

福岡

5. 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋。原発性胆汁性肝硬変における CD4+CD25+ regulatory T cell の検討。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡

6. 下田慎治、上平幸史、河野聡、半田瑞樹、中村稔、石橋大海。原発性胆汁性肝硬変の自己抗原反応性 T 細胞の CD28 分子発現について。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡

7. 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋。ヒト肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) の T 細胞に対する抑制作用。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

国立病院における自己免疫性肝炎の治療と肝組織像の推移について

研究協力者 渡部 幸夫 国立相模原病院 内科医長

研究要旨： 1) 1998 年以後国立病院肝疾患政策医療ネットワーク参加施設で自己免疫性肝炎 (AIH) 新規症例を登録してきた。計 391 症例のうち 2002 年 11 月に予後調査を施行し、PSL 治療と AIH の予後について解析した。肝炎ウイルス合併例を除いた 259 例を調査対象としたが、このうちの慢性肝炎 220 例中、経過中に 14 例 (6.4%) が肝硬変に進展した。全経過中のステロイド (PSL) 剤治療の有無、初回治療の反応性、治療経過中の肝機能再燃、PSL 中止の有無などのいずれの要因が肝硬変進展を抑制するかについて検討した結果、PSL 治療の有無のみが統計上有意であった。

2) PSL 治療による AIH の予後を検討するため、治療前と治療中に複数回肝生検を施行した 30 例について肝組織変化を比較した。肝生検組織は 2 人の病理医と 3 人の臨床肝臓専門医の総合評価で点数化した。2 回の肝生検の間で PSL 治療を行わなかった 11 例では、ほぼ全例で線維化 (fibrosis) が悪化進展した。グ鞘炎や piecemeal necrosis、小葉炎の炎症所見は改善する例も散見された。PSL 治療で完全寛解を維持している 10 例では組織 4 項目ともすべて改善したが、炎症所見に比して繊維化の改善は遅れる傾向があり、組織改善には時間差があった。PSL 治療で寛解、再燃のある 13 例では、各因子とも数年経ても平行線をたどるものが多かった。

3) AIH 初期治療における PSL 投与量や PSL 中止、漸減の仕方などの治療方針は予後決定因子として重要である。また、経過を追って肝生検を施行し、肝組織所見改善の程度を十分に把握して PSL 投与量などを決定すれば、再燃回数を減らすことが可能であると考えられた。

共同研究者

中村 陽子 国立相模原病院消化器内科医師
三富 弘之 国立相模原病院 病理

A. 研究目的

AIH は症例数の少ない疾患であり、原因、機序は不明であり、再燃を繰り返しやすい、気がついた時には既に肝硬変進展例であったという症例も少なくない。AIH の長期予後を考慮すると、免疫抑制剤の選択や投与量について、適切量を十分に検討して治療する必要があり、AIH の初期治療、再燃時の投与量、治療中止時期の決定の判断は重要ではあるが、主治医に一任されており、EBM は明らかではない。

よりの確な治療を行うためには何を指標とすべきか、どのような症例が難治例であり、どのような治療が有効かについて解析するため、今回は国立病院肝疾患ネットワーク施設から多数の AIH 症例の治療内容に関する予後調査を行った。さらに治療経過、治療効果と肝組織変化を詳細に検討することとした。

1. ラットに dimethylnitrosamine (DMN) (10 mg/kg) を週 3 回、4 週間腹腔内投与し肝硬変を作製した。Phosphate buffered saline (PBS) または遺伝子組み換え型ヒト HGF 0.3 mg/kg を DMN 投与第 1~4 週に 1 日 1 回 (対

B. 研究方法

対象と方法：国立病院療養所肝疾患政策医療ネットワーク施設において、1998 年から 4 回の AIH 症例の新規登録調査を行い、既に 391 例が集計されている。この AIH を対象に平成 14 年 11 月、各施設に AIH 予後調査を依頼した。予後調査では患者背景因子のほか初診日からの通院状況や初期治療内容と効果、最近の治療内容と肝機能寛解状態、再燃の有無、そして最終受診時頃の肝病態などについて調査した。肝炎ウイルス合併 AIH 例は解析対象から除外し、計 259 例の予後調査が集計され、検討された。

AIH 治療前と経過中の複数回肝生検についても問い合わせた結果、最も多くの複数回肝生検を行っていた国立病院長崎医療センター (20 例) と当

院（10例）の2施設の計30症例について、臨床経過と肝組織所見を対比して検討した。

AIHの治療と肝組織変化との関連を検討するため、PSL治療内容により3群（経過により2群にまたがる症例もあり）に分類した。①PSL未治療11例、②PSL治療で完全寛解し、再燃のない10例、③PSL治療で寛解と再燃を繰り返している13例である。肝組織所見は国立長崎医療センターで以前から使用されていた方法に準じ、fibrosis、グ鞘炎、piecemeal necrosis、小葉炎の4項目について所見の強弱を0~4の5段階で評価した。たとえばfibrosisでは0は正常、5は肝硬変である。病理医2名、臨床肝臓専門医3名の計5名の評価点の中央値をとって各肝組織を評価した。剖検2例を含む総肝生検数は66回（平均2.2回/1例）で、臨床経過の観察期間は 7.2 ± 5.3 年（中央値6.0年）であった。経過観察期間、肝生検間隔の中央値は各群それぞれ①5.9年、1.3年②3.7年、1.8年③8.7年、4.0年であり、再燃のある群で長かった。

C. 研究結果

1. AIHの予後調査

肝炎ウイルス合併AIHを除外した259症例（HCV抗体陽性でHCVRNA陰性の3症例を含む）の集計である。背景因子としては、女性が90%を占め、平均年齢は54歳、平均観察期間は6.6年。現在の通院状況は66%が通院中で、15%が診療を自己中断していた。経過中PSL治療は190例（73%）に行われ、PSL未治療例は69例であったが、そのうちの58%にUDCAが投与されていた。UDCA投与例は総数108例であり、無治療で経過している症例が23例あった。HCC合併は5例にみられ、いずれも肝炎ウイルスは陰性でAIHによる発癌と考えられた（表1）。

治療開始時のAIH肝病態は、慢性肝炎が220例で、そのうち最終病態が慢性肝炎のままが204例（平均観察期間5.9年）、肝硬変への進展が14例（平均観察期間8.7年）に見られた。治療当初から肝硬変であった例は35例あり、劇症肝炎が2例あった。死亡は11例で、慢性肝炎例で5例と最も多いが、死因はすべて他病死であり、肝硬変進展死亡例では肝不全死1例、HCC死2例であった。他に劇症肝炎による肝不全死が2例あった（図1）。

PSL治療内容と肝炎の再燃状況を集計したところ、PSL投与例99例中68例（71%）では1-2回の再燃、29例（29%）では3回以上の再燃を認めている。再燃時にPSL投与を中止していた例は17例/93例、維持または減量中であったのは66例/93例（PSL

量5mg未満が17%、5~10mg未満が47%、10~15mg未満が23%、15mg以上が9%）であった（表2）。

慢性肝炎から肝硬変への進展率を検討した結果、PSL治療の有無で肝硬変への進展に有意差が認められた。AIH発症時のPSL初回治療で完全寛解を得られるか否か、治療中に肝炎再燃があるか否か、治療開始後にPSLを中止した経過があるか否かについては、いずれも肝硬変への進展率に影響を与える因子ではあったが、統計上の有意差は認めなかった（図2）。

