

20020715

厚生労働科学研究補助金

特定疾患対策研究事業

難治性の肝疾患に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 戸田 剛太郎

平成15（2003）年4月

序

難治性の肝疾患調査研究班の今後3年の継続が決まった。研究班の目的は診断基準の作成、新しい診断法の開発、治療指針の作成、新しい治療法の開発を通じて国民の福祉向上に資することである。しかし、これらの目標達成のためには基礎的な研究も重要である。

本研究班における研究対象疾患は自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、劇症肝炎である。新たに原発性硬化性胆管炎を加えることも考えている。原発性硬化性胆管炎はその発症に自己免疫性の機序が関わっていると想定され、このような意味では自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変の類縁疾患であり、欧米では自己免疫性肝炎とのoverlap症例の高頻度が報告されている。

自己免疫性肝炎は肝実質細胞障害に自己免疫性機序の関与があると考えられているが、特異的な診断マーカーがなく、診断に難渋する症例もある。したがって、特異的な診断マーカーの開発も依然として大きな課題である。また、治療についても、コルチコステロイドの有効性は確立されているものの、無効例も少なからず存在する。小児の自己免疫性肝炎ではコルチコステロイドによる成長障害という大きな問題がある。また、治療の目標をどこに置くかも重要な課題である。わが国の自己免疫性肝炎はコーカソイドのそれとは遺伝免疫学背景が異なり、治療反応性も異なっている。

原発性胆汁性肝硬変についてはその典型例の診断についてはほぼ確立されているように思われる。しかし、自己免疫性肝炎との鑑別が困難な例も存在する。原発性胆汁性肝硬変は胆管障害を主体とする自己免疫性肝疾患であるが、自己免疫性肝炎においても胆管障害をみることがしばしばある。また、症候性原発性胆汁性肝硬変症例の治療は大きな問題である。移植医療の不十分なわが国ではいかにして肝移植が必要な病態への進展を阻止するかが最も重要な課題である。

劇症肝炎は依然として予後不良の疾患である。肝移植によって目覚ましい予後の改善がみられるが、ドナー肝の不足は深刻である。劇症肝炎の成因は多様でありウイルス、自己免疫、薬物などさまざまな原因で発症する。一方、ウイルス性疾患の治療薬としての抗ウイルス薬、また、自己免疫抑制のための免疫抑制薬も次々と開発されており、これらの薬物を劇症肝炎の治療にいかに有効かつ適切に使用するかが現在われわれに求められている課題と考えられる。本研究班では治療の前提としての成因診断のための基準を提案したが、これが予後改善につながって欲しいと切に願っている。

平成15年4月

難治性の肝疾患調査研究班
主任研究者 戸田 剛太郎

目 次

はじめに 主任研究者 戸田 剛太郎 (東京慈恵会医科大学消化器肝臓内科)

I. 総括研究報告書

難治性の肝疾患に関する研究	1
戸田 剛太郎 (東京慈恵会医科大学消化器肝臓内科)	

II. 分担研究報告

II-1. 自己免疫性肝炎

1. 自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変における細胞障害性 Tリンパ球関連4(CTLA-4)遺伝子の遺伝子多型の解析	7
三田村 圭二 (昭和大学医学部第二内科)	
2. マイクロサテライト多型・SNP解析を用いた自己免疫性肝炎の疾患感受性の解析	9
清澤 研道 (信州大学医学部内科学第二)	
3. 自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病変における網羅的遺伝子発現頻度解析	11
田中 直見 (筑波大学臨床医学系消化器内科)	
4. 自己免疫性肝炎病態とcostimulatory moleculeとの関連性についての検討	12
栗山 茂樹 (香川医科大学第三内科)	
5. 自己免疫性肝炎における急性発症例からみた肝細胞障害機序	15
熊田 博光 (虎の門病院消化器科)	
6. 急性肝炎様発症自己免疫性肝炎について	18
恩地 森一 (愛媛大学医学部第三内科)	
7. マウス自己免疫性肝炎モデル作製の試み	19
各務 伸一 (愛知医科大学消化器内科)	
8. ConA誘発マウス肝炎モデルを用いた免疫学的肝細胞障害の発症とその制御機構の検討	20
牧野 勲 (旭川医科大学第2内科)	
9. 自己免疫性肝炎におけるSLA/LP抗体：頻度・意義と対応抗原の解析	24
宮川 浩 (帝京大学医学部溝口病院第4内科)	
10. 自己免疫性肝疾患における抗carbonic anhydrase II抗体—その測定法の検討—	26
池田 有成 (東京厚生年金病院内科)	
11. 自己免疫性肝炎におけるステロイド中断後の予後に及ぼす因子の解析	29
森實 敏夫 (神奈川歯科大学附属病院内科)	

12. 自己免疫性肝炎の予後調査と複数回肝生検施行例の検討	31
渡部 幸夫 (国立相模原病院内科)	

13. 難治性の肝疾患に関する研究	35
中沼 安二 (金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学)	

II-2. 自己免疫性肝炎

14. 国際共同研究にもとづいた日本人自己免疫性肝疾患の特性	41
石橋 大海 (国立病院長崎医療センター臨床研究センター)	

