

D. 考察

PBC全国調査登録症例には、自己免疫性肝疾患非定型例が混在していると考えられる。G-2 (AMA陽性または抗PDH抗体陽性でANA陽性またはSMA陽性) およびG-3 (AMA陰性かつ抗PDH抗体陰性でANA陽性またはSMA陽性) に含まれていた、 γ globまたはIgGが2.0g/dl以上かつALTが正常上限の2倍以上を満たす症例群G-2A、G-3BはAIH-PBC overlapsyndromeまたは胆管病変を伴うAIH群の一部と推定される。今回の検討ではG-2A、G-3Aいずれの群も診断時検査所見で有意差のあった項目のうちPBCの病像を主に現すALP、T-choまたAIHの病像を主に現すAST、ALT、 γ glob、modified AIH score項目を両有していた。これらの群はPBCの診断基準を満たしながらもPBCとAIH双方の性格をしていることから、胆管病変を伴うAIH群と呼称するよりむしろAIH-PBC overlap syndromeとするほうが妥当であると思われた。

また、生存率の検討では、G-2Aは、G-2Bに比較して有意に予後不良であったが、今回の検討でG-2Aの診断時検査所見のうち有意因子であったT-Bil、T-cho、Albは、これまでに報告されているMayo model等のPBCの予後予測モデルにおける予後因子でもある。PBCと診断された症例の中で、AMA陽性または抗PDH抗体陽性・ANA陽性またはSMA陽性であり、 γ globまたはIgGが2.0g/dl以上かつALTが正常上限の2倍以上を満たす症例群は、副腎皮質ステロイド治療の適応を含め、病態の進展に対して慎重な対応が必要な症例群と考えられる。

E. 結論

第11回調査症例を含む登録症例中の自己免疫性肝疾患非定型例群の臨床像および予後について検討した。全症例中、G-1は20.5%、G-2群は72.3%、G-3は6.7%、G-4は0.5%を占めていた。G-2 (AMA陽性または抗PDH抗体陽性でANA陽性またはSMA陽性) およびG-3 (AMA陰性かつ抗PDH抗体陰性でANA陽性またはSMA陽性) には各々約13%、16%のAIH-PBC overlap syndrome群と思われる症例が含まれていると推定された。また、G-2の中で γ globまたはIgGが2.0g/dl以上かつALTが正常上限の2倍以上を満たす症例群は他に比較して予後不良であり、慎重に対応すべきと考えられた。

なお、2003年12月末に実施した第12回PBC全国調査では、2003年12月までの既登録症例の予後調査と2002年1月から2003年12月末までに新たに診断された新規症例について報告を求め、同時に肝移植例の予後追跡調査および家系例一次調査も継続して実施した。今後、あらたに設けた個人情報管理システムに則り統計学的解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 仲野俊成、廣原淳子、有田清三郎：原発性胆汁性肝硬変の予後(2)日本における長期予後の推移と病期進展の要因。臨床消化器内科2003;18:601-608
2. 学会発表
- 1) 廣原淳子、大西三朗、戸田剛太郎：原発性胆汁性肝硬変(PBC)全国調査における自己免疫性肝疾患非定型例の検討：第45回日本消化器病学会大会、ワークショップ5、自己免疫性肝疾患の非定型例、2003.10.15

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：無し
2. 実用新案登録：無し
3. その他：無し

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・療養所における原発性胆汁性肝硬変症例のデータベース構築：
第五報 - 血清収集システム-

研究協力者 酒井 浩徳 国立病院九州医療センター 消化器科医長

研究要旨：本研究は、国立病院肝疾患政策医療ネットワーク施設を中心に国立病院・療養所を対象として原発性胆汁性肝硬変症例のデータベースを構築し、さらにこのデータベースを用いたデータ解析の試みや新たな調査研究のシステム作りを目的としている。これまでの四回にわたる調査と本年度行った追加登録により、現在428症例を登録し、266症例に関しては診断時から現時点までの追跡調査を完了、多くの症例は安定した経過をたどるものと考えられた。症例数が少なく、しかも多くの症例が安定した経過をたどる原発性胆汁性肝硬変において、進行症例よりの試料(血清・肝生検標本など)の収集は困難である。今回、登録症例を中心に対象施設より症候性原発性胆汁性肝硬変(S2-PBC)症例の血清47検体を収集し、各種測定に供することが出来た。本データベースおよび国立病院肝疾患政策医療ネットワークは原発性胆汁性肝硬変に関する調査研究に有用であると考えられる。

共同研究者：

西 秀博 国立病院九州医療センター
中村 稔 国立病院長崎医療センター

A. はじめに

代表的自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、その特徴的臨床像や病態にも関わらず未だ病因が解明されていない。PBCに関する知識が医師の間に浸透するにつれて診断される症例は年々増加してきているものの、ウイルス性肝疾患に比べて発生頻度は極めて低く、単一の施設では病因解明に十分な症例数の集積は困難である。PBC研究の第一歩はきちんとした症例の集積にあると思われる。本研究は、国立病院肝疾患政策医療ネットワーク施設を中心とした国立医療施設においてPBC症例を対象とした調査による症例の集積と追跡を行い、疫学調査・予後調査・病因解明・治療法解明の一助としての利用を目的とした全国横断的データに時間軸の要素を加えたデータベースの構築を目標としている。さらに構築されたデータベースを用い、データ解析の試みや新たな調査研究のシステム作りを目的としている。結果としてPBCの実態を把握するとともに、個々の症例の追跡調査を行うことにより自然経過を明らかにする事を目的としている。

本年度はこれまでに行った四回目の調査によって登録した症例に一部施設の症例の追加登録を行った。これまでに、データベース登録症例を対象とした新たな調査(QOL調査)やデータベースそのものの解析(老年者PBCの臨床像の解析)を行ってきたが、今回はデータベース登録症例を対象に試料の収集(血清収集)を行い、試料(血清・肝生検材料)収集システムの確立をめざした。

B. 対象と方法

原発性胆汁性肝硬変を対象疾患とし、過去四年間年一回の調査を行った。調査対象施設はこれまで調査を

行ってきた国療西札幌病院、国立仙台病院、国立霞ヶ浦病院、国立西埼玉中央病院、国立埼玉病院、国立国府台病院、国立千葉病院、国立国際医療センター、国療東京病院、国立横浜東病院(現、国立病院横浜医療センター)、国立横浜病院(現、国立病院横浜医療センター)、国立相模原病院、国立松本病院、国立中信松本病院、国立金沢病院、国立名古屋病院、国立京都病院、国立大阪病院(現、国立病院大阪医療センター)、国立大阪南病院、国立神戸病院、国立岡山病院(現、国立病院岡山医療センター)、国療香川小児病院、国立善通寺病院、国立病院呉医療センター、国立小倉病院、国立病院九州医療センター、国立佐賀病院、国立大分病院、国立病院長崎医療センター、国立熊本病院の29施設(合併や移譲により3施設減)に、今回新たに国立病院東京災害医療センター、国立病院東京医療センター、国立嬉野病院、国立米子病院、国立下関病院、国療福岡東病院、国療松江病院の7施設が加わった。

C. 結果

過去の四回の調査による登録408症例に今回の追加症例を加え、これまでに428症例が登録された。そのうち266症例については診断時からの追跡調査が終了し、追跡期間が20年以上に及ぶ症例も存在する。第一回調査において245症例(平均年齢 61.5 ± 10.4 歳)、男性28症例、女性217症例、第二回調査において107症例(55.5 ± 11.8 歳)、男性14症例、女性91症例が登録され、第三回調査では39症例(60.5 ± 10.3 歳)、男性6症例、女性33症例、四回目の調査では新たに18症例(55.2 ± 14.4 歳)、男性4症例、女性14症例が登録された。今回新たに男性3症例、女性17症例が登録され、登録症例数は428症例となった。男性が54症例、女性が374症例である。診断時よりの追跡調査が完了した症例は266例(平均年齢 59.1 ± 11.3)であり、そのうち追跡期間の長い症例は242症例、平均追跡期間は7.34

年であった。追跡266症例のうち追跡終了および中断症例は33症例であった。死亡例は13症例であった。転院などによる追跡脱落症例は19症例(7.1%)と少ないことが本データベースの最大の特徴である。追跡症例を検討すると、肝機能検査値は長期に渡って同じレベルを保つことが示され、多くの症例は安定した経過をたどり、長期間にわたって無症候性PBCの状態を経過すると考えられる。一方、一部の症例は診断早期から、あるいは長期経過するうちに症候性PBCとなり、さらに進行し肝不全のために死亡したり、肝移植を行う結果となっている。PBCの病勢が進行する原因を明らかにする、あるいは長期無症候性で経過するPBCと進行して症候性となるPBCは、本来別のカテゴリーの疾患であるのかを解明するためには、肝不全に陥った症例や症候性(S2-PBC)の症例の集積が必要である。

表1.

