

例で PD-L1 の発現を認め、全例で PD-L2 の発現を認めた。また類洞内皮細胞は 5 例で PD-L1 の発現を認め、全例で PD-L2 の発現を認めた。

表 1.

AIH	門脈域 浸潤 T 細胞				Kupffer 細胞		類洞内皮細胞		
	ALT	ANA	IgG	PD-1	PD-L1	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
64 F	153	x40	6019	+	+-	+	+	+	+
33 F	168	x80	2302	+	-	+-	+	+	+
63 F	127	x40	1698	+	-	-	+	+	+
27 F	137	x640	2120	+	-	+	+	+	+
19 F	186	x40	1728	+	+-	+	+	+	+

PBC	門脈域浸潤 T 細胞				Kupffer 細胞		類洞内皮細胞		
	ALP	AMA	IgM	PD-1	PD-L1	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
50 M	1139	x320	694	+	+-	+	+	+	+
47 F	428	62	319	+	-	+	+	+	+
39 F	1177	x320	774	+	+-	+	+	+	+
54 F	512	16	74	+	+-	-	+	-	+
55 M	811	x640	718	+	+-	+	+	+	+
52 F	223	-	263	+	+-	+	+	+	+

AIH では全例で門脈域浸潤 T 細胞に PD-1 の発現を認めたが、同細胞にける PD-L1 の発現は 3 例で陰性、他の 2 例でもごく微弱だった。Kupffer 細胞は 5 例中 3 例で PD-L1 の発現を認め、全例で PD-L2 の発現を認めた。また類洞内皮細胞は全例で PD-L1、PD-L2 の発現を認めた。

蛍光染色を用いたオーバーレイ解析により、PBC、AIH のいずれにおいても門脈域浸潤 CD3 陽性 T 細胞は PD-1 の発現を認めるが PD-L1 の発現はないことが確認された。

これら分子の肝内発現動態と血清 ALT、ALP、IgG、IgM 値、ANA、AMA 抗体価などの臨床検査値とは関連がなかった。また AIH、PBC いずれにおいても、これら補助分子の肝細胞、胆管細胞における発現は認めなかった。

#### D. 考察

PD-1、PD-L1、PD-L2 は免疫応答を負に制御する補助刺激分子として注目され、末梢性免疫寛容誘導への関与が示唆されている。また、これらの分子は炎症性サイトカインにより発現誘導されることから、一端生じた免疫反応を抑制するための negative feedback 的に働くと推測される。

したがって今回の検討で観察された PD-1、PD-L1、PD-L2 の肝内発現は自己免疫性肝疾患の病態形成に直接的に関与するのではなく、病態の進行を反映した現象である可能性がある。しかし最近になって PD-1、PD-L1、PD-L2 系が条件によっては T 細胞を活性化し得ることが報告され、PD-L1、PD-L2 と結合する PD-1 以外の分子の存在が想定されており、この分子は免疫応答を正にドライブする可能性が考えられている。もしそのような分子が存在するならば、今回観察された PD-1、PD-L1、PD-L2 の肝内発現動態は自己免疫性肝疾患の病態形成に直接的に関与する可能性もある。今後の検討課題と思われる。

いずれにせよ、慢性ウイルス性肝炎などにおけるこれら分子の肝内発現動態と比較検討し発現動態の疾患特異性を明らかにするとともに、発現動態の経時的变化を検討する必要がある。

また Kupffer 細胞や類洞内皮細胞に発現している PD-L1、PD-L2 が、実際に T 細胞の活性化制御に関与しているか不明である。興味深いことに PD-L1 ノックアウトマウスでは肝内に活性化 CD8 陽性 T 細胞の有意な集積を認め、同マウスでは Con A 投与により肝内単核球浸潤の増加と CD8 陽性 T 細胞のアポトーシス減少を認め肝細胞障害が増強することが報告され、PD-L1 が肝内における CD8 陽性 T 細胞の動態を規定する可能性が示されている。ヒトの自己免疫性肝疾患においても同様の現象が生じているか解析することは大変重要と思われるが、方法論的に困難な点が多い。まずは正常な状態で類洞内皮細胞や Kupffer 細胞が T 細胞活性化を制御するかを in vitro で解析する試みが必要であろう。

さらに、ヒトの炎症性腸疾患や慢性関節リウマチにおいては病巣浸潤 T リンパ球が PD-1 と PD-L1 をともに発現していることが多いが、今回の検討では肝内浸潤 T 細胞は PD-1 のみを発現し PD-L1 の発現は認めなかった。これがどのような意義を有するかも今後の大きな検討課題と思われる。

#### E. 結論

AIH、PBC においては肝内の門脈域浸潤 T 細胞に PD-1、Kupffer 細胞、類洞内皮細胞に PD-L1、PD-L2 が発現していることが明らかになったが、これら分子の発現が直接的に病態形成に関与するのか、それとも病勢を反映しているのかを明らかにすることは現時点では困難であり、今後は発現動態の経時的变化や PD-L1、PD-L2 陽性細胞の T 細胞活性化制御機能の in vitro における解析を行なう必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## CpG DNA による肝抗原に対する免疫寛容の破綻

研究協力者 佐藤由紀夫 福島県立医科大学医学部第2内科 教授

**研究要旨：**近年、Th1 タイプのアジュバント作用を有する微生物由来 CpG DNA と自己免疫疾患との関連が注目されており、自己抗原を CpG DNA と免疫することで自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、自己抗体が産生されることが報告されている。これまで、我々は、ヒト由来肝細胞抗原を CpG DNA とともにマウスに投与し、抗 calreticulin 抗体が産生されることを報告してきた。そこで、calreticulin 蛋白をターゲットとし CpG DNA による肝炎の誘導について検討した。免疫マウス血清中に Western blot 法にて抗 calreticulin 抗体の存在が確認された。非免疫マウス由来の脾細胞を calreticulin 蛋白で刺激した場合には IFN- $\gamma$  産生を認めず、免疫マウス由来の脾細胞を calreticulin 蛋白で刺激した場合に有意な IFN- $\gamma$  産生が認められた。免疫マウスの ALT の上昇は軽度であったが、組織学的にはすべての免疫マウスにおいて、肝実質に肝炎像が確認された。微生物由来の CpG DNA をアジュバントとし calreticulin 蛋白と免疫することにより、免疫寛容の破綻が惹起され肝炎が誘導された。自己免疫性肝炎患者血清にも抗 calreticulin 抗体が存在することから、calreticulin 蛋白が自己免疫性肝炎の標的抗原のひとつであることが示唆された。

### 共同研究者

大平弘正 福島県立医科大学第2内科 講師  
阿部和道 福島県立医科大学第2内科  
高橋敦史 福島県立医科大学第2内科  
雷 毅 福島県立医科大学第2内科 助手  
小林浩子 福島県立医科大学第2内科 助手

### A. 研究目的

微生物 genome 中に存在する CpG DNA [非メチル化シトシンの次がグアニンであるモチーフ (CpG motif) を有する DNA] は直接哺乳類の B 細胞、樹状細胞、単球を活性化して種々の Th1 タイプの炎症性 cytokine (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ ) を産生させ、Th1 タイプの免疫反応を引き起こすアジュバント作用を有することを、研究協力者は報告してきた (Sato Y, et al. Science, 1996)。

近年、Th1 タイプのアジュバント作用を有する CpG DNA と自己免疫疾患との関連が注目されており、自己抗原を CpG DNA とともに免疫することにより自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、自己抗体が産生されることが明らかにされている (Bachmaier K, et al: science 283, 1999)。また、免疫活性化作用を有する CpG DNA は哺乳類の genome にも存在して自己の B 細胞を活性化し、自己抗体の産生を誘導することも報告されている (Leadbetter EA, et al. Nature, 2002)。これまで、ヒト肝細胞由来の蛋白を CpG DNA とともにマウスに免疫することにより、自己免疫性肝炎患者血清にも検出される抗 calreticulin 抗体が産生されることを報告してきた。そこで、calreticulin 蛋白をターゲットとし CpG

DNA による肝炎の誘導について検討した。

### B. 研究方法

8 週齢のメス B57BL/6NCrj マウスに 50  $\mu$ g の CpG DNA (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3') をアジュバントとして、calreticulin 蛋白 (Sigma) 20  $\mu$ g とともに 3 回投与し免疫した。Western blot 法にて、免疫マウス血清と calreticulin 蛋白との反応を検討した。また、免疫マウスの脾細胞を calreticulin 蛋白で刺激し、培養上清中の IFN- $\gamma$  の測定を行なった。肝炎の誘導の確認は、血清 ALT 値ならびに組織学的検討にて行なった。

さらに、免疫マウス脾細胞から CD4 および CD8 陽性 T 細胞を分離し、正常マウスへの移入を行い、組織学的に肝炎の誘導について確認した。

(倫理面への配慮)

実験動物は、当大学の実験動物取り扱い倫理指針を遵守して実験に使用した。

### C. 研究結果

1. 免疫マウス血清中を用いた Western blot 法による検討では、calreticulin 蛋白に反応するバンドが確認された。
2. 免疫マウス由来の脾細胞を calreticulin 蛋白で刺激した場合には IFN- $\gamma$  産生を認められず、免疫マウス由来の脾細胞を calreticulin 蛋白で刺激した場合に有意な IFN- $\gamma$  産生 (1000 pg/ml) が認められた。
3. マウスの平均 ALT 値は 56.8 IU/ml とコントロールマウス ALT 値の 18 IU/ml に比し軽度の上昇であったが、組織学的にはすべての免疫マウスにおいて、肝実質に巣状壊死が確認された。

