

13:45~14:35 Program (1)-4

Randomized double blind control trial of reverse transcriptase inhibitor for UDCA-resistant PBC

Yoshiyuki Ueno, Yuki Moritoki, Takayuki Kogure, Noriatsu Kanno, Koji Fukushima, Tooru Shimosegawa.

Tohoku University Hospital, Division of Gastroenterology

Backgrounds: Currently, ursodeoxycholic acid (UDCA) is the only proven therapy to prolong the time for liver transplantation, especially in stage I and II patients with PBC. However, the presence of UDCA resistant cases is well known, and for these subpopulation of the patients with PBC has no means to prevent liver failure. The pathogenesis of PBC has been enigma although there have been lines of evidences that this condition is the results of immune-mediated destruction of intrahepatic bile ducts. Recently, Mason et al reported the involvement of retrovirus infection in the pathogenesis of PBC. Moreover, the antiviral therapy using reverse transcriptase inhibitor has been reported to be effective by the same authors.

Aim: Thus, the aim of this study is to evaluate the efficacy of anti-reverse transcriptase inhibitor (Lamivudine) in the UDCA-resistant Japanese patients with PBC.

Patients and methods: Total of 20 patients with PBC were enrolled in the study. The diagnosis of PBC was made by both well established criteria (liver enzyme profile and positive anti-mitochondrial antibody) and liver biopsy. The inclusion criteria are: 1) elevated liver enzyme (GGT, ALP) in spite of UDCA administration more than 6 month, 2) age between 20 to 70 years old, 3) normal renal function, 4) normal CPK, 5) no past history of administration of anti-retroviral agents, 6) obtainment of written informed consent. Exclusion criteria include: 1) normal liver enzyme, 2) patients with abnormal renal function, 3) presence of other cause of liver injury (HBV, HCV, alcoholic, AIH), 4) use of corticosteroids. Finally, 20 patients (4 male, 16 female) were randomly grouped into Lamivudine group and placebo group. Each patients were given either 100mg/day of lamivudine or lactose in power form for 3 month. These 20 patients were monitored monthly.

Results: Each group of patients has completed the study. Lamivudine was well tolerated by patients with PBC. There was no significant difference between symptomatic adverse effects (ex. headache, abdominal pain, deteriorating renal function), although certain portion of lamivudine treated patients exhibited the elevation of serum CPK and amylase levels. As for liver enzymes, there are no significant improvements between two patients group, similar to changes of anti-mitochondrial antibodies' titer. However, some patients in Lamivudine group have demonstrated the improvement of liver enzymes as well as the decrease of AMA titer.

Conclusion: Lamivudine is well tolerated in patients with PBC. Although its short term effects have not been significant, some patients have demonstrated the improvements. Long term effects need to be monitored to draw conclusion about its efficacy.

Prevalence of anti-mitochondrial antibody in Japanese population.

Morizane T¹, Shibata M², Nishioka M³, Miyakawa H⁴, Yanagawa T², Miyauchi Y³, Kuriyama S⁵, Kurokouchi K⁵, Masaki T⁵, Tomita T⁶, Furuta Y⁶, Kobayashi M⁶, Imawari M⁷

¹ Kanagawa Dental College

² Kanto Medical Center NTT EC

³ Ehime Rosai Hospital

⁴ Teikyo University

⁵ Kagawa Medical University

⁶ Utsumi Hospital

⁷ Showa University

Purpose: We studied the prevalence of anti-mitochondrial antibody (AMA) in a Japanese population with a modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure serum anti-M2. We used an immunoblot (IB) method as gold standard and studied the diagnostic performance of the ELISA method and determined the most accurate cut-off value.

Subjects: We studied 1,467 (486 males and 981 females, mean age 68.5 ± 9.9 years) general population in Shodo island of Kagawa prefecture in Shikoku.

Methods: Serum anti-M2 was measured by MESACUP-2 test and Mitochondria M2 with a cut-off value of seven according to the attached manual. Anti-M2-positive samples were re-examined with indirect immunofluorescence (IF) and IB methods.

Results: Anti-M2 was positive in 58 people (4.0%, 95% CI 3.0-5.0%). Eight of these positive cases were positive with IF and 10 were positive with IB. Using IB method as the gold standard, the pre-test probability of AMA was estimated to be 0.68%. The positive predictive value (PPV) of the ELISA method was 17.2% and the accuracy was 96.7%. With the receiver operating characteristic analysis, we found that the optimal cut-off value was 55 when the ELISA method was applied to general population. With this cut-off value, the PPV was 100% and the accuracy was 99.9%. Ten out of 58 people (17%) with positive anti-M2 and five out of 10 people (50%) with positive IB, were found to have abnormal results of liver function tests. Two of these people had elevations of alkaline phosphatase and immunoglobulin M, which suggested primary biliary cirrhosis (PBC). The prevalence of AMA in the Japanese general population was estimated to be 0.5% (0.2-0.9%) with IF method, 0.7% (0.3-1.1%) with IB method, and the prevalence of PBC was estimated to be 0.1% (0-0.3%). These results were consistent with those of our previous study conducted in Kanto area.

Conclusion: The modified ELISA produces many false positive results when applied to the general population whose pre-test probability is low. Therefore, the cut-off value should be set at a higher level. The prevalence of AMA is approximately 0.5% in the east as well as in the west Japan and there was no regional difference.