病院名	n	病院名 7	n
長崎医療センター	9	東京災害医療	0
国際医療センター	7	国立名古屋病院	0
国立相模原病院	7	国立京都病院	0
国療東京病院	5	国立大阪南病院	0
横浜医療センター	5	大阪医療センター	0
国立大分病院	3	国立米子病院	0
国療松江病院	3	岡山医療センター	0
国立中信松本病院	2	呉医療センター	0
国療西札幌病院	1	国立善通寺病院	0
国立仙台病院	1	国立下関病院	0
国立金沢病院	1	国立小倉病院	0
国立西埼玉中央病院	1	九州医療センター	0
東京医療センター	1	国療福岡東病院	0
国立熊本病院	1	国立嬉野病院	0

今回、本データベース登録症例を主体とし、国立病院肝疾患政策医療ネットワーク施設を中心とした国立病院・療養所を対象に、国立医療施設間のclosed-networkシステムであるHOSP-NETを利用した呼びかけを行い、肝不全に陥った症例、S2-PBC症例の血清の収集を行い短期間に47症例の血清(表1)を集積する事が出来た。

最も多い施設においても9症例であり、調査研究を行うに十分な症例数の集積のためには、本データベースおよび国立病院肝疾患政策医療ネットワークを中心とした国立病院・療養所の密接な連携が有用であると考えられる。また、各施設における血清保存のシステム作りが重要であることはいうまでもない。

D. 考察

国立医療施設における原発性胆汁性肝硬変のデータベースの基本的システムの構築が完了し、登録症例数も400症例に達した。本データベースの最大の特徴は、登録症例が国立医療施設という限られた施設においてclose-follow up中の症例であるということである。その特徴を利用し、長期追跡の経過からの詳細な解析、患者のQOLなど身近な問題の検討、新たな診断法・治療法の開発や治験に不可欠な症例の登録などにその目的を設定する事が可能である。これまでに、データベース登録症例を対象とした新たな調査(QOL調査)やデータベースそのものの解析(老年者PBCの臨床像の解析)を行ってきた。今回は、データベース登録症例を中心として、さらに、国立医療施設間のclosed-networkシステムであるHOSP-NETを利用した呼びかけを行うことにより短期間に多くの試料の収集(血清収集)を行い、試料(血清・肝生検材料)収集システムの確立をめざした。本データベースが信頼性のある有用なものであるためには、今後のデータの充実と漏れのない追跡調査が重要となる。しかし、調査用紙による登録とデータベースへの手入力という方法では、データベースの維持に多大な労力を必要とする。今後、現在B型慢性肝炎およびC型慢性肝炎を対象として稼働を始めた、HOSP-NETを利用した国立医療施設間のL-Net(肝ネット)による登録へと早急に移行し、日常診療の場での随時の症例登録を可能とすることが本データベースを維持する最大の方策と考えられる。さらに、試行中の検査成績自動集積システムへの参加施設の拡大が、信頼性のあるデータを労力をかけることなく集積するためには不可欠である。PBCの調査研究のさらなる発展のためには、症例の登録とデータの集積だけでなく、今回試みたように多くの検体試料を短期間に効率よく収集するシステムの確立が不可欠である。

E. 結論

国立医療施設における原発性胆汁性肝硬変症例のデータベースの基本的構造と基本的システムの構築を完了した。本データベースの有用性をさらに高めるために、今回検体試料の効率的な収集システムの確立を試みた。

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

一般住民における抗ミトコンドリア抗体の疫学調査

研究協力者 井廻 道夫 昭和大学医学部第二内科 教授

研究要旨：ELISA法によるM2抗体測定キット（M2）を用いて、香川県の一般住民1,467人の抗ミトコンドリア抗体（AMA）を測定した。M2陽性は58例（4.0%：95%信頼区間CI 3.0-5.0%）であった。M2陽性例のうち、間接蛍光（IF）法で8例、免疫ブロット（IB）法で10例にAMAが検出された。IB法を診断のGold Standardとすると、AMAの検査前確率は0.68%、ELISA法の陽性的中率は17.2%、正診度96.7%であった。IB法とELISA法のROC曲線の解析より、一般住民のように検査前確率が極めて低い対象では、ELISA法のcut offはキット規定の7.0は偽陽性率が多く、55が至適と計算された（陽性的中率100%、正診度99.9%）。M2陽性58例中10例（17%）、IB陽性10例中5例（50%）に肝機能異常を認め、このうち2例は肝胆道系酵素およびIgMの上昇を認め原発性胆汁性肝硬変を発症していると思われた。一般住民のAMA陽性率はIF法で0.5%（0.2-0.9%）、IB法で0.7%（0.3-1.1%）、原発性胆汁性肝硬変罹患率は0.1%（0-0.3%）と推定された。我々は平成12年度班会議で関東地方の一般住民のAMA陽性率はIF法で0.5%（11/2160）と報告しており、今回の成績と比べAMA陽性率に明らかな地域差は認められなかった。

共同研究者

柴田 実¹⁾、柳川達郎¹⁾、西岡幹夫²⁾、宮内嘉明²⁾、
栗山茂樹³⁾、黒河内和貴³⁾、正木 勉³⁾、
富田忠孝⁴⁾、古田康夫⁴⁾、小林三善⁵⁾、宮川 浩⁵⁾
¹⁾NTT東日本関東病院消化器内科、
²⁾愛媛労災病院内科、³⁾香川大学医学部第三内科、
⁴⁾内海病院内科、⁵⁾帝京大学第四内科

法およびIB法によるAMAの測定を行った。IF法はMBL社のフルオロAID-1テスト、IB法はウシ心筋分画を抗原とし、既報の通り測定した1)。

C. 研究結果

1) M2陽性率

M2は（4.0%：95%信頼区間 3.0-5.0%）で検出された（表1）。M2陽性率に性差は認められなかった。

2) M2陽性例の肝機能異常率

異常率はT-Bil 0%、AST 7%、ALT 7%、ALP 10%、 γ -GTP 14%、IgM 8%であり、上記のうち1つ以上の検査項目で異常を認めた例は10例（17%）であった。

3) 各測定法の関係

M2陽性58例のうち、IF法で8例（14%）、IB法で10例（17%）にAMA陽性であった。IB法を診断のGold Standardとすると、AMAの検査前確率は0.68%、ELISA法の陽性的中率は17.2%、正診度96.7%であった。M2陽性例のM2 indexは、IB法陽性例は70.9 \pm 30.2、IB法陰性は15.5 \pm 11.1であり、前者が有意に高値であった（P<0.001）。ELISA法、IF法、IB法の間には図1のような関係が認められた。IF法、IB法による一般住民のAMA陽性率は、それぞれ0.5%（0.2-0.9%）、0.7%（0.3-1.1%）と推定された。

4) M2検査の至適cut off

IB法とELISA法のROC曲線を作成した（図2）。正診度が最も高くなるcut offは55であり、至適cut offと思われた（表2）。M2のcut off 55では、陽性的中率100%、正診度99.9%であった。M2キットが定めるcut off 7で偽陽性が多かったのは、極めて検査前確率が低い集団（0.68%）を対象としたためと考えられた（図3）。

5) IB法のAMA陽性例

IB法AMA陽性の10例を示す（表3）。5例（症例3, 6, 7, 8, 10）で肝機能検査値の異常が認められ、このうち2例（症例6, 7）で肝胆道系酵素およびIgMの上昇を認め

A. 研究目的

ELISA法による改良型M2抗体測定キット（M2）を用いて、一般住民の抗ミトコンドリア抗体（AMA）陽性率を検討した。免疫ブロット（IB）法を診断のGold Standardとして、M2キットの診断能および至適cut offを検討した。さらに、得られた結果を、関東地区の一般住民で行われた先行研究と比較し、AMA陽性率に地域差が存在するか検討した。

B. 研究方法

1) 対象

2002年9月20日～10月2日に香川県小豆郡で実施された住民検診で、説明文書および口頭で疫学調査への協力を依頼し、文書による同意が得られた1,467人を対象とした。男性は486人、平均年齢70.7 \pm 9.1歳（41-93歳）、女性は981人、平均年齢67.4 \pm 10.1歳（40-92歳）であった。

2) 方法

スクリーニング検査として、患者背景因子（性、年齢）、血液検査（AST、ALT、 γ -GTP、TC、HDL-C、TG、FBS）、M2の測定を行った。M2は医学微生物学研究所（MBL）が2002年4月に発売したELISA法による抗ミトコンドリア抗体測定試薬、MESACUP-2テスト ミトコンドリアM2キットで測定した。キットが定めるindex 7以上をM2陽性とした。