4. 疫マウスからの T 細胞移入による肝炎の誘発は、今回の検討では確認されなかった。

#### D. 考察

これまでの検討にて、アジュバンド効果を有する微生物由来の CpG DNA をヒト肝細胞由来の抗原蛋白と共に免疫することにより、肝抗原と反応する新たな自己抗体として抗 calreticulin 抗体がマウス血清中に検出された。この抗体は、AIH や PBC においても 40-60% の頻度で陽性となることが報告されている (Kreisel W, et al. Scand J Gastroenterol, 1999)。

calreticulin 蛋白は、主として有核細胞の小胞体に存在する Ca<sup>2+</sup> 結合蛋白である。種々の機能がこれまでに報告されており、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 調節のみならず、ステロイド関連遺伝子や接着分子の発現、T 細胞の活性化に関与することが報告されている (Michalak M, et al. Biochem J, 1999)。活性化された T 細胞においては、細胞表面に calreticulin 蛋白が表出することが知られており、今後肝細胞での検討が必要である。

今回、CpG DNA を Th1 タイプのアジュバンドとして calreticulin 蛋白と共に免疫することによって、肝細胞に対する免疫寛容を破綻させ、肝炎が誘発されることが明らかとなり、AIH などの自己免疫性肝疾患の発症機序に微生物由来 CpG DNA が関与する可能性が示唆された。肝には、CpG DNA のレセプターである TLR-9 の発現が確認されており、bacterial translocation によって門脈系を介して流入する CpG DNA が容易に肝へ作用し、何らかの原因によって肝細胞表面へ発現した calreticulin 蛋白との抗原・抗体反応あるいは T 細胞を介する反応による肝炎の誘発が推定される。免疫マウスからの T 細胞移入による肝炎誘発が見られなかったことから、今後は、抗体の移入による肝炎の誘発について検討する必要がある。

#### E. 結論

微生物由来の CpG DNA をアジュバンドとし calreticulin 蛋白と免疫することにより、免疫寛容の破綻が惹起され肝炎が誘導された。自己免疫性肝炎患者血清にも抗 calreticulin 抗体が存在することから、calreticulin 蛋白が自己免疫性肝炎の標的抗原のひとつであることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohira H, Takiguchi J, Rai T, Abe K, Yokokawa J, Sato Y, Takeda I, Kanno T. High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. *Hepatol Res* 28, 137-139, 2004.
- 2) Tojo J, Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y, Kasukawa R. Autoimmune hepatitis accompanied by systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 43, 258-62, 2004.
- 3) Rai T, Ohira H, Tojo J, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Shishido S, Sato Y. Expression of human glucocorticoid receptor in lymphocytes of patients with autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 29, 148-152, 2004.
- 4) Rai T, Ohira H, Fukaya E, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Shishido S, Sato Y. A case of merged idiopathic portal hypertension in course of mixed connective tissue disease. *Hepatol Res* 30, 51-55, 2004.
- 5) Ohira H, Rai T, Takiguchi J, Abe K, Sato Y. Six cases of primary biliary cirrhosis complicated by psoriasis. *Hepatol Res* 30, 111-115, 2004.
- 6) Iwadate H, Ohira H, Suzuki T, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Orikasa H, Irisawa A, Obara K, Reiji K, Sato Y. Hepatocellular Carcinoma Associated with Wilson's Disease. *Intern Med* 43, 1042-1045, 2004.

##### 2. 学会発表

- 1) 大平弘正、阿部和道、雷毅、滝口純子、小原勝敏、佐藤由紀夫、微生物 CpGDNA を用いた新たな肝関連自己抗体の検索。第 40 回日本肝臓学会総会 (2004 年 6 月 3 日)
- 2) 阿部和道、大平弘正、雷毅、滝口純子、高橋敦史、小原勝敏、佐藤由紀夫。自己免疫性肝疾患における抗 calreticulin 抗体の臨床的検討。第 8 回日本肝臓大会 (2004 年 10 月 21 日)

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## 自己免疫性肝疾患類似 GVHR 肝病変の肝病理組織学的検討

### － 遺伝子発現の面から－

研究協力者 田中 直見 筑波大学大学院人間総合科学研究科  
病態制御医学専攻消化器病態学分野専攻 教授

**研究要旨：**マウス graft-versus-host reaction (GVHR) モデルにおいて門脈域の炎症細胞浸潤は経時的に改善を示す原因について、遺伝子発現と肝病理組織学的面から検討したところ、制御性 T 細胞による免疫自己寛容の再誘導による可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

マウス移植片対宿主反応 (GVHR) モデルは、(bm12×B6) F1 メスマウスに、B6 脾臓より分離した T 細胞を  $1 \times 10^7$  個静注することにより作製される。この GVHR モデルは、MHC クラス II の差に基づく GVHR において自己免疫機序の関与した肝病変が観察される。その特徴は、GVHR 導入 5 日目より門脈域、中心静脈周囲にリンパ球を中心とした細胞浸潤、胆管上皮内リンパ球浸潤を認め、導入後 2 週目をピークに 8 週目までの自然経過観察で炎症細胞浸潤は改善傾向を示し、線維化や肝硬変には至らない。自己免疫性肝炎のメカニズムについて把握するために、網羅的遺伝子発現頻度解析と病理組織を比較することによって、この GVHR モデルにおける炎症改善の原因について検討する。

#### B. 研究方法

GVHR 導入直後 (コントロール)、導入後 2, 4, 6, 8 週目のマウスより肝組織を採取し、10% フォルマリン固定後パラフィン切片を作製した。得られた切片より H&E 染色と CD4, CD8, CD20 の発現について免疫染色を行った。

また、コントロール、GVHR 導入 2 週目、8 週目のマウスから得られた肝組織から total RNA を抽出し、cytokine 関連遺伝子についてマイクロアレイ法により網羅的遺伝子発現頻度解析を行った。

#### C. 研究結果

H&E 染色より、胆管ならびに中心静脈周囲にみられるリンパ球中心の炎症性細胞浸潤において、T 細胞、B 細胞の形態を示さない未分化様のリンパ球の細胞浸潤が多く観察された。その未分化様リンパ球は、炎症改善傾向においても浸潤細胞の多くを占めていた。免疫染色の結果、炎症細胞浸潤には CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup> の細胞が観察され、炎症改善と共に減少することが確認された。しかしながら、浸潤細胞には CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> 細胞が数多く存在し、GVHR 導入 8 週後まで高い割合で観察された。

マイクロアレイ法の結果、炎症の経過とともに発現

頻度が 2 週目で増加し、8 週で低下している遺伝子が多数見られ、IL-2 receptor  $\gamma$  鎖が 2 週目で最も高い発現を示した。そこで、IL-2 receptor について確認したところ、制御性 T 細胞である CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞の特異的マーカー IL-2 receptor  $\alpha$  鎖 (CD25) がコントロールにおいて無発現であったのに対し、2 週目で発現を認め、8 週目まで持続していた。

#### D. 考察

遺伝子発現解析ならびに組織学的検討をふまえると近年注目されている自己免疫疾患と深い関連のある制御性 T 細胞 (CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞、NKT 細胞、Tr1 細胞など) による免疫自己寛容の再誘導による肝病変の改善がもたらされている可能性が示唆された。また、我々のこれまでの報告からも制御性 T 細胞の関与が考えられる。

#### E. 結論

GVHR モデルは、免疫自己寛容の破綻により生じるため、このモデルにおける炎症性病変の改善は免疫自己寛容の再誘導が生じている結果である可能性が考えられる。今後は、このモデルにおける制御性 T 細胞群の発現についての確認と自己免疫性肝疾患における制御性 T 細胞の関連性の検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Seo E, et al.: Effective gene therapy of biliary tract cancer by a conditionally replicative adenovirus expressing Uracil phosphoribosyl-transferase (UPRT): significance of timing of 5-fluorouracil administration. Cancer Res. (in press)
- 2) Matsuzaki Y: Alcohol abuse and Occult HBV - a risk factor for hepatocellular carcinoma (Editorial).