15. 小児自己免疫性肝炎の全国調査	43
松井 陽 (筑波大学臨床医学系小児科学)	

16. 自己免疫性肝疾患における遺伝子多型の包括的解析	45
戸田 剛太郎 (東京慈恵会医科大学内科学講座消化器肝臓内科)	

17. 自己免疫性肝疾患境界病変の発現遺伝子プロファイルを用いた解析	47
小林 健一 (金沢大学大学院医学系研究科内科)	

18. プロテインチップによるAIHとPBCの特異的蛋白の解析	49
西口 修平 (大阪市立大学肝胆膵病態内科学)	

19. 自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変の遺伝子発現プロファイルとそれを用いた境界病変の診断	51
小俣 政男 (東京大学大学院医学系研究科消化器内科学)	

II-3. 原発性胆汁性肝硬変

20. 原発性胆汁性肝硬変全国調査 (第23報)	55
廣原 淳子 (関西医科大学第三内科)	

21. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)に関する臨床調査個人票の有用性の検討	60
森 満 (札幌医科大学公衆衛生学)	

22. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の家族発症例 - 当科における6家系についての検討 -	62
大西 三朗 (高知医科大学第一内科)	

23. 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変形成における自然免疫の関与	63
中沼 安二 (金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学)	

24. 原発性胆汁性肝硬変における免疫異常の解析	65
石橋 大海 (国立病院長崎医療センター臨床研究センター)	

25. 抗ミトコンドリア抗体及び食道静脈瘤発現とPBCstaging, polyIC投与による自己免疫性胆管炎マウスの作成	69
恩地 森一 (愛媛大学医学部第三内科)	
26. 肝内胆汁うっ滞疾患における肝組織中アルカリフォスファターゼ(ALP)の局在の検討	71
向坂 彰太郎 (福岡大学医学部第三内科)	
27. 原発性胆汁性肝硬変における胆管上皮細胞特異的遺伝子発現の解析	72
白鳥 康史 (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)	
28. 原発性胆汁性肝硬変に対する生体部分肝移植	74
幕内 雅敏 (東京大学大学院医学系研究科肝胆膵外科人工臓器移植外科)	
29. 国立病院・療養所における原発性胆汁性肝硬変データベース構築： 第四報—老年者原発性胆汁性肝硬変の臨床像—	79
酒井 浩徳 (国立病院九州医療センター消化器科)	

II-4. 劇症肝炎

30. (1)劇症肝炎及びLOHFにおけるHEV感染の意義	83
(2)オステオポンチントランスジェニックマウス：新たな劇症肝炎モデル	
藤原 研司 (埼玉医科大学第三内科)	
31. 急性肝炎の劇症化予知に関する研究	85
鈴木 一幸 (岩手医科大学第一内科)	
32. 重症型アルコール性肝炎の全国調査—平成13年度集計結果—	90
石井 裕正 (慶應義塾大学医学部消化器内科)	
33. コンディショナルノックアウトマウスを用いた肝細胞におけるBc1-xLの機能解析	94
林 紀夫 (大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学)	
34. 微生物由来のCpG DNAによるconcanavalin A誘発肝炎の増悪	97
佐藤 由紀夫 (福島県立医科大学第2内科)	
35. 急性肝不全時の肝外分泌蛋白の生成調節	100
与芝 真 (昭和大学藤が丘病院消化器内科)	
36. I：自己骨髄細胞を用いた難治性肝疾患に対する細胞療法の開発	103
II：劇症肝炎時におけるアポトーシス誘導因子であるチトクロムC血清中濃度の 臨床的検討について	105
沖田 極 (山口大学医学部先端分子応用医科学講座消化器病態内科学)	

37. 劇症肝炎に対するHGF治療法の確立.....	106
坪内 博仁 (宮崎医科大学内科学第二内科)	
38. CTLA 4 Igを用いた免疫抑制による劇症肝炎の治療の試み	108
渡辺 明治 (富山医科薬科大学医学部第三内科)	
39. ウイルス性肝炎および肝硬変に対する肝移植の検討.....	109
川崎 誠治 (順天堂大学医学部第二外科)	
40. 難治性の肝疾患に関する研究.....	110
森脇 久隆 (岐阜大学医学部消化器病態学)	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	115
班員名簿	125

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

難治性の肝疾患に関する研究

主任研究者名 戸田剛太郎 東京慈恵会医科大学 内科学講座 消化器肝臓内科 教授

分担研究者名

大西三朗（高知医科大学第一内科）
藤原研二（埼玉医科大学第三内科）
小俣政男（東京大学大学院医学系研究科器官病態内科学(消化器内科学)）
川崎誠治（順天堂大学医学部第二外科学）
中沼安二（金沢大学大学院医学研究科形態機能病理学）

A. 研究目的

難治性の肝疾患として自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、およびこれらの類縁疾患並びに劇症肝炎(FH)を含む急性および亜急性肝不全を対象とする。これら疾患のわが国における実態とその変遷、発症機序、診断法、肝移植を含めた治療方策およびQOLを改善するための方策に関する研究を基にして、より有効で確実な診断・治療法の確立と予後改善を目指し、国民の保険医療向上に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

