞はB7-1やB7-2などのcostimulatory分子を豊富に表出し、生体内で最も強力な抗原提示細胞であることが明らかとなっており<sup>4)</sup>、同細胞を用いて免疫することにより、HBV transgenicマウスにおいてHBs抗原特異的CTLが活性化されるかどうか検討した。

## 材料および方法

HBV transgenicマウスとして107-5(H-2d), 1.3.46(H-2d), 1.3.32(H-2bxd)を用い、nontransgenicのコントロールとして、同系のB10.D2(H-2d)あるいはB6/BALB/F1(H-2bxd)マウスを用いた。樹状細胞は、骨髄細胞をGM-CSFとIL-4の存在下で7日間培養して分化、誘導、増殖させた。また、脾臓内の樹状細胞の表面形質を調べる目的で、脾細胞から2段階のプラスチック付着法を用いて樹状細胞の豊富な分画を採取した。樹状細胞のHBs抗原処理およびMHC class I分子への抗原ペプチド提示能は、マウスにおけるimmunodominant HBsAg epitopeであるHBs28-39を認識するCTL clone(Ld-restricted)をエフェクター細胞とし、HBs抗原蛋白をパルスし、51Crでラベルした樹状細胞を標的細胞として細胞障害試験を行い検討した。骨髄由来の樹状細胞は、HBsペプチド(HBs 28-39)、HBs抗原蛋白あるいは培養液でincubateした後、経静脈的に注入(one million/マウス)した。その後、脾細胞を採取し、放射線照射したP815/PreS1 transfectantとEL-4培養上清の存在下で7日間培養、刺激した後、HBs抗原特異的CTL誘導の有無を検討した。

## 成 績

骨髄由来樹状細胞はHBV transgenicマウスとnontransgenicマウスから同様に誘導され、細胞表面のDEC205(NLDC-145)、CD11c、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、MHC class II、CD40、CD54、CD11a、CD44、CD49d、CD49f、LPAM-1の発現は両者間で差異を認めなかった(図1)。また、MHC class I(Ld)上へのHBs 28-39ペプチドの提示能も両者間で差がなかった。さらに脾細胞由来の樹状細胞の検討でも、同様にtransgenicとnontransgenicマウスの間で表面形質あるいは抗原提示能に差を認めなかった。これらより、HBV transgenicマウスの樹状細胞機能には異常がないと考えられた。骨髄由来樹状細胞の移入により、nontransgenicだけでなく上記3系統のいずれのtransgenicマウスにおいても、その脾細胞中にHBs抗原特異的CTLが誘導され、その頻度をlimiting dilution analysisで調べたところ、HBV transgenicマウスにおいてもnontransgenicマウスと同様の頻度でHBs抗原特異的CTL前駆細胞が存在していることが明らかとなった(図2)。HBs抗原特異的CTLは、CD8陽性細胞であり、immunodominant epitope(HBs 28-39)だけでなく、immunosubdominant epitopeに対する障害活性も認めた。また、それに伴い107-5マウスでは、しばしば肝細胞の巣状壊死を主とした軽度の肝炎を樹状細胞注入2週間後に一過性に認め、そのようなマウスでは血清ALT値の軽度上昇をともなっていた。誘導されたHBs抗原特異的CTLは、別の107-5マウスに移入することにより、HBs抗原特異的CTLクローンを移入した時と同様な組織像を示す肝炎を惹起した。しかしながら、HBs抗原特異的CTLの誘導は一過性であり、樹状細胞注入1-2週後をピークに次第に低下し、血中HBs抗原の低下やHBV-RNA、HBV-DNAのdown regulationなどの抗ウイルス効果を示すには至らなかった。

## 考察・結論

HBV transgenicマウスは、HBV持続感染患者におけるウイルス学的、免疫学的および分子生物学的な解析に有用なモデルと考えられる。今回の結果から、transgenicマウスにおいて、従来の免疫法によってHBs抗原特異的CTLが誘導されなかったのは、同CTLが胸腺における負の選択で除去された結果でなく、末梢組織における免疫寛容誘導機序のためと考えられた。さらに、その結果として麻痺に陥ったCTLを活性化させるためには、樹状細胞を用いた免疫が種々の免疫法の中で最も強力であり、B型慢性肝炎患者においても同様の手法により、抗ウイルスCTL反応を誘導できる可能性を示している。しかしながら、CTL誘導は一過性であり、活性化されたCTLを再びsilentな状態にする機序が働いていることが推定さ