- Hepatol. Res. (in press)
- 3) Honda A, et al.: Disrupted coordinate regulation of farnesoid X receptor (FXR) target genes in a patient with cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Lipid Res.* [Epub ahead of print].
  - 4) Matsuzaki Y, et al.: Simultaneous determination of dehydroepiandrosterone and its 7-oxygenated metabolites in human serum by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids.* 69: 817-824, 2004.
  - 5) Miyazaki T, et al.: Optimal and effective oral dose of taurine to prolong exercise performance in rat. *Amino Acids.* 27: 291-298, 2004.
  - 6) Inoue Y, et al.: Liquid chromatography assay for routine monitoring of cellular ribavirin levels in blood. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3813-3816; 2004.
  - 7) Hakamada T et al.: Identification of novel hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes by ELISpot assay using peptides with human leukocyte antigen-A\*2402-binding motifs. *J. Gen. Virol.* 85: 1521-1531; 2004.
  - 8) Homma M, et al.: Marked elevation of erythrocyte ribavirin levels in interferon and ribavirin-induced anemia. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2: 337-339; 2004.
  - 9) Xu G, et al.: Dietary cholesterol stimulates CYP7A1 in rats because farnesoid X receptor is not activated. *Am. J. Physiol.* 286: G730-G735; 2004.
  - 10) Honda A, et al.: Significance of plasma  $7\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one and 27-hydroxycholesterol concentrations as markers for hepatic bile acid synthesis in cholesterol-fed rabbits. *Metabolism.* 53:42-48; 2004.
2. 学会発表
- 1) Ikegami T, et al.: Suppressing effect of ursodeoxycholic acid (UDCA) on phospholipase A2 type IIA expression in patients with liver cirrhosis. *Digestive Disease Week and the 105th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association*, 2004.
  - 2) Yoshida T, et al.: Incidence and improvement factors of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese. *Digestive Disease Week and the 105th annual meeting of the American Gastroenterological Association*, 2004.
  - 3) Honda A, et al.: Disrupted coordinate regulation of FXR target genes in a patient with cerebrotendinous xanthomatosis. *The 18th International Bile Acid Meeting (Falk Symposium)* 2004.
  - 4) 宮崎照雄, ほか: Dehydroepiandrosterone (DHEA) およびDHEA sulfateの培養癌細胞株増殖抑制メカニズムの検討: PI3K/Aktシグナル伝達に対する影響について, 第35回日本肝臓学会東部会, 2004
  - 5) 池上 正, ほか: Suppressing Effect of Ursodeoxycholic Acid on Type IIA Phospholipase A2 in Patients with Liver Cirrhosis, 第35回日本肝臓学会東部会, 2004
  - 6) 正田 純一, ほか: ベザフィブラートの肝輸送蛋白ABCB4 (リン脂質トランスポーター) の発現および機能の賦活効果は核内受容体PPAR $\alpha$ を介在する, 第35回日本肝臓学会東部会, 2004
  - 7) 加納 雅仁, ほか: インチンコウ湯 (TJ-135) の投与により自覚症状ならびに肝機能障害の改善を認めた原発性硬化性胆管炎の一症例, 第35回日本肝臓学会東部会, 2004
  - 8) 本多 彰, ほか: 脳髄黄色腫症(CTX)における胆汁酸合成系up-regulationのメカニズムについて, 第26回胆汁酸研究会, 2004
  - 9) 池上 正, ほか: UDCAによる炎症性サイトカイン誘導性II AフォスホリパーゼA2発現の抑制, 第40回日本胆道学会学術集会, 2004
  - 10) 本多 彰, ほか: 核内胆汁酸受容体 (FXR) 標的遺伝子の発現に対する胆汁アルコールの影響, 第40回日本胆道学会学術集会, 2004
  - 11) 若山 真理子, ほか: 胆嚢癌に対するRGDファイバー変異制限増殖型アデノウイルス(Ad)による抗腫瘍効果の改善, 第40回日本胆道学会学術集会, 2004
  - 12) 加納 雅仁, ほか: インチンコウ湯(TJ-135)の投与により自覚症状ならびに肝機能障害の改善を認めた原発性硬化性胆管炎の1症例, 第40回日本胆道学会学術集会, 2004
  - 13) 宮崎 照雄, ほか: 肝障害ラットにおけるタウリンの肝障害・線維化抑制効果, 第90回日本消化器病学会総会, 2004
  - 14) 南木 融, ほか: LgH遺伝子CDR3領域の monoclonality解析—慢性C型肝炎患者を対象として—, 日本臨床検査自動化学会, 2004
  - 15) 大木 圭子, ほか: 免疫・血清B型肝炎ウイルスのPre-core領域の解析, 第53回日本医学検査学会, 2004
  - 16) 吉田 正, ほか: UDCA投与が有効であった生活習慣病非合併若年性NASHの一例, 第40回日本肝臓学会総会, 2004
  - 17) 宮崎 照雄, ほか: 肝障害ラットの肝障害, 線維化に対するタウリン投与効果と肝内タウリントランスポーター発現分布との関連, 第40回日本肝臓学会総会, 2004
- H. 知的財産権の出願, 登録状況  
なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### Con A 誘発マウス肝炎モデルを用いた免疫学的肝細胞障害の発症と治療法の検討

研究協力者 中村 公英 旭川医科大学内科学第二講座 教授

**研究要旨:** Concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルは、Con A により肝内に T リンパ球が浸潤し、その後肝小葉内に広範な肝細胞壊死が生じること、催炎性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  が肝細胞障害発症に関わっていることから、自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用なモデルとなることが報告されてきた。我々はこれまで本モデルを用いて、サイトカイン産生を抑制あるいは調節することにより、肝障害発症を抑制する薬剤を探索してきた。今年度の研究成果として、海藻由来の多糖体である Fucoidan がサイトカイン産生調節に関与し、肝障害発症を抑制することを明らかにした。

#### A. 研究目的

ウイルス性肝炎、自己免疫性肝疾患、アルコール性肝障害など、我が国の多くの肝臓病の発症進展には免疫学的肝細胞障害機序が関与することが報告されている。我々は Con A 誘発マウス肝炎モデルの検討から、本モデルの肝細胞障害発症には種々のサイトカインが関与し、免疫学的肝細胞障害機序が関与する上記の難治性肝疾患の研究に有用なモデルとなることを報告してきた。今回、非特異的 selectin inhibitor として用いられてきた海藻由来の多糖体である Fucoidan の Con A 肝細胞障害とサイトカイン産生能に対する影響を検討した。

#### B. 研究方法

7-8 週令の雌性 BALB/c マウスに Con A (Type IV, Sigma 社) 18.5 mg/kg を静注し、肝炎モデルを作製した。Con A 投与 30 分前に Fucus vesiculosus 由来の Fucoidan (Sigma 社)、1-30 mg/kgBW を 0.2 ml の生食に溶解し、静脈内投与した。Con A 投与 8 時間後の血中 GPT 値を酵素法 (Wako 社キット) で、経時的な血中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 濃度を ELISA 法 (Genzyme 社) で測定した。また、Fucoidan 10 mg/kgBW 単独投与後の経時的な血中、肝組織中 IL-10 濃度を ELISA 法で検討した。また、Fucoidan 投与前に抗マウス IL-10 中和抗体 (Genzyme 社) 100  $\mu$ g を腹腔内投与し、Fucoidan の作用と IL-10 の関連を検討した。さらに、Gdcl3 10 mg/kg を Fucoidan 投与前 48、24 時間前に、抗マウス CD4+ 中和抗体 (R&D 社) を 24 時間前に静注し、Fucoidan の血中 IL-10 誘導能と Kupffer 細胞、CD4+ T 細胞の関与について検討した。統計学的検討は、血中 GPT 値ならびに血中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、血中、肝組織中 IL-10 濃度の結果を Mean  $\pm$  SE で示し、有意差検定は分散分析 (ANOVA) にて行った。

本実験にあたりあらかじめ旭川医科大学動物実験委員会の承諾を得、さらに NIH の実験動物取り扱い規約に基づいて行った。

#### C. 研究結果

1. Con A 肝障害に対する Fucoidan の影響  
Con A 投与 8 時間後の血中 GPT 値は Fucoidan の前投与により、対照群 2055  $\pm$  259、Fucoidan 1 mg; 3388  $\pm$  881、5 mg; 922  $\pm$  777、10 mg; 62  $\pm$  10、20 mg; 117  $\pm$  65、30 mg; 168  $\pm$  26 (Mean  $\pm$  SE, KU/L) と用量依存性に有意に低下した (図 1)。また、Con A 投与 8 時間後の肝組織像では、Fucoidan 10 mg/kg の前投与により、肝小葉中間帯の広範な肝細胞壊死像の明らかな抑制が見られた (図 2)。
2. Con A 投与後の血中サイトカイン値に対する Fucoidan の影響  
Fucoidan 10 mg/kg の前投与により Con A 投与後の血中 TNF- $\alpha$  値は 2、4 時間後において有意に低下し (図 3)、また、血中 IFN- $\gamma$  値は 2、8 時間後において有意に低下した (図 4)。一方、血中 IL-10 値は Con A 投与 2 時間後において対照群 42  $\pm$  5 に対し、Fucoidan 群 216  $\pm$  69 (Mean  $\pm$  SE, pg/ml) と有意に上昇した (図 5)。
3. Fucoidan 単独投与後の血中、肝組織中 IL-10 産生能  
Con A 投与早期の IL-10 誘導が Fucoidan によるか否かを検討するため、Fucoidan 10 mg/kg の単独静注後の血中、肝組織中の IL-10 濃度を測定した。Fucoidan 投与後の IL-10 は血中では 2 時間後を、肝組織中では 1 時間後をピークとし、それぞれ 4 時間後まで対照に比べ有意な上昇を認めた (図 6、7)。
4. Fucoidan の Con A 肝障害抑制効果と IL-10 の関与  
IL-10 中和抗体の前投与により Fucoidan の Con A 肝障害抑制効果は完全に阻止された (図 8)。
5. Fucoidan の IL-10 産生効果に対する Kupffer 細胞、CD4+ T 細胞の関与  
Gdcl3 前投与により Fucoidan の IL-10 誘導効果は対照群に比べ 25% に低下したが、抗 CD4+ 中和