①全国調査を継続し、わが国における実態把握を行うとともに、研究の結果得られた新たな事実を踏まえたよりの確かな診断・治療指針を明らかにする。②新たな治療法として、AIHに対するウルソデオキシコール酸、PBCに対するベザフィブラート、B型FHに対するラミブジンの効果に関する試験研究を継続し、その有用性、有効性を明らかにする。また、再生医療を勘案した新しい治療方策について検討する。③疾患モデルを含む病態解析を含む基礎的検討を継続する。本年度はPBCについての全国集計のまとめ、劇症肝炎症例登録と従来症例との比較、それぞれの疾患における、診断・治療に関する実験的、臨床的、さらに疫学的検討を行った。また、特に、病態解析においては、DNAチップ、SNPチップ、プロテインチップ等を用いた分子医学的解析を開始し、治療においては再生医学応用を考慮し、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生、HGF投与方法、スーパー肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝の実験的検討と臨床応用に向けての解析を行った。

C. 結果と考察

①AIHの疾患感受性遺伝子としてHLA非関連遺伝子CTLA4の遺伝子多型の意義、DNAチップを用いた網羅的解析、SNP解析による検討が更に進められ、従来のHLA-DR4以外の遺伝子因子の存在が示唆されるとともに、PBCとは異なる遺伝子発現病態を示すことが明らかとなった。更に、プロテインチップによる解析も開始されており、分子医学的技法による今後の解析

の発展が期待される。小児症例の存在が明らかになり、その診断は従来の成人に対する診断指針では困難な場合が多く、また、治療に当たっても発達成長を勘案する必要があることから、小児症例に対する、診断・治療指針確立が必要であり、次年度から作業をすすめることが確認された。また、急性発症型AIHの診断も小児例と同様に困難であり、より適切な診断指標の確立に向けて更なる検討が必要である。一方、AIHの診断において重要な意義を有す病理組織所見、特にPBCとの異同が問題となる胆管病変については、診断医間での所見の相違が問題となることが明らかにされた。この点の解決策として、全国集計で集積された標本から典型的所見を抽出し、この所見を配布することが計画された。UDCAの臨床効果に関する試験研究については症例登録が継続されている。

②PBC症例の全国調査が継続して行われた。2001年12月末に実施した第11回PBC全国調査により、既登録症例1793例と新規登録769例の報告が得られ、総登録症例は5129例となった。5年生存率はa-PBC 97%、s1-PBC 89%、s2-PBC 54% 10年生存率は各々90%、72%、35%であった。年代別予後解析の結果、a-PBC、s1-PBCおよび軽度(T-Bil値2-5mg/dl、組織学的病期IまたはII)のs2-PBCでは、1990年以降に診断された群は以前の群と比較して予後が有意に改善していた。多変量解析の結果、軽度s2-PBCの群の予後にUDCAの影響が示唆され、当班研究で明らかにしたUDCA投与の臨床的有用性が確認された。しかし、内科的治療により生存期間の延長が十分期待できないT-Bil 5mg/dl以上または組織学的病期III・IV期群では、肝移植適応の検討が必要である。また家系調査が進められ、PBCの家系歴を有することはPBC発症の危険因子になることが示された。抗ミトコンドリア抗体のプロフィールが多くの家系内発症例で同一であることに関しては、何らかの遺伝的要因あるいは環境因子の存在を想定させ、今後、全国集計を基に多数例での検討を行う予定である。病態解析に関する免疫学的、モデル動物を用いた解析が進められた。現在進行症例では唯一の治療法である肝移植はわが国では生体肝移植によりなされている。適応の参考となる日本肝移植適応研究会モデルによる移植対象症例の6か月死亡率とMayoモデル(update)による6か月死亡率との間には相関がなく、ともに対象症例のほとんどが100%死亡の判定となるため、手術適応を考慮する指標にはならなかったが、62%の症例ではMayoモデルrisk score (conventional) は平均値8.2 (5.3-11.6)と、手術リスクの高いとされる7.8を越えていた。3年累積生存率は85%と、その成績は良好であるが、今後は生体

肝移植を踏まえた適応基準の確立が必要である。ベザフィブラートの試験研究の症例登録が継続されている。

③FHの全国集計が継続され、新たに101症例が登録され、前年に比し自己免疫性症例が低率であったが、基礎疾患や薬剤歴を有する症例は高頻度であり、成因ではB型が最も多いなどは従来と同じ傾向を示した。また、新たにE型肝炎ウイルスが成因として認知された。肝移植の実施率は前年より更に高率となっており、また、昏睡出現から肝移植までの日数も短縮していることが明らかになった。この結果、肝移植実施例も含めた救命率は、急性型が50%以上、亜急性型とLOHFは40%以上に達していた。しかし、肝移植適応ガイドラインは正診率が急性型で特に低率であり、また、亜急性型もspecificityが低いなど、病型ごとに改変する必要があることが判明した。新たな治療法として自己骨髄細胞を用いた肝再生の誘導、HGFを用いた治療、スーパー肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝などの臨床応用へ向けての検討が加えられた。骨髄細胞からの肝細胞への分化・増殖のGFP (Green fluorescent protein) transgenic miceを用いた in vivo評価モデルでは、血清アルブミン値が有意に改善し、また生存率も有意に改善したことより『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法(細胞療法)』は臨床応用可能な次世代の移植療法となりえる可能性が示された。HNF-4遺伝子を導入した肝細胞は高度の肝細胞特異機能を発現し、スーパー肝細胞として人工肝に応用可能である可能性が示された。

