

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 17 年度

総括・分担研究報告書

主任研究者

**石橋 大海**

平成 18 (2006) 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. 自己免疫性肝炎治療の現状と予後に関する調査研究 .....	15
研究協力者 渡部幸夫	
2. 国立病院機構施設における原発性胆汁性肝硬変症例のデータベース構築 - PBC 患者の再調査 - .....	18
研究協力者 酒井浩徳	
3. PBCの進展予測におけるIgAクラス抗2-OADC抗体の役割に関する研究 .....	21
研究協力者 大曲勝久	
4. 血清・唾液中 IgA 型 AMA の存在 - 自己抗体と PBC の組織学的進展度との関連 - .....	23
分担研究者 田中 篤	
5. 進行 PBC 症例における MRP 発現と胆管障害について .....	25
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 .....	27
分担研究者 金子周一	
7. Hepatic fatty acid metabolism in vivo imaging を用いた bezafibrate 治療抵抗性の予知および機能評価 .....	29
分担研究者 西原利治	
8. 原発性胆汁性肝硬変における抗gp210抗体の産生機序の解析と 新たな予後予測マーカーの検索 .....	31
分担研究者 中村 稔	
9. Toll様レセプターを介した免疫応答のPBC病態形成への関与に関する研究 .....	34
分担研究者 市田隆文	
10. 原発性胆汁性肝硬変における PPAR $\alpha$ の発現 .....	37
分担研究者 伊東正博	
11. ヒト培養胆管細胞および MRL/lpr マウスの胆管炎に対する PPAR $\gamma$ リガンドの 抗炎症効果 .....	39
分担研究者 原田憲一	
12. PBC 患者における血清 BAFF (B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family) 濃度とその意義 .....	43
分担研究者 右田清志	

13. AMA 産生動物モデルの胆管細胞を用いた網羅的検討 .....	45
分担研究者 上野義之	
14. 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 .....	47
分担研究者 松下 祥	
15. 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 .....	50
分担研究者 若月芳雄	
16. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における自己抗原 (PDC-E2) 反応性 T 細胞の免疫制御 .....	53
分担研究者 下田慎治	
17. 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 .....	55
分担研究者 喜多宏人	
18. PBC モデルマウスの作製に関する研究 .....	57
分担研究者 松浦栄次	
19. 新規 PBC 動物モデルを用いた胆道炎発症機序の解析 .....	60
分担研究者 松口徹也	
20. 慢性腸炎モデルマウスを用いた胆管炎モデルの作製と、胆管炎発症機序の検討 .....	62
研究協力者 橋本悦子	
21. 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と移植後の 自己免疫病態の検討 .....	64
分担研究者 兼松隆之	
22. 末期肝硬変に対する肝細胞増殖因子 (HGF) の臨床応用 .....	66
分担研究者 坪内博仁	
23. 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/機能変化に関する研究 .....	69
研究協力者 小森敦正	
24. 難治性肝疾患に対する再生医療の可能性 .....	71
研究協力者 石川文彦	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....</b>	<b>73</b>
<b>IV. 参考資料</b>	
・平成17年度 班員名簿 .....	77
・平成17年度 第1回班会議プログラム .....	78
・平成17年度 第2回班会議プログラム .....	81

## 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

主任研究者 石橋 大海（独）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：**平成15年度からスタートした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）の画期的治療の開発を目的とした研究の最終年度として、3年間の研究成果をまとめるべく研究を進めた。すなわち、国立病院機構ネットワークを利用した治療の現状の分析、問題点の明確化、血清や肝生検組織を用いた診断法の確立、予後予測あるいは規定する因子の同定、治療に対する反応性や病態の進行を規定する宿主因子、治療の標的分子を明らかにするための免疫異常の本態の解析、それらを標的とした新しい画期的な分子標的治療法や免疫制御療法の開発、それを臨床研究応用するための動物モデルの開発について研究を進めた。具体的な研究成果の要約は以下の通りである。

1) AIH, PBC 治療の現状を把握し、既存治療薬の効果を確認するために、国立病院機構施設における原発性胆汁性肝硬変症例および自己免疫性肝炎 (AIH) のデータベース構築の有用性を確認した。2) 発現遺伝子プロファイル解析にて、診断および治療法の開発に重要な知見になるとと思われる初期に変動する分子(群)を同定した。3) 分子 imaging を駆使して PBC に対する bezafibrate 治療の有効性を担保する遺伝的素因の解明を行い、bezafibrate に抵抗性を示す PBC に特徴的な遺伝子座を特定した。4) PBC 症例の中で肝移植が必要となるまで進展する一部 (約 2 割) の予後不良群を判別する検査マーカー (gp210) を同定しその有用性を確認した。5) PBC 症例の治療薬開発のターゲットとなる分子を同定した；①TLR4 ②PPAR $\alpha$  ③PPAR $\gamma$ 。6) 同定した分子を標的とした物質 (PPAR $\gamma$  リガンド) が炎症の改善に有効であることを確認した。7) 胆管表出蛋白分子を明らかにするため AMA 産生モデルを用いた胆管細胞蛋白発現の解析した。8) 免疫制御による治療の可能性が得られた；①自然免疫応答の制御による PBC 進展阻止、②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、③自己反応性 T 細胞, NK T 細胞, ④制御性樹状細胞, 調節性 T 細胞による制御 9) 経口からの抗原投与と抗原特異的な T 細胞の移入による治療の基礎的データが得られた。10) 末期肝硬変への組換えヒト HGF の臨床応用を目指して薬物動態, 安全性および薬理試験を行った。11) PBC 肝内への肝細胞, stem/progenitor cell 移植による肝再構築の可能性をつかんだ。12) 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。13) 発症機序の解明, 病態解析, 治療法の開発に必須となる新たな動物モデル 4 種を開発中であり, 既存の動物モデル 1 種は薬剤評価に有用であることを確認した。

分担研究者：

中村 稔 (独)国立病院機構長崎医療センター  
右田 清志 (独)国立病院機構長崎医療センター  
伊東 正博 (独)国立病院機構長崎医療センター  
兼松 隆之 長崎大学大学院歯薬総合研究科  
坪内 博仁 鹿児島大学大学院歯学総合研究科  
松下 祥 埼玉医科大学  
松口 徹也 鹿児島大学大学院歯学総合研究科  
市田 隆文 順天堂大学医学部附属静岡病院  
西原 利治 高知大学消化器病態学  
金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科  
若月 芳雄 京都大学大学院医学系研究科  
上野 義之 東北大学大学院消化器病態学  
田中 篤 帝京大学医学部内科学  
原田 憲一 金沢大学大学院形態機能病理学  
喜多 宏人 自治医科大学医学部  
松浦 栄次 岡山大学大学院歯学総合研究科  
下田 慎治 九州大学医学研究院病態修復内科学

研究協力者

小森 敦正 (独)国立病院機構長崎医療センター  
大黒 学 (独)国立病院機構長崎医療センター  
八橋 弘 (独)国立病院機構長崎医療センター  
藤岡ひかる (独)国立病院機構長崎医療センター  
松本 武浩 長崎大学大学院・医療情報部  
酒井 浩徳 九州医療センター・消化器科  
渡部 幸夫 国立相模原病院・消化器科  
中村 陽子 国立相模原病院・消化器科  
中沼 安二 金沢大学大学院・形態機能病理学  
恒吉 正澄 九州大学医学研究院・形態機能病理学  
相島 慎一 九州大学医学研究院・形態機能病理学  
井戸 章雄 京都大学医学部・探索医療センター  
大曲 勝久 長崎大学大学院・消化器病態制御学  
石川 文彦 九州大学大学院・病態修復内科学  
橋本 悦子 東京女子医科大学・消化器内科  
栗原 毅 東京女子医科大学・成人病センター  
木村 泰彦 香川医科大学・第三内科