抗体投与では有意な変化は見られなかった。また、Gdcl3 と CD4+中和抗体の併用による相乗効果は認められなかった(図 9)。

図1. Con A 肝細胞障害に対するFucoidanの影響

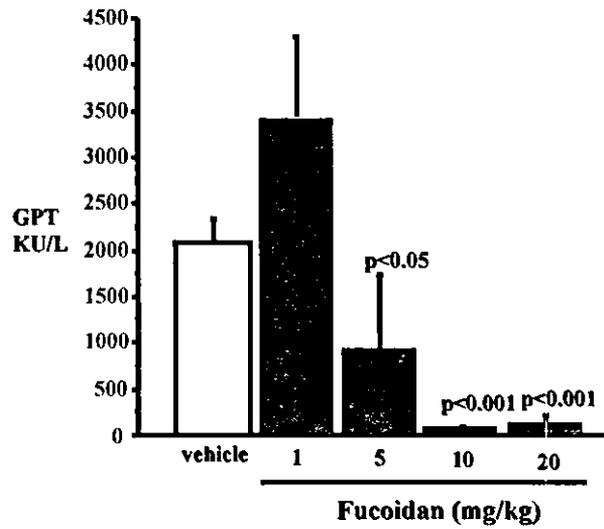


図2. Con A投与後の肝組織像に対するFucoidanの影響

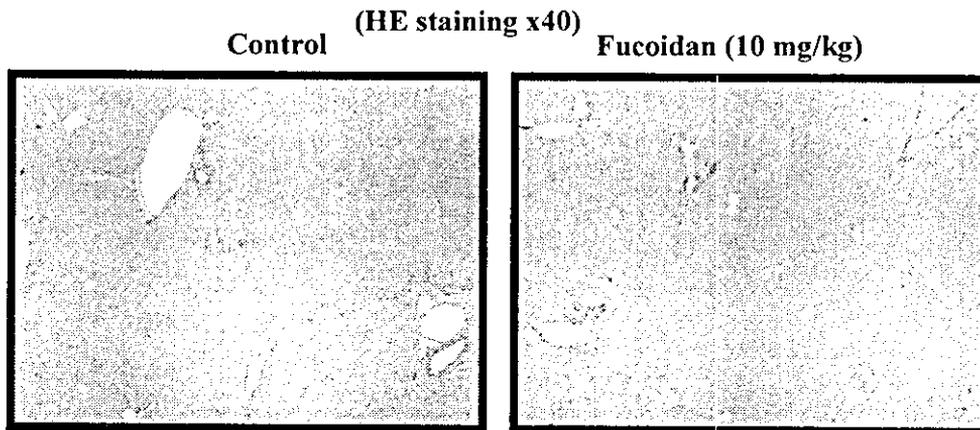


図3. Con A投与後の血中TNF- $\alpha$  値に対するFucoidanの影響

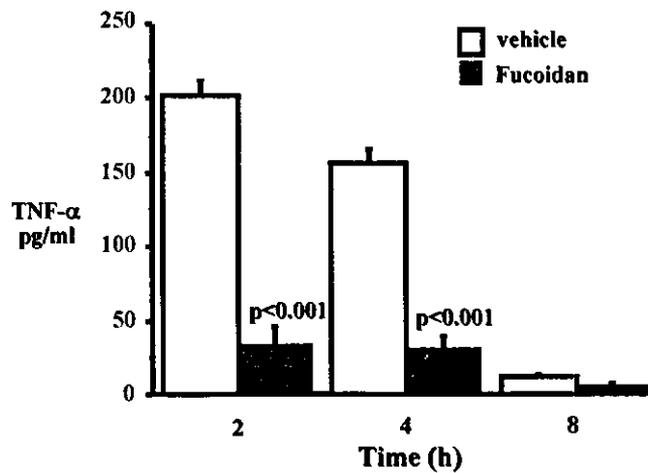


図4. Con A投与後の血中IFN- $\gamma$ 値に対するFucoidanの影響

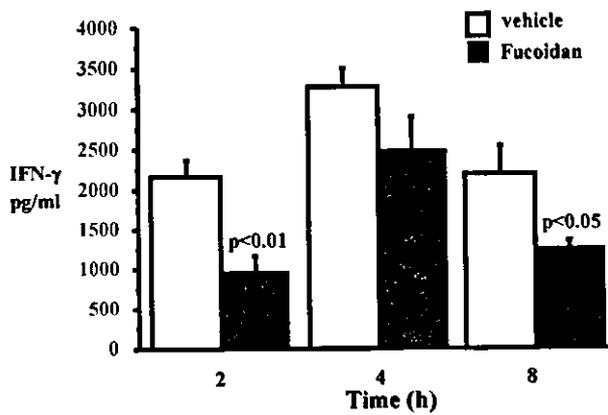


図7. Fucoidan単独投与による肝組織中IL-10の誘導

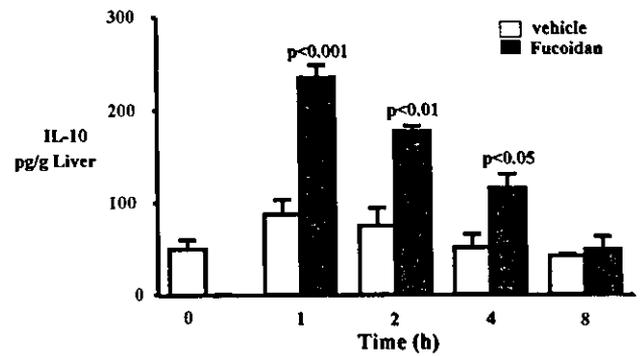


図5. Con A投与後の血中IL-10値に対するFucoidanの影響

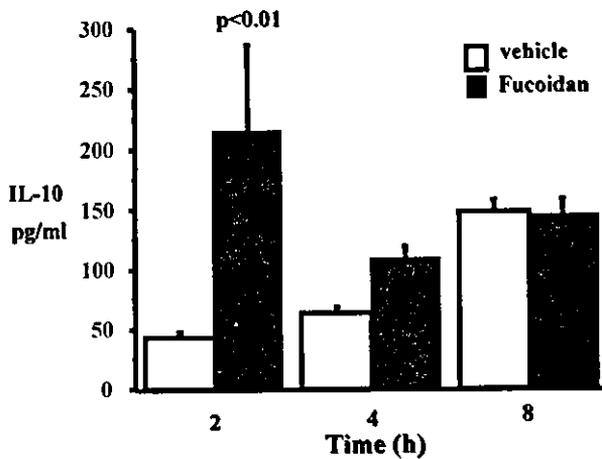


図8. Fucoidanの肝障害抑制効果とIL-10の関与

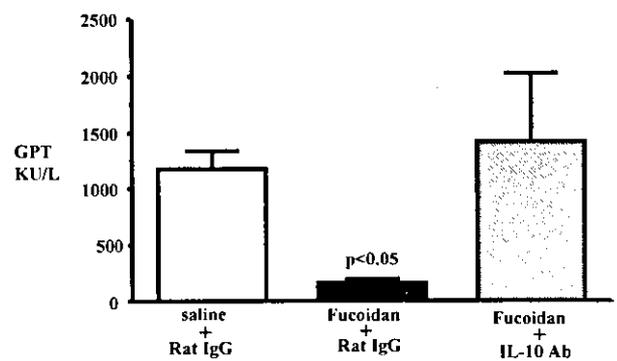


図6. Fucoidan単独投与による血中IL-10の誘導

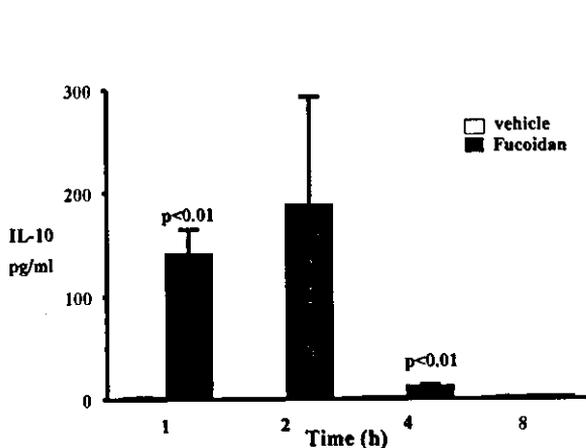
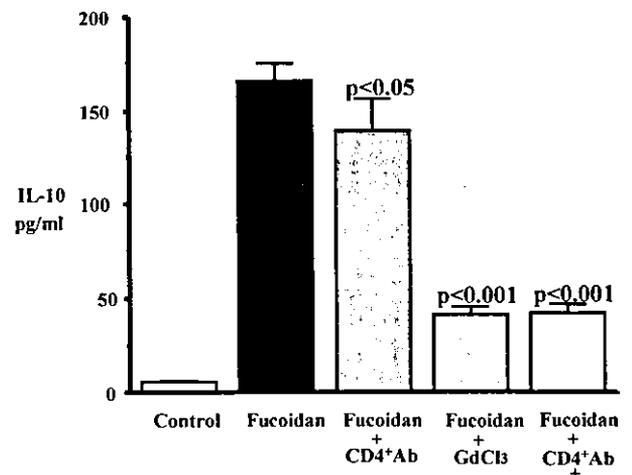


図9. FucoidanのIL-10産生効果に対するKupffer cell、CD4<sup>+</sup> T cellの関与



#### D. 考察

Con A 誘発マウス肝炎モデルは Con A により肝内に Tリンパ球が浸潤し、その後肝小葉内に広範な肝細胞壊死が生じること、催炎性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  が肝細胞障害発症に関わっていることから、自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用なモデルとなることが報告されてきた。今回、非特異的 selectin inhibitor として用いられてきた海藻由来の多糖体である Fucoidan (Fucus vesiculosus 由来) の Con A 肝細胞障害とサイトカイン産生能に対する影響を検討した。