D. 結論

症例の集積により、診断・治療に関わる有用な情報が確実に集積されつつある。一方、AIHにおいては急性発症症例や小児例など、現時点での診断指針、治療指針では対応困難な症例が存在することも明らかとなり、これらに対する明確な診断・治療指針の確立が今後の課題である。病態解析に不可欠な適切な動物モデルが確立されつつあり、また、分子医学を駆使したDNAチップ、SNPチップ、プロテインチップなどの解析は今後の診断・治療法の発展に寄与することが期待される。PBC、FHともに進行症例の治療は現在肝移植が唯一の方法である。移植後の予後は良好であるが、わが国の移植は殆どが生体肝移植であり、現状を踏まえた移植適応基準の再検討も必要である。移植を遅延あるいは回避できる、肝機能補助、肝再生促進に関する研究として、骨髄細胞の利用、HGFの利用さらにはスーパー肝細胞の応用に関しての研究が進められている。新たな治療薬に関する3つの試験研究は現在継続中である。

II. 分担研究報告

Ⅱ-1. 自己免疫性肝炎に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変における細胞障害性
Tリンパ球関連4(CTLA-4)遺伝子の遺伝子多型の解析

研究協力者 三田村圭二 昭和大学医学部第二内科教授

研究要旨：自己免疫性肝疾患におけるCTLA-4遺伝子の遺伝子多型を蛍光PCR-SSCP法で検討した。対象は自己免疫性肝炎(AIH) 20例, 原発性胆汁性肝硬変(PBC) 32例, 慢性ウイルス肝炎(CVH) 117例, 正常対照(NC) 133例である。CTLA-4遺伝子のエクソン1の一塩基置換(A49G)によるGアレル過剰発現は, AIHの45%, PBCの66%, CVHの60%, NCの62%に認められ, 4群間に差を認めなかった。わが国のAIHのGアレル過剰発現は欧米より有意に少なかった(45% vs 67%)。わが国の自己免疫性肝疾患は欧米と比べCTLA-4遺伝子の関与は低い。わが国のAIHのCTLA-4遺伝子多型が欧米より低いことは, わが国に軽症例が多いことと関連している可能性がある。

共同研究者

柴田 実²⁾, 柳川達郎²⁾, 島崎とも江³⁾, 牧野玲子³⁾
2) NTT東日本関東病院消化器内科,
3) 昭和大学医学部臨床系共同研究室

A. 研究目的

ヒト染色体2q33の細胞障害性Tリンパ球関連-4遺伝子(cytotoxic T lymphocyte associated-4: CTLA-4)の遺伝子多型(エクソン1の49番目の塩基のAからGへの置換, A49G)とバセドウ病, 橋本病, 甲状腺関連眼窩症, I型糖尿病, アジソン病, 関節リウマチなどの種々の自己免疫疾患との関連が報告されている¹²³⁴⁵。最近, 自己免疫性肝炎(AIH)および原発性胆汁性肝硬変(PBC)においてCTLA-4の遺伝子多型(49番のGアレル過剰発現)が健常人よりも有意に多いと報告された⁶⁷。今回, わが国の自己免疫性肝疾患におけるCTLA-4遺伝子の遺伝子多型を検討した。

B. 研究方法

1) 対象

AIH 20例(男性1例, 女性19例, 平均年齢60±13歳), PBC 32例(男性8例, 女性24例, 平均年齢62±10歳), 慢性ウイルス肝炎(CVH) 117例(男性64例, 女性53例, 平均年齢54±18歳), 正常対照(NC) 133例を対象とした。CVHの内訳はB型肝炎ウイルス感染が26例, C型肝炎ウイルス感染が91例であった。

2) 方法

末梢血リンパ球よりDNAを抽出し, Fluorescence-based PCR-Single strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を用いてCTLA-4遺伝子の遺伝子多型を解析した。CTLA-4遺伝子のエクソン1の49番塩基を含む259塩基領域を5'末端に蛍光標識したプライマーをもちいたPCRにて増幅し, オートシーケンサーにより電気泳動, 解析を行い, 検出されたピークのパターンから多型配列の組み合わせを決定した。

C. 研究結果

1) CTLA-4遺伝子の遺伝子多型

エクソン1の49番塩基のAAアレル, AGアレル, GGアレルの出現はAIHでは11例(55%), 7例(35%), 2例(10%), PBCでは11例(34%), 17例(53%), 4例(13%), CVHでは47例(40%), 58例(50%), 12例(10%), NCでは50例(38%), 67例(50%), 16例(12%)に認められたが, 4群間に有意差を認めなかった(表1)。