れた。

HBV transgenicマウスにおいては、HBs抗原はtransgeneでcodeされた抗原であることより、自己抗原の一つと考えられる。樹状細胞を用いてその自己抗原に対するCTL反応が誘導できた本実験の結果は、たとえ自己抗原であっても、樹状細胞によってT細胞に提示された場合にはそれに対するCTLが活性化される可能性があることを示唆している。同様な結果は最近になって、別のシステムを用いて報告されるようになってきており<sup>5), 6)</sup>、今後、自己免疫反応の活性化における樹状細胞の役割を詳細に検討してゆく必要がある。

### 参考文献

- 1) Chisari FV, Ferrari C.: Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:29-60.
- 2) Chisari FV.: Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J. Clin Invest* 1997; 99:1472-1477.
- 3) Wirth S. et al.: Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis B virus envelope transgenic mice. *J Immunol* 1995; 154:2504-2515.
- 4) Steinman RM.: The dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996; 24:859-863.
- 5) Gong J. et al.: Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6279-6283.
- 6) Ludewig B. et al.: Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med* 1998; 149:1493-1501.

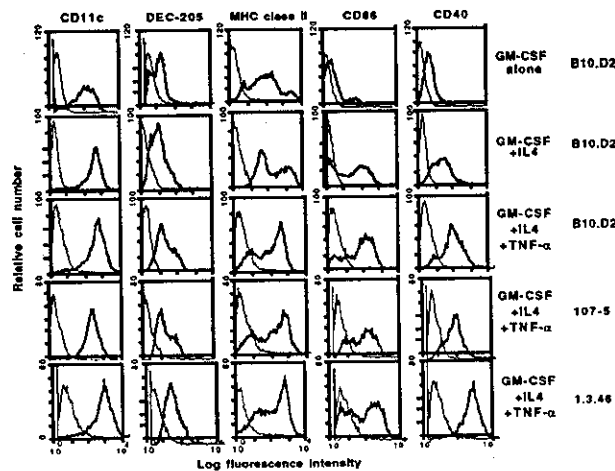


図1 HBV transgenicマウスと同系nontransgenicマウスの骨髄細胞からの樹状細胞の誘導とサイトカインの影響。HBV transgenicマウス (107-5と1.3.46) と同系nontransgenicマウスから、骨髄細胞を採取し、種々のサイトカイン存在下に7日間培養した後、その表面マーカーをsingle histogramで解析した。その結果、各分子の発現は、GM-CSF、IL-4とTNF-alphaの3種類のサイトカイン存在下で培養した時に最も強く、HBV transgenicとnontransgenicマウスでは、有意の差を認めなかった。

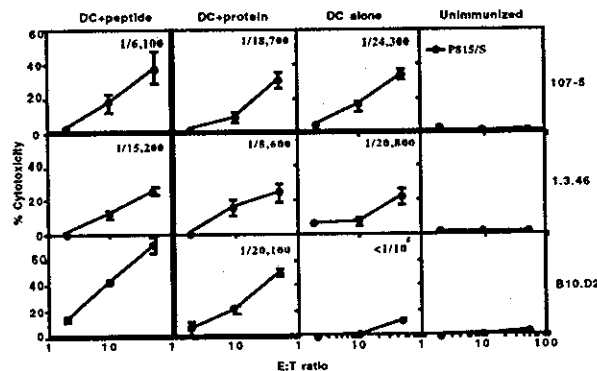


図2 HBV transgenic (107-5と1.3.46) とnontransgenicマウスにHBs28-39ペプチド (DC+peptide)、あるいはHBs抗原蛋白 (DC+protein) をパルスした樹状細胞、あるいは前処理なしの樹状細胞 (DC alone) を注入し、2週間後にその脾細胞を採取した。脾細胞はP815/PreS1 transfectantとEL-4培養上清とともに7日間培養した後、<sup>51</sup>CrでラベルしたP815、P815+HBsペプチド、あるいはP815/S transfectantを標的細胞として細胞障害試験を行った。さらに、その対照として、免疫していないマウス (unimmunized) の脾細胞も同様に培養し、その細胞障害活性を測定した。