PSL治療の初期投与量は記載されている189症例の52.4%において30mg/日以上であった。合併症やAIH疑診例であるためにPSL未使用例も51例（27%）に認められている。初期PSL投与量はピーク時のALT値と関連があるかどうかをみだが、PSL量25mg以下と30mg以上との境界点は、ALT値が0~199IU/Lの比率が53.8%から28.6%に減じ、ALT値500~999IU/Lの比率が17.9%から32.7%に増加しているポイントである。主治医の意向によって決定されたと考えられるPSL初期投与量ではあるが、その後の完全寛解率には差があり、30mg/日では完全寛解率76%、40mg/日では86%と高率であったが、25mg/日以下では67%にとどまった。50mg/日では64%へと完全寛解率が低下してしまう理由は不明であるが、今後、PSL抵抗例がその中に含まれるかどうかの検討を要すると考える。初期投与量による肝硬変への進展率にも差を認め、25mg/日以下では8%と高率であったが、30mg/日では6%であり、40mg/日以上では0%となっている。AIHにおけるPSL初期投与量は30mg/日以上が必要であり、40mg/日以上であれば完全寛解率はより高く、肝硬変への進展率はより低いと考えられた（図3）。

2. 複数回肝生検例について

治療経過と肝組織変化について複数回肝生検30例を対象に検討した（表3）。

PSL治療内容により3群に分類した。①PSL未治療11例、②PSL治療で完全寛解し、再燃のないPSL完全寛解維持例10例、③PSL治療で寛解と再燃を繰り返しているPSL寛解再燃例13例である。

①PSL未治療11例の経過を示す（図4）。一部には発症初期にAIHの確定診断がつかなかった例、一部には発症時の肝組織所見からは非ABC型急性肝炎と考えられた例などが含まれている。大きい星印はAST/ALTが300IU/L以上か、T.Bil 3.0mg/dl以上の肝炎の増悪を示し、小さい星印はそれ以下の肝炎増悪を示す。矢印は肝生検時期を示すが、①群に該当する肝生検時期は太い矢印で示してある。

未治療例の肝組織所見のうちfibrosisは2例

を除いて数年間で悪化している。小葉炎については約半数で改善もあるが、グ鞘炎や piecemeal necrosis では平行線をたどったり、悪化している例が多い (図 5)。

②PSL 完全寛解維持例 10 例の経過を示す(図 6)。肝組織の推移では、fibrosis は 1 のままで経過している 1 例を除いて、大半が改善している。fibrosis 1~2 と繊維化が弱い段階へと改善を認める時期については、多くは治療開始後 1 年半以降であり、しかも fibrosis が 0 となって消失してしまうことはない。一方、グ鞘炎、piecemeal necrosis、小葉炎はすべて改善し、PSL 治療開始後の 1 年未満の早期からの変化が認められる。グ鞘炎については 5 年たっても治まりきらない症例もあり、fibrosis の消失も含めて検討した上で、PSL 治療を中止してよいか否かについては検討する必要がある (図 7)。

③PSL 寛解再燃例 13 例の経過を示す (図 8)。肝組織所見では fibrosis、グ鞘炎、piecemeal necrosis、小葉炎すべてに軽度の改善例や軽度の悪化例が混在している。長期(10 年以上)経過観察例でさえも平行線をたどるものが多く、改善後に悪化する例もある (図 9)。

PSL 治療や寛解再燃の有無で分けた 3 群それぞれについての組織項目の評価点数平均を 1 回目と 2 回目で比較した (図 10)。PSL 未治療例では 4 項目とも不変または悪化し、特に fibrosis において有意に悪化が目立った。完全寛解維持例では 4 項目とも PSL 治療で有意に改善していた。寛解再燃例では 4 項目とも改善はしているが、有意差の認められたのは piecemeal necrosis のみであり、完全寛解例と比べて明らかに肝組織の改善は乏しかった。

D. 考察

今回の予後調査において、合併症のため、または AIH 疑診例であるため、PSL 未使用例も 27%に認められたが、2 回の肝生検組織像の変化を考えると、PSL の使用はできる限り早期より、しかも完全寛解を維持する量で持続するのが望ましいと考えられた。主治医の意向によって決定されたと考えられる PSL 初期投与量で検討すると、その後の完全寛解率には差があり、PSL 初期投与量 40mg/日で完全寛解率は 86%と最高となる。ただし 50mg/日で完全寛解率が低下してしまう理由として PSL 抵抗例がその中に含まれるかどうかの検討を今後すべきと考える。初期 PSL 投与量による肝硬変への進展率にも差を認め、初期 PSL 投与量 40mg/日以上では 0%となっていることより、AIH

における PSL 初期投与量は 40mg/日以上が望ましいのではないかと考えられた。

AIH 治療においては、完全寛解が得られると明らかに肝組織の繊維化や炎症所見が改善するが、治療による繊維化の改善と炎症の改善には時間的なずれがある。fibrosis が改善するのは 1 年以降であり、しかも 3 年以上でも完全には消失することはない。一方、完全寛解が得られると、グ鞘炎、piecemeal necrosis、小葉炎はすべて改善し、しかも PSL 治療開始後 1 年未満の早期から改善が認められる。

経過中に肝生検を行ったうえで、肝組織における繊維化や炎症の程度を十分把握し、再燃時の PSL 増量や他の免疫抑制剤の使用を決定すべきであると考えられた。

E. 結論

多施設合同で AIH の予後調査をし、肝組織変化を集計した結果、AIH の長期予後を改善するには経過中に肝生検を繰り返して行い、治療に反映すべきである。肝硬変への進展を防止するためにも、PSL など免疫抑制剤の投与量、漸減方法、治療の中止時期などを決定する際には肝機能検査成績のみでは不十分であり、肝組織の変化をみるべきである。今後、難治症例の要因を検討し、治療方針を決めていくうえで、多数の症例における治療内容や宿主側の増悪因子、肝組織の変化などを検討していくことが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得：なし
実用新案登録：なし
その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

生体肝移植を受けた原発性胆汁性肝硬変の profile に関する研究

分担研究者 市田 隆文 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 助教授

研究要旨:わが国の生体肝移植レシピエントを調査し、特に自己免疫性肝疾患として原発性胆汁性肝硬変 221 例を中心に検索した。その結果、生体肝移植の移植成績は 5 年生存率 75%と良好であり、原発性硬化性胆管炎や自己免疫性肝炎も同様であった。原発性胆汁性肝硬変の再発は組織学的には 70 例中 7 例(10%)であることが判明したが、特異的な自己抗体である抗糸粒体抗体(AMA)の再陽性率は 70%前後であった。さらに、この頻度をドナーとレシピエント間で血縁、非血縁者間で比較検討すると、非血縁者での AMA 陽性率は HLA クラス I の B locus の一致が深く関与していることが統計学的に示唆された。今後、画期的治療法の開発のためにも生体肝移植に至った症例の背景観察を詳細に行い、病態解明に繋げたいと考える。

A. 研究目的

生体肝移植を施行した自己免疫性肝疾患を集計し、特に原発性胆汁性肝硬変における背景を検索し再発機序を検討することにより、難治性肝疾患としての原発性胆汁性肝硬変の病態解明を目的とした。

B. 研究方法

わが国における生体肝移植の実態調査を日本肝移植研究会の資料を基に独自のアンケート調査を施行し、特に原発性胆汁性肝硬変の症例を集積し、移植成績は元より進行性原発性胆汁性肝硬変へ進展する因子としての 総ビリルビン値、合併症 (osteoporosis, pruritus, varics、肝臓の血流動態異常、HLAclass I、II、さらには肝移植に至った経過としての発病から移植までの期間 (症候性になってからの期間) や移植を実施するにあたっての障害、問題 (移植後の状態、QOL、移植後の医療費、医療費を含めての負担、家族的、社会的、精神的問題) を検索し、今回特に肝移植後の再発を規定する因子としての HLA class I、II や術式 (胆道再建術式) ならびに免疫抑制剤の種類などを検討した。

C. 研究結果

生体肝移植を受けた邦人原発性胆汁性肝硬変は 221 例に及び (表 1)、その 5 年生存率は 75%であった。原発性胆汁性肝硬変の再発を示唆する所見として血清 AMA と生検組織検索があるが、AMA 再陽性者は血縁、非血縁者間ドナーレシピエントの間連でそれぞれ 71%、78%と差異はなく、死亡率も差異はなかった。一方、肝生検組織の検索で