表1 CTLA-4遺伝子多型(A49G)

度数		ALLELE			合計
		AA	AG	GG	
疾患	AIH	11	7	2	20
	CVH	47	58	12	117
	NC	50	67	16	133
	PBC	11	17	4	32
合計		119	149	34	302

AIH: 自己免疫性肝炎, CVH: 慢性ウイルス肝炎, NC: 正常対照, PBC: 原発性胆汁性肝硬変
4群間に有意差は認められなかった (P=0.837)

2) CTLA-4遺伝子Gアレル過剰発現

エクソン1の49番塩基のGアレル過剰発現(AGあるいはGG)はAIHで9例(45%), PBCで21例(66%), CVHで70例(60%), NCで83例(62%)に認められたが, 4群間に有意差を認めなかった(表2)。

表2 CTLA-4遺伝子多型:Gアレル過剰出現

疾患		ALLELE		合計
		AA	GA/GG	
疾患	AIH	11	9	20
	CHV	47	70	117
	NC	50	83	133
	PBC	11	21	32
合計		119	183	302

AIH: 自己免疫性肝炎, CVH: 慢性ウイルス肝炎, NC: 正常対照, PBC: 原発性胆汁性肝硬変
4群間に有意差は認められなかった (P=0.460)

3) 欧米の健常人との比較

Agarwalら⁶⁷⁾が報告した欧米の健常人とわが国の健

常人のCTLA-4遺伝子Gアレル過剰発現は、欧米は153/302(51%), わが国は83/133(62%)であり、わが国の方が有意に高値であった(P=0.024)。

4) 欧米のAIHとの比較

Agarwalら⁶⁾が報告した欧米のAIHとわが国のAIHのCTLA-4遺伝子Gアレル過剰発現は、欧米は105/155(67%), わが国は9/20(45%)であり、わが国の方が有意に低値であった(P=0.045)。

5) 欧米のPBCとの比較

Agarwalら⁷⁾が報告した欧米のPBCとわが国のPBCのCTLA-4遺伝子Gアレル過剰発現は、欧米は144/200(72%), わが国は21/32(66%)であり、有意差を認めなかった(P=0.460)。

D. 考察

細胞障害性Tリンパ球関連-4 (CTLA-4) は細胞性免疫応答に重要な役割を果たしており、種々の自己免疫疾患とCTLA-4遺伝子の遺伝子多型との関係が注目されている。CTLA-4は、CD28と競合して、抗原提示細胞のCD80 (B7-1およびB7-2)に作用するTリンパ球表面分子であり、Tリンパ球活性を抑制する作用を有する。しかし、CTLA-4に特定の遺伝子変異が生じると、CD28との平衡が崩れ、Tリンパ球活性が病的に亢進し、自己免疫異常が出現するとされている。CTLA-4遺伝子は染色体2q33上に局在し、エクソン1の49番目の塩基にアデニン (A) からグアニン (G) への1塩基置換の遺伝子多型が存在する。最近、このAからGへの遺伝子多型が、インスリン依存型糖尿病、自己免疫性甲状腺炎および種々の膠原病の発症に関連していることが報告されている。

今回、AIHおよびPBCなどの自己免疫性肝疾患におけるCTLA-4遺伝子多型の臨床的意義を検討した。その結果、CTLA-4遺伝子Gアレル過剰発現はAIH、PBC、NC、CVHの間で有意差を認めなかった。これはわが国のNCのCTLA-4遺伝子Gアレル発現率が比較的高値で、AIHのCTLA-4遺伝子Gアレル発現率が比較的低値であったためと推定される。CTLA-4遺伝子Gアレル発現率はわが国のNCは62%であり、欧米の健常人で報告された51%より有意に高値であった。わが国のAIHのCTLA-4遺伝子Gアレル発現は47%に認められ、欧米のAIHで報告された68%より有意に低値であった。CTLA-4遺伝子Gアレル発現は自己免疫性肝炎の重症化への関与が推定される。わが国のAIHに欧米より軽症例が多いことは、HLAタイプの差以外に、CTLA-4遺伝子多型の差が関与している可能性が示唆される。

E. 結論

わが国の自己免疫性肝疾患は欧米と比べCTLA-4遺伝子の関与は低いと推定される。

わが国のAIHにおけるCTLA-4遺伝子の遺伝子多型の頻度が欧米より低いことは、わが国に軽症例が多いことと関連している可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

文献

- ¹ Howard TA, Rochelle JM, Seldin MF, et al: Cd28 and Ctl4, two related members of the Ig supergene family, are tightly linked on proximal mouse chromosome 1. *Immunogenetics* 33: 74-76, 1991.
- ² Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, et al: CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 165: 6606-6611, 2000.
- ³ Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, et al: Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Molec Genet* 6: 1275-1282, 1997.
- ⁴ Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al: The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Hum Molec Genet* 5: 1075-1080, 1996.
- ⁵ Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, et al: CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J. Clin. Endocr Metab* 86: 1687-1693, 2001.
- ⁶ Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 31: 49-53, 2000.
- ⁷ Agarwal K, Jones DE, Daly AK, et al: CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 32: 538-541, 2000.