# 内在性抗原提示と免疫識別の分子機構

東京都臨床医学総合研究所・化学療法研究部門

田中 啓二

協同研究者：棚橋伸行，千葉智樹

## はじめに

免疫は自己と非自己を識別して自己に有害な非自己を選択的に破壊し，病原体などの侵入から生体を防御するシステムである。したがって，自己と非自己の識別は，免疫システムが作動する基盤であり，この破壊はガン・エイズ・自己免疫病（激症肝炎等を含む）など重篤な免疫疾患の原因となることが予想される。この免疫識別の分子の基礎は，抗原からMHCリガンド（抗原ペプチド・T細胞エピトープ）を切り出し，そのレセプター・輸送担体であるMHC分子に結合させてから細胞表面に提示してTリンパ球に認識させること，すなわち抗原エピトープの生成と選別の生化学反応にある。したがって，抗原タンパク質からのMHCリガンドの生成は，非自己選別の科学的実体であるとも考えられる。この内在性抗原のプロセッシング反応には巨大な多成分複合体であるプロテアソームが重要な役割を果たしていることが判明しつつある<sup>1)</sup>。とくに我々は，これまでにガンマ型インターフェロン（IFN- $\gamma$ ）がプロテアソームの触媒ユニットや活性化因子PA28の発現制御に積極的に関与していることを明らかにしてきた。本研究では細胞性免疫の初反応，すなわちMHCクラスI結合リガンドの生成を触媒するプロテアソームがガン変異蛋白質・ウイルス蛋白質などの様々な標的抗原から如何にしてMHCリガンドを生成するかを明らかにして，免疫識別の分子機構を解明することを研究目標として設定した。

## 対象と方法

(1) プロテアソームを哺乳動物から精製し，内在性抗原のプロセッシング反応を触媒する酵素として実験に供する。(2) プロテアソーム活性化因子PA28を精製してプロテアソームと会合させたのち，その複合体をグリセロール密度勾配遠心法で分離して実験に供する。(3) 腫瘍拒絶抗原ペプチドを含む20-30merの長さのポリペプチドを化学合成して内在性抗原の前駆体モデル基質として実験に供する。(4) 種々の合成ポリペプチドを活性化因子PA28の有無でプロテアソームと反応させたのち，生成ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィーで分離する。分離したペプチドのアミノ酸配列をエドマン分解法およびマススペクトロメーターで決定し切断様式を決定する。(5) プロテアソームの生成産物が，実際に細胞

傷害性キラーT細胞を活性化誘導できるか否かについて，エフェクターT細胞とアイトープで標識した標的モデル細胞を用いたインビボの細胞傷害性実験によって検討する。(6) 免疫プロテアソームとPA28の遺伝子をノックアウトしたマウスを作製して遺伝学的な機能解析を行う。

## 結 果

(1) プロテアソームが腫瘍拒絶抗原ペプチド（10-mer）をその前駆体ポリペプチド（29-mer）から正確に切り出すこと，そして活性化因子PA28がこの抗原エピトープ生成反応を大幅に促進することが判明した。腫瘍拒絶抗原ペプチドの生成は，回収された生成産物のアミノ酸配列の決定およびエフェクターT細胞の細胞傷害性活性の誘導で確認された。(2) 腫瘍拒絶抗原ペプチドの“切り出し”は，この領域を含むN-末端側およびC-末端側のアミノ酸の長さに依存し，短いポリペプチドの場合には切り出し不可であった。即ち，抗原ペプチドの両端のFlankingペプチド領域がプロテアソームによる補足のためのアンカーになっていることが示唆された。(3) 活性化因子PA28はプロテアソームによる“切り出し”活性が認められない短い前駆体ペプチドからも抗原ペプチドを正確に切り出す能力を有することが判明した。この結果，PA28は基本的にはプロテアソームによるsingle-cutペプチド切断反応を促進するが，適当な前駆体ポリペプチドの場合にはdouble-cutペプチド切断反応をも促進し，正確に抗原ペプチド生成を増強することが示唆された<sup>2)</sup>。(4) 腫瘍拒絶抗原ペプチド領域内部のプロリンをアラニン置換すると“切り出し”活性に大きく影響すること，すなわち抗原ペプチドが生成されずに前駆体ポリペプチドは無差別に分解されることが判明した。したがって，プロテアソームによる分解に抵抗性を示す領域が抗原エピトープとして選択されていることが示唆された。さらに我々はプロリン残基がプロテアソームによる無秩序な分解から抗原エピトープを防御する機能を推定し，この仮説を“プロリンルール”と命名した。(5) IFN- $\gamma$ で誘導されるサブユニットが置換した“免疫プロテアソーム”を発見すると共に，プロテアソームの2種の触媒ユニットであるPA700とPA28を両端に会合した“ハイブリッド型プロテアソーム”の存在を見出した<sup>3)</sup>。これらのサイトカイン応答型プロテアソームの免疫学的役割を解明するために，遺伝学的機能解析を準備した。