M2陽性例は、臨床所見（症状、現病歴、既往歴、家族歴）、血液検査（T-Bil、ALP、IgM）、間接蛍光抗体（IF）

原発性胆汁性肝硬変を発症していると思われた。一般住民の原発性胆汁性肝硬変罹患率は0.1% (0-0.3%) と推定された。

6) 先行研究との比較

我々は平成12年度班会議報告で、関東地方の一般住民2,160名のAMAをIF法で測定し、11例 (0.5%:0.2-0.8%) で陽性と報告した 2)。今回の測定した関西地方のAMA陽性率はIF法で0.5%であり、先行研究と差を認めなかった。

表1 M2陽性率 (ELISA法)

	対象(例)	陽性 (%)	95% 信頼区間
男性	486	20 (4.1%)	2.3 - 5.9%
女性	981	38 (3.9%)	2.7 - 5.1%
全体	1,467	58 (4.0%)	3.0 - 5.0%

表2 M2の至適cut off

Cut off	7	15	25	45	55	65	75
感度 (%)	100	100	90	80	80	50	50
特異度 (%)	96.7	99.0	99.5	99.8	100	100	100
偽陰性 (%)	3.3	1.0	0.5	0.2	0	0	0
尤度比	30	97	164	389	∞	∞	∞
正診度	96.7	99.0	99.4	99.7	99.9	99.7	99.7
陽性的中率 (%)	17.2	40.0	52.9	72.7	100	100	100
陰性的中率 (%)	100	100	99.9	99.8	99.9	99.7	99.7

表3 B法によるAMA陽性例

	性	年齢 (歳)	M2 (index)	IF	T-Bil	AST	ALT	ALP	γ-GTP	IgM
1	M	85	18	+	0.8	25	19	155	33	188
2	F	66	29	-	0.4	19	17	192	21	112
3	F	77	62	-	1	23	19	<u>374</u>	62	<u>358</u>
4	F	82	63	+	0.5	20	13	213	26	112
5	F	51	65	+	0.3	20	14	232	46	273
6	F	72	84	+	0.5	<u>53</u>	<u>48</u>	<u>796</u>	<u>259</u>	<u>512</u>
7	F	68	85	+	0.3	<u>77</u>	<u>51</u>	<u>871</u>	<u>453</u>	<u>315</u>
8	F	83	94	+	0.4	23	19	<u>574</u>	43	133
9	F	69	94	+	0.5	23	15	NT	28	NT
10	F	55	116	+	0.3	27	17	317	<u>208</u>	181

正常値: AST<40, ALT<40, γ-GTP<60, ALP<350, IgM<310
肝機能検査の異常値は斜線付きイタリックで示した。症例6,7は肝胆道系酵素およびIgMの上昇を認め原発性胆汁性肝硬変を発症していると思われた。

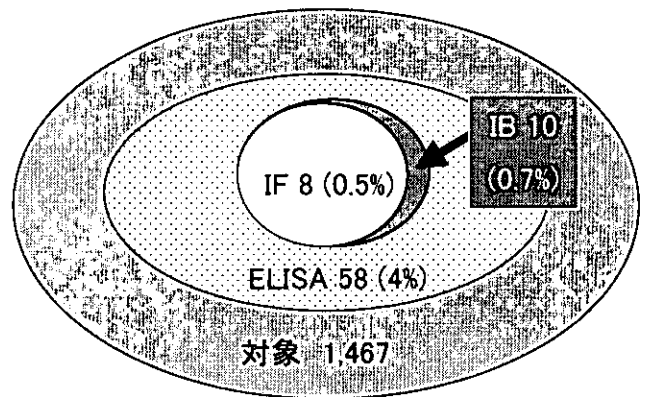


図1 ELISA, IF, B法の関係
ELISA法による改良型M2検査は偽陽性が多く認められた。

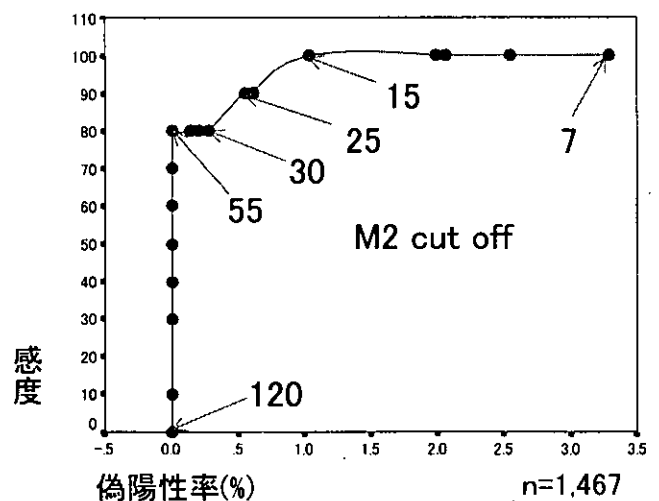


図2 IB法をAMA診断のGold Standardとした際のELISA法のROC曲線
Cut off 7は偽陽性率が高く、cut off 55が最も正診どが高値であった。

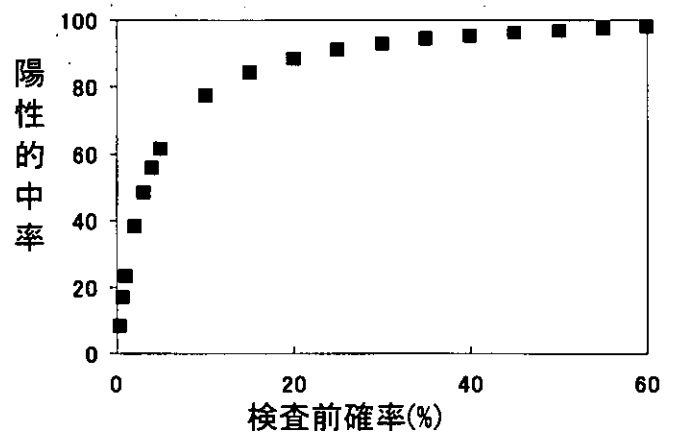


図3 一般住民におけるAMA検査前確率とM2陽性的中率
検査前確率0.7%の陽性的中率は17.2%であった。

D. 考察

改良型のELISA法によるAMA測定試薬、MESACUP-2テストミトコンドリアM2は、従来品MESACUPミトコンドリアM2が1種類のリコンビナント蛋白抗原(PDC-E2)を用い、IgGクラス抗体のみを検出していたのに対して、3種類のリコンビナント蛋白抗原(PDC-E2, BCOADC-E2, OGDC-E2)を用い、IgG, IgA, IgMクラスの抗体を捕らえることができ、診断能が向上した 3)。今回、改良型M2を用いて一般住民をスクリーニングしたところ4%が陽性となった。IB法による検証ではM2陽性例の83%は偽陽性であり、実際のAMA陽性率は0.5%程度と推定された。M2の感度、特異度からすると、一般対象のような検査前確率が極端に低い集団では、MBL社が定めたcut offは低すぎた。今回の対象における至適cut offは55と計算された。

関東地方の一般住民のAMA陽性率はIF法で0.5%であり、今回行った関西地方の成績と一致した。これは、AMA陽性率には、ウイルス肝炎のような地域差が存在しない可能性を示すものである。

E. 結論

- 1) 一般住民のAMA陽性率は、ELISA法による改良型M2では4.0%、IB法では0.7%、IF法では0.5%であった。
- 2) 改良型M2は偽陽性が多く、検査前確率の低い集団ではcut offを高くする必要があった。
- 3) わが国の一般住民のAMA陽性率は関東、関西とも0.5%で、地域差は認められなかった。

文献

- 1) Yanagawa T, Miyakawa H, Shibata M, et al: Immunoreactivity to pyruvate dehydrogenase complex-E2 in well-defined patients with autoimmune hepatitis: Western blot analysis. *Hepatology Res* 26: 81-86, 2003.
- 2) 賀古 眞、柴田 実、小野塚靖、小泉英子、川口直美、宮川 浩、森實敏夫、三田村圭二、上野幸久。わが国の一般集団における抗ミトコンドリア抗体の検討。厚生労働省 特定疾患対策研究事業「難治性の肝疾患に関する研究」班・平成12年度研究報告書：p82-84, 2001.
- 3) 橋本悦子、島田昌彦、林 直諒：原発性胆汁性肝硬変におけるリコンビナント抗原を用いたELISA法による抗ミトコンドリアM2測定の診断的意義。 *医学と薬学* 46: 1031-1037, 2001.