High frequency of the cross-reactivity against *E. coli* derived-pyruvate dehydrogenase complex-E2 in sera from patients with other than PBC

Norikazu Makati¹, Hiroshi Miyakawa², Atsushi Tanaka³, Naomi Hosoya²,
Kentarō Kikuchi^{2,4}, Soichiro Miura¹, M. Eric Gershwin⁴

¹ Second Department of Internal Medicine, National Defense Medical Collage

² Fourth Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine

³ Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine

⁴ Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology, University of California at Davis, School of Medicine

Antimitochondrial antibodies are a serological hallmark of primary biliary cirrhosis (PBC). Pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2), a member of the 2-oxo dehydrogenase enzyme complex family, is the primary autoantigen of antimitochondrial antibodies. The PDC-E2 molecule contains antigenic inner lipoyl domains that are highly conserved among various species including bacteria. Human anti-PDC-E2 in PBC patients' sera cross-reacts with *E. coli* PDC-E2 based on molecular mimicry of the common antigenic site. However, the frequency and potency of reactivity with *E. coli* PDC-E2 in sera other than from PBC individuals have not been clarified. In the present study, we investigated immunoreactivity against *E. coli* lysate with sera other than from PBC individuals and compared the frequency and reactive potency of sera from PBC patients. Lysate derived from *E. coli* DH5 alpha was developed with SDS-PAGE and then immunoblotted onto a nitrocellulose membrane. Seventy-seven serum samples from 24 PBC patients and 53 non-PBC individuals (autoimmune hepatitis: 16, primary sclerosing cholangitis: 10, and normal control: 27) were examined for the reactivity against *E. coli* lysate by immunoblotting. The specificity for anti-PDC-E2 of two bands visible at 74-kDa and 52-kDa was confirmed using mouse anti-human monoclonal PDC-E2 antibody (C355.1). The bands were visible for all PBC patient sera by immunoblotting. The same reactivity was also observed in 20-38% of non-PBC sera. However, based on dilution tests, the overall potency was one-hundredth lower than that of PBC sera. Such non-PBC sera cross-reacted with the synthetic peptide derived from *E. coli* PDC-E2. Taken together, using the *E. coli* unique buffer, we succeeded in reducing the optical density values of non-PBC sera for an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant proteins as the antigen for antimitochondrial antibodies. Since weak cross-reactivity with *E. coli* PDC-E2 occurred in sera other than from PBC patients at a high frequency, this was taken to be the cause of the non-specific reaction of non-PBC sera in the recombinant assay.

Anti-p95c antibody from patients with primary biliary cirrhosis inhibits *in vitro* nuclear envelope assembly and may be identical to p97/VCP

**Hiroshi Miyakawa¹, Kiyomitsu Miyachi², Tsuneyoshi Horigome³, Tsuneyo Mimori⁴,
Minoru Shibata⁵, Hiroo Hosaka⁶, Shouzou Matsushima⁷, R.W. Hankins², M.J. Fritzler⁸**

¹Fourth Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine

²Health Sciences Research Institute

³Niigata University, Faculty of Science and Center for Transdisciplinary Research

⁴Kyoto University Graduate School of Medicine

⁵Kanto Medical Center NTT East Hospital

⁶Yokohama Saiseikai Nambu Hospital

⁷National Yokohama Medical Center

⁸University of Calgary, Faculty of Internal Medicine

We have reported previously that p95c, a novel 95-kDa cytosolic protein, was the target of autoantibodies in sera of patients with autoimmune hepatic diseases. We studied 30 sera that were shown previously to immunoprecipitate a 95-kDa protein from [³⁵S]-methionine-labelled HeLa lysates and had a specific precipitin band in immunodiffusion. Thirteen sera were available to test the ability of p95c antibodies to inhibit nuclear envelope assembly in an *in vitro* in which confocal fluorescence microscopy was also used to identify the stages at which nuclear assembly was inhibited. The percentage inhibition of nuclear envelope assembly of the 13 sera ranged from 7% to 99% and nuclear envelope assembly and the swelling of nucleus was inhibited at several stages. The percentage inhibition of nuclear envelope assembly was correlated with the titer of anti-p95c as determined by immunodiffusion. To confirm the identity of this autoantigen, we used a full-length cDNA of the p97/valosin-containing protein (VCP) to produce a radiolabelled recombinant protein that was then used in an immunoprecipitation assay. Our study demonstrated that 12 of the 13 (93%) human sera with antibodies to p95c immunoprecipitated recombinant p97/VCP. Because p95c and p97 have similar molecular masses and cell localization, and because the majority of sera bind recombinant p97/VCP and anti-p95 antibodies inhibit nuclear assembly, this is compelling evidence that p95 and p97/VCP are identical.

14:35~15:25 Program (2)-8

Treatment of PBC by modulating antigen-specific immune response via CD4 T cells

Shinji Shimoda,

Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Science

New therapy with antibodies targeting costimulatory molecules has been identified in autoimmune diseases. Previously it was cleared that activation of CD40 on BEC using recombinant CD40L induce apoptosis. Then it's hypothesized that blocking CD40L from T cells may prevent BEC from apoptosis in PBC. We have established cytotoxic assay of PDC-E2 reactive T cell clones (TCC) to PDC-E2 pulsed BEC. This cytotoxic assay may reflect the bile duct lesions in PBC. To assess the effect of antibody targeting CD40L, this antibody was used in this assay.

In the CTL assay, anti-CD40L antibody had prevented TCC from killing BEC. In the immunohistochemistry, CD40L positive T cells from PBC existed around BEC, on the contrary CD40L positive T cells from other liver diseases did not. The stimulation from TLRs directly influenced the aquired immunity in the CTL assay. New therapy with anti-CD40L antibody has possibility to control the inflammation around BEC in PBC.