## 考 案

以上の結果，プロテアソームが腫瘍拒絶抗原ペプチド（10-mer）を含む前駆体ポリペプチドから，MHCリガ



ンドを前駆体領域の長さで配列を識別して生成していることが判明した。さらに、プロテアソームが抗原ペプチドの生成酵素である条件として、抗原ペプチド領域を切断しないことと抗原ペプチドの両端のFlankingペプチド領域を補足することによって抗原ペプチド領域を選別していることが示唆された。また、プロテアソーム活性化因子PA28は抗原エピトープの生成活性を増強するとともに切り出し配列の正確性の保証にも関与していることが判明し、この新たに発見された調節因子が内在性抗原のプロセッシング機構に重要な役割を演じていることが示唆された。現在、新たに見出したハイブリッド型プロテアソームの内在性抗原のプロセッシング酵素としての役割の解明を行っている。〈BR〉今後は、我々が発見した「免疫プロテアソーム」の抗原提示における役割を明らかにするためにIFN- $\gamma$ に応答するプロテアソーム遺伝子群のノックアウトマウスを作製するとともにIFN- $\gamma$ 応答型プロテアソーム活性化因子についても同様な分子遺伝学的な方法での機能解析を行う計画を進めている。最終的に、免疫プロテアソームが生体内で重要に作動しているか否かを検証するために健常者及び様々な患者の細胞群における免疫プロテアソーム及びその活性化因子をコードした遺伝子群の発現動態を系統的に解析すると共に、本研究で得た成果を臨床医学的な実践的研究に波及させてゆくことを目指している。

## 結 論

プロテアソームが内在性抗原のプロセッシング酵素として作用することが試験管内における抗原エピトープに生成機構の解明から直接的に証明された。また、プロテアソーム活性化因子PA28は、このプロテアソームによるMHC-リガンド“切り出し”活性を増強することが示唆された。そしてプロテアソームによる抗原ペプチド生成の分子機構として、新たに「Flanking-Anchor」仮説と「プロリンルール」仮説を提唱した。さらに内在性抗原のプロセッシング酵素として作用する有力な候補として“ハイブリッド型プロテアソーム”を見出した。これらの結果は自己と非自己を分子レベルで解明する研究に大きく貢献すると推定される。

## 参 考 文 献

- 1) Tanaka, K., Tanahashi, N., Tsurumi, C., Yokota, K., and Shimbara, N.: Proteasomes and antigen processing. *Adv. Immunol.* 1997; 64, 1-38.
- 2) Tanaka, K., and Kasahara, M.: The MHC class I ligand generating system: Roles of immunoproteasomes and INF- $\gamma$  inducible PA28. *Immunol. Rev.* 1988; 163, 161-176.

- 3) Tanaka, K. and Chiba, T.: The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells*, 1998; 3, 485-498.

## II. 原發性胆汁性肝硬變

## 平成十年度 原発性胆汁性肝硬変報告（総括）

井上 恭一

原発性胆汁性肝硬変（PBC）分科会の本年度の研究課題は従来より行ってきた全国調査の集計、解析の継続及びPBCの病因解明、治療法の開発などである。

全国調査については、本調査を開始してから約20年が経過し、本邦におけるPBCの実態はほぼ明らかにされたものと考えられる。昨年度は1989年末迄に登録された患者群A（1193例）と1990年末迄に登録された患者群B（1843例）の両群の予後を比較し、B群の予後が有意に良好であることを報告したが、今年度はこれらの中で、黄疸を伴った症候性PBC（S<sub>2</sub>-PBC）についてA群（1989年以前に登録された症例）とB群（1990年以降登録例）の予後の比較を行い、診断時血清総ビリルビン値2.0～8.0mg/dlまたは組織学的病期がⅠ期あるいはⅡ期の例ではB群で予後の改善がみられたが、血清ビリルビン値10.0mg/dl以上または組織学的病期Ⅲ期あるいはⅣ期ではA群とB群の間に予後の差異はみられず、中等度の黄疸ではUDCAの投与により予後の改善がみられるが、黄疸の増強とともにUDCA投与の効果は薄れ、これらの高度黄疸例では肝移植が治療の唯一の手段であることが示唆された。またこれらS<sub>2</sub>-PBCの予後予測においてメイヨーモデル、ヨーロッパモデルに比較して、日本肝移植研究会モデルの予測性が高いことが明らかとなった。