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。

非B非C型肝炎における遺伝子発現プロフィール

分担研究者 小俣 政男 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨： 非B非C型肝炎の病因は未だ不明であり、その発生機序に関する知見は少ない。そのため有効なスクリーニングや高危険群の設定が困難になっている。本研究では、非B非C型肝炎の病態に特異的に関与する遺伝子発現を、B型、C型肝炎と比較することにより検討した。cDNAマイクロアレイデータの比較により、非B非C型肝炎の背景肝に特異的な発現を示す遺伝子を選択し、これらをクエリとして、より大規模なデータセットのマイニングを行った。その結果、非B非C型肝炎の背景肝においては、細胞接着、抗アポトーシス、細胞周期、細胞増殖に関与する遺伝子群の特異的な発現を認めた。これらの知見は、非B非C型肝炎の病態解明、臨床診断、治療ターゲット遺伝子の探索に有用であると考えられる。

共同研究者

大塚 基之
東京大学大学院医学系研究科消化器内科学
星田 有人
東京大学大学院医学系研究科消化器内科学

A. 研究目的

DNAマイクロアレイ技術の登場により、大量の遺伝子発現情報が一度に得られるようになり、病態の違いによる網羅的な遺伝子発現プロフィールを検討することが可能になった。本研究ではマイクロアレイにより得られた情報を基に、既存のさらに大規模なマイクロアレイデータセットのマイニングを行うことにより、非B非C型肝炎の病態の解明や効率的な診断、治療のターゲットの候補となる遺伝子の探索を試みた。

B. 研究方法

非B非C型、B型、C型肝炎の背景肝組織由来のRNAからpoly(A) mRNAを抽出し、cDNAに逆転写する際にCy-3蛍光色素にて標識した。また対照として正常肝組織より得られたmRNAより作製されたcDNAをCy-5蛍光色素にて標識した。これらを約2,300の既知遺伝子のcDNAをスポットしたガラスアレイに競合的にハイブリダイズさせ、2種の蛍光色素のシグナル強度を自動検出器にて測定し、遺伝子発現比を計算した。

正常肝に対する非B非C型、B型、C型肝炎組織中での遺伝子発現比を用いた平均連結法を用いた凝集クラスタリングを行った。また非B非C型肝炎組織で特異的に発現する遺伝子を並べ替えt検定に基づく順位から選択した。多重比較の補正はfalse discovery rateを用いた(family-wise error rateは0.01とした)。

得られた遺伝子リストをクエリとして、コルモゴロフ・スミルノフ・スキャン(KSS)により、公開されているマイクロアレイデータセットのマイニングを行った。データセット中の遺伝子を順番にインデックス遺

伝子とし、他の遺伝子をインデックス遺伝子とのユークリッド距離の順にソートする。ソートされたデータセットにクエリ遺伝子のIDをマップし、インデックス遺伝子との近さの定量値であるスコアを計算する。データセットに含まれるすべての遺伝子についてこれを行う。有意水準の決定は、無作為なマップによるスコアを10万回計算して得られた擬似分布に基づいて行った。以上の解析は自作の解析プログラムにて行った。

有意水準を超えるスコアを示す遺伝子について、その関与する経路について検討を行った。

C. 研究結果

2,300遺伝子発現比を用いた平均連結法による階層クラスタでは非B非C型肝炎組織に特異的に高発現を示す遺伝子群の存在が明らかになった。これらを選び出す目的にて、B型およびC型に比して、発現が亢進もしくは低下している遺伝子群を並べ替えt検定にて行った。多重比較を補正した上で有意水準を満たす遺伝子群はすべて非B非C型肝炎組織で高発現を示す遺伝子であった。それらの機能的な内訳を見ると、シグナル伝達、細胞増殖、細胞内輸送に関与する遺伝子であった。これらの群間比較から得られた結果をよりエンリッチする目的にてKSSを行ったところ、関連が強い遺伝子群の機能の内訳は、細胞接着、シグナル伝達、抗アポトーシス、細胞周期、細胞増殖であった。

D. 考察

非B非C型肝炎においては、過去のB型肝炎ウイルス(HBV)感染の関与が示唆される症例が存在することは事実であるが、大部分は明らかな病因が不明である。今回の我々の検討では、HBV感染の影響も否定できない症例も含めて、非B非C型肝炎の背景肝に特異的と考えられる遺伝子発現の亢進が認められた。これらの結果を既存の大規模な遺伝子発現データセットと組み合わせることにより、よりリーズナブルな遺伝子リストを得ることが可能であった。その遺伝子群

の機能の内訳を見ると、細胞接着、シグナル伝達、抗アポトーシス、細胞周期、細胞増殖が含まれており、高発がん状態を示唆している結果と考えられた。

E. 結論

cDNAマイクロアレイを用いて非B非C型肝炎の背景肝の遺伝子発現解析を行った。大規模な遺伝子発現解析を行うことにより包括的な病態の解明、治療ターゲットの検討の候補遺伝子の選定が可能になると考えられる。また適切に選択した遺伝子セットを用いることにより、遺伝子発現プロファイルの臨床診断への応用の可能性が示唆される。

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

DNAチップを用いたPBC肝組織における遺伝子発現の検討

分担研究者 大西 三朗 高知大学医学部消化器病態学 教授

研究要旨：DNAチップを用いて原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、C型慢性肝炎の肝組織中に発現する遺伝子の発現強度を比較解析し、原発性胆汁性肝硬変の病態に関与しうる遺伝子を検索した。結果としていくつかの遺伝子が抽出されたが、その中で肝におけるステロイド代謝酵素の一つである11-beta-hydroxysteroiddehydrogenaseは、原発性胆汁性肝硬変の肝組織において発現増強が認められ、さらに、治療群では未治療群に対して発現の低下がみられたことから、疾患の病態に何らかの関連性が示唆された。

A. 研究目的

DNAチップ技術の進歩により、包括的な遺伝子発現情報を得ることができるようになった。今回、肝臓に優位に発現している遺伝子約300の搭載されたDNAチップを用いて原発性胆汁性肝硬変の肝組織中に発現する遺伝子の発現強度を解析し、疾患の病態に関与しうる遺伝子を抽出を試みた。

B. 研究方法

対象は原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 16例 (未治療例 7例、治療例 9例)、自己免疫性肝炎 (AIH) 3例、C型慢性肝炎 (C-CH) 9例。PBCおよびAIH症例の肝組織を経皮的肝生検にて採取し、これらの肝組織およびレファレンスコントロール細胞からQiagen社のRNA later, RNeasyを用いてRNAを精製。このRNAをもとにAmbion社のMessageAmp aRNA kitでRNAの増幅を行なった後、cDNA合成の際に蛍光色素Cy3、Cy5で各々を標識し、これをプローブとしてJGS社 (Japan Genome Solutions Inc.) 製のDNAチップにハイブリダイズさせ、シグナル強度の比を自動検出器で測定した。C-CH例についてはインターフェロン治療前の検体9例のデータをJGS社から提供を受けた。なお、すべての患者で検体の一部をこれら遺伝子解析に使用することについてのインフォームドコンセントを

得ている。

また、JGS社製DNAチップでの遺伝子発現強度の解析に用いたコントロール細胞として、同社で調整されレファレンスコントロールとして用いられている4種類の肝癌細胞株 (HepG2、HuH7、Hep3B、IMY) のmixtureを用いた。

C. 研究結果

PBC患者肝組織における遺伝子発現強度の解析にあたっては、コントロール細胞が前述のごとく肝癌細胞株のmixtureであるため、C-CH患者群との比較検討とした。すなわち、C-CH群の各々の遺伝子シグナル強度の平均値でPBC16人の各患者データを除いた値を算出し、その値が2.0倍以上の発現を認めた遺伝子、または0.5倍未満の発現にとどまった遺伝子を、C-CH患者肝組織に対してupregulationまたはdownregulationされた遺伝子として抽出した(表1)。

また、同様にして症例数は3例と少ないもののAIH群に対してPBC群で2.0倍以上の発現を認めた遺伝子、また0.5倍未満の発現にとどまった遺伝子を(表2)、さらに、PBC患者の未治療群に対して治療群で2.0倍以上の発現を認めた遺伝子、また0.5倍未満の発現にとどまった遺伝子を抽出した(表3)。

表1 C-CHに対するPBCの遺伝子発現強度 (PBC/C-CH)