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

マイクロサテライト多型・SNP解析を用いた自己免疫性肝炎の疾患感受性の解析

研究協力者 清澤 研道 信州大学医学部第二内科教授

研究要旨：自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH) は、その疾患感受性にヒト組織適合抗原 (HLA) の遺伝子の関与が示されてきた。わが国では、HLA-DR4抗原を発現する遺伝子に疾患感受性があることが報告されている。昨年は、HLA全領域におけるマイクロサテライト多型とHLA-A, B, C, DR, DQタイピングの組み合わせにより、AIHにおけるHLA領域内の疾患感受性遺伝子はDRそのものである可能性が高いことを報告した。今回は、マイクロサテライト解析から、TNF- α 遺伝子近傍にもAIHの疾患感受性に有意さを認めたことより、SNP解析として、TNF- α のプロモーター領域の遺伝子多型との相関、および欧米で相関があると報告されているCTLA-4の多型について検討した。TNF- α の多型とは相関を認めたが、DRB1*0405との層別解析では有意とはいえ近傍のいくつかの遺伝子を含め、さらに検討が必要であった。また、CTLA-4の多型については相関は認められなかった。

共同研究者

吉澤 要 信州大学医学部第二内科講師
太田正穂 信州大学医学部法医学講師

A. 研究目的

自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis: AIH) は、その疾患感受性にヒト組織適合抗原 (HLA) の遺伝子の関与が示されてきた。わが国では、HLA-DR4抗原を発現する遺伝子に疾患感受性があることが報告されている。しかし、病態の違いやDR4をもたない患者の存在などよりHLA-DR以外の疾患感受性遺伝子の存在が示唆され、多因子性の遺伝疾患であると考えられている。昨年は、HLA全領域におけるマイクロサテライト多型とHLA-A, B, C, DR, DQタイピングの組み合わせにより、AIHにおけるHLA領域内の疾患感受性遺伝子はDRそのものである可能性が高いことを報告した。

今回、AIHにおける遺伝的相関解析を、HLA領域内のマイクロサテライト解析から、TNF- α 遺伝子近傍にもAIHの疾患感受性に有意差を認めたことより、TNF (tumor necrosis factor)- α と、HLA領域外にある免疫関連分子であるCTLA (cytotoxic T lymphocyte antigen)-4の遺伝子多型について検討した。これらは、いずれも欧米においてAIHとの相関が報告されているが、本邦においては否定的であるが論文としての報告はない。

B. 研究方法

AIHスコアで診断の患者73名、コントロールとして非血縁関係の210名において、血清学的にHLA-A, B, C, DR, DQをタイピングした。さらに末梢血よりDNAを抽出し、DR, DQのDNAタイピングを行った。TNF α のプロモーター領域 (-1031, -863, -857, -308, -238) の遺伝子多型はPCR後直接シークエンス法にて、CTLA-4の遺伝子多型(第一エクソン49番)はPCR-RFLP法にて解析した。層別解析はMantel-Haenszel

法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学倫理委員会にて承認を得ており、末梢血よりDNAを抽出し本研究に使用することを患者に説明し、文章にてインフォームドコンセントを行った。コントロールDNAに関しては、血液採取時、同様に承諾を得ている。

C. 研究結果

TNF α のプロモーター領域 (-1031, -863, -857, -308, -238) の遺伝子多型において、欧米でAIHとの相関がみられるTNF*2 (-308A) は患者、コントロール群ともにほとんど認められなかった。TNF α のhaplotype Dが患者に有意に認められた (p=0.026) が、DRB1*0405との層別解析ではp=0.075であった。CTLA-4の多型では、欧米においては、第一エクソンの49番がG (GG or AG)であることとの相関が報告されているが、今回の検討では、やや多いものの有意差は認めなかった (p=0.149)。

D. 考察

AIHは急激に発症し短期間に肝不全にいたるものから、緩徐に発症するもの、ステロイド治療への反応性の違いなど、また、DR4をもたないものも小数存在する。このため、HLA-DR以外の疾患感受性遺伝子の存在が示唆され、多因子性の遺伝疾患であると考えられている。

以上のことを踏まえ、昨年はAIHでの疾患感受性遺伝子の検索をHLA全領域においてマイクロサテライト多型を用いた相関解析にて検討した。この結果、HLA-DR, DQとHLA-Bの近傍にAIHとコントロールの間に有意差を認め、HLA-B54-DRB1*0405-DQB1*0401はハプロタイプをなしていることより、この領域では、HLA-DR遺伝子そのものに疾患感受性があると考えられた。今回、マイクロサテライト多型を用いた相関解析にてTNF- α 近傍にも有意差を認めたこと、

さらに欧米において、相関が報告されていることよりTNF α のプロモーター領域の遺伝子多型を解析した。欧米でAIHとの相関がみられるTNF*2 (-308A)は患者、コントロール群ともにほとんど認められなかったが、これはTNF*2 (-308A)がHLA-DRB1*0301に連鎖不平衡をなしていることに関係しているためであり、日本人においてはHLA-DRB1*0301がほとんど存在しないことにより理解される。また、haplotype Dが患者に有意に認められたが、DRB1*0405との層別解析ではp=0.075となり、さらなる検討が必要であった。さらに、その近傍にある他の遺伝子(LTA, MICB, MICAなど)の多型についても検討する必要がある。