PBCの成因については従来より多くの報告がなされて来たが、基本的には標的となる胆管上皮細胞とこれを攻撃する側のリンパ球（effector細胞）の二者の相互関係が大きな問題となる。小林研究協力者は標的抗原として重要な役割を担っていると考えられるPDCE2遺伝子をクローニングし、胆管上皮細胞における細胞特異的遺伝子の発現調節機序の解明を試み、胆管上皮細胞がeffector細胞により攻撃をうける機序の一端を明らかにした。恩地研究協力者は強力な抗原提示能を有する樹状細胞（DC）が、PBCの胆管細胞障害にどのような役割を演じているかを明らかにする目的で、末梢血より単離したDCに対しPDHによる抗原パルスを行い、T細胞増殖が誘導されることを明らかにした。DCはPBCの肝組織中にその存在が証明されることと合わせ、DCがPBCの胆管細胞障害の成立に重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方辻研究協力者はPBCにおけるT細胞レパトアの解析をすすめ、胆管障害にかかわるクローンを見出した。さらにサイトケラチン7（CK7）が病期の進行とともに出現することを明らかにした。牧野研究協力者はマウスにコンカナバリンA（conA）を静脈内投与

することにより、Tリンパ球を活性化し肝炎モデルを作成し、その際みられる病変が雌雄によって異なることから、その際みられるサイトカインの動態について検索し、肝病変がより高度である雌マウスではTNF- $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、MIP-2の値が高く、これらが肝病変の成立に深く関与していることを明らかにし、PBCの発生頻度の性差にも関連することと考えられた。

## 原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査結果（第19報）

関西医科大学・第三内科 井上 恭一

協同研究者：廣原淳子、仲野俊成

関西医科大学・数学

有田清三郎

富山医科薬科大学・第三内科

樋口清博

東京大学大学院・医学系研究科消化器内科

小俣政男、白鳥康史

### はじめに

本邦における原発性胆汁性肝硬変（PBC）の全国調査は1980年より9回にわたり行われ、その集計・解析を著者らが担当してきた。これまでに、本症の実態に関する検討（本会第14・15報）、および長期予後予測のための数学的モデル式（12・13報）さらに時間的因子を考慮した長期予後予測式（16・17報）を作成し報告してきた。前回は、第1～9回調査における全登録症例を対象として、臨床的病態および予後の変化について報告した（18報）。年代別予後解析の結果、1990年以降に登録された症例は以前の症例に比べ有意に予後が改善しており（ $p < 0.00001$ ）、診断時臨床病期別に検討すると、無症候性PBC（asymptomatic PBC:a-PBC）および皮膚掻痒感のみの症候性PBC（symptomatic PBC:s1-PBC）では生存率に有意差は認められなかったが、総ビリルビン値2.0mg/dl以上のs<sub>2</sub>-PBCでは1990年以降の群で予後改善の傾向が認められた<sup>1)</sup>。そこで今回は、s<sub>2</sub>-PBCについて組織学的因子も加えた再検討を行った。

また進行したPBC症例において生命予後に影響を及ぼす因子を多変量解析し、肝移植適応基準の一因子となりうる短期予後予測式作成のためのデータ集積を目的として、1998年1月に既登録症例の一部について詳細な二次調査を実施した。ここでは1999年1月18日における中間集計結果について報告する。今回二次調査によって得られた死亡症例について、既に報告されている短期予後予測式を用いその予測性をretrospectiveに比較検討し

た。

## 対象と方法

### 1. s2-PBCにおける年代的予後の変化

全登録症例3673例のうち、診断時臨床病期s2-PBCであった症例の中で、観察期間1ヶ月以上であり解析に必要なデータを満たしている379例を解析対象とした。症例を1989年12月末までに登録された症例群 (Group A) と1990年1月から1996年12月末までに登録された症例群 (Group B) に二分し、診断時総ビリルビン値・組織学的病期別に生存率を比較した。生存率はKaplan-Meier法を用い、 $p < 0.10$ を有意とした。