## A. 研究目的

本研究班の目的は、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）の画期的治療を開発することである。平成15年度からスタートした本研究班の最終年度として、3年間の研究成果をまとめるべく研究を進めた。具体的には以下の内容を目的として研究を行った。すなわち、国立病院機構肝疾患ネットワーク、肝疾患治療の現状を解析して問題点を明らかにすること、血清や肝生検組織を用いた診断法の確立、予後予測あるいは規定する因子の同定、治療に対する反応性や病態の進行を規定する宿主因子、治療の標的分子を明らかにするための免疫異常の本態の解析、それらを標的とした新しい画期的な分子標的治療法や免疫制御療法の開発、それを臨床研究応用するための動物モデルの開発。

## B. 研究方法

対象となる疾患（難治性PBC, AIH）に関しては残念ながら実用化に近い治療法の開発はみられないので、戦略として各方面からのアプローチが必要である。初年度より各分担研究者、研究協力者が担当した研究分野をそれぞれが継続して研究を進めた。

### [I] 現行治療法の解析

- 1) AIH治療の現状と予後に関する調査研究（渡部幸夫）
- 2) 国立病院機構施設におけるPBC症例のデータベース構築：QOLの再調査（酒井浩徳）

### [II] 病態解析と治療標的の探索

- 3) PBCの進展予測におけるIgAクラス抗2-OADC抗体の役割に関する研究（大曲勝久）
- 4) 血清・唾液中IgA型AMAの存在－自己抗体とPBCの組織学的進展度との関連－（田中 篤）
- 5) PBC患者におけるBAFF（B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family）の血清濃度とその意義（右田清志）
- 6) PBC進展メカニズムの組織学的解明：胆管消失、線維化、血管構築の破綻について（恒吉 正澄・相島真一）

- 7) 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）

### [III] 治療の分子標的の探索

- 8) Hepatic fatty acid metabolism in vivo imaging を用いた bezafibrate 治療抵抗性の予知および機能評価（西原利治）
- 9) PBCにおける抗gp210抗体の産生機序の解析と新たな予後予測マーカーの検索（中村 稔）

- 10) Toll様レセプターを介した免疫応答のPBC病態形成への関与に関する研究（市田隆文）

- 11) PBCにおけるPPAR $\alpha$ と関連分子の発現（伊東正博）

- 12) 培養胆管細胞およびMRL/lprマウスの胆管炎に対するPPAR $\gamma$ リガンドの抗炎症効果（原田憲一）

### [IV] 胆管細胞の機能解析

- 13) AMA産生動物モデルの胆管細胞を用いた発現蛋白の網羅的検討（上野義之）

### [V] 免疫制御法の開発

- 14) 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（松下 祥）
- 15) 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（若月芳雄）

- 16) PBCにおける自己抗原(PDC-E2)反応性T細胞の免疫制御（下田慎治）

- 17) AIHにおける細胞性免疫応答の解析と治療応用（喜多宏人）

### [VI] 動物モデルの開発

- 18) PBCモデルマウスの作製に関する検討（松浦栄次）
- 19) PBC動物モデルを用いた胆道炎発症機序の解析および治療法開発（松口徹也）
- 20) 慢性腸炎モデルマウスを用いた胆管炎モデルの作製と、胆管炎発症機序の検討（橋本悦子）

### [VII] 先端医療（移植と再生医療）の適用

- 21) 原発性胆汁性肝硬変症例の肝移植後経過と移植後の自己免疫関連病態の検討（兼松隆之）
- 22) 末期肝硬変に対する肝細胞増殖因子(HGF)の臨床応用（坪内博仁）
- 23) 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（小森敦正）
- 24) 難治性肝疾患に対する再生医療の可能性（石川文彦）

## C. 研究結果

### [I] 現行治療法の検証

AIH治療の現状と予後についての今回の第5回新規登録では、急性肝炎型・急性増悪型の発症様式をとった69例中14例が重症型であった。初回PSL治療で完全寛解に至る率は30mgも40mgも同じであるが、その後の寛解持続率、寛解後再燃率をみると40mgの方が望ましいと考えられた。2005年予後調査では経過年数が増えるとともに慢性肝炎から肝硬変への進展が前回調査の53%から74%へと増加した。肝硬変からは死亡9例のうち肝不全死が5例認められ、肝不全死に

至る原因としては、PSLの有効性と使用量の問題が挙げられた。(渡部幸夫)

国立病院機構の医療施設における原発性胆汁性肝硬変症例のデータベースの基本構築、基本的システムの構築を完了し、本データベースの時間軸での症例の蓄積の効果を確認するために今回、再度のQOLアンケート調査を行い、データベースの有用性を確認した。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。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。今回3年前と同一症例に対してSF-36を使用しQOL調査を行ったが、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。(酒井浩徳)

## [II] 病態解析と治療標的の探索

Western blot法でのIgAサブクラス抗2-oxo-acid dehydrogenase complex (2-OADC)抗体と、PBCの進展予測および組織学的進展度との関連を検討した。IgA, IgA1, IgA2, secretory IgAクラス抗2-OADC抗体はいずれもPBCの組織学的進展と関連はなかった。組織学的ステージ(Scheuer's stage)とIgA2, secretory IgAクラス抗2-OADC抗体およびIgAクラス抗PDC-E2抗体の出現率とはいずれも関連はなかったが、IgAクラス抗2-OADC抗体はstage 3-4で11例全例が陽性であり、有意に陽性率が高かった( $p=0.0049$ )。一方、IgA1クラス抗2-OADC抗体はstage 1-2で20例中16例が陽性であり、有意に陽性率が高かった( $p=0.0232$ )。以上の結果より、これらの抗体はPBCの進展予測因子とはなり得なかったものの、PBCの病態に関与している可能性が示唆された。(大曲勝久)

AMAの一つであるIgA型抗PDC-E2抗体が、PBC患者53例中37例の血清、26例中12例の唾液中に検出され、その存在が肝生検時のScheuer分類によって決定された肝病変の組織学的進展度と強く相関している(血清: $p=0.0124$ , 唾液: $p=0.0002$ )ことが明らかとなった。これは血清・唾液中IgA型抗PDC-E2抗体がPBC肝の病態形成に強く関連していることを示唆するものであると考えられた。(田中 篤)

PBC患者血清中のBAFF濃度をELISA法で測定した。その結果、PBC患者血清中のBAFF濃度は有意に増加していた(健康人  $732 \pm 167$  mg/ml, PBC患者  $1369 \pm 1169$  mg/ml)。血清BAFF濃度と抗ミトコンドリア抗体価の間に相関は認められなかった

が、血清ビリルビン値との間に正の相関を認めた。また病期の進行した症例、interface hepatitisの程度の強い症例において、血清BAFF濃度は高い傾向にあった。(右田清志)

移植摘出肝26例を対象に、1) MRP(multidrug resistance-associated protein)蛋白発現と2)胆管障害レベルとheterogeneityについて検討した。その結果、1-1)進行したPBCの約7割以上において、通常は毛細胆管側にのみ発現のみられるMRP2は他の細胞膜にも発現し、胆汁うっ滞と相関した。1-2) MRP3は小葉改築と線維化が高度であるmicronodular type, mixed nodular typeの肝硬変で発現が弱く、線維化の進行との関連が示唆された。2-1)胆管障害の程度、特に $50 \mu\text{m}$ 以下のより小さい胆管障害によって進行した時の肝硬変の型が決まる可能性がある。2-2)胆管の消失はいずれの肝区域でもおこりうるが、特に後区域ではその程度が強い症例が多くみられた。(恒吉正澄・相島慎一)

PBCおよびAIHの組織を対象にレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いてリンパ球および肝細胞を選択的に採取し包括的な発現遺伝子解析を行った。またSAGE法によるPBCの包括的な発現遺伝子プロファイルを得た。PBC初期のリンパ球においてはinterferon  $\gamma$ , interleukin 6 receptor, Interleukin 7, 11が発現亢進し、進行すると発現が低下した。SAGE法を用いてPBCの大規模で正確な発現遺伝子プロファイルを得た。これらの結果はPBCの初期における診断法および治療法の開発に有用であると考えられた。(金子周一)

## [III] 治療の分子標的の探索

分子imagingを駆使してPBCに対するbezafibrate治療の有効性を担保する遺伝的素因の解明を行った。その結果、bezafibrateに抵抗性を示すPBCに特徴的な遺伝子座を特定した。(西原利治)

PBCの進展におけるgp210蛋白の役割を明らかにするために、gp210蛋白の肝局所での発現を免疫組織学的に検討した。小葉間~小型胆管上皮細胞の核膜のgp210蛋白の染色性は、原発性胆汁性肝硬変において疾患コントロールに比し有意に上昇していた。また、gp210蛋白の発現は、門脈炎やinterface hepatitisの強さと相関していた。また、原発性胆汁性肝硬変の進展に関与するgp210蛋白以外の予後予測マーカーの候補として、centromere蛋白、新規のp80蛋白を同定した。(中村 稔)

aPBC症例の末梢血中CD14陽性細胞において、(1)刺激前のCD83発現が高く、またPGN, LPS

で刺激後の CD83 発現が健常人と比べて有意に高かった。(2) TLR2 発現は無刺激の状態では健常人と比べて有意に高かった。(3) TLR4 発現は無刺激では健常人と有意な変化は認められないものの、LPS 刺激後に健常人と比べて有意に高かった。(4) TLR2, 4 のアダプター分子である MyD88 の mRNA 発現は、LPS 刺激後に健常人と比べて有意に高値を示した。(市田隆文)

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 $\alpha$  とその発現調節機構や肝細胞内酸化酵素の発現を検討した。その結果、① PPAR $\alpha$  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みられなかった。肝細胞内 catalase 発現は PBC の進行症例で低下していた。② mRNA レベルでも PPAR $\alpha$  の発現は亢進していた。③ 肝細胞培養実験で、PPAR $\alpha$  は分裂、増殖する細胞の核内に限局した発現がみられ、48 時間培養で核、細胞質に発現がみられた。Bezafibrate 添加群で PPAR $\alpha$  の発現は亢進し、細胞増殖効果、catalase 発現亢進が観察された。④ Ubiquitin は進行した PBC で有意に発現亢進がみられた。HSP90 $\alpha$  は進行した PBC で核内発現が広く観察された。(伊東正博)

PPAR $\gamma$  リガンドによる抗炎症効果について検討した。その結果、① PPAR $\gamma$  リガンドとして 15d-PGJ2 またはトログリタゾンを用いて、ヒト培養胆管細胞での LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 活性や TNF- $\alpha$  産生の影響を検討した結果、15d-PGJ2、トログリタゾン共に LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B や TNF- $\alpha$  産生が抑制された。② PBC 類似の胆管炎を自然発症する MRL/lpr マウスを対象に、15d-PGJ2(腹腔内投与) またはトログリタゾン(混餌投与)の抗炎症効果を検討した結果、どちらの PPAR $\gamma$  リガンド共に胆管炎に対して抗炎症効果が得られた。(原田憲一)

#### [IV] 胆管細胞の機能解析

NOD マウスの亜種 2 種を米国より入手し、適当な検疫業務の後に繁殖させて安定したコロニーを作製した。更に、経時的にこのモデル動物を観察することにより胆管炎モデルとして妥当であることを確認した。さらに AMA が経時的に産生されてくることを確認した。また、今回新たに開発した胆管細胞の分離法が純度の高い胆管細胞を得る方法として有望であることを確認し、得られた胆管上皮細胞は多様性や細胞特性を有すること観察した。(上野義之)

#### [V] 免疫制御法の開発

異なる iNKT 細胞サブセットが、DC 機能の変化に及ぼす影響を比較検討し、iNKT 細胞サブセットのバランスが末梢における Th1/Th2 応答バランス

を制御する重要な要因となり得ることを明らかにした。さらに iNKT は、自己免疫疾患関連ヘルパー T 細胞の活性化を抑制することを明らかにした。(松下 祥)

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では、抗原特異的、非特異的に起こる肝障害モデルを設定し、この免疫調節性細胞の移入、及び経口からの抗原投与により肝障害が阻止されか検討した。その結果いずれのモデルにおいても、肝障害阻止効果が認められた。肝組織 T 細胞の機能を検討したところ、細胞移入と抗原の投与により、肝傷害性 CD4T 細胞の機能が抑制されていることが確認された。(若月 芳雄)

抗原提示細胞(APC)として免疫調節性樹状細胞(regDC)を用いて、自己抗原反応性 T 細胞クローン(TCC)の増殖能の検討と、最終的にこの TCC が免疫調節性 TCC に変換されるかを検討した。regDC は通常の DC よりも抗原提示能は制御されたが、最終的に TCC を免疫調節性 T 細胞(regT)に変換できなかった。

(下田慎治)

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。また、同様に AMA 陰性患者における CD4 陽性自己反応性 T 細胞応答についても併せて解析した。これらの AMA 陰性患者の血清中の抗体反応についても解析した。AMA 陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞や CD4 陽性自己反応性 T 細胞応答が存在しており、AMA 陰性 PBC においても、T 細胞レベルでの自己抗原に対する異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。(喜多宏人)

#### [VI] 動物モデルの開発

マウスにおける PDC-E2 に対する細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導と原発性胆汁性肝硬変(PBC)モデルの開発を目的として研究を開始した。具体的には、以下の実験を計画し実施中である。ヒト HLA-A0201 遺伝子を導入(ノックイン)したトランスジェニックマウス(HHD マウス)、雌性、6 週齢を PDC-E2(159-167)ペプチドあるいはホスファチジルエタノールアミン修飾ペプチドを CFA および MDP 含有リポソームを用いて免疫し CTL を誘導する。CTL 活性検討には、PDC-E2(1-414)遺伝子を pIRES2-EGFP に導入し、HLA-A0201 マウス由来 RMA-HHD 細胞へのトランスフェクション後、GFP およびネオマイシンでセレクションを行うことで樹立した PDC-E2(1-141)/HLA-A0201 安定発現株を用いる。免疫マウスの肝臓の病理標本を調製し、胆管の周囲における様々な単核球細胞、特に、CD4 陽性、 $\alpha\beta$  TCR 陽性 T 細胞や種々のリンパ



球の集簇・浸潤を観察する。(松浦栄次)

SJL/JマウスへのPDC-E2由来ペプチド抗原投与による胆道炎誘導プロトコルを確立した。次に我々が開発したTh1タイプに偏位した抗原特異的免疫反応を示す2つの遺伝子改変マウス系統(T細胞特異的ドミナントネガティブ型MKP-MトランスジェニックおよびCot/Tp1<sup>-</sup>2KO)とSJL/Jマウスとのバッククロス交配をすすめた。C57BL/6背景の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PDC-E2由来ペプチド抗原投与にてコントロールマウスに比して著明な腹水貯留を示した。(松口徹也)

慢性腸炎を伴うマウスを用いて胆管炎を生じる可能性の有無を検討した。この結果、TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>xAIM<sup>-/-</sup>マウスでPBC-likeの胆管炎を生じることが明らかとなった。次いで、胆管炎の病因の可能性に関して、グラム陽性菌由来のリポタイコ酸の関与の有無を検討した。免疫染色の結果、胆管炎部にLTAの発現を認めた。(橋本悦子)

#### [VII] 先端医療(移植と再生医療)の適用

生体肝移植後に54例中3例(55%)に自己免疫関連が疑われる肝障害が発生した。2例で肝生検にて形質細胞が浸潤しており、IgG4関連病態を疑った。結果的には血清中IgG4は正常範囲内、肝内にIgG4陽性細胞は陰性であった(1例で散在性に陽性)。1例でAzaを導入しFK、ステロイド減量可、他の1例で類天疱瘡が発症し、ステロイド増量にて肝機能障害も緩解した。(兼松隆之)

原発性胆汁性肝硬変等による末期肝硬変に対する組換えヒトHGFの第I/II相臨床試験を医師主導治験の枠組みで行うべく、非臨床安全性試験、治験計画届に向けた準備および治験実施にかかる組織構築を行った。組換えヒトHGFの非臨床試験では、反復投与毒性試験において、可逆性の腎毒性、血圧低下作用が認められた。また、臨床用量の組換えヒトHGFに肝発癌促進作用は認められなかったが、増殖因子であるHGFの発癌性に関しては十分なインフォームドコンセントが必要と考えられた。(坪内博仁)

増殖ヒト肝内胆管上皮細胞(HIBEC)の再分化機構を検討する目的で、HIBECの*in vitro*分枝管腔様構造形成および肝細胞化生誘導アッセイ法の確立を試みた。HIBEC single cell suspensionないしspheroid(集塊)を、Matrigel+collagen I混合ゲル内でEGFないしHGF添加にて培養することで分枝索状構造が形成された。またHIBECを無血清、Dexamethasone、添加培地を用いてLamininコートdish上で培養することで、albuminならびにacute phase proteins mRNAなど肝細胞特異的転写産物の誘導が生じた。(小森

敦正)

ヒト幹細胞を新規開発免疫不全マウスにおいて評価するアッセイシステムを確立し、肝細胞、膵 $\beta$ 細胞、心筋細胞など、様々な組織を構成する細胞の再生能を評価するとともに、そのメカニズムの同定を行うことに成功した。(石川文彦)

#### D. 考察

今回の国立病院機構肝疾患ネットワークAIH症例第5回新規登録では重症型が多く存在した初回PSL治療で完全寛解に至る率は30mgも40mgも同じであるが、その後の寛解持続率、寛解後再燃率をみると40mgの方が望ましいと考えられた。2005年予後調査では経過年数が増えるとともに慢性肝炎から肝硬変への進展が前回調査の53%から74%へと増加した。肝硬変からは死亡9例のうち肝不全死が5例認められ、肝不全死に至る原因としては、PSLの有効性と使用量の問題が挙げられた。

国立病院機構の医療施設におけるPBC症例のデータベースの基本構築、基本的システムは有用であり、データベースの時間軸での症例の蓄積の効果の確認、再度のQOLアンケート調査を行い、

AMAの一つであるIgA型抗PDC-E2抗体が、PBC患者血清、および唾液中に高率に検出され、その存在が肝生検時のScheuer分類によって決定された肝病変の組織学的進展度と強く相関していることは、血清・唾液中IgA型抗PDC-E2抗体がPBC肝の病態形成に強く関連していることを示唆するものであると考えられた。

IgA, IgA1, IgA2, secretory IgAクラス抗2-OADC抗体はいずれもPBCの組織学的進展と関連はなかったが、組織学的進展度との関連が一部のIgAサブクラスの抗体で認められたことより、これらの抗体はPBCの病態に関与している可能性が示唆された。

BAFF(B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family)は、B細胞の分化、自己抗体産生を誘導する、TNFファミリーに属する分子である。PBC患者血清中のBAFF濃度が有意に増加し、血清BAFF濃度と血清ビリルビン値との間に正の相関を認め、また病期の進行した症例、interface hepatitisの程度の強い症例において、血清BAFF濃度は高い傾向にあったことは、PBCの肝障害にBAFFが関与している可能性が示唆された。

PBCを特徴づける胆管消失と胆汁うっ滞に関して生体肝移植症例の病理学的な解析は十分なされていない。今回の検討でMRP(multidrug resistance-associated protein)蛋白MRP2およ

び 3 の発現と胆管障害レベルおよび heterogeneity が観察された今後も移植肝での形態学的アプローチによる PBC の病態解明の必要があると考えられる。

包括的な発現遺伝子プロファイル解析により従来の臨床病理学的な診断法よりも正確、かつ治療に適した診断法が確立される可能性が明確に示された。今回の包括的発現遺伝子解析の結果から、発病の初期における遺伝子発現とは進展した病態における遺伝子発現は PBC において大きく異なっていた。初期に変動する分子（群）のいくつかが明らかとなったことは初期の診断および治療法の開発に重要な知見であると考えられた。また SAGE 法の結果を用いることによってさらに正確な PBC におけるプロファイルが得られるものと思われた。

画像診断に用いた手法は最先端技術である分子 imaging の手法の新たな確立であり、非侵襲的に in vivo で機能解析が行える画期的な system である。本検査法は保険収載された物質を用法通りに使用して検査を行っており、データ処理の部分に特許性が存在する。

gp210 蛋白は、核膜孔を構成する蛋白であるが、その発現調節機構や機能については未だ不明の点が多く、PBC 症例の中で、肝不全に進行する高リスク群に gp210 蛋白に対する自己抗体が出現する機序も全く不明であった。

今年度の研究で、PBC の肝局所での gp210 蛋白の局在と発現レベルの解析が可能となり、小型胆管上皮細胞では、その周囲の炎症により gp210 蛋白の発現が増加することが示唆された。炎症に伴う何らかの機序により胆管上皮細胞の gp210 蛋白が高発現することと、gp210 蛋白に対する自己免疫応答が出現、持続することが、肝不全に進行する PBC の特徴と考えられた。

PBC における自然免疫応答、特に微生物病原体の構成成分認識を行う Toll 様レセプター (TLR) を介した活性化に関するこれまでの検討により、無症候性 PBC (aPBC) 症例では細菌認識にかかわる TLR2, TLR4 のリガンドである peptidoglycan (PGN), lipopoly -saccharide (LPS) 刺激により TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 産生が健常人に比べて有意に高値であり、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可能性が示唆された。今年度の結果より、aPBC 症例における TLR2, 4 リガンド刺激に対する高活性化の原因として、TLR 発現とアダプター分子である MyD88 発現の相違が関与している可能性が示唆された。TLR シグナル伝達に関与する分子は多数同定されており、TLR リガンド刺激による高活性化の原因

の更なる解明と、画期的治療法の一つとして、その制御による PBC 病態進展抑制の可能性について検討する必要があると考えられる。(市田隆文) Fibrate の受容体である PPAR $\alpha$  の発現は進行した PBC 症例で蛋白レベル, mRNA レベルで亢進していたが、PPAR $\alpha$  の核内発現を伴っていなかった。PPAR $\alpha$  が間細胞内で分解されずに安定化している要因として、核内移行抑制に作用する HSP90 $\alpha$  の発現亢進、蛋白分解を司る ubiquitin 蛋白の異常蓄積が考えられた。本研究では PBC における PPAR $\alpha$  発現に関する一部を明らかにすることができた。(伊東 正博)

PBC の障害胆管で抗炎症性分子 PPAR $\gamma$  の発現低下がみられ、菌体成分に対する感受性の亢進が PBC 胆管炎の発生に加担していると推測されている。今回の検討で、15d-PGJ2, トログリタゾン共に LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B や TNF- $\alpha$  産生が抑制され、15d-PGJ2(腹腔内投与)またはトログリタゾン(混餌投与)共に胆管炎に対して抗炎症効果が得られたことより、PPAR $\gamma$  リガンドが PBC の新たな治療薬として応用できる可能性が示唆された。(原田憲一)

種々のマウス自己免疫疾患モデルおよびヒト自己免疫疾患患者において、DN iNKT サブセットの機能不全、あるいは減少が報告されている。NOD マウスでも同様に DN サブセットの機能不全と減少が認められるが、これに  $\alpha$ -GalCer を投与することにより、脾所属リンパ節で DC における寛容性の DC 分化が誘導され、病原性の T 細胞が抑制を受けることが知られている。ヒト CD4 および DN iNKT サブセットは共に  $\alpha$ -GalCer によって活性化されることにより、寛容性の DC 分化を誘導する。つまり、DN iNKT サブセットの機能不全が認められる自己免疫疾患において、正常な機能を有する CD4 iNKT 細胞の活性化を通して、病原性の Th 細胞が抑制されることが予想される。(松下 祥)

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からは、経口からの抗原投与により、肝臓で起こる免疫反応を制御することが可能であること、またこれを用いて、肝障害(肝炎)を阻止できることが判明した。肝炎の阻止機序として、肝臓に誘導された抑制性の T 細胞が直接的な役割を担っていることが判明した。(若月芳雄)

以前検討した HLA DR53 導入マウス線維芽細胞(L-DR53)では regT の誘導ができたが、今年度検討した regDC では、誘導できなかった原因のひとつとして、DC が元来抗原提示細胞であり L-DR53 がそうではないことが考えられた。(下田慎治)

PBC の自己抗原である AMA の主たる対応抗原で

あるピルビン酸脱水素酵素の E2 コンポーネント (PDC-E2) を特異的に認識する CD8 陽性自己反応性 T 細胞がどのような機序により生体内で活性化を受け増殖しているのかは明らかでない。AMA 陰性 PBC 患者末梢血中にも CD8 陽性自己反応性 T 細胞や CD4 陽性自己反応性 T 細胞応答が存在しており、AMA 陰性 PBC においても、T 細胞レベルでの自己抗原に対する異常反応が病態に関与している可能性が示唆された。AMA 陰性 PBC と AMA 陽性 PBC は自己反応性 T 細胞の活性化という点で共通しており、これらの自己反応性 T 細胞の制御が病態進展を抑制する治療法につながる可能性が示された。(喜多宏人)

PBC モデル動物については、松浦、松口、橋本班員から新たな試みが報告された松浦班員による HLA-A0201 (HHD) トランスジェニックマウスを用いれば、マウスでヒトと同様のエピトープを認識する CTL が誘導されることが期待される。CTL 誘導の他に、primary あるいは secondary hit あるいは調節性 T 細胞が関与していることが知られている *FOXP3* についても検討可能である

(松浦 栄次)

PDC-E2 抗原投与依存性に NSDC を誘導できることから、PBC マウスモデルのマ基礎系統として SJL/J が適切であることが示された。また、C57BL/6 背景の DN 型 MKPM Tg マウスへの PDC-E2 由来抗原投与によって肝障害を誘導しうることから、この遺伝子改変マウス系統が、PBC 病態解明のためのマウスモデルとして有効になりうる可能性が示唆された。(松口徹也)

PBC の病因の可能性として細菌関与を示唆する報告が散見されているが、 $\text{TCR}\alpha^{-/-}\times\text{AIM}^{-/-}$  マウスでは、胆管炎に細菌由来物質が関与している可能性が示唆された。(橋本 悦子)

肝移植は免疫学的には移植によって肝臓への攻撃をリセットする状態である。諸家の報告と同様に血清学的再発はあるものの組織学的所見に乏しいか拒絶との鑑別がつきにくい状態で、肝機能は維持されていた。免疫抑制はステロイドが必要か否かは明らかではない。Aza や Cellcept の導入でも十分ではないだろうか。

(兼松 隆之)

組換えヒト HGF の臨床試験は、本邦初の開発型医師主導治験、また世界初の組換えヒト HGF の臨床試験である。このように臨床試験を治験の枠組みで実施することは、その安全性および科学性が確保され、さらにその成績が国際的な評価に耐えうるということが考えられ、学術的、社会的意義は大きいと考えられる。一方、未承認臨床サンプルの開発を目的とした医師主導治験は本邦初の事例で

あるため、その立ち上げには未知の部分も多かった。また、専門的な人材や製剤化、非臨床試験および治験計画届などにかかる資金およびノウハウが不足していること、また治療法開発を目的とする医師主導治験を支援する体制の整備が不十分であることが問題点として考えられた。

(坪内 博仁)

終末分化したヒト胆管上皮細胞 (HIBEC) は炎症局所で増殖相へ変化すると考えられるが、この後 ECM 由来の刺激により遺伝子発現上 ductular hepatocytoid state を経て、さらに組織局所のサイトカインならびに増殖因子の影響下、胆管分化、肝細胞分化へと誘導されることが示唆された。

(小森 敦正)

純化したヒト正常造血幹細胞の新しいアッセイシステムの確立に成功した。ヒト免疫系を有するマウスモデルは、造血、免疫、腫瘍など幅広い分野に応用されると期待される。今年度、内胚葉系において、膵  $\beta$  細胞の再生において、造血組織の有する能力と再生の機序について明らかとした。(石川 文彦)

## E. 結論

今年度の研究成果として、以下の治験が得られた。

1) AIH, PBC 治療の現状を把握し、既存治療薬の効果を確認するために、国立病院機構施設における PBC 症例および AIH のデータベース構築の有用性を確認した。

2) 発現遺伝子プロファイル解析にて、診断および治療法の開発に重要な知見になると思われる初期に変動する分子(群)を同定した。

3) 分子 imaging を駆使して PBC に対する bezafibrate 治療の有効性を担保する遺伝的素因の解明を行い、bezafibrate に抵抗性を示す PBC に特徴的な遺伝子座を特定した。

4) PBC 症例の中で肝移植が必要となるまで進展する一部(約 2 割)の予後不良群を判別する検査マーカー(gp210)を同定しその有用性を確認した。

5) PBC 症例の治療薬開発のターゲットとなる分子を同定した;①TLR4, ②PPAR $\alpha$ , ③PPAR $\gamma$ 。

6) 同定した分子を標的とした物質(PPAR $\gamma$ リガンド)が炎症の改善に有効であることを確認した。

7) 胆管表出蛋白分子を明らかにするため AMA 産生モデルを用いた胆管細胞蛋白発現の解析した。

8) 免疫制御による治療の可能性が得られた;①自然免疫応答の制御による PBC 進展阻止, ②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, ③自己反応性 T 細胞, NK T 細胞, ④制御性樹状細胞, 調節性 T

細胞による制御。

9) 経口からの抗原投与と抗原特異的なT細胞の移入による治療の基礎的データが得られた。

10) 末期肝硬変への組換えヒトHGFの臨床応用を目指して薬物動態, 安全性および薬理試験を行った。

11) PBC 肝内への肝細胞, stem/progenitor cell 移植による肝再構築の可能性をつかんだ。

12) 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。

13) 発症機序の解明, 病態解析, 治療法の開発に必須となる新たな動物モデル4種開発中であり, 既存の動物モデル1種は薬剤評価に有用であることを確認した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishibashi H, Shimoda S, Gershwin ME. The immune response to mitochondrial auto-antigens. *Seminars in Liver Disease* 25(3): 337-46, 2005
- 2) Mao TK, Lian ZX, Selmi C, Ichiki Y, Ashwood P, Ansari AA, Coppel RL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 42(4): 802-808, 2005
- 3) Ichiki Y, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Vierling JM, Gershwin ME. T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev* 5(1):1-9, 2006
- 4) Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. T cell immunity in autoimmune hepatitis *Autoimmun Rev* 4(5):315-21, 2005
- 5) Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, Shimoda S, Mori T, Fujiwara S, Koyabu M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K, Yatsushashi H, Ishibashi H. Human intra-hepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF- $\kappa$ B and -MAPK signaling pathways *Liver International* (in press), 2006
- 6) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsushashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 26(2): 138-145, 2006
- 7) Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, Nakao R, Kusumoto K, Nagaoka S, Yano K, Abiru S, Ueki T, Matsumoto T, Daikoku M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K, Yatsushashi H, Nakashima M, Harada M, Ishibashi H. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 85(7): 908-920, 2005
- 8) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, Komori A, Yokoyama T, Ueki T, Daikoku M, Yano K, Matsumoto T, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Masaki N, Adachi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Saoshiro T, Sodeyama T, Koga M, Shimoda S, Ishibashi H. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatology* 42(3): 386-392, 2005
- 9) Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 25(1): 85-91, 2005
- 10) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, Handa M, Ishibashi H, Gershwin ME, Harada M. Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases. *Hepatology* 41(1): 151-159, 2005
- 11) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Peroxynitrite-mediated matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 579(14): 3119-3125, 2005
- 12) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yokoyama T, Takii Y, Mori T, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix metalloproteinase-9 induction in TNF- $\alpha$ -stimulated human hepatic stellate cells. *Life Sci* (in press), 2006
- 13) Ito M, Ishibashi H. Interobserver

- variation in assessing small bile duct lesions in PBC, CVH, and AIH. *J Gastroenterol* 40(2): 223-224, 2005
- 14) Kusumoto K, Ido A, Moriuchi A, Katsura T, Kim ID, Takahama Y, Numata M, Kodama M, Hasuike S, Nagata K, Uto H, Inui K, Tsubouchi H. Repeated intravenous injection of recombinant human hepatocyte growth factor ameliorates liver cirrhosis but causes albuminuria in rats. *Int J Mol Med* 17(3): 503-509, 2006
- 15) Uto H, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Yamagishi T, Gohda E, Tsubouchi H. Development of a rapid semi-quantitative immunochromatographic assay for serum hepatocyte growth factor and its usefulness in acute liver failure. *Hepatol Res* 33: 272-276, 2005
- 16) Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 20(11): 1753-1761, 2005
- 17) Matsushita S, Liu T-Y and Uemura Y. Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. *Allergol Int* 54(4): 507-513, 2005
- 18) Kato N, Ohyama H, Nishimura F, Matsushita S, Takashiba S, Murayama, Y. Role of helper T cells in the humoral immune responses against 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 20(2): 112-117, 2005
- 19) Liu T, Kohsaka H, Suzuki M, Takagi R, Hashimoto K, Uemura Y, Ohyama H, Matsushita S. Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- $\gamma$  Production from CD4T cells. *Allergol Int* 54(1): 117-122, 2005
- 20) Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K, Namisato M, Fukutomi Y, Nishimura F, Naruishi H, Ohira T, Hashimoto K, Liu T, Suzuki M, Uemura Y, Matsushita S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol* 58(7): 740-743, 2005
- 21) Yoneyama H and Ichida T. Recruitment of dendritic cells to pathological niches in inflamed liver. *Med Molecular Morphol* 38(3): 136-144, 2005
- 22) Miyakawa R, Ichida T, Yamagiwa S, et al. Hepatic natural killer and natural killer T cells markedly decreased in two cases of drug-induced fulminant hepatic failure rescued by living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 20(7): 1126-1130, 2005
- 23) Fukumoto M, Ono M, Masuda H, Ogawa Y, Nemoto Y, Onishi S, Saibara T. In vivo imaging of fatty acid metabolism in the liver: using semiquantitative <sup>123</sup>I-BMIPP liver scan. *Hepatol Res* (in press), 2006
- 24) Honda M, Kawai H, Shirota Y, Yamashita T, Takamura T, Kaneko S. cDNA microarray analysis of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and consecutive disease manifestation. *J Autoimmun* (inpress), 2006
- 25) Tsuji H, Hiramatsu K, Minato H, Kaneko S, Nakanuma Y. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation with de novo autoimmune hepatitis in the allograft and leftover primary biliary cirrhosis in the native liver. *Semin Liver Dis* 25(3): 371-377, 2005
- 26) Honda M, Kawai H, Shirota Y, Yamashita T, Kaneko S. Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 100(9): 2019-2030, 2005
- 27) Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Interferon- $\gamma$  accelerates NF- $\kappa$ B activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligands interaction. *J Clin Pathol* (in press), 2006
- 28) Harada K, Isse K, Kamihira T, Shimoda S, Nakanuma Y. Th1cytokine induced down-regulation of PPAR $\gamma$  in biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 41(6): 1329-1238, 2005
- 29) Kita H. PBC and eosinophilia: New insight from autoantibody response. *Hepatol Res* 32: 12-13, 2005
- 30) Kita H. A role of NKT cells in HCV infection and development of hepatocellular carcinoma: Are they protective or destructive? *Hepatol Res* 32: 197-199, 2005
- 31) Kita H. Family study in PBC as a clue to

- the possible involvement of genetic and environmental factors. *Hepatol Res* 33: 5-6, 2005
- 32) Amano K, Leung PSC, Rieger R, Quan C, Wang X, Marik J, Suen YF, Kurth MJ, Nantz MH, Ansari AA, Lam KS, Zeniya M, Matsuura E, Coppel RL, Gershwin ME. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol* 174(9): 5874-5883, 2005
- 33) Watanabe T, Yamori M, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y. CD4+CD25+ T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflamm Bowel Dis* 11(6): 541-550, 2005
- 34) Taffetani S, Ueno Y, Meng F, Venter J, Francis H, Glaser S, Alpini G, Patel T. Tannic Acid Inhibits Cholangiocyte Proliferation after Bile Duct Ligation via a Cyclic Adenosine 5',3'-Monophosphate-Dependent Pathway. *Am J Pathology* 166(6): 1671-1679, 2005
- 35) Glaser S, Alvaro D, Francis F, Ueno Y, Marucci L, Benedetti A, Marzioni M, De Morrow S, Mancino MG, Phinzy JL, Reichenbach R, Fava G, Summers R, Venter J, Alpini G. Beta 1 and Beta 2 adrenergic receptor agonists prevent bile duct injury induced by adrenergic denervation by increased cAMP levels and activation of Akt. *Am J Physiology* (in press), 2006
- 36) Moritoki Y, Ueno Y, Kanno A, Yamagiwa Y, Fukushima K, Shimosegawa T. The limited role of bone marrow cells in experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Liver International* (in press), 2006
- 37) Marzioni M, Francis H, Benedetti A, Ueno Y, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Mancino MG, Summers R, Alpini G, Glaser S. Ca-dependent cytoprotective effects of urso- and taurochenodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathology* (in press), 2006
- 38) Fukushima K, Ueno Y. The bioinformatic approach for understanding the heterogeneity of cholangiocytes. *World J Gastroenterology* (in press), 2006
- 39) Meng F, Yamagiwa Y, Ueno Y, Patel T. Over-expression of Interleukin-6 enhances cell survival and transformed cell growth in human malignant cholangiocytes. *J Hepatol* (in press), 2006
- 40) Tamai K, Fukushima K, Ueno Y, Moritoki Y, Yamagiwa Y, Kanno N, Jefferson DM, Shimosegawa T. Differential expressions of aquaporin proteins in human cholestatic liver diseases. *Hepatol Res* 34:99-103, 2006
- 41) Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* (in press), 2006
- 42) Kadokawa Y, Omagari K, Ohba K, Masuda J, Hazama H, Kinoshita H, Ohnita K, Mizuta Y, Tanioka H, Imanishi T, Kohno S. Does the diagnosis of primary biliary cirrhosis or autoimmune cholangitis depend on the "phase" of the disease? *Liver Int.* 25(2):317-324, 2005
- 43) Omagari K, Kadokawa Y, Nakamura M, Akazawa S, Ohba K, Ohnita K, Masuda J, Ishibashi H, Mizuta Y, Kohno S. IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex are not predictive markers of histopathological progression in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity* (in press), 2006
- 44) Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood.* 106(5): 1565-1573, 2005
- 45) Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S, Yasukawa M, Kanemaru T, Ishibashi H, Shultz LD, Harada M. Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells in vivo. *Stem Cells* 23(9):1409-1416, 2005
- 46) Ishikawa F, Harada M et al. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J* (in press), 2006

- 47) Haruta I, Hashimoto E, Kato Y, Miyakawa H, Shibata N, Kobayashi M, Shiratori K. Intrahepatic biliary epithelial cell damage and inflammation in portal tract in association with chronic colitis-harboring TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> mice. *Hepato Res* (in press), 2006
- 48) Haruta I, Hashimoto E, Kato Y, et al. Lipoteichoic acid may affect the pathogenesis of bile duct damage in primary biliary cirrhosis. *Gut* 54: A12, 2005

## 2. 学会発表 (主なもの)

- 1) Nakamura M, Takii Y, Mori T, Komori A, Yokoyama T et al. Anti-gp210 antibody in combination with anti-centromere antibody may identify PBC patients who are at high risk for end-stage hepatic failure. *AASLD Abstract #678*, November 13, 2005 San Francisco
- 2) Ueno Y, Moritoki Y, Kanno N, Fukushima K, Yamagiwa Y, Kogure T, Tamai K, Shimosegawa T. Randomized double blind control trial of reverse transcriptase inhibitor for treatment of UDCA-resistant PBC. *Digestive Disease Week And 106th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association 2005*, 5.14, Chicago
- 3) Harada K, Isse K, Nakanuma Y. Expression of apoptosis-related molecules and their regulation by pathogen-associated molecular patterns in human intrahepatic biliary epithelial cells. *56th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) San Francisco, USA, 2005*
- 4) Wakatsuki Y, et al. A liver tolerates to a portal antigen by generating CD11c<sup>+</sup> cells which select regulatory CD4<sup>+</sup> T cells via apoptosis. *12<sup>th</sup> International congress of mucosal immunology. (Boston, USA, 2005, 6, 25-30)*

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

(ア)特許取得 出願中 3件

1) 経口的に抗原投与により、肝臓において、免疫調節性リンパ球を誘導する方法、その同定・機能評価方法、および実験肝炎モデルを用いることにより、試料の検定スクリーニングする方法の提供。

①国内特許出願中 特願 2004-307885

②国外特許出願中 PCT/JP2005/019293

2) in vivo で肝臓における脂肪酸の $\beta$ 酸化能を半定量化できる分子 imaging system

①米国仮出願 60/675, 605

②2005428 出願, 本出願準備中

3) 新たな胆管細胞分離法について

(東北大学知的財産部と共同確認中)

(イ)実用新案登録 なし

(ウ)その他 なし

## II. 分担研究報告



自己免疫性肝炎治療の現状と予後に関する調査研究

研究協力者 渡部 幸夫 国立病院機構相模原病院 地域医療・研修部長

**研究要旨：** 国立病院肝疾患政策医療ネットワークにおける自己免疫性肝炎の治療の現状と予後についてアンケート調査による報告である。1998年から自己免疫性肝炎登録を行い計522例が集計された。その中から追跡調査として、治療内容と肝病態の悪化進展や生命予後についてのアンケート調査286例および新規登録131例を中心に解析した。まれな疾患であるAIHの国立病院機構肝疾患ネットワーク参加施設における全国登録集計と予後調査はAIH治療の現状把握をする意味で極めて重要な資料となってきた。

**研究協力者：**

中村陽子 相模原病院 消化器科医師  
三富弘之 相模原病院 研究検査科病理医長  
大黒 学 長崎医療センター 消化器科医長

**A. 研究目的**

自己免疫性肝炎(AIH)は症例数が少なく、一施設では治療と予後の検討は不可能である。私達は、多数の長期治療経過を追える症例が集積できる国立病院機構肝疾患ネットワーク参加施設の協力を得てデータの解析を行ってきており、今回も追加調査及び新規登録を行ったので報告する。

**B. 研究方法**

対象と方法：国立病院機構肝疾患政策医療ネットワーク参加施設（現在26施設）において、1998年から2002年までのAIH第1～第4回新規登録調査までで391例が登録され、2005年の第5回新規登録調査で131症例が追加され、合計522例となった。登録されたAIHの中で追加調査可能な施設には、治療や経過観察等を含めた予後のアンケート調査を依頼した。1回目の予後調査を2002年に行い、ウイルス合併例とPBC症例等を除いた解析対象は265例であった。今回はその265例の追跡調査と新たな追加症例21例を含めた予後調査286例が集計され再度の解析を行った。

（倫理面への配慮）

AIH登録調査は各施設において、書類上で本人同意を得た。過去の診療録(既存資料等)より調査票に基づいて情報を収集する場合で同意書のない場合には、個人情報保護法に基づき既存資料等から抽出加工し連結可能匿名化を行った。

**C. 研究結果及び考察**

1) 第5回新規登録調査

26施設のうち14施設より131症例の新規登録があり、HCV陽性5例とHBV陽性1例のウイルス肝炎合併を除いた125例について解析した。

平均年齢は57.7歳、男女比は1対9.8。肝生検施行例は81.1%であり、所見として肝硬変9例、急性肝炎像10例を含んでいた。急性肝炎型・急性増悪型の発症様式をとっている69例中14例が重症型であり、潜行型発症38例の中で1例亜急性型を認めていることより、発症時に診断、治療が速やかにかつ適切に行われることの重要性が明らかとなっている。主治医の初診時診断でのAIH確診は72例、疑診43例、未記入10例であり、確診例が63%を占めた。AIHスコアでは治療前スコアが16以上または治療後スコアが18以上を確診とすると、スコア上の確診例は59例であり、全体の51.3%を占めていた。AIHスコアが以前より頻用されてはいるが、診断には専門医の判断が重要であり、PBCの合併例ではスコアが減点されること等の問題点が残されていることを示唆するものと考えられる。

治療についてであるが、PSL使用例は85例あり、平均年齢56.9歳、AIHスコアは治療前平均15.8、治療後平均18.4となっている。PSL未使用例は40例であり、UDCA単独34例、無治療2例を含んでいる。40例の平均年齢は59.5歳、AIHスコアは治療前平均13.8、治療後平均13.8となっていて、疑診例が多いためPSLを使用していないとも考えられるが、寛解後再燃2例や肝炎持続14例に関してはPSL使用について再検討を要するかもしれない。

詳細不明の1人を除いたPSL投与84例について初期投与量別に検討した。初期投与量20mg

以下 18 例、30mg32 例、40mg22 例、60mg 以上 12 例の 4 群に分けた。UDCA 併用例は各々 12 例、11 例、8 例、4 例であり、アザチオプリン(AZ)は PSL30mg 群で 1 例、40mg 群で 1 例、60mg 群では 2 例で使用されていた。30mg 群と 40mg 群とを比較すると、初期治療で完全寛解にいたるのは前者で 74.2%、後者で 71.4%であるが、寛解持続は各々 53.3%、64.7%であり、寛解後再燃が前者で 30%、後者で 17.6%となっている。つまり PSL 初期投与量を決める際には肝機能成績等で決定し、初回治療では完全寛解に至る率は 30mg 群も 40mg 群も同じであるが、その後の寛解持続率、寛解後再燃率を見ると 40mg 群の方が望ましいと考えられた。大腿骨頭壊死や糖尿病の副作用等で PSL を多く使い切れない症例もあり難しいところであるが、AZ、CYA 等の免疫抑制剤併用も今後考慮していくべきかもしれない。

## 2) 予後アンケート調査

前回調査までの AIH265 例の背景因子：女性 90.6%、発症時年齢 54.2 歳、経過観察年数は 6.7 年、治療内容では PSL76.5%、AZ、CYA などの免疫抑制剤 5.3%、UDCA59.1% (単独治療例 15%)。予後については、初期診断時慢性肝炎であった 225 例のうち 213 例は慢性肝炎のまま経過したが、12 例(5.3%) が肝硬変に進展した。この 12 例の平均観察期間は 13.1 年で、慢性肝炎の 6.6 年と比較すると長くなっていた。診断当初より肝硬変症例が 38 例あった。最終肝硬変として代償性が 21 例、非代償性が 17 例で、後者が 45%を占めた。劇症肝炎は 2 例存在した。265 例中死亡例が 14 例、肝細胞癌は 5 例(1.9%)に発生した。

今回の 2005 年再予後調査で 286 例が集計された結果、女性 90.9%、初診時年齢 53.4 歳、観察期間 7.6 年。前回の調査と重複する症例もあり、経過観察できていない症例もあり、他院への紹介、診療の自己中断症例もある。追加調査で解析できた 286 例の内訳は慢性肝炎が 244 例、肝硬変が 36 例、劇症肝炎と亜急性肝炎が 3 例、未記入 3 例であった。慢性肝炎から肝硬変に進展した症例は 18 例(7.4%)であった。経過年数が増えるとともに肝硬変への進展が前回調査の 5.3%から 7.4%へと増加している。初診時より肝硬変症例が 36 例あり、最終病態として代償性肝硬変が 20 例、非代償性が 16 例で、後者が 44%を占めた。初診時すでに肝硬変の症例では調査年数が長くなった割には代償性と非代償性の比率には変化はなかったが、肝不全死は増加した。死亡は最終的には 19 例あり、慢性肝炎からの死亡 7 例はすべて他病死であり、肺炎 2、多

臓器不全 1、突然死 2、脳梗塞 1、乳癌 1。肝硬変からは死亡 9 例のうち肝不全死 5、肝癌死 3、脳血管障害 1 であった。他、劇症肝炎 2 と亜急性肝炎 1 が死亡例の原因であった。

調査期間中に慢性肝炎から肝硬変に進展した症例は全部で 18 例あり、その観察期間は 12.3 年と、慢性肝炎にとどまる症例の観察期間 7.6 年に比べて明らかに長期にわたっていた。進展した理由として治療内容に関して検討した。18 例中 15 例に PSL 治療を行っており、その使用頻度は 83%で、慢性肝炎にとどまっている症例の 78%に比べて決して少なくはない。ただ肝硬変に進展した症例では PSL 治療効果が不十分であったり、肝炎持続していたり、AIH に対する治療効果不十分と考えられる症例が多かった。PSL 治療中止の有無に関しては、肝硬変に進展した症例では 22%と多く、慢性肝炎にとどまる症例の 6%と比べて差があるが、肝硬変進展例では有効性の欠如や副作用のために中止せざるを得なかったと思われる症例も散見された。

一方、肝不全死亡例 5 例中 4 例はもともと初診時より肝硬変であった症例であり、1 例は慢性肝炎から肝硬変へ、さらに肝不全に至った症例であった。PSL は 4 例に使用されたが、うち 2 例は寛解状態が得られず、PSL の有効性に問題があった。1 例は副作用のために十分量の PSL 投与ができなかった。1 例は診療を自己中断し、重篤な肝不全状態で再診となった。その他の 1 例では、PSL が使用されず、肝炎が持続して肝不全に至っている。肝不全死に至る原因としては、PSL の有効性と使用量の問題が挙げられる。

全症例の経過中に肝細胞癌が発症した症例は 7 例あり、うち肝癌死は 3 例でいずれも肝硬変症例であった。

## E. 結論

まれな疾患である AIH の国立病院機構肝疾患ネットワーク参加施設における全国登録集計と予後調査は AIH 治療の現状把握をする意味で極めて重要な資料となってきている。

第 5 回新規登録では急性肝炎型・急性増悪型の発症様式をとっている 69 例中 14 例が重症型であり、発症時に診断、治療が速やかにかつ適切に行われることが重要である。AIH スコアが以前より頻用されてはいるが、AIH スコアによる確定診断と臨床診断には差があり、確定診断には専門医の総合的判断が必要である。初回 PSL 治療で完全寛解に至る率は 30mg も 40mg も同じであるが、その後の寛解持続率、寛解後再燃率を見ると 40mg の方が望ましいと考えられ

た。

2005 年予後調査では経過年数が増えるとともに慢性肝炎から肝硬変への進展が前回調査の 5.3%から 7.4%へと増加した。肝硬変に進展した症例では PSL 治療効果が不十分であったり、肝炎持続していたり、AIH に対する治療効果不十分と考えられる症例が多かった。肝硬変からは死亡 9 例のうち肝不全死が 5 例認められ、肝不全死に至る原因としては、PSL の有効性と使用量の問題が挙げられた。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

- 1) 渡部幸夫: 自己免疫性肝炎の予後は治療でどう改善されたか? Medical Practice 23(1): 63-67, 2006

##### **2. 学会発表**

- 1) 中村陽子, 玉眞俊平, 菅野 聡, 安達 献, 渡部幸夫, 大黒 学, 石橋大海: 肝ネットワークにおける自己免疫性肝炎の診断と治療の現状, 共同). 第 59 回国立病院総合医学会. 広島, 2005. 10. 14

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**

なし

国立病院機構施設における原発性胆汁性肝硬変症例のデータベース構築  
－ PBC 患者の再調査 －

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ネットワーク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. 研究目的**

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の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. 研究方法**

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 Survey (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. 研究結果**

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