Enhanced- expression of type I IFN and Toll- like receptor- 3, - 4 mRNAs in the liver of primary biliary cirrhosis

Yasushi Takii^{1,3}, Minoru Nakamura^{1,2}, Masahiro Ito^{1,2}, Terufumi Yokoyama¹,
Atsumasa Komori^{1,2}, Rumiko Nakao¹, Koji Yano¹, Manabu Daikoku^{1,2},
Hiroshi Yatsuhashi^{1,2}, Mine Harada³ and Hiromi Ishibashi^{1,2}

¹ Clinical Research Center, National Hospital Organization (NHO) Nagasaki Medical Center

² Department of Hepatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

³ Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medicine Sciences

Background and Aims: It is generally believed that primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune liver disease. However, there are several reports that microbial agents are involved in the etiology of PBC. To address the pathophysiology of PBC, we examined the expression of messages for various cytokines and toll- like receptors (TLRs) in portal tract and liver parenchyma of PBC.

Methods: Using laser captured microdissection, 18 portal tracts and 9 liver parenchymas were captured from 9 liver biopsy specimens of PBC patients. As a control, 12 portal tracts and 4 parenchymas were captured from 4 specimens of autoimmune hepatitis (AIH) patients, and 6 portal tracts and 3 parenchymas were captured from 3 specimens of chronic hepatitis C (CHC) patients. Total RNA was extracted from these samples. The mRNAs of cytokines (IFN- α , - β , - γ , IL- 1 β , -6, -10), and TLRs (-2, -3, -4, -7, -9) were measured by quantitative reverse- transcription polymerase chain reaction. To study the *in situ* localization of type I IFN and TLR-3 proteins, immunostaining was also done using the same specimens.

Results: While almost all mRNAs of cytokines, except IL-10, were detectable in the portal tract, IFN- α and - β (type I IFN) were the only cytokines which were detectable in liver parenchyma. TLRs were all detectable in both portal tract and liver parenchyma. Interestingly, there were positive correlation between TLR-3, 4 and type I IFN in both areas. In addition, the mean values of TLR- 3, - 4 and type I IFN were significantly higher in PBC of both portal tracts and parenchyma than those in AIH and CHC. By immunohistochemistry, TLR-3 was detected in hepatocytes and histiocytes in portal tracts. IFN- α was detected in histiocytes and plasma cells in portal tracts and IFN- β was detected in hepatocytes and histiocytes in portal tracts.

Conclusions: These data indicate that as yet unknown ligands for TLR- 3 and/ or -4 exist in the portal tracts and parenchyma, and that the stimulation by these ligands leads to the sustained production of type I IFN in PBC.

Intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts: Physiologic distribution and phenotypes and pathologic alterations

Kumiko Isse, Kenichi Harada, Yasunori Sato, and Yasuni Nakanuma.

Department of Human Pathology, Kanazawa University Graduate School of Medicine

Background and Aims: Mucosa of the luminal tract such as the intestine is equipped with a developed lymphoid tissue, and harbor intraepithelial lymphocytes (IEL). They are known to be involved in the innate immunity and to relate to the pathogenesis of intestinal diseases. So far, there have been no reports on such system along the intrahepatic bile ducts. The present study was aimed to examine the presence of IEL and their presumed roles in the normal and pathologic intrahepatic bile ducts.

Methods: Intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts were surveyed immunohistochemically at the different anatomical levels in four "histologically normal" autopsy livers and in the surgically resected and wedge biopsied liver specimens as "histologically normal" livers, chronic viral hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, extrahepatic biliary obstruction, and hepatolithiatic livers. Immunostaining of leukocyte common antigen (LCA), CD3, CD4, CD8, CD20, and CD57 was done to identify intraepithelial lymphoid cells. CD4 and CD28 double stain was also done.

Results: There were lymphoid cells positive for LCA within the biliary epithelial layer of the intrahepatic bile ducts. They were regarded as biliary intraepithelial lymphocytes (*b*IEL). LCA⁺ *b*IEL /1,000 biliary epithelial cells were 11.6 ± 1.9 (mean \pm S.D.) at interlobular bile ducts, and their number increased along with the increased size of the intrahepatic biliary tree (33.3 ± 3.8 and 40.5 ± 6.8 at septal and large bile ducts, respectively). A majority of them were positive for CD3 and CD8, and some positive for CD57. In primary biliary cirrhosis, there were significant increase of LCA⁺ *b*IEL (205.7 ± 186.3) at the interlobular bile ducts, and an increase of CD4⁺, CD8⁺ and CD20⁺ cells were also evident. About 48 % of CD4⁺ *b*IEL were negative for CD28 in primary biliary cirrhosis, but not so rich in normal liver (18%), extrahepatic biliary obstruction (30%), and chronic viral hepatitis (25%). In hepatolithiasis, an increase of LCA⁺ *b*IEL (81.5 ± 14.6), particularly CD3⁺ and CD8⁺ ones, were evident at the intrahepatic large bile ducts. In other diseases, the density and phenotypes of *b*IEL were not different from those of normal livers.

Conclusions: IEL physiologically present in the intrahepatic bile ducts belong to CD8⁺ T cells or CD57⁺ cells, similar to IEL of the intestine, though their number were very small, suggesting their limited roles as innate immunity in normal states. Markedly increased CD8⁺, CD20⁺ and CD4⁺, especially CD4⁺CD28⁻ *b*IEL at the interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis and increased CD8⁺ *b*IEL at the large bile duct in hepatolithiasis seem to be involved in the immunopathogenesis of these diseases.

FAS-L⁺CD56⁺CD3⁺ cells significantly increase in the liver of patients with late stage primary biliary cirrhosis (PBC) compared with early stage PBC: possible involvement in the disease progression.

Yuiko Ishimoto¹, Takafumi Ichida², Satoshi Yamagiwa¹, Yasunobu Matsuda¹, Yutaka Honda¹, Chikako Miyaji-Tomiyama¹, Hisami Watanabe³, Toru Abo¹, Yutaka Aoyagi¹.

¹ Niigata University, Niigata, Japan

² Juntendo University, Tokyo, Japan

³ University of the Ryukyus, Naha, Japan

Backgrounds: Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune cholestatic liver disease characterized by immunological destruction of intrahepatic biliary epithelial cells. Although its pathogenesis has not been clearly elucidated, growing evidence suggests a major role for T cells. However, the liver contains a large population of natural killer (NK) and natural killer T (NKT) cells, and their roles in the pathogenesis of PBC are still unknown.

Aim: To investigate intrahepatic lymphocytes, especially NK and NKT cells, in patients with early and late stage PBC, and to elucidate their roles in the pathogenesis of PBC.

Methods: Liver tissues and heparinized venous blood were obtained from 15 patients with PBC and 7 donors for LDLT as control with written informed consent from each individual. Eight asymptomatic patients who underwent needle liver biopsy were diagnosed as stage I or II (early stage PBC), and 7 patients underwent LDLT (late stage PBC). Mononuclear cells (MNCs) were separated by Ficoll-gradient from peripheral blood and liver tissues, and then various surface markers, including CD3, CD4, CD8, CD25, CD16, CD56, CD57, CD161, CD28, CD152 (CTLA-4), and CD95 ligand (FasL), were analyzed by FACScan. We also investigated the distribution of FasL⁺ cells in the liver with PBC by immunohistochemical staining according to the avidin-biotin- peroxidase complex method.

Results: The total cell numbers of intrahepatic MNCs were higher in PBC patients than donors. The proportion of CD3⁺CD56⁺ NKT cells in the liver of early stage PBC patients was significantly lower than donors ($p < 0.05$), but in late stage patients the proportion of CD3⁺CD56⁺ NKT cells in the liver was significantly higher than those in early stage ($p < 0.05$). CD3⁺CD57⁺ NKT cells in the liver also constituted significant high proportion in late stage PBC compared with donors ($p < 0.05$). Conventional CD3⁺CD56⁺ T cells in the liver constituted significant high proportions in early stage PBC compared with donors ($p < 0.05$), but decreased in late stage PBC. Most of CD3⁺CD56⁺ NKT cells in the liver and peripheral blood expressed CD28 in control, but intrahepatic CD3⁺CD56⁺ NKT cells in patients with both early and late stage PBC significantly decreased ($p < 0.01$). The expressions of CTLA-4 and FasL on CD3⁺CD56⁺ NKT cells in the liver increased with the progression of disease, and were significantly higher in late stage PBC than those in control ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). The increased expression of FasL on the cytoplasm of MNCs infiltrating around the injured bile duct in late stage PBC was confirmed by immunohistochemical staining. Furthermore, we investigated both biopsy samples diagnosed Stage I or II (early stage) and removed liver (late stage) from the same patients who underwent LDLT, and less expression of FasL on MNCs in the liver of early stage than late stage was also confirmed by immunohistochemical staining.

Conclusion: We revealed that activated FasL⁺ NKT cells constituted significant high proportion in the liver of late stage PBC patients compared with early stage PBC patients and normal donors. NKT cells may play an important role in the progression of bile duct and hepatocyte injury in PBC through Fas/FasL interaction.

Genome wide analysis of the SNPs that relates to susceptibility to primary biliary cirrhosis in Japanese population

Mikio ZENIYA, Katsushi AMANO, Hiroki TAKAHASHI

Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, JIKEI University School of Medicine
Tokyo, JAPAN

Aim: The aim of this study is to investigate whether gene polymorphism of CTLA-4, which was reported to associate with the susceptibility to PBC in Caucasian, and IFN- γ that is thought to participate in the pathogenesis of autoimmune disease relate to disease susceptibility to PBC in Japanese. In addition we tried to identify new disease related SNPs by genome wide analysis.

Patients and Methods: 90 PBC patients and 84 controls were studied. The CTLA-4 exon 1 position 49 AG polymorphism was typed by RFLP. The IFN- γ position 874 AT polymorphism was defined by ARMS PCR. The genome wide analysis of SNPs was performed by using GeneChip HuSNP Mapping Array.

Results: Both CTLA-4 GG genotype and IFN- γ TA genotype were significantly over repressed in patients compared to controls (57.3% vs. 40.4%, OR=1.97, 95%CI:1.1-3.6, $p<0.04$), (34.4% vs. 19.0%, OR=2.23, 95%CI:1.1-4.4, $p<0.03$). The risk for PBC of individuals carrying both CTLA-4 GG and IFN- γ TA (OR=5.23) was higher compared with CTLA-4 GG or IFN- γ TA alone (OR=2.34, 2.95), indicating the effect of both genotypes on susceptibility to PBC was additive. The CTLA-4 GG and IFN- γ TA positive patients were resistance to UDCA treatment compared to other patients. Genotypes of 172 known SNPs, which existed on almost every chromosome, were different between CTLA-4 GG positive patients and control.

Conclusion: Genetic polymorphisms of CTLA-4 and IFN- γ related to susceptibility to PBC in Japanese additively and associated with clinical features. In addition, many CTLA-4 relevant SNPs may relate to susceptibility to PBC in Japanese.

16:35~17:25 **Special Lecture**

The Molecular Basis of Primary Biliary Cirrhosis

Professor, Division of Rheumatology, Allergy and Clinical Immunology

University of California at Davis

M.E. Gershwin

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の
開発に関する臨床研究

平成 16 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者

石橋 大海

平成 17 (2005) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

**難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の
開発に関する臨床研究**

平成 16 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者

石橋 大海

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する臨床研究 1
主任研究者 石橋大海

II. 分担・協力研究報告

1. 原発性胆汁性肝硬変に対する治療方針の現状把握のための調査
-肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査のまとめ- 13
研究協力者 酒井浩徳
2. 複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果 18
分担研究者 渡部幸夫
3. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測マーカーの同定 21
分担研究者 中村 稔
4. 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 ... 24
分担研究者 大曲勝久
5. PBCにおける生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討 26
研究協力者 恒吉正澄
6. 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 28
分担研究者 金子周一
7. PBCにおけるPPAR α と酸化酵素の発現 30
分担研究者 伊東正博
8. 原発性胆汁性肝硬変の病態形成におけるWnt/ β -cateninシグナルの関与 32
分担研究者 田中 篤
9. PBCにおける胆管・肝細胞障害/再生を特徴づける、各種肝転写因子および
増殖因子の発現/機能変化について 34
研究協力者 小森敦正
10. 分子生物学的手法による肝内胆管細胞のheterogeneity(多様性)についての解析 ... 36
分担研究者 上野義之
11. PBCと関節リウマチとの共通の因子の検討 39
分担研究者 右田清志

12. 抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性T細胞の同定とその誘導機序・臨床応用に関する研究	40
分担研究者 若月芳雄	
13. 原発性胆汁性肝硬変における Toll 様レセプターを介した単核球活性化の研究	42
分担研究者 市田隆文	
14. 胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析	45
分担研究者 下田慎治	
15. 自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析と治療応用に関する研究	47
分担研究者 喜多宏人	
16. Th1/Th2 バランス制御法の開発：インバリアント NKT 細胞亜分画による制御	49
分担研究者 松下 祥	
17. ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける PPAR γ リガンドによる抗炎症効果の検討	56
分担研究者 原田憲一	
18. 難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する研究	60
分担研究者 西原利治	
19. PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道傷害機序の解析・治療法開発に関する研究	62
分担研究者 松口徹也	
20. 生体肝移植を施行した原発性胆汁性肝硬変症例の臨床経過	64
分担研究者 兼松隆之	
21. 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用	66
分担研究者 坪内博仁	
22. ヒト幹細胞を用いた肝再生	69
分担研究者 石川文彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	71
IV. 参考資料	
・平成16年度 班員名簿	77
・平成16年度 第1回班会議プログラム	78
・平成16年度 第2回班会議プログラム	81
・PBCフォーラム プログラム・抄録集	84

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する臨床研究

主任研究者 石橋 大海 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：本研究の目的は、難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自己免疫性肝炎（AIH）を根治的に治療する治療法や進展を阻止し改善する治療法、あるいは発症を予防する画期的な方法を開発することである。

本年度の研究成果として以下の新知見を得た。

- 1) PBC患者の予後不良群を同定するために極めて有用な抗 gp210 抗体の測定系を開発した。
- 2) 治療標的分子の候補として、interferon- γ 、peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)、Wnt-2B、 β -catenin、MMP-3 遺伝子を同定した。
- 3) 胆管上皮の治療標的細胞を同定する目的で、胆管上皮細胞間での遺伝子発現の相異を明らかにし、小型胆管細胞に選択的に発現されている蛋白 EphA5 を同定した。
- 4) 抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性 T 細胞を同定した。
- 5) PBC の病態初期には TLR を介した自然免疫系の活性化が関与している。
- 6) 胆管上皮細胞は抗原提示細胞としての機能はなく、胆管上皮細胞が産生するプロスタグランジン E2 (PG-E2) の産生によって T 細胞の増殖を制御する機能を有する。
- 7) 自己反応性 T 細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる。
- 8) ヒト iNKT 細胞サブセットのバランス制御による人為的 Th1/Th2 応答制御の可能性を示した。
- 9) PBC 治療薬のターゲットである PPAR α の活性化の程度を非侵襲的に検討する目的で、肝臓における脂肪酸の β 酸化能を in vivo で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。
- 10) PPAR γ の内因性リガンドである 15d-deoxy-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) は細胞毒性が低く、PPAR γ 発現が低下した PBC 胆管にも抗炎症効果を示し得る結果を得た。
- 11) 動物モデルとして T 細胞特異的なドミナントネガティブ型 MKP-M トランスジェニックマウスを作製した。
- 12) 肝移植後の組織学的再発防止には適切な免疫抑制剤使用が重要である結果を得た。
- 13) 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の非臨床試験（安全性試験）を行い、臨床応用実現化の可能性を得た。
- 14) 純化したヒト臍帯血、骨髄由来幹細胞から肝細胞が再生することを明らかにした。
- 15) ヒト疾患モデルとして、新規免疫不全動物を作成し、それをレシピエントとしてヒト幹細胞を移植する異種移植アッセイ系の開発に成功した。

分担研究者	渡部 幸夫	国立相模原病院・消化器科
中村 稔	上野 義之	東北大学大学院 消化器病態学
右田 清志	原田 憲一	金沢大学大学院・形態機能病理学
伊東 正博	石川 文彦	九州大学大学院・病態修復内科学
兼松 隆之	研究協力者	
坪内 博仁	八橋 弘	長崎医療センター・臨床研究センター
松下 祥	藤岡ひかる	長崎医療センター・臨床研究センター
松口 徹也	大黒 学	長崎医療センター・臨床研究センター
市田 隆文	小森 敦正	長崎医療センター・臨床研究センター
西原 利治	松本 武浩	長崎医療センター・臨床研究センター
金子 周一	酒井 浩徳	九州医療センター・消化器科
若月 芳雄	中村 陽子	国立相模原病院・消化器科
田中 篤	恒吉 正澄	九州大学大学院・形態機能病理学
喜多 宏人	松浦 栄次	岡山大学大学院・病態機構学
下田 慎治	井戸 章雄	京都大学医学部・探索医療センター
大曲 勝久	蒲原 行雄	長崎大学大学院・移植消化器外科

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)と自己免疫性肝炎(AIH)の画期的治療法を開発することである。そのために、今年度は以下の項目に関して研究を進めた。

1. 現状の治療の解析
2. 予後予測マーカーの開発と予後不良患者の判別
3. 治療標的分子の探索
4. 免疫機構とその制御および制御法の開発
5. 治療薬の開発および治療効果の評価法
6. 治療法開発のための動物モデルの開発
7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発

B. 研究方法

1. 現状の治療の解析

1) PBC に対する治療の現況：肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査の報告

PBC の多くの症例は安定した経過をたどるものの、一部の症例は進行し予後不良の経過をたどることがわかっている。しかし、現時点では経過や予後を予測することは困難であり、両者を区別することなく治療を行っているのが現状である。本研究は、PBC の治療に対する基本的方針(治療者各人の治療方針)の現状把握と検証を目的として、肝臓学会西部会評議員を対象に治療方針に関するアンケート調査を行った。

2) 複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果

1998 年以後国立病院機構政策医療肝疾患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。登録症例 391 例のうち肝炎ウイルス合併例を除いた 265 例を調査対象として予後調査を施行した。

また、AIH 症例の中でどのような症例が肝硬変へ進展するのか、その要因を検討し、どのような治療により AIH の予後が改善されるのかを検討するため、治療前後に複数回肝生検を施行している 4 施設より肝組織標本を検討し得た 39 例について肝組織変化と臨床経過を比較した。

2. 予後予測、予後不良患者の判別

3) PBC の長期予後予測マーカー

PBC には、長期間の経過観察でもほとんど進行しない予後良好な症例と、進行して肝不全に至る予後不良な症例とが混在することが知

られていたが、両者を鑑別するために有用な血清マーカーは知られていなかった。当長崎医療センターで過去 22 年間に長期経過を観察した PBC 患者 71 症例の経過血清を用いて、核膜孔蛋白の一つである gp210 蛋白に対する自己抗体が PBC の長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることを明らかにした。また、全国の国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期経過観察された PBC 患者 80 症例の解析して、その有用性について確認した。

4) 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

免疫グロブリンサブクラス別の抗 M2 抗体が PBC の経過中にどの程度変動するのか、また、IgA クラス抗 M2 抗体は PBC の進展予測因子となりうるかについて検討した。

5) PBC における生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討

移植に至った 22 例の臨床的背景とともに摘出肝を病理形態学的に検討した。対象は 1999 年 6 月～2004 年 7 月までに当教室において診断した PBC 22 例(男：1、女：21)で、平均年齢 50.3 歳、初発時年齢 41.1 歳、AMA は 19 例で陽性、初発時から手術までの期間は平均 9.2 年である。術後 5 例が死亡したが、現在まで再発例は認めていない。

3. 治療標的分子の探索

6) 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

PBC 肝生検材料を用いて、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。

7) PBC における peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の発現

PPAR α には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、抗アポトーシス作用があることが知られている。UDCA 抵抗性 PBC 症例には PPAR α のリガンドであるフィブレート系の薬剤が選択される場合が多い。本研究ではフィブレート系の薬剤選択の理論的根拠を検討する目的で、PBC における PPAR α と肝細胞内酸化酵素の発現を検討した。

8) 胆管結紮ラットにおける肝内発現遺伝子の包括的検索

PBC の胆管上皮細胞に特異的に発現している分子として Wnt 分子を同定し、PBC の病態生理における Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の

役割について検討してきた。今回、PBC および対照肝において real-time PCR によって Wnt-2B 分子の発現を検討した。

9) 遺伝子発現からみたヒト培養肝内胆管細胞の多様性

外科手術摘出肝組織より抗上皮細胞抗体マイクロビーズを用いて肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) の分離を行い、同上皮細胞におけるヒト Toll like receptors (TLRs) mRNA の発現、LPS および LTA 刺激による IL-8, IL-6, MCP-1 の NF- κ B 依存性発現遊離亢進、LPS および LTA 刺激に対する HIBEC 間での反応性の差の有無を検討した。

10) 肝内胆管細胞の heterogeneity (多様性) についてのプロテオーム解析

小葉間胆管に特異的に発現される分子・蛋白の解明を進めるために、従来行ってきた cDNA マイクロアレイ法に加えて、2D ゲルを用いた蛋白質の網羅的検討を行うことを目指し基礎検討を行った。

11) PBC と関節リウマチとの共通の因子の検討

PBC と関節リウマチ (RA) の合併が多いことから、病因・病態に関連する共通の因子を検討する目的で、PBC 患者各 73 名の血清を用い、リウマトイド因子 (RF) と RA に特異的な自己抗体である抗 CCP 抗体を測定した。

4. 免疫機構とその制御および制御法の開発

12) 肝類洞の抗原提示細胞の機能について

免疫調節性肝 CD4T 細胞が、肝類洞に存在する肝樹状細胞により抗原提示をうけて、抗原非特異的に肝内での炎症反応を抑制することを見出したので、これを治療に応用することを目的に、その基礎的検討を行うとともに、その臨床的意義を肝炎モデルで検討した。

13) PBC における Toll-like receptor を介した単核球活性化の検討

PBC における TLR を介した自然免疫系活性化の病態への関与について検討するため、無症候性 PBC (aPBC) 5 例、症候性 PBC (sPBC) 3 例と健常人 5 例より末梢血単核球 (PBMC) を分離し、細菌認識にかかわる TLR2、TLR4 のリガンドである peptidoglycan (PGN)、lipopolysaccharide (LPS) で刺激後各種解析を行った。

14) 胆管上皮細胞の免疫制御機構の解析

胆管上皮細胞に自己抗原である PDC-E2 163-176 ペプチドを表出させた場合に、この自己抗原反応性 T 細胞が抗原反応性に増殖するなど、胆管上皮細胞に抗原提示細胞としての役

割があるかを検討することで、胆管上皮細胞が積極的に自己免疫反応に関与しているかどうかについて検討した。

15) CD8 T 細胞による免疫制御機構の解析

抗ミトコンドリア抗体 (AMA) 陰性患者においても CD8 陽性自己反応性 T 細胞が活性化されているかどうかを明らかにするために、AMA 陰性患者における CD8 陽性自己反応性 T 細胞応答を解析した。

16) Th1/Th2 バランス制御法の開発

ヒトにおいて iNKT サブセットが、DC を介して Th1/Th2 バランスを支配し、免疫応答性をいかにして制御しているのか検討した。

5. 治療薬の評価および治療効果の評価法

17) ヒト培養胆管細胞および自己免疫疾患自然発症モデル MRL/lpr マウスにおける PPAR γ リガンドによる抗炎症効果の検討

① 培養胆管細胞を用いた検討: PPAR γ リガンドとして、内因性リガンドである 15d-deoxy-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) と 3 種のチアゾリジン誘導体を用いて、培養胆管細胞に対する細胞障害性および LPS 誘導性 NF- κ B 活性の抑制効果について検討した。

② 動物モデルを用いた検討: MRL/lpr マウスは糸球体腎炎や唾液腺炎などの種々の自己免疫疾患を自然発症する遺伝子変異動物であり、また PBC 類似の胆管炎も発症する。この MRL/lpr マウスを用いて 15d-PGJ2 の抗炎症効果について検討した。

18) 肝臓における脂肪酸の β 酸化能の生体内測定法の開発

新しい治療薬 bezafibrate のレセプターである PPAR- α の活性化の程度を非侵襲的に検討する目的で、肝臓における脂肪酸の β 酸化能を in vivo で半定量化する分子イメージングシステムを開発した。

6. 治療法開発のための動物モデルの開発

19) PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道障害機序の解析・治療法の開発

新たに作製した T 細胞特異的なドミナントネガティブ型 MKP-M トランスジェニックマウスは、Th1 タイプに偏位した抗原特異的免疫反応を示し、PBC 治療の研究のためのマウスモデルとして有用であるか検討した。

7. 肝移植、HGF、再生医療による治療法開発

20) 生体肝移植をうけた PBC 症例の中期的状況

PBC に対し生体肝移植を施行した PBC 症例の移植後の中期的状況を解析した。

21) 末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の臨床応用

末期肝硬変に対する組み換え型ヒト HGF の非臨床試験（安全性試験）として、毒性試験および肝前癌病変および肝発癌に及ぼす影響を検討した。

22) ヒト幹細胞を用いた肝再生

PBC および AIH における画期的治療法の開発のため、ヒト幹細胞の多能性の評価およびヒト疾患モデルの作製を行った。幹細胞は、倫理的に国内外で未だ受容されにくい胚性幹細胞（ES 細胞）ではなく体性幹細胞、中でも、骨髄、末梢血、臍帯血の 3 つの幹細胞源を用いた。一方、造血細胞だけでなく、非造血細胞の含めた primary cell の生体内での動態を解析するため、獲得免疫系と自然免疫系の両者のシステムを障害したマウスの作製を行った。

*倫理面への配慮: 研究の遂行にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」に則り、当センターおよび各実施施設の倫理委員会で厳正な審査を経た後に準備をすすめ、患者から十分なインフォームドコンセントを得るとともに、登録においては匿名化する。症例登録は肝ネットを利用した。肝ネットは政策医療肝疾患診療・臨床研究ネットワークシステムであり、患者の登録に際しては、施設ごとにその内容を患者に説明した上で同意書を得た。登録された情報に関しては、匿名化して、個人が特定できないような仕組みとした。遺伝子解析に関しては、文部科学省、厚生労働省および科学技術省が共同して策定した「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」（2001 年 3 月 29 日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守し、患者より遺伝子情報を得るための検体を得る施設においては各施設で倫理委員会に諮り許可を得た。動物実験を行なう場合は、動物愛護に配慮した。

C. 研究成績

1. 現状の治療の解析

1) PBC に対する治療の現況: 肝臓学会西部会評議員に対するアンケート調査の報告（酒井浩徳）

診断初期より UDCA を開始し、UDCA による効

果が不十分の場合ベザフィブラートの追加投与が最も採用されている治療方針であった。しかし、治療開始時期、治療開始時の選択薬やその投与量、第一選択薬が効果不十分の時の対応などに方針の違いがあることも明らかとなった。

2) 複数回生検からみた自己免疫性肝炎の治療効果（渡部幸夫）

初期診断が慢性肝炎であった 225 例中予後調査時に臨床的に肝硬変へ進展していた症例は 12 例（5.3%）であった。肝硬変への進展要因の検討では、副腎皮質ステロイド薬（PSL）治療で完全寛解を維持している症例では肝組織 4 項目（線維化、グ鞘炎、interface hepatitis、小葉炎）ともすべて改善したが、炎症所見に比して線維化の改善は遅れる傾向があった。

複数回生検症例のうち生検間隔が 0.5 年以下および生検間未治療例を除いて、最終生検時の肝線維化別に F0-1（軽度）、F2（中等度）、F3-4（高度）の 3 群に分けて検討した。最終生検時に F2 群、F3-4 群では interface hepatitis とグ鞘炎の改善が F0-1 群と比べて乏しかった。

2. 予後予測、予後不良患者の判別

3) PBC の長期予後予測マーカー（中村 稔）

核膜孔蛋白の一つである gp210 蛋白に対する自己抗体の測定系を開発し、抗 gp210 抗体が、PBC の長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることを明らかにした。validation study として全国の国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期経過観察された PBC 患者 80 症例の検体を解析した。その結果、抗 gp210 蛋白抗体が PBC の長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることが確認された。

4) 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（大曲勝久）

IgG クラス抗 M2 抗体は 32 例中 25 例（78%）が経過中持続陽性、4 例（13%）が持続陰性、3 例（9%）では判定が変動した。IgM クラス抗 M2 抗体は 15 例（47%）が経過中持続陽性、8 例（25%）が持続陰性、9 例（28%）では判定が変動した。IgA クラス抗 M2 抗体は 10 例（31%）が経過中持続陽性、13 例（41%）が持続陰性、9 例（28%）では判定が変動した。また、Scheuer's stage と IgA クラス抗 M2 抗体との関係を検討では、I 期では陽性 7 例、陰性 8 例、II 期では陽性 3 例、

陰性 3 例、III 期では陽性 9 例、陰性 1 例、IV 期では陽性 2 例、陰性 0 例となり、有意差は認められないものの、ステージが進む程 IgA クラス抗 M2 抗体の陽性率が高い傾向にあった。組織進展例 5 例では持続陽性が 2 例、持続陰性が 2 例、陰性から陽転化した例が 1 例であった。非進展例 11 例では持続陽性が 8 例、持続陰性が 3 例であった。結論として、IgA クラス抗 M2 抗体は PBC の進展予測因子として有用ではなかったものの、IgG クラス抗 M2 抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあった。

3. 治療標的分子の探索

5) PBC における生体肝移植症例の臨床的背景と病理形態学的検討 (恒吉正澄)

移植に至った 22 例のうち、移植肝 3 例は組織学的に Stage II-III の非硬変肝で、いずれも肝は腫大傾向で移植までの平均期間は 4 年であった。大結節性の肝硬変 4 例では肝は萎縮傾向で、移植までの平均期間は 15 年であった。PBC の症例では他の原因による肝硬変症に比し小葉間胆管 (100 μ m 以下) 数は著明に減少していたが、線維化の程度や胆汁うっ滞との相関はみられなかった。

6) 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 (金子周一)

比較的早期の症例を用いてレーザーマイクロダイセクションにてリンパ球の集簇領域を選択的に採取し、包括的な発現遺伝子解析を行った。PBC のリンパ球細胞集団から得られるプロファイルは Stage I と Stage III の相同性が、C 型慢性肝炎から得られる相同性よりも高かった。PBC の CNSDC における遺伝子発現は、C 型慢性肝炎のリンパ球集簇領域における遺伝子発現と比較すると、interferon- γ , 7, 11 などの発現が亢進していた。これらの遺伝子は Stage III では低下していた。またこの亢進は Stage が進行すると低下していた。

7) PBC における peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の発現 (伊東正博)

① 進行例と非進行例で初回生検が同じ Scheuer stage でも interface hepatitis や炎症スコアが高い症例が進行群に有意に多くみられ、炎症要素が強いほど進行することが予測された。② PPAR α は病変が進行するに従って肝細胞の細胞質・膜発現が亢進して

いたが、核内移行は少数例にしか見られなかった。肝細胞内 catalase 発現は PBC の進行症例で低下していた。③ mRNA レベルでも PPAR α の発現は亢進していた。④ 肝細胞培養実験で、PPAR α は分裂、増殖する細胞の核内発現がみられ、48 時間培養で核、細胞質に発現がみられた。Bezafibrate 添加群で PPAR α の発現は亢進、細胞増殖効果、catalase 発現亢進が観察された。

8) 胆管結紮ラットにおける肝内発現遺伝子の包括的検索 (田中 篤)

PBC 進行例ではコントロールと比べ、有意差はなかったものの Wnt-2B の発現が増強している傾向がみられた。早期例では Wnt-2B の発現増強はみられなかった。一方、Wnt 分子によって活性化され、種々の遺伝子の転写を促進することが知られている β -catenin の活性化は、PBC 進行例では見られなかったものの、早期例ではコントロールに比べ多数例で認められた。9) 遺伝子発現からみたヒト培養肝内胆管細胞の多様性 (小森敦正)

① 肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) におけるヒト Toll like receptors (TLR1, 2, 3, 4, 6) mRNA の発現、LPS および LTA 刺激による IL-8, IL-6, MCP-1 の NF- κ B 依存性発現遊離亢進、LPS および LTA 刺激に対するドナーの異なる HIBEC 間での反応性の差を確認した。② Liver enriched transcription factors (LETFs: HNF1 β , P2 promoter 由来 HNF4, FXR) と cytokeratin 7/19 の転写発現量を指標にすることで、HIBEC 由来細胞クローンが *in vitro* で分類可能であることを明らかにした。

10) 肝内胆管細胞の heterogeneity (多様性) についてのプロテオーム解析 (上野義之)

マウス大型・小型の胆管細胞間での蛋白発現プロファイルの比較により、細胞の増殖や、遊走に関与する蛋白 Ephrin 関連蛋白が認められその発現の生理学的意義に対する検討を行った。その結果、EphA5 が小型の胆管細胞に選択的に発現されていることが認められ、これは再生が旺盛な細胆管レベルでの胆管細胞の特徴を裏付けるものと考えられた。

11) PBC と関節リウマチとの共通の因子の検討 (右田清志)

73 名の PBC 患者中 11 名が RF 陽性であったが、内 2 名のみが抗 CCP 抗体も陽性であり、RA の合併が疑われた。また PBC 患者では、健康人に比べ血清 MMP-3 濃度が有意に上昇しており、病態との関連が示唆された。