>2.0		<0.5	
11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	16/16	interferon, alpha-inducible protein 27	16/16
gamma-G globin	14/16	IFN-gamma inducible chemokine IP-10 (IP-10)	16/16
Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)	12/16	alpha-2 macroglobulin	16/16
vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	11/16	Apolipoprotein B	15/16
		alcohol dehydrogenase 1class I	14/16
		2,5-oligo-adenylate synthetase (2,5-AS)	14/16
		IFN- α / β -inducible IFI-56K (IFI-56K)	14/16
		elongation factor 2	14/16
		betaine:homocystein methyltransferase	13/16
		UDP glycosyltransferase 2 family	13/16
		glutamate dehydrogenase	13/16
		transferrin	12/16
		multiple drug resistance protein 1 (PGY1)	12/16
		glycogen phosphorylase type IV	12/16
		Human MHC HLA class I cell surface antigen (HLA-B 5102)	11/16
		immunoglobulin heavy constant gamma 3	11/16

表2 AIHに対するPBCの遺伝子発現強度 (PBC/AIH)

>2.0	<0.5	
該当なし	immunoglobulin heavy constant gamma 3	16/16
	interferon, alpha-inducible protein 27	16/16
	IFN-gamma inducible chemokine (IP-10 (IP-10))	16/16
	IFN- α /b-inducible p44 (p44)	16/16
	immunoglobulin kappa variable 1D8	15/16
	alcohol dehydrogenase 1 class I	14/16
	MHC Class II DQ	13/16
	IFN- α /b/g-inducible (IFI-56K (IFI-56K))	13/16
	insulin-like growth factor binding protein 4	12/16
	Human MHC HLA class I cell surface antigen (HLA-B 5102) mRNA	12/16
	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	11/16

表3 未治療群に対する治療群の遺伝子発現強度

>2.0	<0.5
該当なし	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 6/9 (他の3例中2例も 0.55, 0.64 と低下傾向)

C-CHに対してPBCで発現が増強している遺伝子として、11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase, gamma-G globin, Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin) が抽出されたが、このうち11-beta-hydroxysteroid dehydrogenaseはPBCの治療群で未治療群に比較して発現の低下が認められた。

その他、C-CH群ではPBC群に比較しインターフェロン関連遺伝子の発現が増強し、また、AIH群ではPBC群に比較して免疫グロブリン関連遺伝子の発現の増強を認めた。

D. 考察

cortisolをcortisoneに代謝する酵素(逆の反応も触媒)である11-beta-hydroxysteroid dehydrogenaseがPBC全例で肝臓に発現が増強していることの意義は現時点では不明である。基質であるcortisolの肝での増加による同酵素の誘導の可能性があり、自己免疫機序によるPBCではC-CHとは異なる肝細胞障害のストレスに対し、肝あるいは血中のcortisolが増加していると推測される。この点については更に検討が必要である。

E. 結論

PBC, AIH, C-CH患者の肝組織中での、遺伝子発現強度の比較解析を行った。C-CH群との比較検討で、PBC群で発現の増強を認めた遺伝子4個と、発現の低

下を認めた遺伝子16個を抽出した。その中で、11-beta-hydroxysteroid dehydrogenaseはPBC全例で発現が増強しており、また未治療群に対し治療群で発現の低下が認められ、PBCの病態に何らかの関連性がある可能性が示唆された。今後、同一個体での治療前後の比較検討を検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

首都圏の原発性胆汁性肝硬変症例におけるHLA DRB1の検討

研究協力者 池田 有成 東京厚生年金病院 内科部長

研究要旨：首都圏の原発性胆汁性肝硬変（PBC）症例についてHLA DRB1を測定し、PBCとの関連を検討した。52例（男：女＝8：42、36-75歳）を対象とした。肝生検は37例（71％）に施行。診断時2例のs1以外aPBCだった。経過中の死亡は3例で、静脈瘤は7例に認めた。DRB1はPCR-RFLP法で測定し、首都圏の健常者118人と比較した。HLA DRB1 alleleの頻度は*1502が20（19.2％）と対照に較べて有意に多かった（ $P<0.05$ ）。以下多い順に、*0803が14（13.4％）、*0405が13（12.5％）、*0901が11（10.6％）、*1501と1401とが7（6.8％）、*0802が6（5.8％）だった。*1302は4（3.8％）と有意に少なかった（ $P<0.05$ ）。また、*15（DR2）は27（26.0％）、*08（DR8）は20（19.2％）で、いずれも有意に多かった（ $P<0.05$ ）。症例毎では*1502が18例（34.6％）、*0803が14例（26.9％）、*0405が13例（25％）の順で、このいずれかを有する者が37例（71.1％）を占めた。また、52例中48例（92.3％）がDR15（24例）、DR8（20例）、DR4（16例）のいずれかを有した。既報に較べて*0803が少なかった原因として、組織学的に軽症の症例が多かった可能性を考えた。DRB1はPBCの臨床像と関連する可能性が示唆された。

共同研究者

橋本直明 東京逡信病院消化器科

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は免疫遺伝的背景因子としてHLA DR8との関連が報告されている。HLA分布には地域差があること、HLA DRとPBCの臨床像との関連が報告されていることから、首都圏のPBC症例についてHLA DRB1を測定して検討した。

B. 対象と方法

対象は当科を受診したPBC症例52例で、男8例女42例、年齢36-75歳である。肝生検は37例（71％）に施行した。診断時は2例のs1症例以外はaPBC症例だった。静脈瘤は7例に認め4例で内視鏡的治療を行った。経過中3例が死亡し死因は胃静脈瘤破裂、肝細胞癌（HCC）、神経疾患だった。HLAはinformed consentを得て、class Iはmicrolymphocytotoxicity法で、DRB1はPCR-RFLP（restriction fragment length polymorphism）法で測定した。首都圏の健常者118人の頻度と比較した。

C. 結果

(1) HLA DRB1 alleleの頻度は（表1）、*1502が20（19.2％）と有意に多かった（ $P,0.05$ ）。以下、多い順に*0803が14（13.4％）、*0405が13（12.5％）、*0901が11（10.6％）、*1501と1401とが7（6.8％）、*0802が6（5.8％）と続いた。*1302は4（3.8％）と有意に少なかった（ $P,0.05$ ）。また、*15（DR2）は27（26.0％）、*08（DR8）は20（19.2％）で、いずれも有意に多かった（ $P<0.05$ ）。

(2) 症例毎では、*1502が18例（34.6％）、*0803が14例（26.9％）、*0405が13例（25％）の順で、三者いずれかを有する者が37例（71.1％）を占めた。また、52例

中48例（92.3％）がDR15（24例）、DR8（20例）、DR4（16例）のいずれかを有し、残る4例はDR9（B1*0901）又はDR6（B1*1401）を有した。

(3) homozygoteは3症例で *1401のホモ1例と*1502のホモ2例だった。

(4) ハプロタイプの可能性は、*1504の17/20（85％）がA24-B52-DRB1 *1502、*0803の6/14（42.9％）がA2-B46-DRB1*0803、*0101は3 alleleすべてがA24-B7-Cw7-DRB1*0101、*1401の2/7（28.6％）がA2-B61-DRB1*1401と考えられた。

(5) 姉妹発症例が1組含まれ、A2-B61-Cw(-)-DRB1*1401を共有した（表2）。

(6) *0803の有無で2群に分けると、陽性群では肝組織がScheuer IIまたはII-IIIの者が10例中6例（60％）だったのに対して、陰性群では27例中9例（33.3％）だった。

(7) *0901の有無で2群に分けると、陽性群では11症例中4例に癌（胃癌1例、乳癌1例、HCC 1例、肺癌とHCC 1例）の既往を認めたが（表3）、陰性例41例中に癌は1例のみ（肺癌とHCC）。癌症例5例中4例は男性だった。Sjogren症候群（SjS）の8例は全員陰性群だった。ANAのdiscrete speckled type陽性の11例は全例陰性群だった（うち5例がSjSを合併）。

(8) *0405の有無で2群に分けると、蛍光抗体法でAMA陰性の5症例は全例*0405陽性群に含まれた。

D. 考察と結論

首都圏のPBC症例ではHLA DRB1 *1502 alleleの頻度が有意に高かった。DRB1 *0803の頻度も高かったが（52例中14例26.9％）、Onishiらの31例中24例（72.7％）、Mukaiらの48例中16例（33.3％）、Oguriらの53例中23例（37.7％）には及ばなかった。その原因の可能性として、自験例ではDRB1 *0803陽性者の方が肝組織

所見が進行していたこと、肝生検を施行した37例中22例(59.5%)がScheuer I期またはI-II期と軽症の患者が多く含まれたこと、が考えられた。なお、DRB1*08 (DR8)は20(19.2%)で、有意に多かった(P<0.05)。また、*1502、*0803、*0405のいずれかを有する者が37例(71.1%)と多数を占めたが、家族発症例として

Iに含まれた姉妹例での共通ハプロタイプはA2-B61-Cw(-)-DRB1*1401と稀なものだった。これらから、PBC症例のDRB1は自己免疫性肝炎の場合ほど強い相関は示さないものの、PBCの臨床像と関連する可能性が示唆された。