一方、CTLA-4の遺伝子多型では、やはり欧米で報告されている、第一エクソンの49番がGであることと疾患感受性との相関は、今回の検討では認めなかった。これは、人種差によるものと思われた。

今後、順次HLA以外の遺伝子においてもマイクロサテライトマーカーを用いた相関解析を行い、それによって絞り込まれた領域の遺伝子のSNP解析を行い、AIHの発症、病態の解明を目指す。これにより、患者個々の予後の予測、治療法の決定などが可能となると思われる。

E. 結論

HLA全領域におけるマイクロサテライト多型解析により、TNF- α 近傍にAIHとの相関が認められたため、TNF α のプロモーター領域の遺伝子多型を解析し有意差を認めたが、DRB1*0405との層別解析では明らかな相関は認められず、今後の検討が必要であった。また、欧米において認められているCTLA-4の遺伝子多型との相関は日本人においてはないと考えられた。

F. 健康危険情報

ルーチン検査としての末梢血採血時に10mlのサンプルを研究用に使用した。そのため、一般の末梢血採血時における合併症の危険につき説明、理解を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

一條哲也、吉澤 要、清澤研道

当科における自己免疫性肝疾患の実態と変遷—自己免疫性肝炎を中心に—

第88回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション2

(2002年4月25日)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病変における網羅的遺伝子発現頻度解析

研究協力者 田中 直見 筑波大学臨床医学系消化器内科 教授

研究要旨：マウスgraft-versus-host reaction (GVHR) モデルにおいて門脈域の炎症細胞浸潤は経時的に改善傾向を示した。そのトレランス獲得過程に関与する遺伝子群をマイクロアレイの手法により同定し、自己免疫性肝疾患の病態把握や、治療への応用をはかる。

A. 研究目的

マウスのMHCクラスIIの差に基づく移植片対宿主反応 (GVHR) において自己免疫機序の関与した肝病変が観察される。肝組織所見ではGVHR導入5日目より門脈域、中心静脈周囲にリンパ球を中心とした細胞浸潤、胆管上皮内リンパ球浸潤を認め、浸潤細胞の多くがrecipient由来である。また、自己抗体の産生も観察された。しかし、このモデルはヒトの自己免疫性肝疾患やGVHR肝病変と異なり、自然経過で炎症細胞浸潤は改善傾向を示し、線維化や肝硬変には至らない。そこで、このトレランス獲得過程に関与する遺伝子群を網羅的遺伝子発現頻度解析により同定することで、ヒトにおける病態診断や治療ターゲット候補の探索に役立てる。

B. 研究方法

(bm12×B6) F1メスマウスに、ナイロンウールカラムを用いて分離したB6 spleen T cellsを 1×10^7 個静注しGVHRを導入。導入直後をコントロールとして用い、門脈域の炎症のピークの2週目、炎症改善の見られる8週目のマウスのwhole liverを摘出する。これより、total RNAを抽出、逆転写の際に ^{32}P を取り込ませる。このラベルされたcDNAを、あらかじめ約2万個のgene (NIA Mouse 15K, Mouse brain cDNA clones MNCb) で作成されたアレイメンブランにhybridizationさせる。これをimaging plateを用いてスポット化すると、遺伝子発現頻度の程度がスポットの濃淡で表現される。

この濃度の差をArrayVisionで数値化し、GeneSpringを用いて解析を行う。

(倫理面への配慮)

すべてのマウスは筑波大学動物実験取扱規定に基づき飼育管理された。また、実験の際は頸椎脱臼にて安楽死させたため、倫理面に問題がないと判断した。

C. 研究結果

解析可能な約1万5千個のgeneについて解析を行う予定だが、preliminaryな実験では、炎症の経過とともに2週で発現頻度が増加していて、8週で低下しているgeneが多数見られた。一方で、2週で発現頻度が低下、または変わらず、8週で増加しているgeneも見られた。

D. 考察

GVHRの経過に伴って発現頻度が増加してくるgeneは多数存在する可能性があり、今後はfunction別に解析していく必要がある。

E. 結論

自己免疫性肝疾患類似のGVHR肝病変は経時的に改善傾向を示し、この改善過程に働く遺伝子群を同定することで、治療ターゲットの候補を探索できないかと検討中である。これらのgeneは多数存在する可能性があり、今後function別の解析や、免疫関連のgeneに焦点をあわせた解析が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし

G. 研究発表

1. 論文発表

R Unno et al. Progression of autoimmune-mediated hepatic lesions in a murine graft-versus-host reaction by neutralizing IL-10. *Hepatology Research* (in press)

2. 学会発表

海野理恵：抗IL-10抗体投与による自己免疫性肝疾患類似のGVHR動物モデル肝病変の進展 (第38回日本肝臓学会総会 2002 6.13 in大阪)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