### 2. 二次調査

- ①中間集計結果：第1～9回までの全登録症例3673例中、第9回調査時 (1996年12月末実施) における死亡例444例と診断時s2-PBCであった生存例342例を対象として、226施設に対し月毎の詳細な臨床検査データおよび臨床経過、治療歴などの報告を求めた。
- ②モデル式の検討：データの集積できた118例の肝不全による死亡例について、日本肝移植適応研究会モデル<sup>2)</sup>・Mayo update model<sup>3)</sup>・Europe new version model<sup>4)</sup> (表1) による任意観察時より6ヶ月後の予後予測率を死亡前から月毎に求めた。

## 結 果

### 1. s2-PBCにおける年代的予後の変化

- ①解析対象例の基礎統計：対象としたs2-PBC全体の平均年齢は51歳 (23～83歳) で、平均観察期間は42ヶ月である。これら全症例の5年・10年生存率は各々50%・28%であった。1989年末までに登録された症例 (Group A) は221例で、1990年以降に登録された症例 (Group B) は158例である。診断時総ビリルビン値段階別 (T-Bil  $\geq 2$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 8$ mg/dl) に、また診断時組織学的病期が明らかであった症例について病期別 (Scheuer分類 I + II, III, IV期) に検討した場合の各々の症例数、性別比、平均年齢、臨床検査成績、ウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid : UDCA) の使用頻度を表2に示す。各群ともGroup A, B間において、UDCA以外有意差は認められなかった。
- ②総ビリルビン値別での検討 (図1)：診断時のT-Bil別にGroup A, B間の生存率を比較した結果、T-Bil  $\geq 2$ ,  $\geq 5$ mg/dlでは1990年以降の群は以前の群に比べて有意に生存率は高かった (各々 $p = 0.0637$ ,  $p = 0.0536$ )。一方、T-Bil  $\geq 8$ mg/dlでは、二群間の生存率に有意差は認められなかった。

- ③組織学的病期別での検討：診断時の組織学的病期別に二群間の生存率を比較した結果を図2に示す。I + II期では1990年以降の群は以前の群に比べて有意な生存率の改善 ( $p = 0.0086$ ) が認められたが、III期、IV期では認められなかった。

### 2. 二次調査

- ①中間集計結果：調査表送付症例中、回答例は死亡200例、診断時s2-PBCであった生存112例、消息不明99例で、回収率は53%であった。各々の転帰の内訳を表3に示す。死因の明らかであった149例のうち83.9%は徐々に肝不全が進行して死亡に至っており、10.1%は食道静脈瘤破裂・消化管出血による死亡であった。肝不全による死亡例のうち、死亡時T-Bil 8mg/dl以上であった118例 (表4) におけるT-Bil値の推移を図3に示す。死亡24ヶ月前の平均T-Bil値は4.8mg/dlで、11ヶ月前には8.4mg/dlとなり、6ヶ月前頃より急峻な上昇を来し死に至る経過をたどる。
- ②モデル式の検討：各モデル式による死亡24ヶ月前までの予測率の推移を図4に示す。死亡6ヶ月前の時点において、日本肝移植適応研究会モデルによる6ヶ月後の予想死亡率は約70%、Mayo update modelによる6ヶ月後の予測生存率は約50%、Europe new version modelによる6ヶ月後の予測生存率は約40%であり、日本肝移植研究会モデルの予測性が比較的優れていた。

## 考案・結論

1990年以降の登録症例で認められた予後の改善は、s2-PBCのうち、軽度から中等度の発黄例 (T-Bil 2～8mg/dl) で、また組織学的にも進展度の低い例において認められた。1990年以前の症例群と以降の群間にはUDCAの使用頻度に明らかな有意差が認められ、UDCAが予後に影響を及ぼしていることが示唆された。一方T-Bil 8mg/dl以上または組織学的病期III・IV期では予後の改善が認められなかったことより、現在の内科的治療効果に限界が想定され肝移植を検討すべき対象と考えられた。

本邦においても、既にPBCに対して数十例の生体肝移植が行われ、生命予後のみならず術後のquality of lifeの改善には著しいものがある。その有用性が広く認識されるにつれてさらに今後対象症例の増加が予想される。今回行った死亡例のretrospectiveな検討では、1991年に日本肝移植適応研究会から出されたlogistic 回帰分析によるモデル式が比較的予後予測性に優れていた。最近の予後の変化に対応できる予測式作成を目的として、さらに二次調査結果の解析を進める予定である。