表1. PBC患者におけるHLA DRB1 allelesの頻度

HLA DRB1*	No. of Alleles (% of Group)		
	Patients with PBC (n=104 alleles)	Normal Subjects (n=236 alleles)	
0101	3 (2.9%)	11 (4.7%)	
0403	2 (2.0%)	7 (3.0%)	
0404	1 (1.0%)	1 (0.4%)	
0405	13 (12.5%)	30 (12.7%)	P=0.999, NS
0406	2 (2.0%)	8 (3.4%)	
0701	1 (1.0%)	1 (0.4%)	
0802	6 (5.8%)	7 (3.0%)	
0803	14 (13.5%)	17 (7.2%)	P=0.069, NS
0901	11 (10.6%)	38 (16.1%)	P=0.240, NS
1201	4 (3.8%)	7 (3.0%)	
1202	2 (2.0%)	4 (1.7%)	
1205	1 (1.0%)	0 (0.0%)	
1302	4 (3.8%)	27 (11.4%)	P=0.025, <0.05
1401	7 (6.7%)	7 (3.0%)	
1403	2 (2.0%)	7 (3.0%)	
1405	2 (2.0%)	8 (3.4%)	
1406	1 (1.0%)	2 (0.8%)	
1501	7 (6.7%)	14 (5.9%)	
1502	20 (19.2%)	23 (9.7%)	P=0.021, <0.05
1602	1 (1.0%)	4 (1.7%)	

表2. PBCの姉妹症例

	生年	性別	DRB1	ANA	AMA	肝組織	HLA A,B,C locus
1.	1942	女	1401/1502	640x ds	160x	II	A 2,24, B61,52, Cw(-)
2.	1948	女	1401/1401	1280x ds	40x	I-II	A 2,31, B61,60, Cw(-)

表3. PBC患者と癌

	生年	性別	DRB1	癌	ANA	AMA	肝組織	HBc抗体(200x希釈)
1.	1935	女	0802/0901	乳癌	(-)	320x	未検	
2.	1956	男	0803/0901	胃癌	(-)	320x	I-II	
3.	1928	男	1502/0901	HCC	(-)	320x	I-II, then IV	98% (5%)
4.	1929	男	0405/0901	HCC,肺癌	(-)	160x	未検	28%
5.	1927	男	0406/1501	HCC,肺癌	(-)	160x	胆管消失	未検

E. 参考文献

1. Onishi S, et al: DNA typing of HLA classII genes; DRB1*0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis. J Hepatol 21: 1053-1060,1994.
2. Mukai T, et al: Association of HLA-DRB1*0803 and *1602 the susceptibility to primary biliary cirrhosis. Int Hepatol Comm 3:207-212,1995
3. Oguri H, et al: Susceptibility to primary biliary cirrhosis is associated with human leukocyte antigen DRB1*0803 in Japanese patients. Int Hepatol Comm 2:263-270,1994
4. 飯領田久巳男、他：HLAクラスII抗原よりみた原発性胆汁性肝硬変の臨床像. 肝臓 42:231-237, 2001.

原発性胆汁性肝硬変におけるPDC-E2特異的T細胞と胆管上皮細胞との相互作用の解析

研究協力者 石橋 大海 国立長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：本研究の目的は原発性胆汁性肝硬変（PBC）の発症、進展の主因とされる免疫異常の中で、特に胆管の破壊に重要な役割を果たしていると考えられるPDC-E2特異的T細胞と胆管上皮細胞との相互作用を解析し、最終的にはPDC-E2特異的T細胞を標的とする画期的治療法を開発することを目的とする。本年度は①PBCにおけるPDC-E2特異的CD28-CD4+T cell（補助刺激非依存性T細胞）の意義について解析した。健常者においても、PDC-E2に特異的な自己反応性T細胞は存在するが、その活性化にはB7 - CD28 を介したシグナルが必須である（補助刺激依存性）。これに対して、PBCにおいては、補助刺激非依存性のPDC-E2に特異的な CD4+ T cellやCD28-CD4+ T cellが末梢血と肝臓局所に増加していた。この細胞群は胆管上皮細胞に対し*in vitro*で細胞傷害活性を有し、胆管上皮細胞との接触後もアナジーとなり難いことから、*in vivo*で比較的長期間活動性を有し、PBCの病態形成・維持に深く関与している可能性が示唆された。また、②PDC-E2特異的T細胞クローンと胆管上皮細胞との相互作用の解析から、胆管上皮細胞には、免疫抑制を担う補助分子の発現や抗炎症性の液性因子の分泌を介して、胆管周囲の免疫反応を抑制するユニークな免疫制御機構を有することが示唆された。

共同研究者

下田慎治、上平幸史、河野 聡
九州大学大学院病態修復内科学
中村 稔、小森敦正、横山照史、吉田由紀、
瀧井 康
国立長崎医療センター
海外共同研究者
Gershwin M.E.
米国カリフォルニア大学デイビス校

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は、抗ミトコンドリア抗体の出現を特徴とし、胆管上皮細胞の慢性進行性の障害により、肝硬変、肝不全に至る難治性の自己免疫性肝疾患と考えられている。我々は、AMAの主たる標的蛋白であるPDC-E2に特異的なT細胞が、PBC患者の肝臓局所で増加していることから、その病因における役割に注目して解析をすすめてきた。

一方、発症後間もない1型糖尿病患者の末梢血中に補助刺激非依存性GAD65反応性 CD4+Tcellが増加していることや、多発性硬化症患者末梢血中に補助刺激非依存性MBP反応性CD4+T cellやCD28-CD4+T cellが増加していることが最近報告されている。これらの細胞群は、補助刺激非依存性に活性化し、増殖能・IFN γ 産生能が高くアポトーシスに抵抗性であることから、種々の自己免疫疾患において、病態形成・維持に深く関与している可能性が示唆されている。

そこで、本年度はPDC-E2特異的T細胞をCD28の発現の有無、あるいは補助刺激依存性・非依存性に着目して、PBC発症における自己反応性T細胞の意義について検討した。

B. 研究方法

stageI/IIのPBC患者26名、stageIV の7名の患者の検体を解析した。コントロールとしては、32名の健常者、12名のC型慢性肝炎患者、8名のC型肝硬変患者を解析した。末梢血中と肝臓内リンパ球中のCD28-CD4+T cell の頻度は、flowcytometryおよび組織染色にて検討した。PBC患者および健常者のPBMCをPDC-E2抗原ペプチドで刺激を繰り返すことによりCD4+T cellクローンを樹立した。細胞障害活性は、⁵¹Cr-release assay にて、細胞増殖能は、³H-thymidine uptake で評価した。抗原提示細胞としては、抗原ペプチドをパルスした放射線照射自己PBMC、マイトマイシン処理したHLADR53発現L-cell、HLADR53陽性胆管上皮細胞を用いた。胆管上皮細胞は、移植レシピエントの肝臓よりコラゲナーゼ処理とマグネティックビーズを用いて分離した。

C. 研究結果

1. PBC患者末梢血中には、健常者や慢性ウイルス肝炎患者に比べて、costimulation非依存性のPDC-E2特異的 CD4+T cellが有意に増加していた。
2. PDC-E2特異的T cell clone 18株中11株はcostimulation依存性であり、7株は非依存性であった。その7株中2株はCD28陰性であった。
3. CD28-CD4+T cellがPBC患者末梢血中・肝臓内で有意に増加していた。
4. PDC-E2特異的T cell cloneは、costimulation依存性・非依存性のいずれも抗原ペプチドをパルスした胆管上皮細胞を*in vitro*で傷害した。
5. costimulation 依存性T cell cloneは、抗原ペプチドをパルスした胆管上皮細胞と共培養後はアナ

ジーとなったが、costimulation 非依存性 T cell clone はアナジーとはならなかった。

- 胆管上皮細胞は、IFN- γ 処理と B7 分子の遺伝子導入により、HLADR53 と B7 を発現した後も、抗原提示能は示さなかった。

C. 考察

近年、種々の自己免疫疾患で増加している自己反応性 T 細胞は、TCR/MHC/peptide の刺激のみで増殖し、B7 からの補助シグナルが増殖に不必要であることが報告され注目されている。本研究において、PBC で増加している PDC-E2 特異的 T 細胞は、costimulation 非依存性に増殖し、HLADR53 を発現した胆管上皮細胞との接触によってもアナジーが誘導されずに、引き続きプロフェッショナル抗原提示細胞からの抗原刺激により、すみやかに増殖が誘導されることが示された。このことは、costimulation 非依存の自己反応性 T 細胞が一旦出現した場合には、標的細胞との接触後もアナジーに陥ることなく、長期間、活性化した状態で生存し得る事、すなわち、標的細胞の傷害を繰り返し得ることを意味している。従って、この悪循環を遮断するために、PDC-E2 特異的 T 細胞を直接の標的とする治療法の開発が必要と思われる。

一方、胆管は、さまざまな外来抗原に日常的に暴露されている門脈域に局在するため、免疫学的な監視機構、すなわち、自然免疫から獲得免疫誘導への橋渡しやバイスタンダードな免疫学的攻撃からの防御機構など、多様な免疫制御機構を有している可能性がある。今後は、この点にも着目し、PDC-E2 特異的 T 細胞と胆管上皮細胞との相互作用を解析する必要がある。

D. 結論

PBC において、costimulation 非依存性 PDC-E2 特異的 CD4+ T cell や CD28- CD4+ T cell が増加していた。この細胞群は胆管上皮細胞を傷害し、胆管上皮細胞との接触後もアナジーとなり難いことから、患者体内で比較的長時間活動性を有し、病態形成・維持に深く関与する自己反応性 T 細胞である可能性が示唆された。

E. 研究発表 (学会発表)

- 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
- 河野聡、下田慎治、上平幸史、半田瑞樹、東みゆき、原田実根。原発性胆汁性肝硬変発症にかかわる B7 分子の影響。第33回日本免疫学会総会、2003.12.8-10、福岡
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

F. 研究発表 (誌上発表)

- 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.
- Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S, Gershwin ME. : T cell immunity and primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev*. 2003 Jan; 2(1): 19-24.
- 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.
- 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.
- Fukushima N, Nalbandian G, Van de Water J, White K, Ansari AA, Kenny T, Kamita SG, Hammock BD, Coppel RL, Stevenson F, Ishibashi H, Gershwin ME. Characterization of recombinant monoclonal IgA anti-PDC-E2 autoantibodies derived from patients with PBC. *Hepatology*. 2003

6. Ishibashi H, Shimoda S, Shigematsu H, Nakamura M. Induction of T cell Anergy by Antigen Peptide Analogue in Primary Biliary Cirrhosis. In: General Aspects of Molecular Biology and Immunology for the treatment of Intractable Liver Diseases, Tsuji T, Meyer zum B'chenfelde KH (eds), Tokyo: Elsevier Science BV, 2002.

原発性胆汁性肝硬変（PBC）における胆管消失の分子機構：
老化形質の発現を中心に

分担研究者 中沼 安二 金沢大学医学系研究科形態機能病理学 教授

研究要旨： 原発性胆汁性肝硬変における肝内小型胆管消失の機序は十分に解明されていない。今回PBCでの胆管消失の機序として、胆管細胞の老化(cellular senescence)の関与を検討した。その結果、PBCの障害胆管では、1) 形態学的な老化形質の発現、2) 老化形質senescence-associated β -galactosidaseの発現、3) 老化関連p16(INK4a), p21(WAF1/Cip)の発現亢進、が認められた。また、培養マウス胆管上皮には酸化ストレス（過酸化水素投与）、TGF- β 投与により老化関連形質が誘導された。PBCでは、胆管細胞の老化が胆管再生不良から胆管消失の要因となる可能性が示唆された。

共同研究者

佐々木素子、池田博子
金沢大学医学系研究科形態機能病理学

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変における肝内小型胆管消失の機序は十分に解明されていない。本来、胆管細胞は増殖能、再生能に優れており、障害胆管は再生胆管細胞により速やかに修復されるはずである。私どもは、“PBCでは胆管の再生障害が胆管消失につながるのではないか”と仮説をたてて研究をすすめている。最近、私どもは再生障害の一因として細胞老化 (cellular senescence) に注目するようになった。細胞老化は“種々の障害因子によって生じる細胞増殖の停止状態”と定義され、癌抑制や各種疾患の病態形成における役割が注目されている。PBCと同様に胆管消失をきたす肝移植後慢性拒絶では、胆管の消失と胆管細胞老化の関与が報告されている (Lunz III, et al., Am J Pathol 2000)。そこで今回、私どもは、PBCの肝内小型胆管における老化形質の発現を検討した。

B. 研究方法

1) 肝内小型胆管における形態学的老化形質の発現

PBC47例、肝移植後慢性拒絶10例、対照正常肝10例の病理組織標本 (HE染色) を観察して肝内小型胆管細胞における形態学的老化形質 (細胞質の好酸化、細胞、核の腫大、多核化など) の発現と胆管障害の程度との関連を観察した。

2) 肝内小型胆管における老化形質senescence-

associated β -galactosidase (SA- β -gal)の発現
1,2期PBC6例、3,4期PBC9例、PSC3例、慢性ウイルス性肝炎 (CVH) 7例、正常肝8例の凍結肝組織切片を用い、Dimriらの方法でSA- β -galの発現を検出した。

3) 肝内小型胆管における老化関連p16 (INK4a) とp21 (WAF1/Cip) の発現

1,2期PBC24例、3,4期PBC9例、PSC8例、肝移植後慢性拒絶10例、CVH22例、閉塞性黄疸肝18例、正常肝25例の外科的生検、切除肝 (10%ホルマリン固定パラフィン包埋材料) を用いて、胆管細胞における老化関連p16 (INK4a) とp21 (WAF1/Cip) の発現を免疫組織化学的に検討した。尚、肝移植後慢性拒絶症例は京都大付属病院病理部：真鍋俊明教授より供与を受けた。

4) 培養マウス胆管上皮における老化関連形質の発現誘導

培養マウス胆管細胞 (BALB/Cマウス肝内末梢胆管由来) をコラーゲンゲル内で3次元培養し、過酸化水素添加 (450 μ M, 2時間) とTGF- β 添加 (2ng/ml) による老化形質の誘導を試みた。添加後、計時的に観察とサンプル採取を行った。老化関連p16 (INK4a) とp21 (WAF1/Cip) の発現を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

1) 形態学的老化形質の発現

PBCの肝内小型胆管では、胆管障害像を示す部位優位に胆管細胞は形態学的老化形質 (細胞質の好酸化、細胞、核の腫大、多核化など) を示した。同様に肝移植後慢性拒絶においても障害胆管に形態学的老化形質を認めた。対照正常肝の小型胆管には形態学的老化形質は全く見られなかった。

2) 老化形質SA- β -galの発現

PBCの肝内小型胆管では胆管障害部を中心にSA- β -gal発現を認めた。一方、CVH、正常肝の小型胆管におけるSA- β -gal発現は低率であり、PBCとの間に有意差を認めた (図1)。尚、3,4期のPBC、PSCでは門脈域辺縁の細胆管と肝細胞にもSA- β -gal発現を認めた。

3) 老化関連p16(INK4a), p21(WAF1/Cip)の発現

PBCの肝内小型胆管では胆管障害部を中心に、高

率にp16 (INK4a), p21 (WAF1/Cip) の発現を認めた(図2)。発現は主に、胆管細胞の核に見られた。肝移植後慢性拒絶においても障害小型胆管でのp16, p21発現が目立った。一方、CVH, 閉塞性黄疸肝、正常肝ではp16, p21発現ともに低率であり、PBC, 肝移植後慢性拒絶との間に有意差を認めた(図2)。

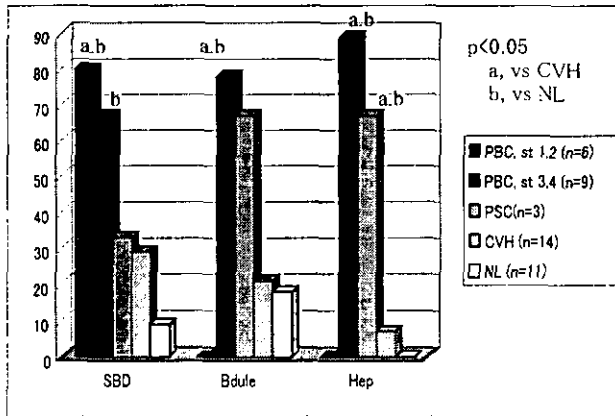


図1. PBCの肝内小型胆管 (SBD) における老化形質SA-β-galの発現

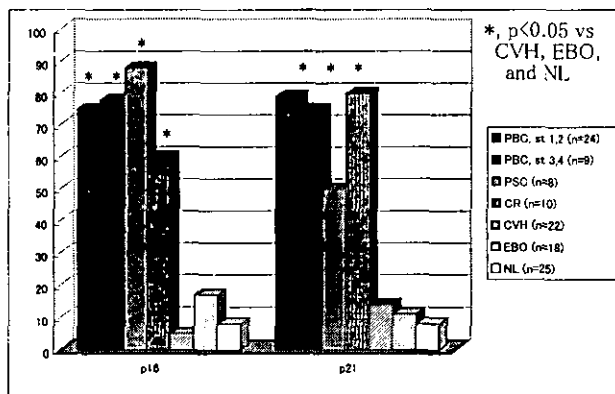


図2. PBCの肝内小型胆管 (SBD) における老化関連p16(INK4a), p21(WAF1/Cp)の発現

4) 培養マウス胆管上皮における老化関連形質の発現誘導

刺激因子無添加状態(対照)のコラーゲンゲル内3次元培養では、培養マウス胆管上皮細胞は球状の嚢胞を形成した。過酸化水素添加により嚢胞の変形と収縮が生じた。TGF-β添加では添加後約2日目以降、スパイク形成を示す嚢胞形態の変化が認められた。過酸化水素、TGF-beta添加により老化関連p16(INK4a), p21(WAF1/Cip)の発現亢進が認められた。

D. 考察

今回の検討の結果、PBCの肝内小型胆管は、胆管障害部を中心に形態学的老化形質を示すこと、老化形質SA-β-gal発現を示すこと、老化関連形質p16, p21発現が亢進していること、が明らかとなった。従って、PBCの障害小型胆管は“細胞老化”の状態にあるとい

える。細胞老化、すなわち増殖停止状態にある障害胆管は、再生細胞によって置換されずに停滞すると考えられる。老化細胞の停滞は組織の再生修復の遅延、局所の炎症持続の原因となることが報告されている。実際、肝移植後慢性拒絶や腎移植後慢性拒絶では胆管細胞や尿細管細胞に細胞老化が生じており、胆管消失などにつながる可能性が示唆されている。PBCの障害胆管においても肝移植後慢性拒絶と同様の機序で胆管細胞老化が胆管消失の原因となると考えられる。

PBCの胆管細胞の細胞老化誘導因子については今後の検討課題である。細胞老化を誘導する重要な因子としては酸化ストレスが知られている。以前よりPBCにおける酸化ストレス亢進に関する報告は散見されており、酸化ストレスが胆管老化の要因である可能性は十分考えられる。また、肝移植後慢性拒絶では細胞老化の誘導におけるTGF-βの関与が報告される。興味深いことに、PBCにおけるTGF-β発現亢進についても報告がある。今回のマウス培養胆管細胞を用いた検討では、過酸化水素による酸化ストレス、TGF-βともに老化関連形質p16, p21発現を亢進させることが明らかとなった。今後さらに、酸化ストレスの程度や他のサイトカインなどと胆管細胞老化の関連について検討を進めたい。

E. 結論

PBCでは胆管細胞老化が胆管の再生不良の原因となり、胆管消失につながる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki M, et al. Site-Characteristic Expression and Induction of Trefoil Factor Family 1, 2 and 3 and DMBT1 in Normal and Diseased Intrahepatic Bile Ducts Relates to Biliary Pathophysiology. Liver Intern 2004 (in press)

2. 学会発表

佐々木素子ら。肝内胆管粘膜免疫における粘膜再生因子trefoil factor family-1, 2, 3の役割.第40回消化器免疫病学会(2003年8月,東京)

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(PBC)における肝組織中アルカリフォスファターゼ(ALP)の発現の検討

研究協力者 向坂彰太郎 福岡大学医学部第三内科 教授

研究要旨： PBCの肝組織におけるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現を検討した。
対象) 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 13例、C型慢性肝炎10例、正常肝2例であった。
方法) 1) 抗ヒトALP抗体を用いた免疫組織化学により、肝組織内のALPの局在を検討した。2) ウエスタンブロット法により、肝組織のALP蛋白の発現を評価した。3) 定量的RT-PCR法により、肝組織のALPのmRNAの発現を評価した。
結果) 1) 正常肝、C型慢性肝炎では、ALPは肝細胞の毛細胆管膜と門脈域の胆管の内腔側に局在していた。PBCでは、ALPは肝細胞の類洞側膜ならびに毛細胆管膜の両者と、門脈域の胆管細胞の細胞質に広く認められ、正常肝、C型慢性肝炎とは異なる局在がみられた。2) 肝のALPのmRNA及び蛋白の発現は、PBCでは、C型慢性肝炎に比較し、統計的に有意に亢進していた(P<0.05)。

A. 研究目的

アルカリフォスファターゼ(以下ALP)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(以下 γ -GTP)は、胆汁うっ滞性肝疾患の臨床マーカーとして診療の場で広く用いられている。しかし、これらの酵素の肝組織における局在や、さらに、各種病態における機能については明確でない。胆汁うっ滞性疾患における血清ALPの上昇の機序としては、胆管内圧の上昇による毛細胆管膜上のtight junctionの破綻、細胞障害性胆汁酸による誘導などが推定されているが、詳細は不明である。一方、ALPには胆汁分泌を抑制する作用や、胆管腔を縮小させる作用、 γ -GTPを誘導する作用が知られているが、その機能についても不明な点が多い。また、これらの実験報告はほとんどが動物実験によるものであり、ヒトの肝組織においての検討は極めて少ない。ヒトの肝組織において、疾患による障害部位や機序の相違を解明する事は、疾患の病態を理解する上で非常に有用であると考えられる。今回我々は、代表的な胆汁うっ滞疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)の肝組織におけるALPの局在を検討した。

B. 研究方法

- 1) 免疫組織化学：対象は、PBC13例、C型慢性肝炎10例、正常肝2例の肝生検標本を用いた。アセトン固定肝凍結切片に、抗ヒトALP抗体及び蛍光色素標識2次抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ALPの局在を評価するために、DPPIV(毛細胆管膜マーカー)、Na-K ATPase(類洞側肝細胞膜マーカー)、サイトケラチン19(胆管上皮細胞マーカー)との二重染色を施行した。
- 2) ウエスタンブロット法によって、肝組織のALP蛋白の発現を評価した。
- 3) 定量的RT-PCR法によって、肝組織のALPのmRNAの発現を評価した。

C. 研究結果

- 1) 免疫組織化学：正常肝、C型慢性肝炎では、ALPは肝細胞の毛細胆管膜と門脈域の胆管の内腔側に局在していた。PBCでは、ALPは肝細胞の類洞側膜並びに毛細胆管膜の両者と、門脈域の胆管細胞の細胞質に広く認められ、正常肝、C型慢性肝炎とは異なる局在がみられた。
- 2) ウエスタンブロット：各サンプルとも、分子量85000付近にバンドが認められた。ヒト肝ALPの分子量は16万であるが、ALPは2つのsubunitよりなるhomodimerであり、subunit間の結合はSDS-PAGEの際のサンプル処理により切断されるものと考えられ、約半分の分子量の部位にバンドが出現したものと考えられた。陽性コントロールとして、市販のヒト肝ALP蛋白を泳動したが、同分子量の位置にバンドが認められ、ALPのバンドである事が確認された。バンドの定量的評価では、正常肝：C型慢性肝炎：PBCで1:1.1:3.6であり、胆汁うっ滞を伴ったPBCでは、C型慢性肝炎に比べ、ALP蛋白の発現が亢進していた。
- 3) 定量的Real-Time RT-PCR：肝組織内のALPのmRNAの発現は、正常肝：C型慢性肝炎：PBCで、1:1.1:7.0であり、PBCでは、C型慢性肝炎に比べ、ALPのmRNAの発現の亢進がみられた。

D. 考察

本研究は、胆汁うっ滞状態下におけるALPのヒト肝組織内の発現の観察である。今回の検討では、PBCにおける肝組織内ALPの局在は正常肝、C型慢性肝炎と異なる分布を示し、また、その発現が亢進している事が確認された。局在の変化については、胆管内圧の上昇によって毛細胆管膜上のtight junctionが破綻し、ALPが肝細胞膜のapical siteからbaso-lateral siteに移行した可能性が考えられる。また、胆汁うっ滞時には肝細胞のpolarityの変化がみられる事に伴う変化と

も解釈できる。ALPの発現の亢進については、胆汁酸などによってALPが誘導されている可能性が想定される。

以上の事により、私共の研究室でこれまで研究されてきた肝細胞の各種トランスポーターやtight junctionの変化と、ALPや γ -GTPなどの胆道系酵素との関連を総合的に理解できるようになり、従来より臨床マーカーとして広く普及し、すべての医学書に記載されている両酵素の肝における意義を初めて理解できるようになる。また、それにより将来、このような難治性肝疾患の治療の開発にむすびつける事ができると考えられる。

E. 研究発表

2) 論文発表

無し

3) 学会発表

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
第11回肝病態生理研究会(2003年5月21日)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し