今回の検討では、Fucoidan の前投与により Con A 投与後の血中 GPT 値は Fucoidan の用量依存性に有意に低下し、その効果は肝組織学的検討においても明らかであった。また、血中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  値は、Fucoidan の前投与により抑制され、逆に血中 IL-10 は増加していた。本モデルにおいては Th1 サイトカインである TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  は肝障害を増悪させ、Th2 サイトカインである IL-10 は肝障害を抑制することが報告されている。本研究では IL-10 中和抗体を前投与すると Fucoidan の肝障害抑制効果は完全に阻止されたことから、Fucoidan の作用機序として IL-10 産生誘導効果が示唆された。また、Fucoidan の単独投与により、肝組織中には 1 時間後を、血中には 2 時間後をピークとした IL-10 産生誘導が認められた。さらに、Gdcl3 の前投与により血中 IL-10 は対照の約 25% に抑制されたことから、Fucoidan は主として肝内の Kupffer 細胞に作用し、IL-10 を産生することが示唆された。すなわち、多糖体 Fucoidan は肝組織内で抗炎症性サイトカインである IL-10 を誘導し、催炎性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  産生を抑制し、Con A 肝障害発症を抑制すると考えられた。Kupffer 細胞を含めたマクロファージがスカベンジャー受容体を介して酸化コレステロール、リポ蛋白、細菌菌体成分、アポトーシス細胞などを非特異的に取り込み IL-10 や他のサイトカインを産生することが知られている。今回用いた Fucoidan は IL-10 を優位に誘導することが明らかとなり、今後有効成分を抽出、精製が可能となれば自己免疫性肝炎や劇症肝炎などの難治性肝疾患の有用な治療薬になることが期待される。

#### E. 結論

海藻由来の多糖体である Fucoidan は主として肝内の Kupffer 細胞に作用し、抗炎症性サイトカインである IL-10 を誘導し、催炎性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  産生を抑制し、Con A 肝障害発症を抑制すると考えられた。今後さらに詳細な作用機序について検討が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) High, but not, low molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing pro-inflammatory cytokines in mice. *J Gastroenterol*;39:346-354,2004.
- 2) Concanavalin A (Con A) 繰り返し投与による Con A 肝細胞障害に対する免疫寛容現象の誘導. *薬理と治療*;32:S155-S159,2004.

##### 2. 学会発表

- 1) 第 40 回日本肝臓学会総会  
Con A 誘発マウス肝炎モデルにおけるサイトカイン、ケモカインのクロスリンクとその治療法の検討. *肝臓* 45: Suppl A297, 2004.
- 2) 第 40 回日本肝臓学会総会  
Con A 誘発マウス肝炎モデルに対する多糖体 Fucoidan の効果. *肝臓* 45: Suppl A306, 2004.

#### H. 知的財産権の出願登録状況

なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分担研究報告書

### 劇症型自己免疫性肝炎の臨床的特徴

研究協力者 白鳥 康史 岡山大学大学院消化器・肝臓・感染症内科学 教授

**研究要旨：**本研究の目的は、劇症型自己免疫性肝炎の臨床像を明らかにすることである。今回は、劇症肝炎の原因として明らかな疾患が特定できず抗核抗体が陽性を示した症例を劇症型自己免疫性肝炎と定義した。対象は2004年12月までに当科及び関連施設に入院した108例の劇症肝炎症例であり、うち11例（10.2%）が劇症型自己免疫性肝炎と診断された。入院時に肝性脳症Ⅳ度で systemic inflammatory response syndrome を伴った1例と T/D ratio > 2.0 の1例は入院後2週間以内に死亡したが、全体としては2週間後生存率82%、4週間後生存率73%と比較的良好であった。入院経過中における予後因子としてはALT値やPT値よりもT.Bil値の推移が重要と考えられた。

#### 共同研究者

三宅康広	岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学
岩崎良章	岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学
小橋春彦	岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学
坂口孝作	岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科学

であったが、他の10例はⅡ度であり、Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) を1例に認めた。入院時検査ではT.Bil 20.6 mg/dL (5.9-31)、T/D ratio 1.5 (1.2-2.2)、ALT 220 IU/L (59-1094)、PT 29% (6-38)、IgG 2672 mg/dL (1560-4187)、ANAは3例で40倍、2例で80倍、他の6例は160倍以上であった。治療としては8例でステロイド剤が使用され、うち2例でパルス療法が行われた。また、ステロイド剤が使用された8例中2例でサイクロスポリンが併用された。予後については5例が肝移植なしで生存し、1例が肝移植、5例が肝移植なしで死亡した。

入院時に肝性脳症がⅣ度でSIRSを伴う1例とT/D ratioが2.0を超えていた1例は入院後2週間以内に死亡した。

入院後の経過中における予後因子について肝移植例を除く10例で検討を行ったところ、経過中のALT値やPT値には生存例と死亡例の間で差を認めなかったが、T.Bil値は経過を通して死亡例で有意に高値であった（生存例vs死亡例：入院時19.2 mg/dL vs 29.1 mg/dL、3日後11.1 mg/dL vs 19.0 mg/dL、7日後12.5 mg/dL vs 23.2 mg/dL、15日後7.9 mg/dL vs 24.1 mg/dL）。

#### A. 研究目的

近年、劇症肝炎症例の約1割で自己免疫性肝炎（以下、AIH）による病態への関与が報告<sup>1</sup>されているが、それらの症例についての検討はいまだ十分なされていない。本年度はAIHが病態に関与したと考えられる劇症肝炎症例の臨床像について検討を行った。

#### B. 対象と方法

2004年12月までに当科及び関連施設に入院された劇症肝炎症例108例中、下記の条件を満たす症例を劇症型AIH症例と診断し検討を行った。

1. 初発症状発現から8週間以内に肝性脳症Ⅱ度以上を呈しプロトロンビン時間40%以下となった症例。
2. IgM-HA抗体、HBs抗原、IgM-HBc抗体、HCV抗体、HCV-RNAの全てが陰性。
3. 原因と考えられる薬物や他に疑われる原因がない。
4. 抗核抗体が40倍以上で陽性。AIH国際診断基準<sup>2</sup>で確診または疑診症例。

#### C. 研究結果

劇症肝炎108例中11例（10.2%）が劇症型AIHと診断され、2例はAIH国際診断基準の確診例、9例は疑診例であった。年齢は中央値で53歳（16-75）、全例女性であった。初発症状発現から肝性脳症Ⅱ度出現までの期間は24日（16-52）と全例が亜急性型劇症肝炎であった。入院時の肝性脳症は1例がⅣ度

#### D. 考察

劇症型AIHの診断については一定の見解が得られておらず、診断に苦慮する症例が存在する。一般臨床においてANA陽性を伴う肝機能異常はAIHを疑う重要な所見であり、AIH国際診断基準においてもANA40倍以上にスコアが与えられている。しかし、健康人においてもANA40倍は31.7%、80倍は13.3%と高率に認められ、160倍以上で5%以下の低頻度になってくると報告されている<sup>3</sup>。また、恩地らの報告にもあるようにAIHによる急性肝炎では血清IgGやガンマグロブリン値が低値であり、典型的なAIHの病状を呈しにくい<sup>4</sup>。今回はANA40倍以上でAIH国際診断基準の疑診または確診例を劇症型AIHと定義しANA80倍にもかかわらず臨床経過と

生検組織像より劇症型 AIH と診断された症例も報告したが、劇症型 AIH の診断について今後症例を積み重ね更なる検討が必要と考えられる。

昨年、我々は病因 (HBV または不明)、肝性脳症(Ⅲ度またはⅣ度)、SIRS (陽性)、T/D ratio ( $> 2.0$ ) の 4 項目から成る劇症肝不全における短期予後予測システムを考案し報告した<sup>5</sup>。今回、劇症型 AIH と診断された症例においても肝性脳症(Ⅲ度またはⅣ度)、SIRS (陽性) T/D ratio ( $> 2.0$ ) の 3 因子は短期予後と関連していた。しかし、劇症型 AIH では subacute hepatitis や LOHF に似た病態をとる症例が多く、経過中の T.Bil の変動も予後を規定する重要な因子と考えられた。

今回の 11 例中診断時に肝性脳症Ⅳ度で SIRS を伴った 1 例と T/D ratio  $> 2.0$  を満たした 1 例 (3 日後に SIRS 陽性) は早期に死亡したが、診断 2 週間後の生存率は 82%、4 週間後の生存率は 73% と比較的良好であった。よって、劇症型 AIH 例では最初に免疫抑制剤や血漿交換、CHDF などの治療を行い、これらの治療に反応しない症例には肝移植を考慮するといった治療計画を立てて診療にあたるのが可能と考えられた。

#### E. 結論

劇症型 AIH と診断された 11 例全例が女性かつ亜急性型であった。診断時に高度の肝性脳症や SIRS を伴う症例や T/D ratio  $> 2.0$  を満たす症例では急速に病状が悪化した。治療経過中では T.Bil の変動が予後と関連していた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### I. 参考文献

- 1) 藤原研司. 劇症肝炎及び遅発性肝不全(LOHF : late onset hepatic failure)の全国集計(2002). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性の肝疾患に関する調査研究 平成 15 年度 研究報告書, pp.85-106.
- 2) Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J hepatol 1999; 31: 929-938.
- 3) Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. Arthritis Rheum 1997; 40: 1601-1611.
- 4) Abe M, Hiasa Y, Masumoto T, et al. Clinical characteristics of autoimmune hepatitis with histological features of acute hepatitis.
- 5) 白鳥康史. 劇症肝不全における短期予後予測システム. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性の肝疾患に関する調査研究 平成 15 年度 研究報告書, pp.121-122.