自己免疫性肝炎病態とcostimulatory moleculeとの関連性についての検討

研究協力者 栗山 茂樹 香川医科大学 第三内科

共同研究者

黒河内和貴、渡辺精四郎、正木 勉

はじめに

自己免疫性肝炎 (AIH) は肝細胞障害に自己免疫機序が関与していると考えられており、抗核抗体 (ANA)、抗平滑筋抗体 (SMA)、抗肝腎ミクロゾーム抗体 (anti-LKM) など各種自己抗体が出現する。またわが国では、HLA-DR4が疾患感受性因子として同定されており、免疫遺伝学的背景とAIH発症との関連が指摘されている。AIHにおける肝細胞障害機序では実際に肝細胞を障害するeffectorが何であるかについての明確な解答はこれまでのところ得られていない。さらに、AIHの診断については、国際診断基準が検討され、以前よりは診断が容易となってきたが、依然AIHの診断に苦慮する症例も中には存在する。AIHにおいて肝臓内に浸潤している多くのリンパ球はCD3陽性T細胞であることがわかっている。T細胞は樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞 (APC) よりシグナルを受けるが、この際costimulatory分子を介する副シグナルがT細胞の活性化にとってきわめて重要であることが明らかとなっている(1)。しかし、AIHとこれらcostimulatory分子との関連については不明の点が多い。そこで今回、AIH症例の末梢血単核球 (PBMC) と肝浸潤単核球 (LIMC) におけるcostimulatory分子発現とAIHの病態との関連性について検討した。

対象と方法

ANA陽性で国際診断基準でprobable以上のAIHと診断された29例 (男性2例、女性27例) を対象としPBMCの解析を行った。このうち肝生検を施行した12例についてLIMCの解析を行った。健常人25例を対照とし、疾患対照群として、C型慢性肝炎 (CAH) 患者10例について検討した。PBMCは末梢血より、LIMCは16ゲージ肝生検により採取した約1cm長の肝組織よりFicoll-Conray比重遠心法により調整した。調整後、抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗CD152 (CTLA-4)抗体、抗CD69抗体により処理後、flow cytometryにより陽性細胞比率を測定した。

結果

健常人とAIH患者のPBMCの検討では、CD80とCD152 (CTLA-4)、CD86陽性細胞は、健常人と比べ患者において有意に低値を示していた。しかし、CD86陽性細胞については、PBMC中では健常人、患者ともに約1~2%と低値を示し、きわめてその存在比率

が低いことがわかった (Table 1)。

Table 1

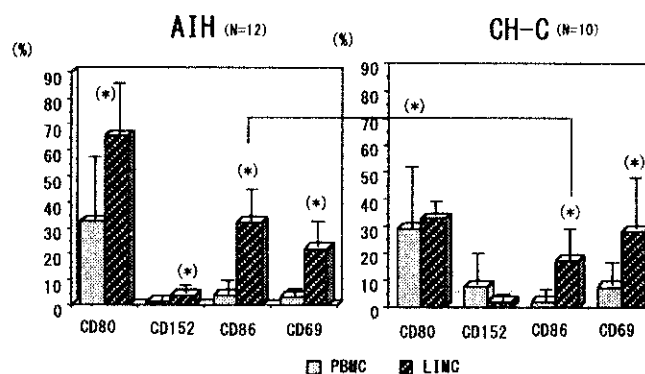
Analysis of costimulatory molecules expressed on PBMC in patients with AIH

	Control (N=25)	AIH Patients (N=29)	p-value
CD80	41.3 ± 7.04	32.7 ± 23.5	(0.008)
CD86	1.15 ± 1.19	0.78 ± 0.75	(0.04)
CD152(CTLA-4)	13.8 ± 10.9	2.32 ± 2.80	(0.01)

(%)

次に、本来なら健常人とAIH患者間でLIMCについて解析するところであるが、健常人よりLIMCを採取するのは倫理的に困難であるため、AIH患者とCAH患者におけるPBMCとLIMC中の各種陽性細胞について比較検討し、どの細胞が炎症の主座である肝臓内により高率に浸潤しているかにつき検討した。T細胞の活性化マーカーであるCD69陽性細胞は、AIH患者、CAH患者両群で、LIMC中の陽性率がPBMC中より有意に高値を示していた。CD80陽性細胞は、AIH患者でPBMC中に比べLIMC中に多く存在しており、CAH患者ではこのような差を認めなかった。CD86陽性細胞は、AIH患者、CAH患者ともにLIMC中でPBMC中より有意に高値を示していた。しかも、AIH患者ではLIMC中とPBMC中での陽性率は著しく異なり存在の有無が明確であった。また、CAH患者におけるLIMC中CD86陽性細胞比率より、AIHにおけるそのほうが有意に高値を示していた。CD152 (CTLA-4) 陽性細胞ではAIH患者でCD152陽性細胞がLIMC中でPBMC中と比べ有意に高値を示したが、CAHでは差を認めなかった (Fig. 1)。

Fig. 1



以上のように、AIH患者において末梢血と炎症の主座である肝臓内での存在で最もON and OFFが明確な