

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minoru Shibata, Yasushi Onozuka, Toshio Morizane, Hideko Koizumi, Naomi Kawaguchi, Hiroshi Miyakawa, Makoto Kako, Keiji Mitamura: Prevalence of antimitochondrial antibody in Japanese corporate workers in Kanagawa prefecture. J Gastroenterol 39 (3): 255-259, 2004.

2. 学会発表

- 1) 2004年6月4日, 第40回日本肝臓学会総会. 一般住民における抗ミトコンドリア抗体の疫学調査. 柴田 実、西岡幹夫、宮川 浩、柳川達郎、宮内嘉明、栗山茂樹、黒河内和貴、正木勉、冨田忠孝、古田康夫、小林三善、井廻道夫。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

謝辞

各種 AMA の測定に協力していただいた医学生物学研究所の丹下比呂志氏および新井次郎氏に深謝いたします。

I. 参考文献

- 1) 賀古 眞、柴田 実、小野塚靖、他。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。
- 2) 井廻道夫、柴田 実、柳川達郎、他：一般住民における抗ミトコンドリア抗体の疫学調査。厚生労働科学研究補助金（特定疾患対策研究事業）難治性の肝疾患に関する研究。平成 15 年度研究報告書：p64-66, 2004。
- 3) 竹村真理, 大矢和彦, 小島和夫：MESACUP-2 テスト ミトコンドリア M2 の基礎的検討. 医学と薬学 46: 809-816, 2001.
- 4) 川口直美、宮川 浩、阿部和裕、他：抗ミトコンドリア抗体陰性原発性胆汁性肝硬変における抗 M2 抗体-Western blot 法による解析-。臨床病理 45: 1079-1084, 1997.
- 5) 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.

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 高知大学大学院医学系研究科消化器病態学 教授

研究要旨：平成 15 年度の本研究班における我々の研究において、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、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-hydroxysteroid dehydrogenase 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。そこで今年度は、前回の検討時に未治療であった 6 名の原発性胆汁性肝硬変患者から同意を得て治療後の肝組織を採取し、治療前後の遺伝子発現を比較した。その結果、11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase については治療による発現の増減には一定の傾向は認められなかった。治療後に発現が増強した遺伝子として、cytochrome P450II E1、aldolase B、haptoglobin alpha 1S が、発現が低下した遺伝子としては、alpha-fetoprotein、cytochrome c oxidase 1 が抽出された。しかし、それらに PBC の病態と関連すると考えられるものは認められず、治療による肝の炎症の沈静化と関連して変動した可能性が考えられた。

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。昨年度の本研究班における我々の研究で、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の抽出を試みたところ、ステロイド代謝酵素の一つである 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase の発現が未治療群に比較し治療群において低下している所見を得た。そこで今年度は、前回の検討時に未治療であった 6 名の原発性胆汁性肝硬変患者から同意を得て治療後の肝組織を採取し、同一患者における治療前後の遺伝子発現を比較した。

B. 研究方法

未治療の原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 6 例の新規症例を対象に用い、治療開始後平均 17.2 ヶ月目に再度肝生検を施行し治療前後で肝に発現する遺伝子の発現量の変化を検討した。方法は昨年度と同様に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。これらの RNA を 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。すべての患者から検体の一部をこれらの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以下の二通りの方法で解析を行った。一つには未治療群と治療群とでの群間比較を行った。また他の方法として、同一個人における治療前に対する治療後の遺伝子シグナル強度を 6 症例個々について検討した。すなわち、個人の治療前の遺伝子シグナル強度でその個人の治療後の遺伝子シグナル強度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、治療前に比較して発現増強または発現低下した遺伝子として抽出した。

結果として、未治療群と治療群とでの群間比較では、有意差 ($p < 0.05$) を持って治療後に 1.5 倍以上の発現増強を示した遺伝子 8 個を (表 1)、また、有意差 ($p < 0.05$) をもって治療後に 1.5 倍以上の発現低下を示した遺伝子 16 個を抽出した (表 2)。

さらに、同一症例での治療前後の比較で、治療後に発現が増強した遺伝子として、cytochrome P450II E1、aldolase B、haptoglobin alpha 1S が、発現が低下した遺伝子としては、alpha-fetoprotein、cytochrome c oxidase 1 が抽出された (表 3)。11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase については、治療前後の発現の変化に一定の傾向は認められなかった。

表 1. 治療前後で発現上昇を示した遺伝子

Gene Name	治療前Ratio		治療後Ratio		Welch's t-test (P値)	
	Mean	S.E.	Mean	S.E.		
macrophage receptor with collagenous structure	8.82	0.60	17.32	2.67	0.023	*
gamma-G globin	5.27	1.17	9.03	0.41	0.022	*
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthetase	37.68	7.41	61.05	5.84	0.034	*
cytochrome P450 IIE1(ethanol-inducible)	30.31	8.65	54.20	4.22	0.041	*
cytochrome P450 IVA	8.97	1.65	15.41	2.18	0.042	*
epoxidehydrolase	4.16	0.90	6.89	0.79	0.047	*
Apolipoprotein C-III	21.17	2.80	31.66	1.12	0.011	*
extracellular matrix protein 1	1.97	0.23	2.74	0.18	0.026	*

表 2. 治療前後で発現低下を示した遺伝子

Gene Name	治療前Ratio		治療後Ratio		Welch's t-test(P値)	
	Mean	S.E.	Mean	S.E.		
FK506-binding protein 2 (13 kD)	1.22	0.07	0.86	0.04	0.002	**
Human transcription factor E2F-5 mRNA, complete cds.	0.46	0.03	0.30	0.03	0.002	**
Human metallothionein-III gene, complete cds.	0.84	0.02	0.56	0.05	0.002	**
Human nuclear factor I-X mRNA, complete cds.	0.83	0.05	0.58	0.04	0.003	**
CD20 antigen (B1, Bp35)	0.68	0.05	0.45	0.03	0.004	**
aldehyde oxidase 1	9.62	0.69	6.52	0.32	0.005	**
interferon-beta	0.93	0.04	0.68	0.05	0.005	**
Homo sapiens FLICE-like inhibitory protein short form	0.44	0.03	0.32	0.02	0.006	**
cytokine-inducible SH2 protein 3 (CIS3)	0.84	0.06	0.58	0.03	0.008	**
Human TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)	0.70	0.04	0.51	0.04	0.010	**
alpha-fetoprotein (AFP)	0.04	0.01	0.02	0.00	0.029	*
Homo sapiens type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator mRNA, complete cds.	0.49	0.08	0.28	0.02	0.042	*
Homo sapiens interferon stimulated T-cell alpha chemoattractant precursor, mRNA, complete cds.	0.72	0.09	0.45	0.05	0.032	*
Human thymocyte antigen CD1a mRNA, complete cds.	0.47	0.06	0.29	0.03	0.020	*
stathmin; (leukemia-associated phosphoprotein p18)	0.12	0.01	0.07	0.00	0.017	*
IL-5	0.66	0.09	0.41	0.03	0.039	*

表 3. 同一症例での治療前に対する治療後の遺伝子発現強度 (治療後 / 治療前)

>2.0		<0.5	
cytochrome P450 II E1	5/6	alpha-fetoprotein (AFP)	4/6
aldolase B	4/6	cytochrome oxidase I	4/6
haptoglobin alpha 1S	4/6		

*) 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenaseについては、6例中4例でdown-regulation傾向を示したが、発現強度が<0.5となったのは1例のみ。残りの2例ではup-regulation傾向を示したが、>2.0とはならず。

D. 考察

治療後に薬物代謝酵素のcytochrome P450II E1や解糖系酵素のaldolase B、また肝で合成されるhaptoglobin alpha 1Sなどの発現が増強したことについては、治療による肝機能の改善に伴いこれらの蛋白の発現が回復したものと推測された。逆に、治療後に肝再生の指標でもあるalpha-fetoproteinが低下したことについては、炎症の沈静化を反映していると考えられ、ミトコンドリアの電子伝達系酵素の一つであるcytochrome c oxidase 1の低下は、肝機能障害時に増大していたエネルギーの需要が肝機能の改善により低下したことに関連している可能性が推測された。

E. 結論

PBC患者の肝組織中での、治療前後での遺伝子発現強度の比較解析を行った。同一個人における治療前後の比較検討で、治療後に発現の増強を認めた遺伝子3個と、発現の低下を認めた遺伝子2個を抽出した。しかし、それらにPBCの病態と関連すると考えられるものは認められず、肝における炎症の沈静化と関連して変動した可能性が考えられた。昨年度の我々の報告で病態との関連が示唆された11-beta-hydroxysteroid dehydrogenaseについては、今回の同一個人の治療前後の比較検討では治療前後のその発現に一定の傾向は認められず、意義は不明である。

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

原発性胆汁性肝硬変(PBC)における胆管消失の分子機構：

細胞老化制御因子 Bmi-1 を中心に

研究協力者 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：PBC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。私どもはPBCの肝内小型胆管障害部における細胞老化形質の発現亢進を報告し、細胞老化が胆管消失の要因となる可能性を考えている。今回は老化関連p16^{INK4a}発現の抑制因子：polycomb蛋白Bmi-1の発現とPBC胆管の細胞老化との関連を検討した。その結果、PBCの障害胆管では、1) Bmi-1発現の低下、2) Bmi-1発現低下と相関するp16^{INK4a}発現亢進を認めた。また、siRNAによるBmi-1発現抑制の結果、培養マウス胆管細胞のp16^{INK4a}と老化形質の発現が亢進した。PBCの胆管細胞老化にはBmi-1発現低下が関与す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、再生障害の一因として細胞老化 (cellular senescence) に着目して研究をすすめている。昨年度の報告ではPBCの肝内小型胆管には胆管障害部を中心に高率に細胞老化形質：

senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal)、老化関連p16^{INK4a}とp21^{WAF1/Cip1}の発現亢進を認めることを示した。従って、PBCでは胆管細胞の老化が再生不良をきたして胆管消失の要因となる可能性が考えられた。

胆管細胞の老化誘導因子についてはほとんど解明されていない。最近、老化関連p16^{INK4a}の抑制因子としてpolycomb蛋白bmi-1の役割が注目されている。そこで今回、PBCの胆管細胞老化におけるbmi-1の関与について検討をおこなった。

B. 研究方法

1. 肝内小型胆管におけるbmi-1の発現
1/2期PBC12例、3/4期PBC 6例、慢性ウイルス性肝炎(CVH)10例、閉塞性黄疸 (EBO) 肝5例、対照正常肝16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Bmi-1の発現を免疫組織化学的に検討した。
2. Bmi-1の発現とp16,p21発現との関連性
代表的な1/2期PBC6例の連続切片を用いてbmi-1と老化関連p16^{INK4a}とp21^{WAF1/Cip1}の発現局在の関連性を検討した。
3. Bmi-1発現抑制による培養マウス胆管細胞の老化
培養マウス胆管細胞(BALB/Cマウス肝内末梢胆管由来)を2次元培養し、bmi-1遺伝子に対するshort

interference RNA (siRNA) をトランスフェクトしてbmi-1発現抑制を試みた。トランスフェクト後、計時的にサンプル採取を行い、Bmi-1、p16^{INK4a}、p21^{WAF1/Cip1}のmRNAと蛋白発現をそれぞれreal time PCR法とイムノブロット法で検討した。

また、Lab-Tek chamber内で培養、蛍光標識siRNAをトランスフェクトした胆管細胞を用いて、bmi-1発現抑制とp16^{INK4a}、p21^{WAF1/Cip1}発現の関連を蛍光免疫法で検討した。さらに、Bmi-1発現抑制による老化マーカーSA- β -gal発現の変動を検討した。

C. 研究結果

1. 肝内小型胆管におけるbmi-1の発現
正常肝と対照疾患肝では肝内小型胆管の細胞核に広範にbmi-1の発現を認め、明らかなbmi-1発現の低下はなかった。一方、PBCの肝内小型胆管では、慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) 部において胆管細胞核でのbmi-1発現の低下を認めた。bmi-1発現の低下は1/2期PBC12例5例 (42%)に見られ、対照肝に比較して有意に高率であった ($p < 0.05$ vs CVH, 正常肝) (図1)。3/4期PBCでは明らかなbmi-1発現低下は見られなかった。
2. Bmi-1発現とp16,p21発現との関連
1/2期PBCにおいてbmi-1発現低下を示す肝内小型胆管には高率にp16^{INK4a}の発現亢進を示した。従って、bmi-1発現低下を示す胆管細胞は老化状態にあると考えられた。
3. Bmi-1発現抑制による培養胆管細胞の老化
Bmi-1 siRNAのトランスフェクト2日後にBmi-1 mRNA発現は約70%に低下した。蛍光免疫法においてもBmi-1 siRNAトランスフェクト細胞におけるBmi-1蛋白発現消失がみられ、siRNAによる有効なBmi-1発現抑制を確認した。Bmi-1発現抑制によりp16 mRNA発現は3日後で約4倍に亢進した。一方、p21^{WAF1/Cip1} mRNA発現量には有意な増減はなかった。蛍光免疫法ではBmi-1 siRNAトランスフェクト細胞

におけるp16^{NK4a}蛋白発現がより強い傾向を認めた。Bmi-1 siRNAトランスフェクト細胞でのp21^{WAF1/Cip}蛋白発現には一定の傾向を認めなかった。また、Bmi-1 siRNAによる発現抑制により、老化マーカーSA-β-gal 発現は対照と比較して有意に亢進した(図2)。

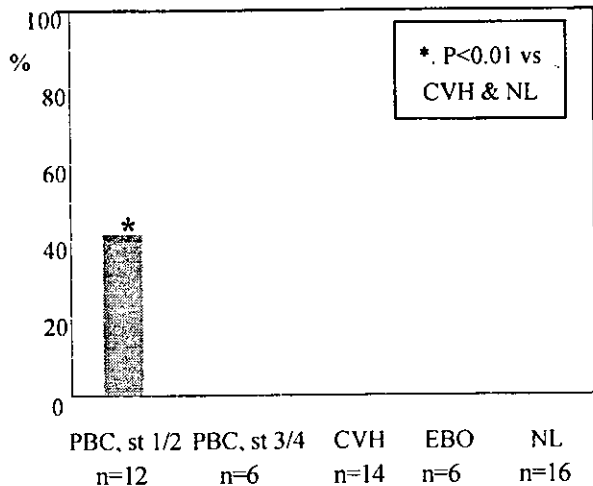


図1. PBCの肝内小型胆管(SBD)におけるbmi-1発現の低下

Sene Index

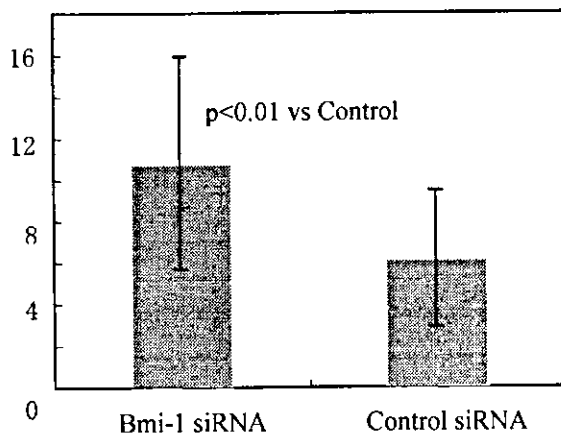


図2. Bmi-1発現抑制によるSA-β-gal発現亢進

D. 考察

PBCの肝内小型胆管には胆管障害部を中心に高率に細胞老化形質を認めることから、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ほとんど解明されていない。老化関連p16^{NK4a}の発現制御には転写制御因子であるEts1/2やId1が関与するとされる。また、最近、p16^{NK4a}発現の抑制因子としてpolycomb蛋白bmi-1の役割が注目されており、bmi-1欠損細胞におけるp16^{NK4a}の発現亢進と細胞老化促進が報告されている。そこで、今回はbmi-1の関与を中心に検討を行った。

今回の検討の結果、PBCのCNSDC部の障害胆管に

おいて、p16抑制因子Bmi-1の発現低下を認めた。連続切片を用いた検討では、Bmi-1の発現低下を示す胆管には老化関連p16^{NK4a}の発現亢進が認められた。また、培養胆管細胞を用いた検討では、siRNAによるBmi-1発現抑制により、p16^{NK4a}発現と老化マーカーSA-β-gal発現の亢進を認めた。これらの結果から、PBCの障害胆管ではBmi-1の発現低下がp16^{NK4a}発現の亢進を誘導することにより細胞老化をひきおこすと考えられた。

PBCにおけるBmi-1発現低下の発生機序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。私どもの以前の検討でも、過酸化水素投与による酸化ストレスは培養胆管細胞の老化関連形質p16^{NK4a}、p21^{WAF1/Cip}発現を亢進させる。今後、酸化ストレスとBmi-1発現低下の関連をさらに検討するとともに、Ets1/2やId1などのBmi-1と連携してp16^{NK4a}発現を制御する因子についても解析を進めたい。

E. 結論

PBCの肝内小型胆管ではCNSDC部を中心にpolycomb蛋白bmi-1の発現低下を認め、同部位で老化関連p16^{NK4a}の発現亢進を伴っていた。従って、PBCの肝内小型胆管における細胞老化には老化関連p16^{NK4a}の抑制因子であるbmi-1の発現低下が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki M, et al. Frequent cellular senescence in intrahepatic small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role for progressive bile duct loss. *Journal of Pathology* 2005 (in press)

2. 学会発表

- 1) 佐々木素子ら、原発性胆汁性肝硬変(PBC)における胆管消失の分子機構：細胞老化形質の発現を中心に、第8回日本肝臓学会大会(2004年10月,福岡)

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変における薬物代謝に関わる遺伝子の SNP と臨床経過

研究協力者 栗山 茂樹 香川大学医学部第三内科 教授

研究要旨： xenobiotics が PBC の発症およびその病態に影響を及ぼすという事が報告されている。そこで本研究では、xenobiotics の代謝に関わるシトクローム P450 酵素群の遺伝子多型 (SNP) が、PBC の発症およびその臨床経過に影響を与えるかどうか検討した。cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) *4 および CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプについて解析したが、PBC の発症に関連が認められるものはなかった。しかしながら、その臨床経過に関連性が認められ、特に CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプは PBC の重症度と関連性が認められた。本研究により、CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプは本疾患の予後を予測する新しい因子になりうる可能性が示唆された。

共同研究者

木村泰彦 香川大学医学部
救命救急センター助手

認められ(図 1)、また c2 アリルを持つ症例はより重篤な臨床像を呈した(図 3)。また、CYP*4 を有する症例では有さない症例に比して有意に腹水の出現率が高かった(図 2)。

A. 研究目的

PBC で出現する抗ミトコンドリア抗体 (AMA) の主要な対応抗原である PDC-E2 はその抗原エпитープにリポイル酸を含み、リポイル酸はハロセンが修飾するリジン残基に結合している事が注目されている。(T 細胞の抗原エピトープもリポイル酸を含んでいる) PBC 患者血清を用いた研究では、xenobiotics により修飾された PDC-E2 ペプチド(リポイル酸結合部) に対しての方が、非修飾のペプチドよりもより反応性が高まる事が報告されている。そこで本研究では、薬物代謝に関わるシトクローム P450 酵素群の遺伝子多型 (SNP) が、ハロセンなどの化学物質の代謝活性に変化をもたらし、PDC-E2 ペプチドの修飾に影響を与えることで PBC の発症およびその臨床経過に関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

対象はイタリア人 PBC169 人(男性 16 人、女性 153 人)、疾患対照群として性別比をマッチさせたイタリアの健常人 225 人を用いた。遺伝子型については、ある SNP によって規定される CYP2D6 *4 および CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプについて、すでに報告されている論文に則り PCR-RFLP 法で解析した。

C. 研究結果

今回検討した薬物代謝に関わるシトクローム P450 酵素群の遺伝子多型 (SNP) において、PBC の発症に関連が認められるものはなかった(図 1)。しかしながら c1/c2 ジェノタイプは進行例で高率に

D. 考察

CYP2E1 の c1/c1 ジェノタイプは c1/c2 および c2/c2 に比較してより高い酵素活性を有する事が報告されている。よって、c2 アリルを有する PBC 症例では c1/c1 の症例に比して CYP2E1 の代謝能力が低下しており、ハロセンおよびハロセン類似の化学物質の活性が高まっていることが推測される。その結果、それら化学物質により PDC-E2 のリポイル酸ドメインが修飾されやすくなり、PBC 患者の同部位に対する免疫反応性が高まりより重篤な臨床所見を呈するのではないかと考えられた。

E. 結論

今回検討した CYP2D6 *4 および CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプにおいて、PBC の発症に関連が認められるものはなかったが、その臨床経過に関連性が認められた。特に CYP2E1 の c1/c2 ジェノタイプは PBC の重症度と関連性がみられたことより、今後本疾患の予後を予測する新しい因子になりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

図 1. PBC 患者および健常人におけるジェノタイプおよびアリル頻度

	Controls	PBC		
		Total	Early disease	Advanced disease
CYP2D6				
N/N (<i>n</i>)	164/225 (73%)	118/169 (70%)	57/77 (74%)	61/92 (66%)
*4/N (<i>n</i>)	57/225 (25%)	48/169 (28%)	19/77 (25%)	29/92 (32%)
*4/*4 (<i>n</i>)	4/225 (2%)	3/169 (2%)	1/77 (1%)	2/92 (2%)
*4 allele frequency	0.144	0.159	0.136	0.179
CYP2E1				
C1/C1 (<i>n</i>)	212/223 (95%)	159/169 (94%)	76/77 (99%)*	83/92 (90%)*
C1/C2 (<i>n</i>)	9/223 (4%)	10/169 (5%)	1/77 (1%)	9/92 (10%)
C2/C2 (<i>n</i>)	2/223 (1%)	0	0	0
C2 allele frequency	0.029	0.033	0.006	0.049

* $P=0.043$ after correction for age and disease duration; OR (95%CI) 11.39 (1.09–119.47) for c1/c2 genotype determining advanced disease

論文 1) より改変・引用

図 2. CYP2D6*4 アリルの存在と PBC 患者の臨床所見との関連性

	N/N (<i>n</i> =118)	*4/N + *4/*4 (<i>n</i> =51)	<i>P</i> value (corrected)
Female sex (<i>n</i>)	106 (90%)	47 (92%)	NS
Age at enrollment (years)	62±13	62±11	NS
Disease duration (months)	122±71	127±76	NS
AMA-positive (<i>n</i>)	99 (84%)	40 (78%)	NS
Total bilirubin (mg/dL) (n.v. <1.0)	1.4±2.7	2.2±4.3	0.194
Albumin (g/dL) (n.v. >3.5)	4.3±0.9	4.2±0.9	NS
Prothrombin time (INR) (n.v.<1.2)	1.04±0.18	1.03±0.14	NS
Ascites (<i>n</i>)	11 (9%)	11 (22%)	0.031 (0.031)*
Mayo score	5.6±1.4	5.9±1.5	NS

* OR (95%CI) 2.76 (1.1–6.92) for *4 allele determining the presence of ascites

Continuous variables are expressed as mean values ± standard deviation

Only *p*-values below the 0.2 level for the comparison between patient groups are reported before and after correction for age and disease duration; NS=non significant

論文 1) より引用

図3. CYP2E1 c2 アリルの存在とPBC患者の臨床所見との関連性

	c1/c1 (n=159)	c1/c2 (n=10)	P value (corrected)
Female sex (n)	143 (90%)	10 (100%)	NS
Age at enrollment (years)	62±12	64±13	NS
Disease duration (months)	122±69	155±112	NS
AMA-positive (n)	131 (82%)	8 (80%)	NS
Total bilirubin (mg/dL) (n.v. <1.0)	1.5±3.0	3.6±5.3	0.054
Albumin (g/dL) (n.v. >3.5)	4.3±0.9	3.6±0.9	0.011 (0.036)
Prothrombin time (INR) (n.v. <1.2)	1.03±0.16	1.13±0.20	0.109
Ascites (n)	19 (12%)	3 (30%)	0.125
Mayo score	5.6±1.4	6.9±1.9	0.011 (0.015)

Continuous variables are expressed as mean values ± standard deviation

Only p-values below the 0.2 level for the comparison between patient groups are reported before and after correction for age and disease duration; NS=non significant

論文1) より引用

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura Y, et al: Genetic polymorphisms influencing xenobiotic metabolism and transport in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:55-63

2. 学会発表

- 1) 木村泰彦、栗山茂樹、M. Eric Gershwin：原発性胆汁性肝硬変における CYP2E1 c1/c2 genotype と臨床経過の関連性；第8回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション3 自己免疫性肝疾患の長期経過と治療による修飾
- 2) Kimura Y, et al: Genetic variants influencing xenobiotic metabolism in patients with primary biliary cirrhosis. 55th AASLD Oct.29-Nov.2, 2004, Boston

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

原発性胆汁性肝硬変に検出される抗 p95c 抗体の対応抗原の検索： p97/VCP との同一性

研究協力者 宮川 浩 帝京大学溝口病院第4内科 助教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）に検出される microsome 分画に属する自己抗体である抗 p95c 抗体の対応抗原が p97/VCP と同一であるかとの仮説をたて、1) p95c 抗体陽性血清が recombinant p97/VCP を免疫沈降するか、2) 両抗体が nuclear envelope assembly を抑制するか、を検討した。方法として、full-length p97/VCP cDNA を template とし、T3RNA polymerase, [³⁵S]-methionine を加えたウサギ網状赤血球 lysate の TnT キットを使用し、作成された recombinant protein と患者血清との IP を行った。また、*Xenopus* sp. eggs に血清、sperm を加え、incubate し、核形成率を検鏡し Nuclear assembly assays を行った。その結果、p95c と p97/VCP は同一の molecular mass で、細胞内の局在も一致していた。また、p95c 抗体陽性血清の大部分が recombinant p97/VCP と反応し、p95c 抗体は nuclear assembly を抑制した。以上のことから、p95 と p97/VCP は同一であると結論された。

共同研究者

宮地清光 保健科学研究所 顧問
堀込恒好 新潟大学理学部 教授
柴田 実 NTT 東日本関東病院
消化器内科医長
Fritzler M.J. 教授,
University of Calgary, Canada

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態は多様性があり、進行も症例によって差異がある。本疾患の血清中には抗ミトコンドリア抗体（AMA）のほか、各種の自己抗体が検出されるが、これらの臨床像との関連性を明らかにすることは重要である。

我々は1996年、PBCと自己免疫性肝炎の一部で、免疫沈降法によって95-kDaに位置する新たな自己抗体の存在を報告し、抗p95c抗体と命名した（Miyachi K, et al. Scand J Immunol 1998; 47: 63-8）。本抗体は立体構造を有しており、通常のImmunoblot法では検出されないことから、対応抗原の解析が困難であった。

最近、p97/Valosine containing protein (VCP) が多くの細胞機能の活性化や制御作用を有し、mitosisの終期において、endoplasmic reticulumやGolgi装置の、nuclear envelope assemblyや産生に関与することが判明している。p97/VCP抗体は、*in vitro*でnuclear reassemblyをinhibitすることが報告されている。

そこで今回、p95cとp97/VCPが同一であるとの仮説を立て、1) p95c抗体陽性血清が recombinant p97/VCP を免疫沈降するか、2) 両抗体が nuclear envelope assembly を抑制するか、を検討した。さらに、本抗体のエピトープ検索にさきがけ、p97/VCPのC末端側のaa687-806の

recombinant protein を作成し、p97/VCP 抗体陽性血清との反応性を検索した。

B. 研究方法

1. *In vitro* transcription/translation および immunoprecipitation (IP)
full-length p97/VCP cDNA (Dr Graham Warren, Yale University, New Haven, CT, USA から供与) を template とし、T3RNA polymerase, [³⁵S]-methionine を加えたウサギ網状赤血球 lysate の TnT (転写、翻訳) キットを使用し、作成された recombinant protein と患者血清との IP を行った。
2. Nuclear assembly assays
Xenopus sp. eggs 9ml に血清 10ml を加え、sperm 2000 個を加え、incubate し、核形成率を検鏡した (Smythe と Newport の方法)。nuclear assembly の inhibition (%) は下記の式にあてはめ算出した。
corrected inhibition rate of nuclear assembly (%) = inhibition rate of nuclear assembly obtained from adding patient's serum (%) - inhibition rate of nuclear assembly obtained from adding normal healthy serum (%) / nuclear assembly obtained from adding normal healthy serum (%)
3. C末端部位 (aa687-806) との反応性
p97/VCP は立体構造を有し、N, D1, D2, C の4つの domain で構成されている 808aa の蛋白であり、エピトープ部位は未だ判明していない。そこで、このうちのC末端側のaa687-806の recombinant protein を作成し、p97/VCP 抗体陽性血清との反応性を Immunoblot 法で検索した。

C. 研究成果

1. 対象とした抗 p95c 抗体陽性の 13 例中 12 例で、

97-kDa のバンドが immunoprecipitate された。また 全例で Nuclear assembly が inhibition され、その inhibition %は 99-7%で、抗 p95c 抗体の力価と相関した(表 1)。

2. 共焦点顕微鏡による免疫染色像-nuclear assembly assay-prototype 血清では、核膜形成段階前の核膜不連続性、不均一構造を認め、核膜形成阻害像も認めた。
3. 検索した p97/VCP 抗体陽性の 9 血清では全例、C 末端側の aa687-806 の recombinant protein と反応した。

表 1. 抗 p95c 抗体陽性 13 例の免疫沈降法(IP)と nuclear assembly の inhibition (%)

No	Diagnosis	Anti-p95c (DID)	Anti-p97/VCP (IP)	Inh.%
1	PBC	128	+	82
2	PBC	32	+	13
3	PBC	1021	+	88
4	PBC	256	+	59
5	PBC	64	+	64
6	PBC	16	+	13
7	PBC	64	+/-	99
8	PBC	4	+	15
9	PBC	32	+	23
10	PBC	512	+	83
11	AIH	1	+	67
12	AIH	8	+	29
13	AIH	16	+	7

D. 考察

抗 p95c 抗体は当初、二重免疫拡散法によって既知の自己抗体と相違する沈降線を形成することから見出された。しかしながら、ラット肝 microsome 分画を抗原とした通常の Immunoblot 法では検出されないことから、対応抗原が立体構造を有すると想定されていたが、本体は不明であった。今回、抗 p95c と p97/VCP は、1) 同一の molecular mass で、2) 細胞内の局在も一致し、3) p95c 抗体陽性血清の大部分が recombinant p97/VCP と反応し、4) p95c 抗体は nuclear assembly を抑制する、ことから、両者は同一であることが明らかにされた。

p97/VCP の多彩な機能が明らかにされ、本抗体の臨床的意義が注目される。現在まで、PBC の比較的早期例にみられ、尿細管性アシドーシスなどの合併症との関連性が示唆されているが、今後、症例数を集積してこの点も明らかにする必要がある。

今回、p97/VCP の C 末端側の aa687-806 部位に少なくとも 1 つのエピトープが存在することを明らかにした。この成績を基に、本抗体のスクリーニング法の確立も必要と思われる。

E. 結論

p95c と p97/VCP は同一の molecular mass で、細胞内の局在も一致していた。また、p95c 抗体陽性血清の大部分が recombinant p97/VCP と反応し、p95c 抗体は nuclear assembly を抑制した。以上のことから、p95 と p97/VCP は同一であると結論された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyachi K, Hirano Y, Horigome T, Mimori T, Miyakawa H, Onozuka Y et al. Autoantibodies from primary biliary cirrhosis patients with anti-p95c antibodies bind to recombinant p97/VCP and inhibit in vitro nuclear envelope assembly. Clin Exp Immunol 136:568-73, 2004

2. 学会発表

- 1) 宮川 浩、宮地清光、他：原発性胆汁性肝硬変に検出される抗 p95c 抗体の対応抗原は AAA ATPase である p97/VCP と同一であった第 9 回日本肝臓学会大会(DDW) 福岡 10.2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

胆汁うっ滞におけるコレステロールの動態

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：胆汁うっ滞時に血清コレステロール値が上昇するが、その機序については明らかではない。本研究では、ラットの胆管結紮モデル肝と PBC 患者の生検肝を用いて肝内 ABCA1 トランスポーターの発現について検討した。ラットモデル、PBC 患者ともに肝内 ABCA1 トランスポーターは増強していた。胆汁うっ滞時の高コレステロール血症の機序として、肝内 ABCA1 トランスポーターを介した肝細胞から類洞血中へのコレステロール排出の増加によるものと考えられた。

共同研究者

竹山康章 福岡大学医学部第3内科

A. 研究目的

胆汁うっ滞は胆汁の流出または生成の障害により、通常胆汁中に排出される物質の血中濃度の上昇をきたす。胆汁うっ滞疾患である原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) や原発性硬化性胆管炎 (PSC) などの患者血清コレステロール値が増加する事が知られている。その機序に関しては胆汁中コレステロールの大循環への逆流と考えられており、我々は PBC, PSC 患者の胆管細胞あるいは肝細胞間の tight junction の破綻を形態学的に確認し報告した (Sakisaka et. al hepatology 2001)。しかし胆汁うっ滞時の高コレステロール血症出現の機序は本変化のみではない可能性がある。そこでさらに胆汁うっ滞時における高コレステロール血症のメカニズムについて、コレステロールのトランスポーターである ABCA1 の肝細胞における動態について胆汁うっ滞ラットと PBC 患者の肝臓を用いて検討した。

B. 研究方法

対象

1. 胆汁うっ滞ラットモデル：胆管結紮を行った Wistar ラットを7日間固形飼料で飼育し、屠殺の16時間前に LPS (2 mg/kg) を腹腔内投与した胆汁うっ滞ラット (BDL/LPS 群：n=3-5) と対照としての Sham 群；n=4。
2. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者で血清コレステロール値が高値 (220mg/dl) 4例、正常肝4例。経皮的肝生検よりサンプル収集。

方法

1. ラットモデル：肝内 CYP7A mRNA の発現を real time RT-PCR 法にて評価した。CYP7A1 の LXR 結合部位のオリゴを合成して、肝内の核蛋白との結合能をゲルシフト法で測定した。ABCA1 トランスポーターをウエスタンブロッ

ト法、real time RT-PCR 法により、蛋白レベル、mRNA レベルでの発現を評価した。更に共焦点レーザー顕微鏡で肝組織内の ABCA1 の局在をも検討した。

2. PBC 患者：real time RT-PCR 法により、肝内 ABCA1 と LXR の mRNA レベルの発現を評価した。

C. 研究結果

1. ラットモデル：胆汁うっ滞ラットの肝内 CYP7A1 mRNA レベルは有意に減少していた。CYP7A1 のプロモーター領域である LXR element と核蛋白との結合能も有意に減少していた。胆汁うっ滞ラットの肝内 ABCA1 は蛋白、mRNA レベルともに有意に増加し、レーザー顕微鏡での観察にて類洞血管側に局在していた。胆汁うっ滞ラットの血清コレステロール値は有意に増加していた。
2. PBC 患者：PBC 患者肝内の ABCA1 mRNA レベルは有意に増加していた。ABCA1 の調節因子の肝内 LXR mRNA レベルも PBC 患者は有意に増強していた。

D. 考察

胆汁うっ滞時の高コレステロール血症の機序として、以前我々の報告した胆管細胞あるいは肝細胞間の tight junction の破綻に伴う大循環への逆流に加えて、今回の検討により、肝内類洞血管側 ABCA1 トランスポーターの発現増強が関わっている可能性が考えられた。肝内の類洞血管側 ABCA1 の調節因子である LXR の mRNA レベルでの増強をも観察し得た。しかし PBC 患者からの肝サンプルが針生検から得たため少量で蛋白レベルでの解析が行えなかった。更に今回は PBC 患者のみの検討となったが、今後 PSC や閉塞性黄疸患者での検討を試みる必要がある。

E. 結論

胆汁うっ滞時の高コレステロール血症の機序とし

て、肝内 ABCA1 トランスポーターを介した肝細胞から類洞血中へのコレステロール排出の増加によるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 向坂彰太郎 竹山康章 : Biliary Cell Lineage. 肝臓. 27 : 661-665
- 2) 竹山康章 向坂彰太郎 : 原発性胆汁性肝硬変. 肝胆膵. 50 : (印刷中)

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

食道胃静脈瘤が先行出現する原発性胆汁性肝硬変(v-PBC)の
臨床像の特異性について

研究協力者 恩地 森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

研究要旨：

- 1) PBCは早期から食道静脈瘤が出現することが知られているが、その静脈瘤に対する治療効果は不明である。そこでPBCと非PBC食道静脈瘤に対するEVL単独療法での再発率について検討し、治療抵抗性について検討を行った。
PBCに合併する静脈瘤は非PBCと比較して早期から再発した。多変量解析の結果でもPBCであることが静脈瘤再発の有意な因子であった。
- 2) 症候性PBCのなかでも瘙痒感や黄疸が出現するPBCと門脈圧亢進症が先行して出現するPBCがある。とくに食道胃静脈瘤を合併したPBC(v-PBC)の臨床的特徴はまだ明らかにされていない。そこで当科で診断し経過のおえたPBCのv-PBC(n=11)の長期予後について、瘙痒感が先行したs1-PBC(n=18)との比較検討を行った。v-PBCはs1-PBCと比較して、予後が不良で、特に発癌例が多かった。PBCに合併する静脈瘤は他の肝疾患と比較して、再発しやすかった。また静脈瘤が先行出現するPBC(v-PBC)は、予後が不良で特に発癌に注意して加療を行う必要があることが明らかになった。

1) PBCの食道静脈瘤の治療抵抗性に関する検討

あった。

A. 研究目的

食道胃静脈瘤は肝疾患では高頻度に見られる合併症の一つであるが、静脈瘤を合併したPBCは予後が不良であるとの報告が既に報告されているが、しかしPBCに合併した静脈瘤に対する治療効果による報告はない。そこでPBCに合併した食道静脈瘤の易再発性をあきらかにすることを目的とした。

B. 研究方法

術者によって比較的技術に差が出にくいEVLによる食道静脈瘤治療効果について検討を行い、特に治療後の再発までの日数を治療抵抗性の指標とした。1993年から2003年までに当科で上部消化管内視鏡で診断しEVL単独療法を行った症例。PBCに合併した静脈瘤(n=13)と対照群はPBC以外の肝疾患(HCV n=83 HBV n=25 アルコール n=17)による静脈瘤(n=125)。食道胃静脈瘤出現時の血液生化学的検査について検討した。またEVL後の再発の因子について多変量解析を行った。

C. 結果 (Figure. 1, 2)

PBC群と非PBC群ではアルブミン、コリンエステラーゼ、K-ICGには差はなかったが、非PBC群でプロトロンビン時間(PT)、血小板が有意に低かった(p<0.001)。EVLによる単独療法術後の静脈瘤の再発はPBCに合併した静脈瘤は対照群と比較して、早期に再発していた(p<0.05)。また多変量解析をおこなったが、PBCであることとPTが有意な因子で

Figure. 1

EVLによる食道静脈瘤の非再発率

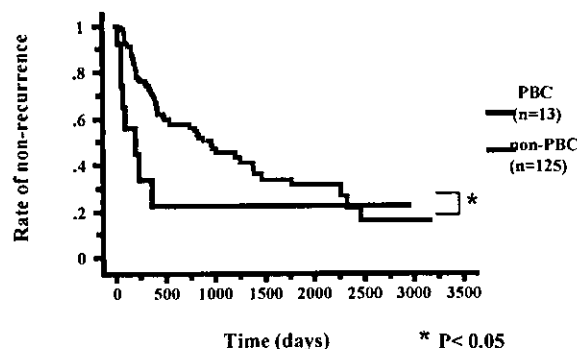


Figure. 2

静脈瘤早期再発の予測因子の解析

Variable		χ^2	P
Etiology	(PBC/non-PBC)	6.425	0.011
PT	(%)	5.041	0.025
T.Bil	(mg/dl)	2.136	0.144
Pit	($10^3 \times \mu l$)	1.253	0.263
Age	(years)	1.082	0.298
Sex	(male/female)	0.601	0.438
Alb	(g/dl)	0.235	0.628

D. E. 考察および結論

PBCに合併する静脈瘤は他の肝疾患に合併した静脈瘤と比較してEVL後早期に再発していた。PBCに食道静脈瘤が合併すると予後が不良であることがすでに報告されているが、PBCの門脈圧亢進症は高度であることや他の疾患とは異なる機序による静脈瘤の形成がある可能性が示唆された。静脈瘤治療はEVL単独療法だけではなく、内視鏡的硬化療法、APCによる地固め療法などがあるが、その再発性については注意が必要であることが明らかとなった。

2) 食道胃静脈瘤が先行出現する原発性胆汁性肝硬変(v-PBC)の発癌との関連性について

A. 研究目的

食道胃静脈瘤のみが出現したPBCは無症候性PBCとされていたが、新しい臨床分類によって静脈瘤のみでも症候性PBCとして分類されるようになった。しかし従来の瘙痒感、黄疸が先行するPBCとの臨床像の差は明らかとされていない。そこで瘙痒感が先行したPBCを対照群として静脈瘤が出現したPBCの長期予後および臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

瘙痒感や黄疸がないにもかかわらず診断時すでに静脈瘤を合併していたPBCおよび診断後加療中に静脈瘤を合併していたPBCを合わせたv-PBC (n=10)の長期予後および臨床的特徴について検討を行った。対象としては診断時にすでに瘙痒感が存在したs1-PBCもしくは診断時は瘙痒感、黄疸、静脈瘤がなかったが、経過中に瘙痒感が出現したs1-PBC (n=18)とした。瘙痒感の出現時および食道胃静脈瘤出現時の血液生化学的検査について検討した。また長期予後はretrospectiveに検討を行った

C. 結果

v-PBCは予後が不良で、5/11例(45%)でHCCの合併が出現していた。一方でs1-PBCではHCCの合併はなかった。

D. 考察

v-PBC群でHCCを中心に発癌例が多く、病気の進展様式が異なる可能性が示唆された。v-PBCでは肝不全予防の対策とともに肝細胞癌合併も含めた発癌を念頭においた加療およびスクリーニング検査が重要であると思われる。今後、v-PBCでの特発性門脈圧亢進症の合併の有無、HBVの既往感染、門脈圧亢進症の発生機序、遺伝的背景などについて検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeshita E, Matsui H, Shibata N, Furukawa S, Yokota T, Murakami H, Ikeda Y, Hiasa Y, Matsuura B, Michitaka K, Onji M.
- 2) Earlier recurrence of esophageal varices, following therapy, in patients with primary biliary cirrhosis (PBC) compared with non-PBC patients. J Gastroenterol. 2004 ;39(11):1085-9.
- 3) Chizuko Okada, Sk. Md. Fazle Akbar, Norio Horiike, Morikazu Onji
Early development of Primary biliary cirrhosis in female C57BL/6 mice due to poly I:C administration Liver International(in press)
- 4) Takeshita E, Kumagi T, Matsui H, Abe M, Furukawa S, Ikeda Y, Matsuura B, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Esophagogastric varices as a prognostic factor for the determination of clinical stage in patients with primary biliary cirrhosis. J Gastroenterol. 2003;38(11):1060-5.
- 5) Hamada M, Tokumoto Y, Furukawa S, Minami H, Hiasa Y, Michitaka K, Horiike N, Onji M.
Hepatopulmonary syndrome in a patient with primary biliary cirrhosis. Intern Med. 2004;43(6):458-60.

2. 学会報告

- 1) 食道胃静脈瘤を合併した原発性胆汁性肝硬変(PBC)の長期的予後の臨床的特徴古川慎哉、竹下英次、村田洋介、長谷部昌、松井秀隆、道堯浩二郎、堀池典生、恩地森一
第8回日本肝臓学会大会 福岡 平成16年10月21日 22日
- 2) 70歳以上で発見された自己免疫性肝疾患の臨床病理学的検討
三宅映己、宮岡弘明、岡田武志、古川慎哉、道堯浩二郎、堀池典生、恩地森一
第8回日本肝臓学会大会 福岡 平成16年10月21日 22日
- 3) 原発性胆汁性肝硬変におけるnitric oxide産生とその役割
中西征司、AkbarS.M.F., 谷本憲治、古川慎哉、堀池典生、恩地森一
第8回日本肝臓学会総会 福岡 平成16年10月21日 22日

H. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変における胆管細胞障害とその制御

研究協力者 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、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態の中心と考えられる胆管細胞障害機構を明らかにし、その制御法を開発することである。PBCの胆管細胞障害機構としては、細胞障害に関する標的抗原の全貌は未だ明らかではないが、胆管細胞に発現する自己抗原に対する自己免疫的機序が想定されている。一方、胆管は解剖学的に腸管内微生物に暴露されやすい部位にあることから、胆管細胞には、炎症、自然免疫、獲得免疫などに関連して多様な免疫制御機構が発達してきた可能性がある。そこで本年度は、PDC-E2 163-176 特異的T細胞クローンとヒト培養胆管上皮細胞（BEC）を用いて、①BECの抗原提示細胞（antigen presenting cell: APC）としての機能、②BECのAccessory Cell（AC）としての機能について検討した。BECでは、抑制性 second signal を伝える補助分子（PD-L1、PD-L2）の発現や prostaglandin-E2（PG-E2）などの抗炎症性液性因子の分泌を介して、T細胞の活性化を抑制する多彩な免疫制御機構を有することが示された。

共同研究者

中村 稔、小森敦正、横山照史、瀧井 康

国立病院機構 長崎医療センター

下田慎治、上平幸史

九州大学大学院病態修復内科学

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（AMA）の出現を特徴とし、胆管上皮細胞（biliary epithelial cells: BEC）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ピルビン酸脱水素酵素E2成分（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、その役割について解析をすすめてきた。

昨年度の研究で、PDC-E2に特異的なT細胞には、T細胞受容体（TCR）からのfirst signalのみで増殖できる補助刺激非依存性のものと、抗原提示細胞（antigen presenting cell: APC）上のB7とT細胞上のCD28を介するsecond signalを必要とする補助刺激依存性のものが存在し、PBCの肝病変局所や末梢血中では前者の補助刺激非依存性T細胞が増加していることを報告した。

そこで、本年度は補助刺激非依存性のPDC-E2 163-176特異的T細胞クローンを用いて、ヒト培養胆管上皮細胞（BEC）の抗原提示細胞（antigen presenting cell: APC）としての機能、T細胞活性化におよぼすAccessory Cell（AC）としての機能について検討した。

B. 研究方法

BECは、非PBC患者（HLADR53陽性）の摘出肝組織より、コラゲナーゼ処理、抗体ビーズ法にて分離し、専用の培養液にて継代したものを用いた。PDC-E2 163-176特異的T細胞クローンは、HLADR53陽性のPBC患者末梢血単核球（PBMC）をPDC-E2 163-176ペプチドで刺激を繰り返すことにより樹立した。T細胞の活性化は、細胞増殖能（ ^3H -thymidine uptake）とIFN- γ 分泌で評価した。Professional APCとしては、放射線照射自己PBMCを、APCとしてのBECは、IFN- γ 刺激にてHLADR53を発現させたBECを用いた。培養上清中のサイトカイン（TGF- β 、IFN- γ 、IL-10、TNF α 、IL-1 β ）、prostaglandin-E2（PG-E2）はELISAにて測定した。

C. 研究結果

- 胆管細胞には、PD-L1、PD-L2が恒常的に発現していた。
- IFN- γ 刺激にてHLADR53を発現させた胆管細胞を抗原（PDC-E2 163-176）でパルスしても、PDC-E2 163-176特異的T細胞の活性化能は認めなかった。
- 上記実験系に、PD-L1、PD-L2に対する中和抗体を加えると、T細胞の活性化能が部分的に回復した。
- 抗原パルスしたprofessional APCとT細胞クローンの混合培養系にACとしてBECを加えてco-cultureするとT細胞の活性化が抑制された。
- この抑制効果は、BECとT細胞の接触は必要なく（cell-contact-independent）、BECから分泌されたPG-E2によるものであった。
- APCあるいは活性化T細胞から分泌されるTNF α やIL-1 β などの刺激によりBECから大量のPG-E2が分泌された。

D. 考察

PBCの肝病変局所では、未だ標的となっている自己抗原ペプチドの全貌は明らかではないが、抗原特異的T細胞による胆管障害が持続していることが推定される。

一方、胆管は、さまざまな外来抗原に暴露されやすい環境にあり、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。

そこで、本研究では、PDC-E2特異的T細胞と胆管上皮細胞を用いて、胆管上皮細胞の免疫制御機構について *in vitro* で解析した。その結果、胆管上皮細胞には、①抗原提示細胞としては、PD-L1, PD-L2分子を介したT細胞活性化の抑制機構、②accessory cellとしては、PG-E2分泌を介するT細胞活性化の抑制機構を有することが明らかとなった。

E. 結論

PBCの胆管障害に対する治療の分子標的として、PD-L1, PD-L2などの抑制性co-stimulation分子、液性因子としてPG-E2が同定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T et al : Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. J.Hepatology in press 2005.
- 2) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, Handa M, Ishibashi H, Gershwin E, and Harada M.: Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases. Hepatology 2005 Jan; 41:151-159.
- 3) Komori A, Ishibashi H: Hen and egg, you mitochondria! PBC revisits mitochondria again. Hepatol Res , 2005, in press
- 4) Ishibashi H, Kamihira T, Shimoda S: CD4+ and CD4+CD28+ T cells in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Mucosal Immunity, 2005 in press
- 5) Ito M, Ishibashi H: Interobserver variation in assessing small bile duct lesions in PBC, CVH, and AIH. J Gastroenterol, 2005 in press
- 6) Ichiki Y, Leung PSC, Ishibashi H, Gershwin E: Mitochondria and Primary Biliary Cirrhosis, 2005, in press
- 7) Ichiki Y, Bowlus C, Shimoda S, Ishibashi H, Vierling J, Gershwin M. E. : T cell immunity and

Graft-versus-host disease (GVHD), 2005, in press

- 8) Ichiki Y, Bowlus C.L., Shimoda S, Ishibashi H, Vierling J, Gershwin ME: T cell immunity and Graft-versus-host disease (GVHD), 2005, in press
 - 9) Shimoda S, Nishio A, Ishibashi H, Gershwin ME: Primary Biliary Cirrhosis Bench to Bedside, Chapter 28. *The Pathophysiology of the Biliary Epithelia*, edited by Gianfranco Alpini, Domenico Alvaro, Marco Marziani, Gene LeSage, and Nicholas LaRusso. LANDES BIOSCIENCE, GEORGETOWN, EUREKAH.COM, AUSTIN, 454p, 2004, pp311-329
 - 10) Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P et al : Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins : genetics, epigenetics, and environment. Gastroenterology 2004 Aug; 127:485-492
 - 11) Ichiki Y, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. Is primary biliary cirrhosis a model autoimmune disease? Autoimmun Rev. 2004 Jun;3(4):331-6.
 - 12) 石橋大海：肝臓の臨床最前線 肝疾患の病態と対策「自己免疫性肝疾患」自己免疫性肝疾患、総合臨牀、2005 in press
 - 13) 石橋 大海:原発性胆汁性肝硬変－原因究明の進歩 Primary biliary cirrhosis－Progress of research on the pathogenesis、日本消化器病学会雑誌、2005 Jan;102:10-16
 - 14) 石橋大海：原発性胆汁性肝硬変の診断と治療の最前線. 治療(J.Therap.) 2004;86(9): 2555-2560
 - 15) 小森敦正、中村 稔、石橋大海：特集 Biliary Cell Lineage 3. 獲得免疫の立場から. 2004;646-649
 - 16) <分担執筆>石橋大海：原発性胆汁性肝硬変(PBC). 肝臓病学、朝倉書店、2004
- ##### 2. 学会発表
- 1) 横山照史、小森敦正、瀧井康、中村稔、上平幸史、下田慎治、石橋大海. ヒト培養胆管上皮細胞における Toll-like receptor(TLR)を介した細胞内シグナル伝達. 第34回日本免疫学会総会、2004.12.1 札幌
 - 2) 王愛平、右田清志、瀧井康、中村稔、横山照史、小森敦正、石橋大海. PBC 肝組織における Toll-like-receptor 4(TLR4)の発現 第34回日本免疫学会総会、2004.12.1 札幌
 - 3) 中村稔、瀧井康、小森敦正、横山照史、大黒学、矢野公士、八橋弘、下田慎治、吉田由紀、右田清志、伊東正博、石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変における抗核膜(gp210)抗体の産生機序の解析. 第34回日本免疫学会総会、2004.12.1 札幌
 - 4) 瀧井康、中村稔、伊東正博、小森敦正、横山照史、中尾瑠美子、阿比留正剛、矢野公士、大黒学、右田清志、八橋弘、原田実根、石橋大海.

- 原発性胆汁性肝硬変における門脈域および肝実質のサイトカイン、Toll-like receptor(TLR)の遺伝子発現解析. 第34回日本免疫学会総会、2004.12.1 札幌
- 5) 中村稔、大黒学、伊東正博. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測因子の検討. 第12回 日本消化器関連学会 (DDW)、パネルディスカッション3 (自己免疫性肝疾患の長期経過と治療による修飾). 2004.10.21、福岡
 - 6) 下田慎治、上平幸史、半田瑞樹、中村稔、石橋大海. PBC 患者あるいは健常者から樹立される自己抗原反応性 T 細胞クローンの性質の比較検討. 第40回 日本肝臓学会総会、2004.6.3 東京
 - 7) 右田清志、阿比留正剛、中村稔、小森敦正、大黒学、吉田由紀、横山照史、瀧井康、松本武浩、植木俊仁、矢野公士、八橋弘、石橋大海. ヒト肝細胞における Toll-like receptor 4(TLR4)の発現. 第40回 日本肝臓学会総会、2004.6.3 東京
 - 8) 小森敦正、横山照史、瀧井康、吉田由紀、中村稔、上平幸史、下田慎治、八橋弘、石橋大海. 自然免疫刺激により発現誘導される胆管上皮細胞由来ケモカイン、サイトカインの解析. 第40回 日本肝臓学会総会、2004.6.4 東京
 - 9) 上平幸史、下田慎治、中村稔、横山照史、半田瑞樹、石橋大海. PD1 リガンド・プロスタグランدين E2 を介したヒト肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) の T 細胞に対する抑制作用. 第40回 日本肝臓学会総会、2004.6.4 東京
 - 10) 瀧井康、中村稔、横山照史、吉田由紀、小森敦正、大黒学、伊東正博、八橋弘、原田実根、石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変症例における門脈域、肝実質別サイトカインおよび Toll-like receptor (TLR) 遺伝子発現の解析. 第40回 日本肝臓学会総会、2004.6.4 東京
 - 11) 中村稔、吉田由紀、下田慎治、瀧井康、横山照史、小森敦正、植木俊仁、大黒学、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 蛋白抗体の臨床的意義. 第40回 日本肝臓学会総会、2004.6.4 東京
 - 12) 中村稔、瀧井康、小森敦正、横山照史、吉田由紀、下田慎治、大黒学、植木俊仁、矢野公士、右田清志、八橋弘、伊東正博、石橋大海. 抗 gp210 抗体価による原発性胆汁性肝硬変の予後予測. 第32回 日本臨床免疫学会総会、2004.10.8-9 東京
 - 13) Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura M, Shimoda S et al: Innate immune responses in human intrahepatic biliary epithelial cells via Toll-like receptors. AASLD Abstract #597, October 31, 2004. Boston
 - 14) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T et al: Anti-gp210 antibody titers as a clinical parameter that predicts the long-term outcome of primary biliary cirrhosis under ursodeoxycholic acid treatment. AASLD Abstract #679, October 31, 2004. Boston

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

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 ：第六報 -QOL 再調査-

研究協力者 酒井 浩徳 国立病院機構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の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。これまで五回にわたる調査と本年度行った追加登録により、現在症例を登録し症例に関しては診断時から現在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。今回は三年前第三報で報告したにデータベースを用いて行った QOL アンケートで回収できた 151 症例を対象に再度のアンケート調査を行い、52 例の回答を回収することが出来、長期的な追跡調査を行い定期的な経過観察を行っていくのに本システムが有用であることが明らかとなった。

共同研究者

西 秀博 国立病院機構九州医療センター

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症（PBC）はその特徴的臨床像や病態にもかか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増加してきてはいるものの B 型肝炎や C 型肝炎などのウイルス性肝疾患に比べて発生頻度はきわめて低く、その症例の集積は研究の第一歩と考えられるが、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。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病院機構の医療施設において 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縦断的データに毎年症例追跡という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。この時間的な個々の症例の追跡によって PBC の自然経過を明らかにすることを目的とするとともに PBC の実態を把握することを目的としている。

本年度は五回目までの調査によって登録した症例に一部施設の症例を追加登録を行うとともに、第三回目に行った登録症例を対象とした新たな調査（QOL 調査）に時間軸の要素を加味した経過観察を行うことにより、PBC の実態把握の検討を行った。

B. 対象と方法

原発性胆汁性肝硬変症を調査対象とした第三回調査において QOL 調査に協力をいただいた 151 症例を対象とし、通常外来診察時に QOL アンケート調査表の記入を依頼し、回収することによって行った。QOL 調査表の記入に要する時間は 10 分程度であった。QOL アンケート調査には MOS Short

Form-36 Health Surve（SF-36）日本語版を用いるとともに、杏林大学第三内科肝疾患調査表を同内科中島 洋先生、川村直弘先生のご厚意により用いた。調査表の解析として SF-36 への解析は 8 つのサブスケールに、杏林大学第三内科肝疾患調査表への回答は 4 つのカテゴリーに分類し、100 点満点にスコア化して集計した。

C. 結果

過去五回までの調査による登録 428 例に今回 30 例が追加登録され、登録症例は 458 例となった。これまでうち 285 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 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 6 症例、女性 14 例そして五回目の調査で男性 6 症例、女性 17 例が登録されていた。今回は 30 症例（55.7 ± 12.6 歳）で男性 7 症例、女性 23 例であった。診断時より追跡調査が終了した症例が 285 症例で、そのうち追跡期間が 5 年以上の症例は 266 例であった。今回の追跡までで死亡例が 18 例となった。転院などによる脱落例が 34 例（12.7%）である。脱落例の特徴として高齢者が痴呆などで他の長期療養型の病院へ転院する例が目立った。

追跡症例を検討すると肝機能検査値は長期にわたって同じレベルを保つことが示され、多くの症例では安定した経過をたどり長期間にわたって無症候性 PBC の状態で経過することが考えられる。他方、今回の追跡でも肝移植症例と肝不全および食道静脈瘤破裂による死亡症例が追加されており一部の症例では診断後早期からあるいは長期間経過した後に症候

性 PBC となりさらに進行していく症例があり、PBC の病勢の進行する原因を明らかにすることもしくは長期間無症候性で経過する PBC と進行する PBC とでは本来別のカテゴリーの疾患であるのか解明するためには、今後さらに肝不全に陥った症例や症候性 (S2-PBC) の症例の集積がさらに必要となってくる。

今回同一症例の三年前と今回とで QOL 調査を行ったが、151 例のうち 52 例 (男性 9 症例、女性 43 症例) から回答を得た。比較対象は C 型慢性肝炎を主体とする慢性肝疾患患者で、三年前の同時期にアンケート調査をおこなった症例である。杏林の QOL 調査票に関して回答に不備のある症例を除き 49 例 (59.7±11.0 : 最高 84 歳から最低 23 歳) 男性 9 症例、女性 40 症例で比較対象は同時期に同様の QOL アンケートを行い、今回再度回答に報じてくれた C 型肝炎を中心とする慢性肝疾患患者 27 症例 (61.9±7.0 歳 : 最高 75 歳から最低 48 歳) 男性 8 症例女性 19 症例を用いた。3 年間の変化を求めたところ PBC の患者は全体でスコア 80 から 78.5 に低下、またカテゴリー別では筋力スコアが 78 から 72.9 と著名に低下、身体症状スコアは 75 から 74.7 とほぼ変化なく精神スコアは 74.8 から 78.2 と上昇、日常生活スコアは 88.2 から 86.6 と若干の低下を認める結果であった。それに対して他の C 型肝炎を中心とした慢性肝疾患の症例では、総合スコアで 3 年前より 79 から 81 に上昇しておりまたカテゴリー別では、筋力スコアは 76.9 から 76.5 とほぼ変化なく、身体症状スコアは 72.8 から 75.9 と著明に上昇、精神スコアは 77 から 78.2 と若干の上昇、日常生活スコアは 86.4 から 89.8 と著明に上昇を認める結果であった。

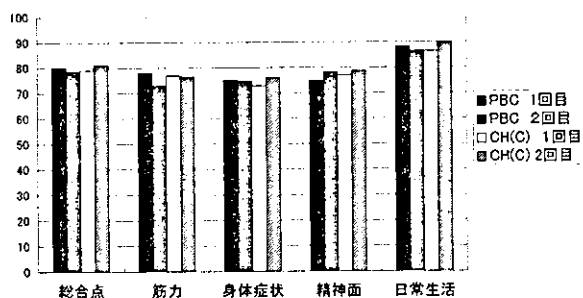


図 1

今回慢性肝炎患者と比較して PBC 症例の筋力のスコアの著明な低下を認めた理由としては、初回アンケート時に 80 歳以上の高齢者が 3 名含まれておりその高齢者の肉体的変化の結果が影響を及ぼした可能性が考えられる。また、C 型慢性肝炎を中心とした比較対象の疾患患者はインターフェロン療法を受けウイルスが排除させるなどの変化があった症例が含まれていることが今回の結果に現れていると考えられた。

SF-36 に関しては、今回回答を得た 52 例中すべてに回答がされており有効であった症例は 33 例 (58.9±11.0 歳 : 84 歳から 23 歳) 男性 8 症例、女性 25 症例に対して比較対象の C 型肝炎を中心とする慢性肝疾患患者ですべてに回答がされており有効であった

症例は 20 症例 (60.6±6.5 歳 : 72 歳から 48 歳) 男性 6 症例、女性 14 症例であった。

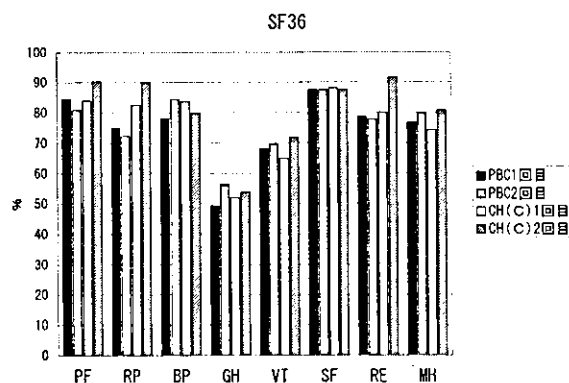


図 2

SF-36 は八つの健康概念を測定しており身体機能 (PF)、日常役割機能 (身体) (RP)、身体の痛み (BP)、全体的健康感 (GH)、活力 (VT)、社会生活機能 (SF)、日常役割機能 (精神) (RE)、心の健康 (MH) の八つのスケールおのおのについて比較してみると、GH, VT, MH は PBC、慢性肝炎の両方ともに上昇しているのに対して PF, RP, RE は肝炎患者では改善しているが、PBC 患者では低下しているしかしながら RE は PBC 患者で改善を認めた。PBC の QOL は通常慢性肝炎程度の患者並みに低下しているが、慢性肝炎の患者が治療で改善するのに比べ治療での QOL の改善があまりみられない。

D. 考察

本研究の国立病院機構における原発性胆汁性肝硬変症のデータベースの基本システムの構築が完了し、登録症例数も 450 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病院機構の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。その特長を生かして長期の追跡結果、詳細な経過の解析、患者の QOL などの身近な問題の検討、新たな診断法の確立・治療法の開発や治験に不可欠な症例の登録など多岐にわたる目的にその活用が可能であると考えられる。

我々はこれまでにデータベースを構築し登録を増やしていくとともに、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) そして新しい試みにおけるデータベースの活用 (血清収集) といったことをおこなってきた。今回我々のデータベースがもつ時間軸の要素を加味した経過観察を行うことにより、PBC の実態把握の検討を行った。

今後本データベースが信頼性のある有用なものとなるためには今後、よりいっそうの登録症例の増加と漏れのない追跡調査とを行っていく必要がある。しかし、現行の調査用紙形式の登録とデータベースへの手入力という方法はデータベース維持に多大な労力を必要とする。現在 B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎を対象に稼動している HOSP-NET を利用した国