# 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

ヒト血清における蛋白質発現の比較 -AIH, PBC, 境界病変を対象として-

研究協力者 西口 修平 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科 助教授

研究要旨：本研究は自己免疫性肝炎（AIH）と原発性胆汁性肝硬変（PBC）とにおいて発現する血清蛋白を解析することで両疾患の特徴を明らかにし診断困難例における新たな血清診断法の確立を計画するものである。対象は国際診断基準に適合した AIH10 例、PBC10 例と診断困難例（境界病変）10 例である。まず AIH と PBC の患者血清をプロテインチップにて解析し両者を特徴付ける蛋白を抽出した。これら候補蛋白からバイオマーカーの探索を行い分子量 6646 と 6628 の蛋白が診断法として有用であることを明らかになった。また血清蛋白は単独より複数用いることにより診断の特異度が向上することが明らかとなった。今回確立したバイオマーカーにて境界病変の血清蛋白を解析した結果、10 例すべてが PBC と診断された。以上より、免疫異常を伴う肝疾患を対象としてプロテインチップを用いた新たな血清診断が可能であることが示唆された。

### 共同研究者

田守 昭博	大阪市立大学 肝胆膵病態内科講師
塩見 進	大阪市立大学核医学 教授
若田部るみ	サイファージェン・ バイオシステムズ(株) 研究員
志和美重子	サイファージェン・ バイオシステムズ(株) 研究員

疾患を区別する最も有効な決定木を作成した。次に作成した決定木にて境界肝病変の蛋白発現パターンを解析しAIHとPBCのいずれに分類されるか検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の目的、方法、患者の個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、口頭にて同意を得た。

### A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）の診断にはスコアリング法が普及しているが、除外診断を基本とするものであり未だに原発性胆汁性肝硬変（PBC）との鑑別難渋する境界病変を経験する。そこで我々は新たな診断法として患者血清のプロテインチップによる解析を導入することを提唱してきた。今回、プロテインチップから得た複数の蛋白マーカーを用いて decision tree（決定木）を作成しその臨床応用の可能性について検討した。

### B. 研究方法

大阪市立大学付属病院にてAIH国際診断基準において診断されたAIH1例、組織学的に確定診断された原発性胆汁性肝硬変（PBC）11例、および血中自己抗体および組織学的には診断が困難であった免疫異常関連肝疾患（AIHとPBCの境界肝病変）10例を対象とした。なお境界病変の2サンプルは東京慈恵会医大・銭谷幹男先生より供与頂いたものである。対象はPBCの1例を除き全例女性でありAIHと境界肝病変は治療前に採取された保存血清を解析した。血清をureaで変成させた条件とPBSによる希釈のみの非変成条件で調節した。プロテインチップはサイファージェン社の陽イオン交換チップ（WCX2）を用いSELDI-TOF-MS法にて解析した。AIHとPBCにおいて発現の異なる蛋白を抽出し統計ソフトにて両

### C. 研究結果

AIH と PBC において異なった発現ピークを示した蛋白は 23 個あった。この中では単一の発現マーカーによって両者を効率的に区分できるものは存在しなかった。そこで発現マーカーの組み合わせを統計解析し効率良い決定木（decision tree）を作成した。検討の結果 23 個の候補蛋白の中から M/Z6628、M/Z6194 の組み合わせによって各々の疾患における診断効率 AIH66.7%、PBC100%と良好な判別が達成された。

次に境界肝病変 10 例の血清蛋白発現を解析した。図 1 に示す血清蛋白の診断フローチャートに従い AIH と PBC のいずれに分類されるか検討したところ今回対象とした境界病変は全例 PBC と判定された。

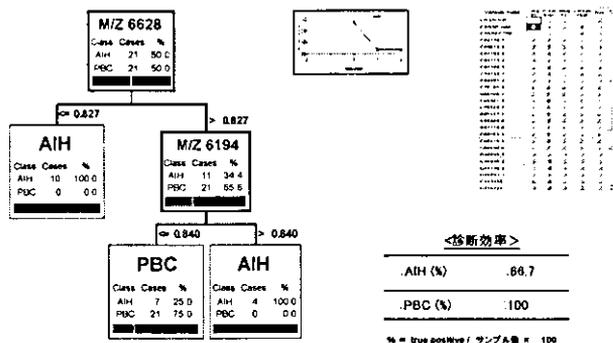


図1. マルチマーカー解析

#### D. 考察

SELDI-TOF-MS法と種々のチップを組み合わせるプロテインチップは蛋白質を網羅的に解析する手法として注目されている。既に癌のスクリーニングや診断ではこれまで報告されていない蛋白質がマーカーとなることが示され臨床応用が進められている。本研究ではこの方法を用いて AIH, PBC の診断マーカーをスクリーニングした。候補となる蛋白質を 23 個抽出したが、単独のマーカーでは両者を区別することは困難であり複数の蛋白質を組み合わせることで診断法として有用であることが推測された。今後より多くのサンプルにて検討することで診断法としての信頼性を検討する必要があると考える。また今回作成した決定木は分子量 6628, 6194 の蛋白質を用いたものであるがその蛋白質同定には至っていない。この点も今後解決すべき課題と考える。一方、境界病変とされた診断困難例は全例が PBC に類似した血清蛋白質を発現していることが明らかとなった。以上本研究からプロテインチップによる血清蛋白質解析が免疫異常を伴う肝疾患への診断に有用であることが示唆された。

#### E. 結論

プロテインチップにより得られた蛋白質マーカーを複数個用いることで効率的な決定木の作成が可能であった。今回の決定木を用いると境界肝病変(診断困難例)は PBC と診断された。以上より血清中の発現蛋白質解析が新たな診断法とな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

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 田守昭博、西口修平、関 守一。パネル「自己免疫性肝疾患:非定型例をどうとり扱うのか?」において、自己免疫性肝疾患患者血清のプロテインチップによる解析を発表した。第 89 回日本消化器病学会総会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

首都圏の自己免疫性肝炎における 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：**首都圏の自己免疫性肝炎（AIH）症例について HLA DRB1 を測定し、AIH 発症との関連を検討した。当研究班の診断指針に合致する 35 例（男：女＝6：29、発症年齢 9-78 歳）を対象とした。20 歳代での発症時に本指針に合致するものの、出産後に原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病像に転じた 2 例は除外した。肝生検は 32 例（91%）に施行した。確診 25 例、疑診 10 例だった。経過中の死亡は 2 例だった。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\*0405 が 25（35.7%）と対照に較べて有意に多かった（ $P<0.001$ ）（DR4 をコードする allele の合計でも 31（44.3%）と対照の 54（22.9%）との間に有意差を認めた（ $P<0.001$ ））。以下多い順に、\*1502 が 11（15.1%）、\*0803 が 5（7.1%）、\*1501\*と\*1302 とが 4（5.7%）だった。\*0101 の 1（1.4%）、\*0901 の 3（4.3%）、\*1302 の 4（5.7%）は対照に較べて少なかった（\*0901 のみ有意差あり（ $P<0.01$ ））。症例毎では\*0405 が 23 例（65.7%）と最多で、\*1502 が 10 例（28.6%）、\*0803 が 5 例（14.3%）の順で、このいずれかを有する者が 30 例（85.7%）を占めた。また、35 例中 DR4(+) が 28 例（80%）、DR2(+) が 14 例、このうち両者陽性が 9 例と、大半の症例（33 例）が DR4 または DR2 を有し、既報に一致した。欧米に多い DR3 は認めなかった。DRB1 は AIH の発症と関連すると考えられた。

共同研究者

橋本直明 東京通信病院消化器科  
細田英雄 東京厚生年金病院中央検査室

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）は免疫遺伝的背景因子として我が国では HLA DR4 との関連が報告されている 1,2)。HLA 分布には地域差があること、HLA DR と AIH の臨床像には関連が報告されていることから、首都圏の AIH 症例について HLA DRB1 を測定して検討した。

B. 対象と方法

対象は両院を受診した当研究班の診断指針 3,4) に合致する AIH 症例 35 例で、男 6 例女 29 例、発症年齢 9-78 歳（平均 53.2 歳）である。肝生検は 30 例（91%）に施行した。国際診断基準スコアでは確診 25 例、疑診 10 例だった。20 歳代の発症時には本診断指針に合致したが、出産後に原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病像に転じた 2 例は除外した。経過中 2 例が死亡し死因は肝細胞癌（HCC）とうつ病だった。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. LA DRB1 allele の頻度は（表 1）、\*0405 が 25（35.7%）と対照に較べて有意に多かった（ $P<0.001$ ）（DR4 をコードする allele の合計でも 31（44.3%）と対照の 54（22.9%）との間に有意差を認めた（ $P<0.001$ ）。以下、多い順に\*1502 が 11

（15.1%）、\*0803 が 5（7.1%）、\*1501\*と\*1302 とが 4（5.7%）と続いた。\*0101、\*0901、\*1302 は少なかった（\*0901 のみ有意差あり（ $P<0.01$ ））。

2. 症例毎では\*0405 が 23 例（65.7%）と最多で、\*1502 が 10 例（28.6%）、\*0803 が 5 例（14.3%）の順で、このいずれかを有する者が 30 例（85.7%）を占めた。また、35 例中 DR4(+) が 28 例、DR2(+) が 14 例、このうち両者陽性が 9 例と大半の症例（33 例）が DR4 または DR2 を有し、既報に一致した 1,2)。欧米に多い DR3 は認めなかった 5,6)。
3. homozygote は 3 症例で\*0405 のホモ 2 例と\*1502 のホモ 1 例だった。
4. DRB1 allele の組み合わせで多かったものは、\*0405/\*1502 が 5 症例、\*0405/\*1302 が 4 症例、\*0405/\*1501 が 3 症例、\*0405/\*0901 と\*0405/\*1201 と\*0803/\*1502 が 2 症例ずつ認められた。以上で 21 症例と全体の 60%を占め、特定の DRB1 allele の組み合わせが多い可能性が示唆された。
5. ハプロタイプの可能性は、\*1502 の 10 alleles は全てが A24-B52-DRB1 \*1502、\*1302 の 4 alleles も全てが A33-B44-DRB1 \*1302、\*0405 の 25 alleles のうち 6 つが A24-B54-DRB1 \*0405、\*0803 の 1/4 が A2-B46-DRB1\*0803 と考えられた。
6. 治療では、ステロイドは 29 例で使用され 28 例が著効だった。UDCA は 5 例で使用された。残る 1 例は自然寛解した。
7. DR4、DR2 両者陰性例は 2 症例だった（表 2）。うち 1 例がステロイド無効の男性例だった。
8. 23 歳以下の若年発症症例は 4 例だった（表 3）。最若年は 9 歳発症、男性は 21 歳の 1 例、最重症