表 1 生体肝移植を受けた自己免疫性肝疾患 (日本)

自己免疫性肝炎 (26)	40.5 ± 14.8 (14-61) 歳
原発性胆汁性肝硬変 (221)	49.6 ± 8.0 (28-69) 歳
原発性硬化性胆管炎 (66)	31.3 ± 14.2 (3-66) 歳
合計 (313)	44.9 ± 12.7 (3-69) 歳

表 2 血縁ドナーと AMA 陽性率/死亡率

	AMA 陽性率	死亡率
非血縁者 3/32 (71%)		17/58 (29%)
血縁者 79/101 (78%)		35/150 (23%)

表 3 AMA の再陽性化と HLA matching の非血縁者ドナー間での比較検討

		(+)AMA 陽性、(-)AMA 陰性、(+)血液型一致、(-)血液型不適合				
		(+)(+)	(+)(-)	(-)(+)	(-)(-)	OR
Locis	A	16	20	4	8	1.6
	B	9	27	1	11	3.7
	DR	10	26	3	9	1.2
PersonA		14	4	3	3	3.5
	B	9	9	1	5	5
	DR	9	9	3	3	1

CNSDC を見出したのは 70 例中 7 例 (10%) であった。これらより、原発性胆汁性肝硬変の再発は 10%と考えられるが、AMA 再陽性も重要な所見であり、これらを解析すると HLA クラス I Blocus の関与が関連していることが推測された。

D. 考察

非血縁者間の生体肝移植に於いて、移植後の AMA 再陽性化は、HLA-B allotype が一致した場合に起こりやすいことが示唆された。一方で、この傾向は HLA-DR locus では認められなかった。また、血縁者間の肝移植に於いては、移植後の AMA 再陽性化は、全ての HLA 抗原 locus の allotype 一致率とは関連していなかった。さらに、従来から報告されている一致した HLA-B のタイプ(51、52)に特定のタイプは認められなく、一致した HLA-DR のタイプに DR8 は多くないことが判明した。今回の HLA-B 抗原との関連は、HLA-B 抗原遺伝子座の極近傍に存在する TNF 多型と関係している可能性が示唆された。

E. 結論

原発性胆汁性肝硬変の生体肝移植の成績は良好で、その再発率は 10%前後と考えられた。しかし病態に関与する自己抗体の AMA の再陽性は HLA クラス IB locus との一致が特に非血縁者で認められたことは、病態解明に寄与するものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

市田隆文：肝移植時の B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルス再感染の予防と治療. 肝胆臓 2003;47(5):715-724.

Ichida T: Artificial liver support system for fulminant hepatic failure as bridge-use to living donor liver transplantation. Internal Med 2003;42(10):920-921.

市田隆文：生体肝移植-EBM から将来へ-、肝疾患の新しい展開、第七回大塚リバーシンポジウム記録、メディカルレビュー社、大阪、pp81-89

市田隆文：生体肝移植におけるドナー選択のピットホール. 今日の移植 2003;16(5):440-450

市田隆文：バイオ人工肝臓の臨床成績と適応. 細胞 2003;35(12):456-458.

市田隆文：原発性胆汁性肝硬変. ダイナミックメディシン 4、下条文武、斎藤康監修、西村書店、新潟、2003 年、15-39 — 15-41

2. 学会発表

Ichida T: Living donor liver transplantation for autoimmune hepatitis in Japan. The Second Single Topics Conference of Japanese Society of Hepatology, 2004-10-13, (Otsu, Shiga)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変に対する EBM の導入に関する研究

分担研究者 西原 利治 高知大学医学部消化器病態学 助教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変の治療には UDCA が広く用いられている。しかし、その作用機序はいまだ明らかになったとは言い難く、胆道系酵素の低下など胆管障害の改善を示唆する明らかな臨床検査成績の改善が得られない場合には、治療により良好な臨床効果が得られているかの判断が困難なのが実情である。しかも、UDCA が有効性を示す作用機序についてはほとんど明らかにされていない。このため有効性を確認し得ないままでの漫然とした投薬に陥り易く、EBM の遂行がはなはだしく阻害されている。原発性胆汁性肝硬変の長期予後の改善には UDCA 抵抗性症例を早期に検出し、予後の改善を計ることが最も重要である。

A. 研究目的

我々は原発性胆汁性肝硬変 (PBC) に対して PPAR- α ligand である bezafibrate を用いた新規治療法を提唱し、UDCA 治療抵抗性症例のみならず、初回治療群においても高い治療効果が期待できることを明らかにしてきた。そこで、今回の研究事業では胆管あるいは肝細胞における PPAR- α を介するシグナルの活性化の程度を系統的に検討し、原発性胆汁性肝硬変の病態における PPAR- α の役割を明らかにすると共に、非侵襲的で客観的かつ再現性と定量性の高い薬効評価法を確立し、EBM の導入に努めたい。

B. 研究方法

PBC を対象に ursodeoxycholic acid (UDCA) 600mg/日の内服治療を施行し、ALP、 γ -GTP、IgM 等の血液検査成績並びに肝臓の組織学的改善度を検討する。上記指標に改善が得られない症例に対しては、bezafibrate 800mg/日の追加内服治療を施行し、ALP、 γ -GTP、IgM 等の血液検査成績並びに肝臓の組織学的改善度を検討する。その間、経時的に PPAR- α を介するシグナルの活性化の程度を系統的に検討する。

C. 研究結果

6 例の新規 PBC 症例に対して UDCA の投与を開始し、3 ヶ月目に PPAR- α を介するシグナルの活性化の程度の系統的検討を行ったが、投与前に比して PPAR- α を介するシグナルの活性化状態に明らかな変化は認めなかった。

D. 考察

現時点では UDCA に明らかな PPAR- α を介するシ

グナルの増強効果を認めていない。6 ヶ月目の検討結果を踏まえて、UDCA 無効例に対する bezafibrate 治療の導入を図る予定である。

E. 結論

現時点では UDCA 投与による PPAR- α を介するシグナルの増強効果を認めていないので、UDCA による PBC に対する治療効果が PPAR- α を介するシグナルの増強による可能性は高いものではないと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toda K, Okada Y, Zubair M, Morohashi KI, Saibara T, Okada T. Aromatase-Knockout Mouse Carrying an Estrogen-Inducible Enhanced Green Fluorescent Protein Gene Facilitates Detection of Estrogen Actions in Vivo. *Endocrinology*. 2003 Dec 18 [Epub ahead of print]
- 2) Saibara T. Can an increase of body mass index by 1 kg/m² be a risk for obesity-related diseases? *J Gastroenterol*. 2003;38:1022-3.
- 3) Ogawa Y, Takahashi T, Kobayashi T, Kariya S, Nishioka A, Ohnishi T, Saibara T, Hamasato S, Tani T, Seguchi H, Yoshida S, Sonobe H. Apoptotic-resistance of the human osteosarcoma cell line HS-0s-1 to irradiation is converted to

- apoptotic-susceptibility by hydrogen peroxide: a potent role of hydrogen peroxide as a new radiosensitizer. *Int J Mol Med.* 2003;12:845-50.
- 4) Takahashi M, Saibara T, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Iwasaki S, Toda K, Ogawa Y, Wakatsuki A, Inagaki S, Onishi S. A novel type hypertriglyceridemia observed in FLS mice. *Lipids.* 2003; 38:687-92.
- 5) Ogawa Y, Murata Y, Saibara T, Nishioka A, Kariya S, Yoshida S. Follow-up CT findings of tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) of breast cancer patients treated with bezafibrate. *Oncol Rep.* 2003;10:1473-8.
- 6) Egawa T, Toda K, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hayashi Y, Hiroi M, Enzan H, Onishi S. Pitavastatin ameliorates severe hepatic steatosis in aromatase-deficient (Ar-/-) mice. *Lipids.* 2003;38:519-23.
- 7) Saibara T, Onishi S, Enzan H. [Recent topics on nonalcoholic steatohepatitis] *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 2003;92:1104-9.
- 8) Soga M, Kishimoto Y, Kawamura Y, Inagaki S, Makino S, Saibara T. Spontaneous development of hepatocellular carcinomas in the FLS mice with hereditary fatty liver. *Cancer Lett.* 2003;196:43-8.
- 9) Saibara T. "Insufficient" leptin production for the fat mass: a risk factor for nonalcoholic steatohepatitis in obese patients? *J Gastroenterol.* 2003;38:522-3.
- 10) Kawai S, Enzan H, Hayashi Y, Jin YL, Guo LM, Miyazaki E, Toi M, Kuroda N, Hiroi M, Saibara T, Nakayama H. Vinculin: a novel marker for quiescent and activated hepatic stellate cells in human and rat livers. *Virchows Arch.* 2003;443:78-86.
- 11) Saibara T, Toda K, Wakatsuki A, Ogawa Y, Ono M, Onishi S. Protective effect of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, a free radical scavenger, on acute toxicity of paraquat in mice. *Toxicol Lett.* 2003;143:51-4.
- 12) Toda K, Okada T, Miyaura C, Saibara T. Fenofibrate, a ligand for PPARalpha, inhibits aromatase cytochrome P450 expression in the ovary of mouse. *J Lipid Res.* 2003;44:265-70.
- 13) Takeda K, Toda K, Saibara T, Nakagawa M, Saika K, Onishi T, Sugiura T, Shizuta Y. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol.* 2003;176:237-46.
- 14) Jin YL, Enzan H, Kuroda N, Hayashi Y, Nakayama H, Zhang YH, Toi M, Miyazaki E, Hiroi M, Guo LM, Saibara T. Tissue remodeling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine. *Virchows Arch.* 2003;442:39-47.
- 15) Murata Y, Ogawa Y, Saibara T, Nishioka A, Takeuchi N, Kariya S, Onishi S, Yoshida S. Tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis in patients with breast cancer: determination of a suitable biopsy site for diagnosis. *Oncol Rep.* 2003;10:97-100.

2. 学会発表

なし

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変に対するフェノフィブラートの効果

分担研究者 道免 和文 国立病院長崎医療センター臨床研究センター 室長

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis, PBC）は小葉間胆管を主とした非化膿性破壊性胆管炎で、しばしば進行性肝硬変に至る慢性疾患である。PBCの90%以上に抗ミトコンドリア抗体（anti-mitochondrial antibody, AMA）が陽性を示し、半数以上に他の自己免疫性疾患を合併する。治療法としてはウルソ酸（ursodeoxycholic acid, UDCA）が用いられているが、肝機能の正常化は20-30%にみられるに過ぎない。近年、抗高脂血症剤がPBCに有効であることが示されている。われわれはUDCA無効の非症候性PBC（asymptomatic PBC, aPBC）9例に抗高脂血症剤であるフェノフィブラートを追加投与し、その血清学的・生化学的検査を継続的に施行した。フェノフィブラートの追加投与により、有意に肝胆道系酵素の低下を認め、同時に9例中4例にAMAの低下も認められた。副作用はみられなかった。フェノフィブラートはaPBCに対し、今後の有効な治療薬のひとつとして位置づけられる。

共同研究者

山本匡介 佐賀大学医学部内科

A. 研究目的

PBCは自己免疫性疾患という点に主眼が置かれ、これまで corticosteroid, azathioprine, cyclosporine, D-penicillamine, methotrexate, colchicine 等が投与されてきたが、副作用の面からもその有効性の優位性は確認されず、現在ではPBCに有効であるとFDAが認可している薬剤はUDCAのみである。しかしながら、近年、抗高脂血症剤（HMG-CoA還元酵素阻害剤あるいはベザフィブラート）が、PBCに有効であるとする論文が発表されている。抗高脂血症剤としてベザフィブラートより特異性の強い薬剤であるフェノフィブラートがaPBCに対し有用であるかどうかを検討する。

B. 研究方法

1. 対象：UDCA抵抗性の無症候性原発性胆汁性肝硬変（aPBC）9例（男性2例、女性7例、平均年齢 50.3 ± 11.7歳、34-69歳）。

2. フェノフィブラート内服：UDCA 600mg/日に加え、体重60kg未満にはフェノフィブラート 100mg/日、60kg以上にはフェノフィブラート 150mg/日を内服投与した。

3. 血清学・生化学検査：フェノフィブラー

ト内服前、内服後4週、8週、12週に肝機能検査、IgG、IgM、AMAを測定し、治療前値と治療開始12週時の値を比較した。

C. 研究結果（表1, 2, 図1, 2, 3）

1. Alkaline phosphatase (ALP) は 285.0 IU/l より 186.9 IU/l へと有意に低下した。IgM 値は 255.8 mg/dl から 192.9 mg/dl へと有意に低下した。9例中4例でAMAが低下し、5例ではAMAの値は不変であった。

2. AMA低下群（4例）とAMA非低下群（5例）とで各種因子を解析したところ、AMA低下群ではIgMが前値と比較し35.4%の低下を示し、AMA非低下群の7.1%と比較し、有意な変化を認めた。

3. 副作用 生化学検査において肝逸脱酵素の有意な上昇や腎障害は認められず、また自覚症状の出現もみられなかった。

D. 考察

peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) は核内受容体のひとつであり、ligandと結合することにより活性化され、各種蛋白の発現調節を行っている。フェノフィブラートはPPAR α のligandである。PPAR α は脂肪・酸化、VLDL/IDLの異化、HDLの産生、肝のcholesterolの産生抑制という脂質代謝作用ならびにNF- κ Bの抑制を介し、IL6,

fibrinogen, CRP, VCAM-1などの炎症蛋白を減少させるという炎症抑制作用のふたつの大きな役割を有している。PBCにフェノフィブラートが奏功した作用機序として免疫調節作用, 抗炎症作用, 胆管細胞保護作用が考えられた。今回のわれわれの結果からフェノフィブラートは PBC の今後の治療薬剤のひとつとして期待される。今後は, 症候性PBCにもフェノフィブラートは有効であるか否か, aPBCに対するフェノフィブラートの長期有用性はあるか否か, 組織学的改善はみられるか否か, 見いだされていない新たな作用機序の有無はどうか, などが検討課題として挙げられる。

E. 結論

aPBC 患者へのフェノフィブラートの追加投与の結果, 有意に肝胆道系酵素の低下を認め, 同時に9例中4例にAMAの低下も認められた。副作用はみられなかった。フェノフィブラートは aPBC に対し, 今後の有効な治療薬のひとつとして位置づけられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文報告:

- 1) Dohmen K, Mizuta T, Nakamuta M, Shimohashi N, Yamamoto K, Ishibashi H:
Fenofibrate for patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis.
World J Gastroenterol 2004;10(6):894-898

2. 学会発表

- 1) 水田敏彦, 道免和文, 中牟田誠, 下橋直也, 山本匡介: 原発性胆汁性肝硬変 (UDCA 効果不十分例) に対する fenofibrate の有効性の検討.
第37回日本肝臓学会総会, 2001. 5. 17-18, 横浜

- 2) Dohmen K, Mizuta T, Nakamuta M, Shimohashi N, Ishibashi H, Yamamoto K:
Fenofibrate for patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis.
54th Annual meeting of the American Association for the study of Liver Diseases, 2003. 10. 24-28, Boston USA

表 1 生化学的検査 (平均±SD)

	治療前	4 週後	8 週後	12 週後
AST (IU/L)	29.9±8.1	50.0±36.3	46.6±24.9	46.9±28.3
ALT (IU/L)	31.1±13.2	48.6±35.2	57.0±38.9	48.4±42.5
ALP (IU/L)	285.0±114.8	238.5±88.4	200.6±76.7 ^a	186.9±76.2 ^a
γ-GTP (IU/L)	149.6±143.0	147.0±178.6	128.8±128.1	125.2±110.3
LDH (IU/l)	311.2±46.7	318.4±44.8	320.1±59.9	324.6±59.2
TB (mg/dl)	0.7±0.7	0.4±0.2	0.6±0.4	0.6±0.5
IgG (mg/dl)	1431.4±285.3	—	—	1415.0±316.1
IgM (mg/dl)	255.8±85.9	—	—	192.9±67.5 ^a

^ap<0.05 (baseline-matched t-test)

表 2AMA 低下群と AMA 非低下群の比較

因子	AMA 低下群	AMA 非低下群	t-test
ALT (IU/L)	61.6±124.8 ^a	52.0±109.2	0.905
ALP (IU/L)	-33.4±24.8	-33.8±16.0	0.978
γ-GTP (IU/L)	-2.8±73.4	-5.3±39.8	0.950
IgM (mg/dl)	-35.4±0.6	-7.1±11.8	0.010

変化率 (%) (平均±SD)

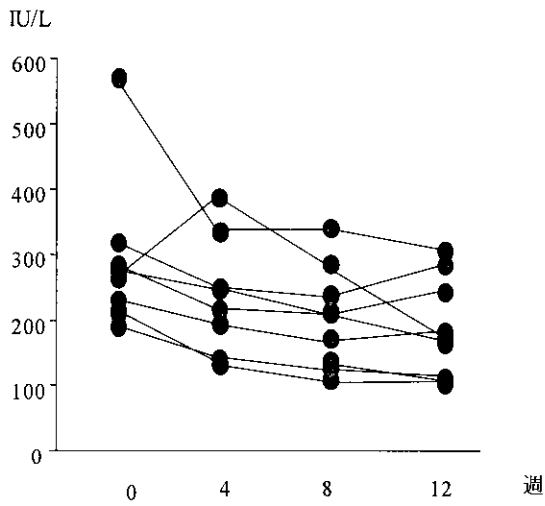


図1 フェノフィブラート治療によるALP変化

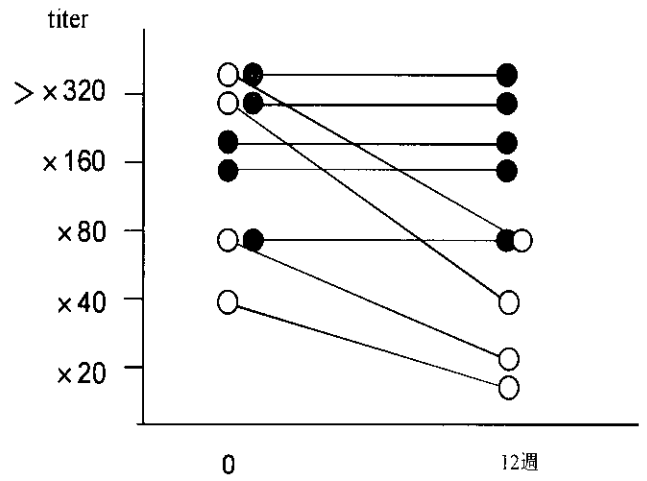


図2 フェノフィブラート治療による抗ミトコンドリア抗体の変化

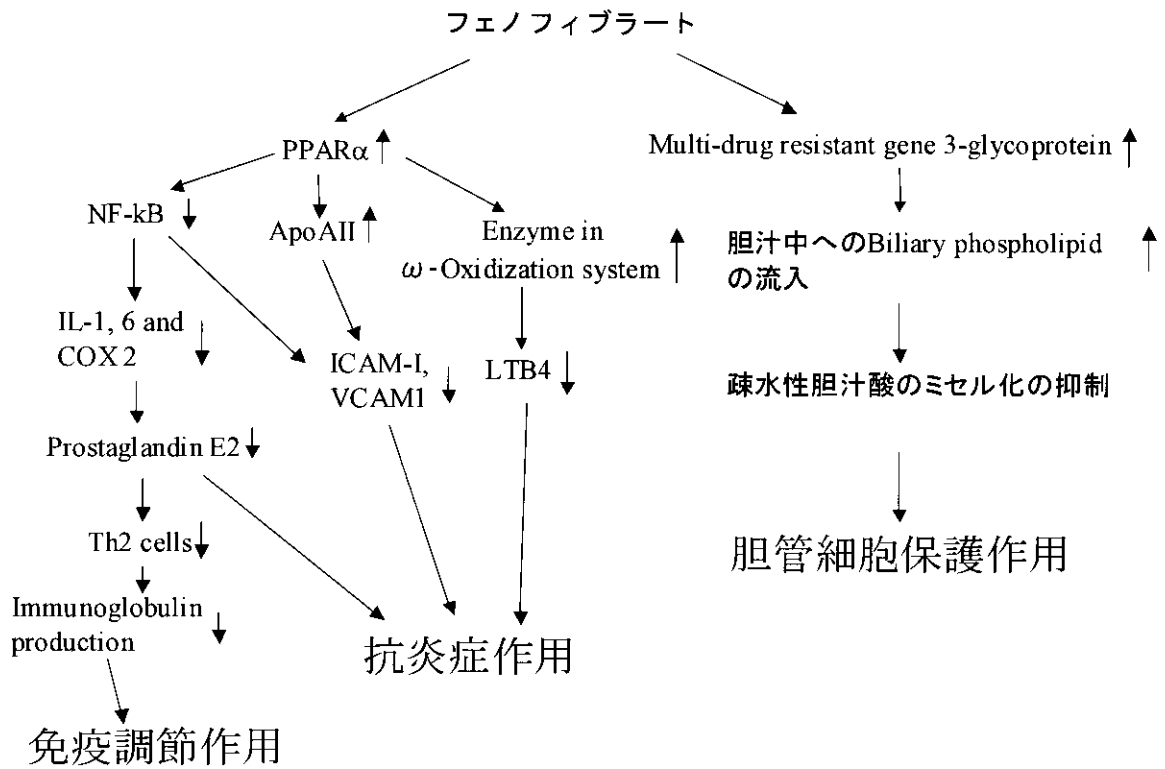


図3 PBCにおけるフェノフィブラートの作用機序

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究

研究協力者 大曲 勝久 長崎大学大学院消化器病態制御学 講師

研究要旨： IgAクラス抗M2抗体が原発性胆汁性肝硬変(PBC)の進展予測因子となりうるかを検討した。2年以上の間隔で2回以上の肝生検を施行され、かつ生検前後の血清が保存されているPBC症例7例を対象とし、Western blot法にてIgAクラス抗M2抗体を検出した。非進行例4例のうち2例は前後とも血清中IgAクラス抗M2抗体は陰性であったが、他の2例は前後とも陽性であった。進行例3例のうち1例は初回肝生検時の血清ではIgAクラス抗M2抗体が陰性であったが、2回目の肝生検時には陽転化していた。他の2例は前後ともに陽性であった。IgAクラス抗M2抗体はPBCの病態に深い関わりがあると推測され、PBCの進展予測因子となりうる可能性が示唆された。さらに症例を増やして、統計的に実証できるよう検討を続けていく予定である。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)に対する画期的な治療法の開発には、まず、的確な診断法の確立とこれまでの治療法では進行を抑えることのできない予後不良群の選別が必要である。われわれはこれまでに各種の血清学的診断法の特徴を検討し、よりの確な診断のためにどのように応用したら良いかを提言してきた。また、PBC患者血清に高頻度かつ高力価みられる抗M2抗体のうちWestern blot法でのIgAクラス抗M2抗体の出現が、組織学的に進行した症例に多く認められ、bile duct lossなどPBCに特徴的な組織所見と関連していることを見いだした。そこで、今回このIgAクラス抗M2抗体がPBCの進展予測因子となりうるかを検討した。

B. 研究方法

2年以上の間隔で2回以上の肝生検を施行され、かつ生検前後の血清が保存されているPBC症例7例を対象とした。このうちScheuer分類で判定した組織学的進展例は3例、非進展例は4例であった。Western blot法はウシ心筋ミトコンドリア抗原を抗原に用い、1次抗体に対象血清、2次抗体としてHRP標識抗ヒトIgAを用いた。1次抗体の希釈率は1000倍で行い、発色はECL法を用いた。74kDのpyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2)、52kDのE3-binding protein (E3BP)、50kDのbranched-chain oxo-acid dehydrogenase complex (BCOADC-E2)、46kDのoxo-glutarate dehydrogenase complex (OGDC-E2)、および41kDのPDC-E1 α に対する抗体を検出した。

C. 研究結果

非進行例の4例は初回肝生検の組織像がScheuer 1期で、4年8ヶ月から10年3ヶ月後に施行した2回目の肝生検の組織像もScheuer 1期であった。うち2例は2回とも血清中のIgAクラス抗M2抗体は陰性であったが、他の2例は2回とも陽性であった。

進行例の3例は、2年5ヶ月から4年4ヶ月のあいだにそれぞれ1期から3期、1期から4期、2期から4期に進行していた。うち1例は初回肝生検時の血清ではIgAクラス抗M2抗体が陰性であったが、4年4ヶ月後の2回目の肝生検時には陽転化していた。他の2例は2回ともにIgAクラス抗M2抗体が陽性であった。

D. 考察

PBCにおける免疫反応の場とされる胆管上皮細胞は、ヒトにおいては生理的にIgAをbasolateral側からluminal側に輸送し、胆管腔に排泄している。PBCにおいては高力価のIgAクラス抗PDC-E2抗体が肝汁や唾液、尿などに検出されることや、胆管や唾液腺上皮に抗PDC-E2抗体と反応しIgAと局在が一致する物質が認められることより、IgAクラス抗M2抗体は胆管上皮細胞内に取り込まれ、細胞内で何らかの機序でPDCあるいは交差反応を示す抗原と反応している可能性がある。さらにIgAとPDC-E2がPDC-E2特異的CD8T細胞の誘導に関わっているとする報告もみられる。血清中と胆汁中のIgAクラス抗M2抗体の値は正の相関を示すという報告があり、血清中IgAクラス抗M2抗体はPBCの病態に深い関わりがあると推測される。今回のわれわれの検討により、PBCの進展予

測因子となりうる可能性が示唆された。

E. 結論

侵襲的な肝生検と異なり、血清診断は反復測定が容易である。IgA クラス抗 M2 抗体が PBC の進展予測因子として有用であれば、陽性例についての臨床的特徴を解析することにより、より画期的な治療法の開発に結びつけることができる。さらに症例を増やして、統計的に実証できるよう検討を続けていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masuda J, Omagari K, Ohba K, et al. Correlation between histopathological findings of the liver and IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. Dig Dis Sci 48: 932-938, 2003.

2. 学会発表

- 1) 大曲勝久、他：原発性胆汁性肝硬変の経過観察における「MESACUP-2 テストミトコンドリア M2」測定の臨床的意義 - 蛍光抗体間接法との比較検討-。第 82 回日本消化器病学会九州支部例会, 11. 2003.

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（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の分子標的の同定と病態に基づく診断法・治療法の開発

分担研究者 中村 稔 国立長崎医療センター 先端技術研究部長

研究要旨：本年度は、我々が提唱してきた PBC の発症と進展に関する作業仮説“分子相同性と epitope spreading”に基づき、核膜孔蛋白 gp210 に着目し、gp210 に対する免疫応答と予後との相関について解析した。まず、gp210 蛋白の中で、最も抗原性が強い B 細胞エピトープを同定した後、その部位を含む抗原を用いて、ELISA による抗体の定量系を確立した。この系を用いて、過去 20 年間に当院で診療した PBC 71 症例の抗 gp210 抗体を経時的に定量した。上記仮説を支持する結果が得られるとともに、抗 gp210 抗体価が、肝不全への進展の独立した予後因子であることが明らかとなった。また、Laser capture microdissection (LCM) と PBC 肝生検凍結組織を用いた部位別遺伝子発現の解析から、PBC に特徴的な免疫関連遺伝子が同定された。ヒト初代培養胆管細胞を用いた研究から、胆管細胞は TLR4, TLR9 などの自然免疫に関与する分子を発現し、その刺激を介してさまざまな免疫応答を修飾していることが示唆された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病因を明らかとし、画期的治療法を開発することを最終目的とする。本年度は、PBC に予後良好群と不良群があることに着目し、両群の臨床病態を比較検討することにより PBC の進行に関与する因子 (予後予測因子) を同定することを目的とした。また、ヒト胆管細胞の機能を *in vitro* で解析するために、ヒト初代胆管培養細胞の分離・培養技術を確立することも目標とした。

B. 研究方法

国立長崎医療センターで過去 20 年間に診療した。PBC 患者 71 症例の臨床データ、保存血清、肝生検組織を用いて、新たな予後予測因子の同定を試みた。本年度は、我々が今までに提唱してきた PBC の発症と進展に関する作業仮説“分子相同性と epitope spreading”に基づき、核膜孔蛋白 gp210 に着目し、gp210 に対する免疫応答と予後との相関について、主に患者血清と臨床データを用いて解析した。また、PBC 肝生検凍結組織と Laser capture microdissection (LCM) を用いて、肝部位別の免疫関連遺伝子の発現を定量し、新しい PBC の分子標的の探索を行った。転移性肝腫瘍患者の肝切除組織から、胆管細胞を分離培養し、胆管細胞と免疫担当細胞との相互作用に関する様々な分子について、その発現を、蛋白・遺伝レベルで解析した。

C. 研究結果

gp210 蛋白の全領域を網羅するように、24 種のリコンビナント蛋白を作製し、B 細胞エピトープを同定した。最も抗原性が強い部位を含むリコンビナント蛋白あるいは合成ペプチドを用いて、ELISA による抗体の定量系を確立した。この系を用いて、過去 20 年間に当院で診療した PBC 71 症例の gp210 に対する自己抗体を経時的に定量した。その結果、分子相同性によるミトコンドリア抗原 (PDC-E2) から gp210 への epitope spreading 仮説が支持されるとともに、抗 gp210 抗体が、肝不全への進展の独立した予後因子であることが明らかとなった。

LCM を用いた部位別のサイトカイン遺伝子発現の定量からは、肝実質の Interferon α 、TLR4 などの発現が PBC の初期の病態形成に深く関与していることが示唆された。また、ヒト初代胆管培養細胞は、TLR4, TLR9 などの自然免疫に関与する分子を発現し、その刺激を介してさまざまな免疫応答を修飾することが *in vitro* で示された。

D. 考察

抗 gp210 抗体は、抗ミトコンドリア抗体とは異なった動態を示し、胆管障害を直接反映する自己抗体であることが示唆された。次年度は、抗 gp210 抗体の意義をさらに明らかとするために国立病院肝疾患ネットワーク (L-net) を利用して PBC の治療に関する prospective study を開始するとともに、gp210 抗原の局所での発現調節や抗原

提示機構の解析、さらには、IFN α 、TLR4 などの局所での発現亢進の意義について肝生検組織や胆管培養細胞を用いて解析を進める予定である。

E. 結論

核膜孔蛋白 gp210 に対する自己免疫応答の強さが PBC の肝不全への進展速度と正の相関を示すことから、抗 gp210 抗体測定は、PBC の予後予測に有用なことが示唆された。さらには、gp210 に対する自己免疫応答の詳細な解析、制御法の開発が、PBC の新たな治療法の開発につながる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano A, Handa M, Baba E, Tsuneyama K, Nakamura M, Ishibashi H, Nakanuma Y, Gershwin ME, Harada M. : Distinct costimulation dependent and independent autoreactive T-cell clones in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Nov; 125(5): 1379-87.
- 2) Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S, Gershwin ME. : T cell immunity and primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev*. 2003 Jan; 2(1): 19-24.
- 3) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Sakamoto N, Matsushita S, Tanaka A, Worman HJ, Gershwin ME, Harada M: Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Jun; 124(7): 1915-25.
- 4) Tanimoto H, Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Matsushita S, Gershwin ME, Harada M. Promiscuous T cells selected by *Escherichia coli*: OGDC-E2 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2003 May; 20(3): 255-63.

2. 学会発表

- 1) 横山照史、小森敦正、瀧井康、吉田由紀、中村稔、上平幸史、下田慎治、右田清志、八橋弘、石橋大海。ヒト初代培養胆管上皮細胞における Toll-like receptor (TLR) の発現とその機能解析。第 33 回日本免疫学会総会、

2003. 12. 8-10、福岡

- 2) 吉田由紀、中村稔、瀧井康、下田慎治、小森敦正、横山照史、大黒学、植木俊仁、右田清志、八橋弘、石橋大海。原発性胆汁性肝硬変における抗 gp210 抗体の産生機序。第 33 回日本免疫学会総会、2003. 12. 8-10、福岡
- 3) 瀧井康、中村稔、横山照史、吉田由紀、小森敦正、伊東正博、八橋弘、原田実根、石橋大海。Laser Capture Microdissection を用いた原発性胆汁性肝硬変の門脈域サイトカイン遺伝子発現の解析。第 33 回日本免疫学会総会、2003. 12. 8-10、福岡
- 4) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋。原発性胆汁性肝硬変における CD28 陰性 CD4 陽性 T 細胞の頻度および同 T 細胞の胆管上皮との相互作用について。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡
- 5) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋。原発性胆汁性肝硬変における CD4+CD25+ regulatory T cell の検討。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡
- 6) 下田慎治、上平幸史、河野聡、半田瑞樹、中村稔、石橋大海。原発性胆汁性肝硬変の自己抗原反応性 T 細胞の CD28 分子発現について。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡
- 7) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋。ヒト肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) の T 細胞に対する抑制作用。第 39 回 日本肝臓学会総会、2003. 5. 22-23、福岡

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

PBCの進展に関する遺伝子・蛋白発現の病理学的解析

分担研究者 伊東 正博 国立病院長崎医療センター 臨床研究センター病理室長

研究要旨：本研究の目的はPBCの進行症例においてどのような因子がPBCの病像進展に関与しているのかを分子病理学的に解析することにある。**【方法】**本院において生検された130症例の組織学的再評価を行った。そのうち非進行例と進行例を対象とし免疫組織化学的にアポトーシス、MHC、HLADR、PPAR α 、PPAR γ の発現を比較検討した。新鮮肝組織の得られたPBC症例においてLCMで肝細胞域、門脈域を選択的に採取しPPAR α mRNAのReal Time PCRによる定量的検討を行った。**【結果】**進行例にはStage1 \rightarrow 2、1 \rightarrow 2 \rightarrow 3、2 \rightarrow 3、3 \rightarrow 4と様々の組み合わせと期間で進行が見られた。Stage1で進行しない症例ではinterface hepatitisと活動性がStage1から進行した症例に比し有意に軽かった。PPAR α は正常肝では肝細胞で発現し胆管での発現は乏しいが、PBC症例ではStageに比例して肝細胞での発現が亢進し、再生胆管で強い発現が見られた。しかし、細胞質や膜発現が主体で核内発現はほとんど見られなかった。PPAR α mRNAの発現は肝実質領域で高く、門脈域で低かった。**【考察・結語】**PBCの予後予測因子としてpiecemeal necrosisと活動性評価は重要な因子であることが示唆された。進行したPBCではPPAR α の発現は亢進しておりfibrateが作用しやすい環境が形成されていることが示唆された。今後、研究計画に沿って症例を集積し、PBCの進行症例においてどのような因子がPBCの病像進展に関与しているのか一定の見解を引き出したい。

A. 研究目的

PBCの進展に関する諸因子の病理学的解析を目的とする。PBCには無症候性に経過する症例から徐々に進行し肝移植を必要とする症例まで存在する。また同一症例肝でも、非活動性の像から実質破壊性に進行する病変まで混在している。本研究の目的は進行症例においてどのような因子がPBCの病像進展に関与しているのかを分子病理形態学的に解析することにある。

B. 研究方法

① 病理組織学的検討：

本院において生検された130生検検体の組織学的再評価を行った。Scheuer分類による進行期分類、線維化、門脈炎、実質炎、活動性分類、胆管増生、胆管消失、CNSDC、肉芽腫、銅沈着についてHE染色や特殊染色スライドを用い二人の病理医によりscore分析した。非進行例と進行例での背景組織の評価も行った。

② 免疫組織学的検討：

非進行例と進行例を対象とし免疫組織化学的に、アポトーシス(ssDNA)、HLADR、PPAR α 、PPAR γ の発現を比較検討した。とくにPPAR α の発現と細胞内局在について検討した。

③ PPAR α のmRNAレベルでの発現の検討：

新鮮肝組織の得られたPBC症例におけるPPAR α mRNAのReal Time PCRによる定量的に検討した。検体は凍結保存されていた生検検体から症例ごとに門脈域と間実質に分けて採取し遺伝子解析に寄与した。比較のためにC型慢性肝炎、AIH、正常肝の新鮮凍結組織からtotal RNAを抽出し、同様にPPAR α mRNAの測定を行った。

C. 研究結果

① 最短2年から最長13年の間に複数回生検された症例から、8例の非進行例、9例の進行例が抽出された。非進行例はStage1、2、3で変化のない症例が見られた。進行例にはStage1 \rightarrow 2、1 \rightarrow 2 \rightarrow 3、2 \rightarrow 3、3 \rightarrow 4と様々の組み合わせと期間で進行が見られた。

このうちStage1に着目し非進行例と進行例のStage1の像を比較した。Stage1で進行しない症例ではinterface hepatitisと活動性が進行例に比し有意に軽度にとどまっていた。CNSDC、肉芽腫の程度や出現頻度は予後と有意な相関関係は見られなかった。

② 免疫組織化学

抗体はコマーシャルベースで入手できるssDNA、MHC、HLADR、PPAR α 、PPAR γ を用いた。抗体至適濃度、前処理方法は抗体によって異なる。

PPAR α は正常肝では肝細胞で発現し胆管での発現は乏しいが、PBC 症例では Stage に比例して肝細胞での発現が亢進し、再生胆管で強い発現が見られた。肝細胞膜での発現が特に亢進していた。しかし、PPAR α は肝細胞質や膜発現が主体で核内発現はほとんど見られなかった。

③ PPAR α の Real Time PCR による定量

PPAR α mRNA の発現は肝実質領域で高く、門脈域で低かった。この結果は免疫組織化学による局在パターンと一致していた。PBC では Stage により発現に増減が見られた。現時点で 4 症例しか新鮮凍結症例が得られなかったため、今後の症例集積が待たれる。

D. 考察

PBC の予後を予見する因子として piecemeal necrosis と活動性評価は重要な因子であることが示唆された。Stage 分類するだけでなく、活動性の評価を付記することは重要なことと思われる。PPAR α は UDCA 抵抗性の症例に適応される fibrate 系薬剤の受容体として重要な因子であるが、PBC では病期進行につれて PPAR α の発現は亢進しており fibrate が作用しやすい環境が形成されていることが考えられた。PPAR α を介する抗炎症作用や抗脂質作用は核内で PPAR α が PPRE に作用することで転写調節される蛋白質の生理機能に寄っている。PBC で PPAR α の発現亢進にも関わらず核内移行が見られない点や PPAR α の発現亢進に関する分子機序の解析が今後の研究課題になる。

E. 結論

PBC の予後予測因子として piecemeal necrosis と活動性が重要な因子であることが示唆されたことは一つの研究成果として評価できる。今後はその分子生物学的な裏付けを探索することが必要と思われる。まだ研究開始から期間が短く、新鮮凍結症例の症例集積が十分ではない。今後引き続き研究目的に沿って研究を遂行し、一定の結論を出したい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- 1) 瀧井 康, 他 : Laser Capture Microdissection

を用いた原発性胆汁性肝硬変の門脈域サイトカイン遺伝子発現解析、第 33 回日本免疫学会総会、12 月 8-10 日、福岡

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ゲノミクスに基づく難治性自己免疫性肝疾患の病態解析と診断・治療への
応用に関する研究

分担研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変材料および自己免疫性肝炎材料を用いて、DNAチップによる病態診断や治療の選択に寄与する診断法の開発を行う基盤研究を行った。それぞれ15例、12例の材料を選択された1,080の遺伝子よりなるチップを用いて解析した。発現遺伝子プロファイルはそれぞれの疾患に固有であった。原発性胆汁性肝硬変では自己免疫性肝炎の病期の進展に比し、初期および後期において発現している遺伝子が異なっていた。すなわち初期にはリンパ球の集族に関与する遺伝子が多く発現亢進し、後期には接着やストレス反応およびケモカイン遺伝子が上昇していた。一方、自己免疫性肝炎では病期の進展に伴い、同様の遺伝子の発現が亢進していた。さらにレーザーキャプチャーによる組織との関連では、浸潤細胞による発現遺伝子プロファイルと、肝組織におけるプロファイルが示され、発現遺伝子からみた相互の関連が明らかになった。この結果は、発病にかかわる分子機序がそれぞれ固有であり、原発性胆汁性肝硬変では初期の病態が後期と異なることを示しており、これらの分子に対する診断や治療法の開発の重要性を示すものであった。

A. 研究目的

難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変および自己免疫性肝炎の病態解析に包括的な遺伝子解析（ゲノミクス）の手法を導入する。その結果にもとづいて、自己免疫性肝疾患の病態診断や治療の選択に寄与する診断法の開発を行う基盤研究を行う。

B. 研究方法

本研究は3年計画で行う。初年度は金沢大学において保存されている自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変の症例を用いて、DNAチップによる包括的な発現遺伝子解析を行い、その発現のプロファイルを明らかにする。次年度は、浸潤あるいは集族したリンパ球および周辺の肝細胞や胆管細胞における遺伝子の発現を明らかにする。研究最終年度は、薬物投与による変動を解析し、病態診断や治療の選択に寄与する分子（群）を抽出できないか研究する。

本年度は15例の原発性胆汁性肝硬変および12例の自己免疫性肝炎組織を対象に、DNAチップを用いて発現遺伝子解析を行った。組織はRNA抽出後に増幅し、選択された遺伝子1,080を搭載したDNAチップを作製し解析した。解析にはGene Springを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

レーザーキャプチャーダイセクションによって、原発性胆汁性肝硬変における浸潤細胞と、肝細胞の部位を採取し、それぞれにおける発現遺伝

子プロファイルを解析した。またいくつかの遺伝子についてはRT-PCR法による発現確認を行った。

C. 研究結果

Hierarchical clusteringにおいて、原発性胆汁性肝硬変と自己免疫性肝炎および8例の正常肝臓の発現遺伝子プロファイルは分離され、さらに原発性胆汁性肝硬変では初期と後期の病期によってもプロファイルが分離された。SheuerのI期においては4.4%の遺伝子の発現が亢進し、II-IV期では3.0%の遺伝子が亢進し、また正常肝臓と比して4.7%の遺伝子の発現が低下していた。I期においてはリンパ球やhematopoietic細胞の分化および血管新生に関連する遺伝子の発現が上昇していた。後期においては接着やストレス反応およびケモカイン遺伝子が上昇していた。原発性肝硬変と診断された例でも組織学的に実質炎の強い3例はクラスターされ、自己免疫性肝炎の症例に近く位置していた。

自己免疫性肝炎では、細胞回転やアポトーシスおよびインターフェロン誘導遺伝子の発現が上昇しており、これらの発現は病期の進行とともに亢進していた。

肝組織全体の解析から、リンパ球等の浸潤細胞による発現が考えられる遺伝子、肝細胞からの発現が考えられる遺伝子、およびリンパ球および肝細胞どちらの細胞からも発現する遺伝子が多く認められた。そこでレーザーキャプチャーによ

て細胞を分画し、遺伝子の発現を検討した。それぞれの細胞分画から特徴的な遺伝子が抽出され、相互の細胞における発現遺伝子変化の関連が明らかになった。

得られた情報を解析すると、炎症や線維化、細胞回転、アポトーシスに関連する遺伝子の変動している他に、微生物の抗原提示に重要な分子、好酸球から特徴的に発現する遺伝子、B細胞やT細胞の活性化、分化に重要な遺伝子が抽出された。

このように、臨床像および病理像と対比して、それらの病態に関与している分子の名前と、その発現量がデジタル情報として蓄積され、これらの結果はRT-PCR法においても確認された。

D. 考察

自己免疫性肝炎における病期の進行に関与する遺伝子は初期から後期にかけて同様の遺伝子発現が関与していたのに比して、原発性胆汁性肝硬変においては初期と後期において変動する遺伝子が異なっていたことは、原発性胆汁性肝硬変の病期の進展を考える上で重要な成果であった。この初期の反応を分子レベルで解析することによって、病因の解析、病態の理解、さらには治療や診断の標的を検討することが可能であると思われた。

包括的に多数の遺伝子を確認することの重要性のひとつに、従来からいわれていた個々の遺伝子の重み付けが出来ることであるが、今回の解析によってこれまで知られている遺伝子が実際にヒトの組織において変動しており、かつ個々の遺伝子の重み付けに加え、相互の遺伝子の関連が明らかにされた。

加えて、従来から言われていた微生物に対する反応性や、好酸球の関与等も遺伝子発現のレベルで明らかにされた。またこれまでに報告のない分子の関与も示唆され、ヒトに材料において分子を明らかにしながら同時に多数の遺伝子解析が可能であった。

包括的に発現遺伝子プロファイルを解析することによって、病理診断に匹敵する、あるいは病理診断で得られなかった情報を与えることが出来たことは、こうした解析が研究だけでなく臨床的にも重要であることを示していた。とりわけ臨床的にも治療選択に迷うことのある症例が、遺伝子発現では同じクラスターを示したことは、治療法の選択にこの手法が有用であることを示すものであった。

E. 結論

原発性胆汁性肝硬変においては初期と後期で

発現している遺伝子のプロファイルが異なっていた。このことは原発性胆汁性肝硬変の診断・治療戦略を検討するうえで重要な知見であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K Masutomi, E Y Yu, S Khurts, I Ben-Porath, J L Currier, G B Metz, M W Brooks, S Kaneko, S Murakami, J A DeCaprio, R A Weinberg, S A Stewart, W C Hahn. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114(2): 241-253, 2003.
- 2) K Kawaguchi, S Kaneko, M Honda, H Kawai, Y Shiota, and K Kobayashi. Detection of hepatitis B virus DNA in serum from patients with chronic hepatitis B using a DNA microarray method. *J Clin Microbiol* 41(4): 1701-1704, 2003.
- 3) Y Nakamoto, S Kaneko, H Takizawa, Y Kikumoto, M Takano, Y Himeda, and K Kobayashi. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A*2402 peptide tetramers. *J Med Virol* 70(1): 51-61, 2003.
- 4) M Hirano, S Kaneko, T Yamashita, H Lou, W Qin, Y Shiota, T Nomura, K Kobayashi, and S Murakami. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278(7): 5109-5115, 2003.

2. 学会発表

- 1) 抗各抗体からみた原発性硬化性胆管炎—自己免疫性肝炎スコアの検討。第7階日本肝臓病学会大会 ワークショップ (大阪)。
- 2) 生体肝移植後の原発性胆汁性肝硬変再発。第7階日本肝臓病学会大会 ワークショップ (大阪)。
- 3) 原発性硬化性胆管炎の消化器・膵病変。第89回日本消化器病学会総会。ワークショップ (さいたま)。

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