は21歳発症時に肝硬変で、いずれもDR2陽性、うち2例は\*0405/\*1502だった。他の1例は自然寛解した(DR2陰性)。

9. 死亡は2症例で、1例は23年通院した女性。大動脈炎症候群を合併し、肝硬変から肝細胞癌を併発して死亡した。他の1例は心筋症に続発したAIHの男性でうつ病で死亡した。両症例とも\*0405/\*1502だった。

10. 臨床経過では、DR2 (\*1501または\*1502)陽性者には、上記の若年発症3例と死亡2例の他、画像やプロトンピン時間から発症時比較的重かった症例2例が含まれた。DR2陰性者と陽性者の比較を示す(表4)。

表 1. AIH 患者における HLA DRB1 alleles の頻度

HLA DRB1	PBC 患者 (n=70 alleles)	健常対照 (n=236 alleles)	
*0101(1)	1 (1.4%)	11 (4.7%)	
(DR4)	31 (44.3%)	54 (22.9%)	P<0.001
*0401	2 (2.9%)	2 (0.8%)	
*0403	2 (2.9%)	7 (3.0%)	
*0405	25 (35.7%)	30 (12.7%)	P<0.001
*0406	1 (1.4%)	8 (3.4%)	
*0410	1 (1.4%)	2 (0.8%)	
*0802	1 (1.4%)	7 (3.0%)	
*0803	5 (7.1%)	17 (7.2%)	
*0901	3 (4.3%)	38 (16.1%)	P<0.01
*1101	1 (1.4%)	3 (1.3%)	
*1201	3 (4.3%)	7 (3.0%)	
*1202	1 (1.4%)	4 (1.7%)	
*1302	4 (5.7%)	27 (11.4%)	
*1403	2 (2.9%)	7 (3.0%)	
*1405	1 (1.4%)	8 (3.4%)	
*1406	2 (2.9%)	2 (0.8%)	
(DR2)	15 (21.4%)	41 (17.4%)	
*1501	4 (5.7%)	14 (5.9%)	
*1502	11 (15.7%)	23 (9.7%)	

表 2. DR4、DR2 両者陰性の AIH 症例

	発症年齢	性別	DRB1	HLA A, B, C locus	経過
1.	43 歳	女	*08032 /*1406	A 2, B46/48, ND	膵炎合併
2.	56 歳	男	*0901 / *1403	A 2/31, B70/75, Cw3	ステロイド無効

表 3. 若年発症の AIH 症例

	発症年齢	性別	DRB1	HLA A, B, C locus	経過
1.	9 歳	女	*08032 /*15011	A 2, B54/55, ND	
2.	21 歳	女	*0405 / *1502	A24, 31, B52, Cw(-)	発症時肝硬変
3.	21 歳	男	*0405 / *1502	A24, B52/54, Cw1	
4.	23 歳	女	*0405 / *0101	A 2/26, B7/61, Cw3/7	自然寛解

表 4. DR2 陰性、陽性 AIH 症例の特徴

	DR2 陰性例、 (n=19 例)	DR2 陽性例 (n=14 例)
平均年齢	56.1 歳	49.9 歳
女性	84.2%	85.7%
確診 (definite)	68.4%	85.7%
組織所見 F3 以上	21.0%	63.6% <
steroid 60mg/日以上	3/17 (17.6%)	3/10 (30.0%)
UDCA 治療例	5.3%	28.6%
IgG > 上限の 2 倍	26.3%	57.1%
ANA $\geq$ 1280 倍	21.0%	39.8%
SMA(+), ANA(-)	0/12 (0.0%)	2/8 (25.0%)

#### D. E. 考察と結論

首都圏の AIH 症例でも HLA DRB1 \*0405 allele の頻度が有意に高かった。症例毎に見ても \*0405 が 23 例(65.7%) と最多で、DR4 は 28 例(80%) で陽性だった。我が国の AIH では \*0405 或いは DR4 が多いとする既報と一致した 1,2)。頻度二位の allele は \*1502 だったが、有意差はなかった。症例毎では \*1502 が 10 例(28.6%)、DR2(15) が 14 例(40%) だった。DR4 陰性症例 7 例中 5 例は DR2 が陽性で、これも DR4 陰性例では DR2 が多いとする既報に一致した 1)。さらに、DRB1 allele の組み合わせにも特定のものが多い可能性が示唆された。DR4、DR2 両者陰性の 2 症例では薬物使用歴があり DLST 陽性(第 1 例)ウコン、第 2 例)健康食品 2 種) だった。また、\*0101、\*0901、\*1302 の 3 alleles は少なく、DR3 は認められなかった。これらから、我が国の AIH 症例は \*0405 allele を中心とする免疫遺伝的背景因子を有すると考えられた。

発症年齢では若年発症例で 3 例が \*1502 (DR2) を有し、この allele が必ずしも高齢発症ではないことが示された 1)。

臨床経過と HLA DRB1 の関連は今後の検討が必要と考えられた。

治療は副腎皮質ステロイドを使用した 29 例中 1 例を除き著効だった。欧米の DR3 陽性例ではステロイド治療に難渋する例があるとされるが 5,6)、我が国では DR4 陽性例の他、DR2 陽性例もステロイド治療が奏効し易いものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hosoda H, Okawa-Takatsuji M, Tanaka A, Uwatoko S, Aotsuka S, Hashimoto N, Ozaki Y, Ikeda Y. : Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. Clin Chim Acta 342: 71-81, 2004

- 2) 細田英雄、大川雅子、池田有成：抗カルボニクアンヒドラーゼ II 抗体 (Anti-carbonic anhydrase II antibody) 日本臨床 (増刊) 2005、(印刷中)

##### 2. 学会発表

- 1) Hosoda H, Okawa-Takatsuji M, Aotsuka S, Ozaki Y, Ikeda Y. : Significance of detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in liver diseases and the study of enzyme-linked immunosorbent assay for the antibody. Asian Pacific Digestive Week 2004. October 4-7, 2004 Beijing (China)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### I. 参考文献

- 1) Seki T, et al: HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. Gastroenterology 103:1041-1047, 1992
- 2) Toda G, et al: Present status of autoimmune hepatitis in Japan -correlating the characteristics with international criteria in an area with high rate of HCV infection. J Hepatol 26: 1207-1212, 1997
- 3) 戸田剛太郎：Meeting Report 自己免疫性肝炎診断指針 1996. 肝臓 37: 298-300, 1996
- 4) Alvarez F, et al: International autoimmune hepatitis group report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol 31:929-938, 1999
- 5) Donaldson PT, et al: Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis, human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. Hepatology 13: 701-706, 1991
- 6) Czaja AJ, et al: Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. Gastroenterology 105: 1502-1507, 1993

## 自己免疫性肝炎における制御性 T 細胞の役割

研究協力者 各務 伸一 愛知医科大学消化器内科 教授

**研究要旨：**制御性 T 細胞 (Tr) は自己免疫性疾患における末梢組織での免疫寛容状態の維持において大きな役割を果たしている。Tr の機能を調節していると考えられている Foxp3、TNF-R-SF18 (GITR)、CTLA-4、CD28 の各分子について、各々の mRNA 量を Real Time PCR 法を用いて定量し、自己免疫性肝炎 (AIH) における Tr の機能について検討し、Tr が AIH の病態に関与している可能性につき検討した。AIH 患者の Tr においては Foxp3 と CTLA-4 の mRNA 量の低下および TNF-R-SF18 (GITR) の mRNA 量の増加が認められたが、これらはすべて AIH 患者の末梢において Tr の機能が負に制御されていることを示唆する所見であり、Tr 機能の低下状態が免疫寛容状態の破綻に寄与している可能性を示唆するものであると考えられる。

### A. 研究目的

制御性 T 細胞 (Tr ; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞) は自己免疫性疾患における末梢組織での免疫寛容状態の維持において大きな役割を果たしている。今回我々は AIH 患者における末梢での免疫寛容状態の break through に Tr が関与しているかどうかを確認する目的で、AIH 患者において Tr の機能的な異常があるかどうかを検討した。

### B. 研究方法

当院にて AIH と診断された 15 例 (男性 2 例、女性 13 例)、健常人(control) 12 例、C 型慢性肝炎(CH) 患者 26 例を対象とした。末梢血よりリンパ球を分離し、①CD4、CD8、CD25、CD28 の各抗体を用いて Tr、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>T 細胞の各頻度をフローサイトメトリーにより検討し、②一部の患者においてはリンパ球をさらに磁気分離法により分画化して Tr 分画を得た後に RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL2、IL4、IL10、TGF $\beta$  の各サイトカインの mRNA 量を定量した。③さらに Tr の機能を調節していると考えられている *Foxp3*、*TNF-R-SF18 (GITR)*、*CTLA-4*、*CD28* の各々の mRNA 量を定量した。

### C. 研究結果

Tr の頻度は、AIH、CH (C) いずれにおいても control に比べて有意に増加していた (AIH vs control;  $9.86 \pm 3.32$  vs  $5.90 \pm 1.66$ ,  $p < 0.01$ )。逆に CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>T 細胞の頻度は、AIH、CH(C) いずれにおいても control に比べて減少していた (AIH vs control;  $11.57 \pm 4.99$  vs  $18.39 \pm 6.55$ ,  $p < 0.05$ )。

一方 CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>T 細胞については各群間で有意な差を認めなかった。②AIH 患者の Tr においては control の Tr に比べて IL4 および IL10 の mRNA の増

加を認めたが、その他のサイトカインの mRNA についてはほとんど差を認めなかった。③Tr の機能を up-regulate すると考えられる Foxp3 と CTLA-4 の mRNA 量は、AIH では control に比べて有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。一方で Tr の機能を down-regulate すると考えられる TNF-R-SF18 (GITR) の mRNA 量は、AIH では control に比べて有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。また、同様に Tr の機能を down-regulate すると考えられる CD28 の mRNA 量には両群間で差を認めなかった。

### D. 考察

AIH の発症機序を解明するためには、末梢における免疫寛容状態の破綻がいかにもたらされるかを調べる必要がある。今回の我々の検討では、AIH 患者の Tr における Foxp3 と CTLA-4 の mRNA 量の低下および TNF-R-SF18 (GITR) の mRNA 量の増加が認められたが、これらはすべて AIH 患者の末梢において Tr の機能が負に制御されていることを示唆する所見であり、さらには Tr 機能の低下状態が免疫寛容状態の破綻に寄与している可能性を示唆するものであると考えられる。今後は実際に AIH 患者の Tr の機能が低下しているかどうかを、細胞との直接的な接触を介した機序、あるいはサイトカインなどを介した機序から解析して確認する必要があると考えられる。

### E. 結論

AIH においては末梢での免疫寛容状態を維持している Tr の機能が低下している可能性があると考えられる。

### F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表  
なし

H. 知的所有権の取得状況  
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

## 小児期発症の自己免疫性肝炎に対するステロイドパルス療法

オブザーバー 藤澤 知雄 国際医療福祉大学附属熱海病院小児科 教授

**研究要旨:** 小児期発症自己免疫性肝炎に対するメチルプレドニンパルス療法の有効性を検討した。経口プレドニン療法と比較すると早期にトランスアミナーゼが正常化し、成長障害、体重増加の副作用も少なかった。

### 共同研究者

乾 あやの 国際医療福祉大学  
附属熱海病院小児科 助教授  
十河 剛 国際医療福祉大学  
附属熱海病院小児科

### A. 研究目的

小児期発症の自己免疫性肝炎（AIH）の治療法は従来は成人同様に経口プレドニン療法が中心であったが、経口プレドニン療法は成長障害や骨粗しょう症、中心性肥満などの副作用が問題となる。これらの副作用を回避する目的で我々は小児期発症 AIH に対するメチルプレドニンパルス療法の有用性を検討した。

### B. 研究方法

小児期発症 AIH と診断された 10 例。経口プレドニンで導入した群（po-PSL 群）4 例とメチルプレドニンパルス療法で導入した群（m-PSL 群）6 例に分けて検討した。経口プレドニンは 2mg/kg/day から開始し、肝機能検査を参考に漸減し、5mg/day で維持した。アザチオプリン（AZP）1mg/kg/day の併用をした症例もあった。

メチルプレドニンパルス療法はメチルプレドニン 15 - 30mg/kg div を 3 日間投与を 1 クールとし、ALT 1,000U/L 以上の症例では 1 週間あけて 2 クール行った。後療法として経口プレドニンを 1mg/kg/day から開始し、20mg までは後療法として内服で PSL 1mg/kg（最大投与量 60mg）と AZP 1mg/kg を内服した。パルス療法終了時と内服開始後 1 週間の時点でトランスアミナーゼが治療前より改善していれば、PSL は 2-4 週間毎に 2.5mg ずつ減量し、一日量 20mg 以降は 2-4 週間毎に 1mg ずつゆっくり減量し、5mg/日を目標とし、それ以上は減量しなかった。m-PSL 群では全例で AZP 1mg/kg をパルス療法と同時に開始した。

肝機能検査、自己抗体、免疫グロブリン値を経時的に観察した。また、成長障害の評価として Z-score、肥満の評価として Kaup 指数（BMI）の推移を経時的に観察した。

### C. 研究結果

po-PSL 群、m-PSL 群ともに全例で ALT 値は正常化した。po-PSL 群では 1 年以上肝機能が正常化しない症例が多いが、m-PSL 群では、4 か月以内に肝機能は正常化した。po-PSL 群では Z-score は m-PSL 群と比較すると低い値で推移し、Kaup 指数は高い値で推移する傾向があった。

### D. 考察

成人では一般に経口プレドニン療法で 6 か月程度で肝機能は正常化するが、小児では経口プレドニン療法群では 1 年以上肝機能が正常化しない症例もみられ、小児期発症の AIH は成人発症の AIH より重症である可能性がある。また、小児期発症 AIH ではメチルプレドニンパルス療法を用いることにより、早期に肝機能を正常化し、成長障害の副作用を軽減する可能性がある。今後はさらに症例を集め、多数例で解析する必要がある。

### E. 結論

小児 AIH の治療方針は成長等を考慮して、成人とは異なったプロトコールを作成する必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) Tsuyoshi Sogo, Tomoo Fujisawa, Ayano Inui, Haruki Komatsu, Yuri Etani, Hitoshi Tajiri, Kenji Waki, Yukitoshi Shimizu, Shoko Nakajima, Tomoyuki Imagawa, Shumpei Yokota. Intravenous methylprednisolone pulse therapy for children with autoimmune hepatitis. The 2<sup>nd</sup> World Congress of Pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. Paris, 2004

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## 自己免疫性肝炎の病態—遺伝子多型と発現蛋白の解析

研究協力者 清澤 研道 信州大学医学部内科 教授

**研究要旨：** AIH の疾患感受性遺伝子をマイクロサテライト解析にて、第 6 染色体短腕の HLA 領域を網羅的に解析し、HLA-DR, -DQ 領域にのみその存在が認められ昨年度報告した。今回は、マイクロサテライト解析を用いた全染色体領域の遺伝子多型解析とプロテインチップを用いた網羅的な発現蛋白を検討した。遺伝子多型の網羅的解析は、大まかに設定したマイクロサテライトマーカの PCR を終了させた。プロテインチップは AIH において、疾患特異的な蛋白発現が認められた。また、AIH と PBC を鑑別可能な蛋白がみられた。今後、症例を増やし、発現蛋白の同定など詳細な検討を加え、さらに、疾患感受性遺伝子の遺伝子多型と発現蛋白量の関連を調べる。

### 共同研究者

吉澤 要 信州大学医学部消化器内科 講師  
太田正穂 信州大学医学部法医学 講師

### A. 研究目的

AIH の疾患感受性遺伝子をマイクロサテライト解析にて、第 6 染色体短腕の HLA 領域を網羅的に解析し、HLA-DR, -DQ 領域にのみその存在が認められ昨年度報告した。

今回は、マイクロサテライト解析を用いた全染色体領域の遺伝子多型解析とプロテインチップを用いた網羅的な発現蛋白の関連について検討する。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子多型の網羅的解析

全染色体領域を大まかに設定した約 400 のマイクロサテライトマーカにより解析し、有意差のある領域を細かに設定したマイクロサテライトマーカにより解析し、それにより有意差のある領域の SNP 解析を行う。

#### 2. 発現蛋白

プロテインチップを用い AIH 12 例、PBC 10 例、コントロール 10 例の蛋白を解析する。

### C. 研究結果

#### 1. 遺伝子多型の網羅的解析

現在、全染色体上におおまかに設定した約 400 のマイクロサテライトの PCR が終了し、解析を行っている。

#### 2. 発現蛋白

##### プロテインチップ

AIH 急性期においてコントロールに比して特異的なピークがみられる。

AIH と PBC を比較すると、AIH には 5000Da のピークが検出されるが、PBC にはみられない。また、PBC には 8000Da 以上のピークがほとんど検出されない。

### D. 考察

遺伝子多型の網羅的解析は、大まかに設定したマイクロサテライトマーカの解析を終了させ、今後、有意差のある領域に細かくマイクロサテライトマーカを設定する。プロテインチップは AIH において、疾患特異的な蛋白発現が認められた。また、AIH と PBC を鑑別可能な蛋白がみられる。今後、症例を増やし、発現蛋白の同定など詳細な検討を加える必要がある。さらに、疾患感受性遺伝子の遺伝子多型と発現蛋白量の関連を調べる必要がある。

### E. 結論

AIH において、疾患特異的な蛋白発現が認められた。今後はさらに症例を増やし、発現蛋白の同定など詳細な検討を加える。さらに、全染色体上の疾患感受性遺伝子の遺伝子多型を解析し、発現蛋白量との関連を調べる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Ichijo T, Matsumoto A, Tanaka E, Kiyosawa K. Genetic Analysis of the HLA Region of Japanese Patients with Type 1 Autoimmune Hepatitis. J Hepatology 2005 in press.

#### 2. 学会発表

- 1) 第 40 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 自己免疫性肝炎の疾患感受性と遺伝子多型—HLA class III 領域のマイクロサテライト多型・SNP 解析を用いた解析

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし