

症例 (55.7±12.6 歳) で男性 7 症例、女性 23 症例であった。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。杏林大学の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と著明に低下、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。

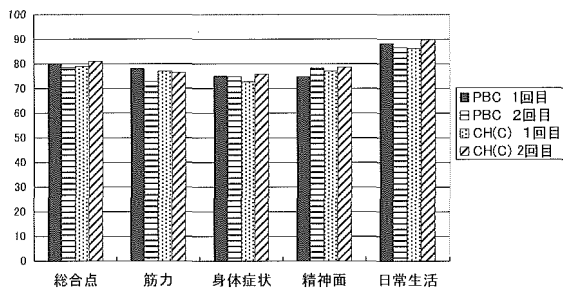


図 1

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。

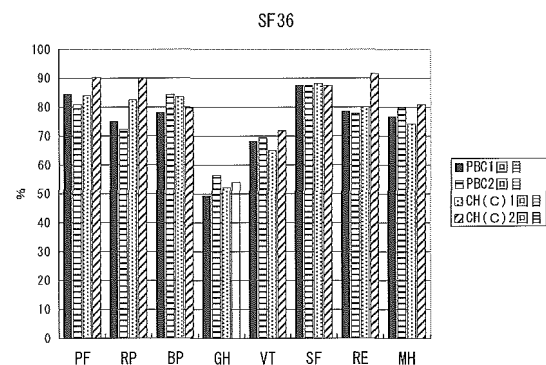


図 2

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 を利用した国立病院機構の医療施設間の L-Net（肝ネット）による登録へと早急に移行し、日常診療の場で随時の症例登録を可能とすることが本データベースの維持、管理の最大の方策と考えられる。

そして、PBC の調査研究のさらなる発展のためには信頼性のあるデータを出来るだけ労力をかけることなく集積するようにするシステムの構築を行うとともに今回試みたように、時間を追って、登録症例に働きかけることによりさらに正確な疾患の把握を行っていくことが必要不可欠となってくる。

#### E. 結論

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た。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。

#### 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(予定を含む。)

なし

## 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

研究協力者 大曲 勝久 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
消化器病態制御学 講師

**研究要旨：** Western blot法でのIgAサブクラス抗2-oxo-acid dehydrogenase complex (2-OADC)抗体と、原発性胆汁性肝硬変(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(stage 1-2では20例中10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(stage 3-4では11例中4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、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。

### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)に対する画期的な治療法の開発には、まず、的確な診断法の確立とこれまでの治療法では進行を抑えることのできない予後不良群の選別が必要である。われわれは前年度までにIgAクラス抗2-OADC抗体はPBCの進展予測因子として有用ではないものの、IgGクラス抗2-OADC抗体に比べ変動する症例が多く、組織がより進行した症例に陽性率が高い傾向にあったことを見だし、反復測定によりPBCの進展を経時的にモニターできる可能性があることを報告した。本年度は、IgA1, IgA2などのIgAサブクラス抗M2抗体について同様の検討を加えた。

### B. 研究方法

1984年から2003年までに国立病院機構長崎医療センターにてPBCと診断され、組織学的進展の有無を確認できた15例(男性3例、女性12例、年齢30-68歳、中央値48歳)を対象とした。全例が、診断時、蛍光抗体間接法あるいはELISA法による抗ミトコンドリア抗体(AMA)が陽性で、経過中2回以上の肝生検を施行され、かつ生検時に近い時期の保存血清が存在した。観察期間は14-129カ月で、中央値は51カ月であった。期間中、組織学的に進展した症例は4例であった。Western blot法はウシ心筋ミトコンドリア抗原を抗原に用い、1次抗体を対象血清、2次抗体としてHRP標識抗ヒトIgA,

IgA1, IgA2, secretory IgAを用いた。発色はECL法を用い、74kDのpyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2)、52kDのE3-binding protein (E3BP)、50kDのbranched-chain oxo-acid dehydrogenase complex (BCOADC-E2)、46kDのoxo-glutarate dehydrogenase complex (OGDC-E2)、および41kDのPDC-E1 $\alpha$ に対する抗体を検出した。

### C. 研究結果

IgA, IgA1, IgA2, secretory IgAクラス抗2-OADC抗体およびIgAクラス抗PDC-E2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(stage 1-2では20例中10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(stage 3-4では11例中4例が陽性)であり、有意に陽性率が高かった( $p=0.0232$ ) (図)。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、組織学的進展度との関連が一部のクラスの抗体で認められたことより、IgAクラスのAMAはPBCの病態に関与している可能性が示唆された。

#### D. 考察

今回の結果で、最も注目されるのは、IgA クラス抗 2-OADC 抗体が stage 3-4 で有意に陽性率が高かったのに対し、IgA1 クラス抗 2-OADC 抗体は逆に stage 1-2 で陽性率が高かったことである。血清中の単量体 IgA の約 90%は IgA1 であることから、上記の結果は同じ傾向を示すはずであるのに、矛盾する結果となった。これが PBC の病態にどのような関連があるのか、さらに検討する必要がある。

#### E. 結論

IgA クラス抗 2-OADC 抗体は PBC の進展予測因子とはなり得なかったものの、組織学的進展度との関連が一部の IgA クラスの抗体で認められたことより、IgA クラスの抗 2-OADC 抗体は PBC の病態に関与してい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) 大曲勝久, 大場一生, 角川淑子他 : 日本人の

PBC 患者はどれくらいいるのか? 消化器の臨床 8 (2):238-244, 2005

2) Kadokawa Y, Omagari K, Ohba K, et al. Does the diagnosis of primary biliary cirrhosis or autoimmune cholangitis depend on the "phase" of the disease? Liver Int 25:317-324, 2005

3) Omagari K, Kadokawa Y, Nakamura M, et al. IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex are not predictive markers of histopathological progression in primary biliary cirrhosis. Autoimmunity (in press)

##### 2. 学会発表

1) 角川淑子, 大曲勝久, 大場一生他 : PBC および AIC 患者における血清学的反応性の経時的变化の検討. 第 41 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2005. 6

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

図 IgA クラス抗 2-OADC 抗体と組織学的ステージとの関連

組織学的ステージ	Stage 1-2 (n=20)	Stage 3-4 (n=11)	p
抗体			
IgA クラス抗 2-OADC 抗体 (+/-)	10 / 10	11 / 0	0.0049
IgA1 クラス抗 2-OADC 抗体 (+/-)	16 / 4	4 / 7	0.0232
IgA2 クラス抗 2-OADC 抗体 (+/-)	16 / 4	6 / 5	0.2175
sIgA クラス抗 2-OADC 抗体 (+/-)	17 / 3	9 / 2	>0.9999
IgA クラス抗 PDC-E2 抗体 (+/-)	10 / 10	9 / 2	0.1284

sIgA: secretory IgA, Stage は Scheuer 分類による。

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—

分担研究者 田中 篤 帝京大学医学部内科学講座 講師

**研究要旨：** 以前より研究者は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）患者の血清のみならず胆汁・唾液中に IgA 型の抗ミトコンドリア抗体（AMA）が検出されることを報告し、IgA 型 AMA が PBC の病態形成に関与している可能性を報告してきた。今年度の本研究では 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る。今後これらの自己抗体の有無によって組織学的進展度を予測しうる可能性をさらに検討していく予定である。

#### A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（Primary biliary cirrhosis; PBC）患者の血清には高率に抗ミトコンドリア抗体（Anti-mitochondrial antibody; AMA）が検出され、診断の上できわめて有力なツールとなっている。しかしその一方で、AMA の抗体価と組織学的進展には相関がないことが知られており、AMA が病態形成に果たしている役割は明らかでない。われわれは以前より、IgA 型の AMA が血清のみならず胆汁や唾液、尿などの外分泌される体液中に検出されることを報告し、AMA の中でもことに IgA 型の AMA が PBC の病態形成に関与している可能性を報告してきた。今年度の研究では、組織学的に確認された PBC 患者の血清・唾液中の IgA 型 AMA の有無ないしその力価と、PBC の組織学的進展度との関連について検討し、IgA 型 AMA が PBC の病態形成において果たしている役割についてより詳細な知見を得ることを目的とした。

#### B. 研究方法

厚生省「難治性の肝疾患調査研究班」による PBC 診断基準（2004 年改訂）を満たす PBC 患者 54 例を対象とした。全例診断時に肝生検を施行され、Scheuer 分類により組織学的進展度が決定されている。これらの症例から informed consent を得たのち、肝生検時に採取し $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存された血清、および直近の外来受診

時に採取し同じく凍結保存した唾液を検体として用いた。AMA の検出は、ブタ心筋ミトコンドリア分画を抗原とした SDS-PAGE、およびイムノブロットを用いた。AMA の力価はイムノブロットによって見られたバンドの濃淡の半定量によって行った。統計学的解析は t 検定、および Mann-Whitney の U 検定を用いた。

#### C. 研究結果

対象となった PBC 患者は 54 例（男性 3 例、女性 51 例、平均年齢  $55.9 \pm 9.5$  歳）であった。血清中の IgA 型 AMA は 54 例中 43 例で検出された（80%）が、IgA 型 AMA の存在と Scheuer 分類による staging との間に相関はみられなかった（ $p=0.1296$ ）。しかし AMA 中の抗 PDC-E2 抗体に限定すると、血清中 IgA 型抗 PDC-E2 抗体は 53 例中 37 例に認められ、staging とよく相関し、stage III ないし IV の進行例でより高頻度に認められた（ $p=0.0124$ ）。IgA 型抗 PDC-E2 抗体を半定量した結果もやはり staging との間に相関が認められた（ $p=0.0481$ ）。一方、唾液中 IgA 型 AMA は検討しえた 26 例中 12 例で検出され、これも血清同様全 AMA では staging との相関はなかったが、抗 PDC-E2 抗体に限ると強い相関があり、stage I では唾液中 IgA 型抗 PDC-E2 抗体はまったく認められなかったが、stage III、IV の進行例では全例に存在した（ $p=0.0002$ ）。

#### D. 考察

以上の結果は、IgA 型 AMA、なかでも IgA 型抗 PDC-E2 抗体の存在が PBC の肝病変の進展と強く関連していることを示している。興味深いのは血清よりも唾液中の IgA 型抗 PDC-E2 抗体の方がより強く関連していることである。われわれは以前より粘膜面に分泌される IgA 型 AMA が PBC の病態形成と関連している可能性を報告してきたが、今回の結果はその可能性を裏付けるものと思われる。しかし、本研究の目的は PBC の診断当初に今後の進行についての予後予測を行うことにあり、その点から考えると今回の研究の結果だけでは予後予測に十分な結果とは言えない。今後、stage I ないし II と診断された症例でかつ血清・唾液中に IgA 型抗 PDC-E2 抗体が検出される症例を集積し、経過観察を行っていくことが必要であると考えている。

#### E. 結論

PBC 患者において、肝病変の組織学的進展度と血清・唾液中 IgA 型抗 PDC-E2 抗体の存在とは極めて強い相関を示した。これは IgA 型抗 PDC-E2 抗体が肝病変の形成に何らかの形で関連していることを示すものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 根津佐江子, 田中 篤, 奥山周平, 中村一久, 松岡弘泰, 浅葉宣之, 佐藤悦久, 川村直弘, 中島洋, 滝川一, 高橋信一: 血中、および唾液・尿中の IgA 型 AMA と原発性胆汁性肝硬変の進展度との関連. 第 9 回日本肝臓学会大会, 神戸. 2005. 10. 6

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

進行 PBC 症例における MRP 発現と胆管障害について

研究協力者 恒吉 正澄 九州大学大学院医学研究院形態機能病理学 教授

研究要旨： 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。本年は移植摘出肝 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。結果は 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、胆汁うっ滞と関連した。1-2) また 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 50um 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見られた。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。

共同研究者：

相島 慎一 国家公務員共済組合連合会  
浜の町病院病理

A. 研究目的

肝細胞には膜輸送蛋白として類洞側に MRP1, MRP3 が毛細胆管側に MRP2 が発現しており、UDCA 投与により毛細胆管側の MRP2 発現が増すことが報告され、PBC の進行とともに MDR1, MDR3, MRP3 の発現が高くなるといわれている。

また進行した PBC で残存している胆管のレベルと分布については詳細な検討はなされていない。

B. 研究方法

前回示したように移植例を線維化のタイプによって、Non-cirrhotic type (Non-LC), Macronodular type LC (Macro-LC), Mixed nodular type LC (Mixed LC), Micronodular type LC (Micro-LC) に分類した。1) PBC 移植摘出 26 例の代表的切片について MRP1, MRP2, MRP3 の免疫組織化学的染色を行った。2) 残存胆管を胆管外径によって <50um, 50~100um, 100~300um に分けて、それぞれの胆管数をカウント表面積あたりの胆管密度を測定した。それぞれについて臨床病理学的な検討を行った。

C. 研究結果

1-1) MRP1 は肝細胞細胞質に陽性で発現強度により 2 群に、MRP2, MRP3 は細胞膜に陽性であり発現している領域によってそれぞれ 2 群に分類した。MRP1-L (low level) は 10 例、MRP-H (high level) が 16 例、MRP2-L は 7 例 MRP2-H

が 19 例、MRP3-L は 17 例、MRP3-H が 9 例であった。

1-2) MRP2 蛋白発現は術前の T-bil 値が高く、組織学的な胆汁うっ滞の所見も高度であった。また MRP3 発現は macronodular type の肝硬変で高いが、micronodular type, mixed nodular type の肝硬変では低かった。

2-1) 胆管障害のレベルについての検討では、残存胆管密度は Macro-LC で高いのに対し Mixed LC や Micro-LC で低く、いずれの胆管レベルでも同様の傾向であった。特に 50um 以下の胆管レベルにおいて Macro-LC と Micro-LC は明らかな胆管密度の差がみられた。また、肝硬変に至っていない Non-LC でも胆管消失が高度にみられた (Table 1)。

2-2) 全肝を用いた胆管障害の heterogeneity の検討では、PBC で傷害されやすい 100um 以下の胆管はいずれの区域でも消失が高度であり、偏った障害のされ方は認めなかった。しかし広範な胆管脱落の領域を直径 2cm 以下と定義して検討すると、これらの高度消失領域は後区域に多くみられた。

D. 考察

1) 進行した PBC の約 7 割以上において通常は毛細胆管側のみ発現のみられる MRP2 は他の細胞膜にも発現し、胆汁うっ滞と関連することから、胆汁うっ滞による発現誘導の可能性がある。また 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) 胆管障害の程度によって進行した時の肝

が示唆された。

2)胆管障害の程度によって進行した時の肝硬変の型、つまり再生結節の大きさと線維化の状態が決まる可能性がある。特に50 $\mu$ m以下のより小さい胆管障害に左右されることが示された。また、胆管の消失はいずれの肝区域でも満遍なくおこりうるが、特に後区域ではその程度が強い症例が多く見られた。この理由に関しては不明である。

#### E. 結論

肝細胞膜の輸送蛋白の発現は胆汁うっ滞や

線維化に深く関与している。また小型胆管消失の程度は肝硬変の型に関わることが示された。

#### 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（予定を含む。）

なし

Table 1 Comparison between remnant bile ducts and fibrotic pattern

	No. of remnant bile duct / cm2 of liver section		
	<50um/cm2	50~100um/cm2	>100um/cm2
Fibrotic pattern			
Non-LC (n=4)	0.411 +/- 0.355	0.732 +/- 0.277	0.908 +/- 0.347
Macro-LC (n=4)	0.692 +/- 0.481	0.736 +/- 0.135	0.971 +/- 0.419
Mixed LC (n=6)	0.243 +/- 0.223	0.603 +/- 0.306	0.889 +/- 0.560
Micro-LC (n=12)	0.192 +/- 0.151	0.570 +/- 0.262	0.844 +/- 0.353



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

分担研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨：** 原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎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 法による原発性胆汁性肝硬変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。

#### A. 研究目的

難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)の病態解析に包括的な遺伝子解析(ゲノミクス)の手法を導入する。その結果にもとづいて、自己免疫性肝疾患の病態診断や治療の選択に寄与する診断法の開発を行う基盤研究を行う。

#### B. 研究方法

本研究は3年計画で行う。本年度は、さらに病変における発現遺伝子の変化を詳細に検討するため、浸潤あるいは集簇したリンパ球および周辺の肝細胞や胆管細胞における遺伝子の発現を明らかにする。これを達成するため、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)によるサンプル採取を行い、病理所見と対比して発現遺伝子プロファイルを解析する。また病初期に加え、進行する時期にあって発現している遺伝子のプロファイルを解析する。SAGE 解析を行うためにサンプル調整を開始し、PBCの詳細なプロファイリングを行う。

#### C. 研究結果

病態診断や治療の選択に寄与する分子(群)をより正確に同定するため、LCMを用いて CNSDC 領域あるいはリンパ球の集簇領域を選択的に採取した。PBCのStage I症例においてはリンパ球から monokine induced by  $\gamma$  interferon, TNF receptor superfamiky, Interleukin 7 といった免疫反応の発現亢進がみられ、それに対応するように肝細胞から Zink finger protein PLIZF,

cadherin, HGF activator の発現亢進がみられた。Stage IIIと比較すると interferon  $\gamma$ , interleukin 6 receptor, Interleukin 7, 11 の発現が亢進していた。C型慢性肝炎にみられた浸潤リンパ球における比較でも、同様に interferon  $\gamma$ , Interleukin 6 receptor Interleukin 7, 11 の亢進が明らかであった。病期が進行するに従い、種々の免疫反応や細胞増殖、線維化にかかわる遺伝子など多彩な変化がみられるようになった。

PBCの発現遺伝子プロファイルを SAGE 法にて解析した。正常肝組織とは勿論、B型およびC型慢性肝炎のプロファイルとは明らかに異なるプロファイルが得られデータベース化した。

#### D. 考察

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。とりわけ interferon  $\gamma$ , interleukin 6 receptor, Interleukin 7, 11 の初期における変化が異なっており、この変化は進行するとみられなくなり末期の変化はC型慢性肝炎と同様であったことは興味深い結果であった。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。

#### E. 結論

難治性自己免疫性肝疾患である PBC および自己免疫性肝炎の病態解析に包括的な遺伝子解析 (ゲノミクス) の手法を導入し、新たな診断および治療法の開発に重要な分子群を同定した。SAGE 法を含めたこれらのデータは重要な意義をもっていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

- 1) M Honda, H Kawai, Y Shiota, T Yamashita, T Takamura and S Kaneko. cDNA microarray analysis of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and consecutive disease manifestation. J Autoimmun (in press)
- 2) H Tsuji, K Hiramatsu, H Minato, S Kaneko and Y Nakanuma. 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):371-7, 2005.
- 3) M Honda, H Kawai, Y Shiota, T Yamashita, and S Kaneko. Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. Am J Gastroenterol 100(9):2019-2030, 2005.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

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

分担研究者 西原 利治 高知大学医学部・消化器病態学 助教授

**研究要旨：** マーカーを用いて UDCA 抵抗性例の同定が可能となれば、PBC 治療に益するところである。そこで UDCA 抵抗性を示した症例につき胆管あるいは肝細胞における PPAR- $\alpha$  を介するシグナルの活性化の程度を系統的に検討した。本年度は分子 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。

### A. 研究目的

PBC は自己免疫性疾患であるため、当初、免疫抑制剤が第一選択と考えられ、胆管の障害が限定的な症例では胆管病変進行の抑制といった好ましい効果が確認された。しかし、本症は閉経後の中年女性に好発する疾患であり、胆管障害の結果として胆汁の消化管への排泄量が減少するためビタミンDなどの脂溶性ビタミンの吸収が低下する骨粗鬆症を来しやすい疾患背景も存在する。このため、長期に亙るプレドニンを中心とした免疫抑制剤の使用は、糖尿病のみならず骨粗鬆症による骨折といった重篤な合併症を高率に引き起こすので禁忌とされ、治療法の開発が急務であった。

利胆作用を有する ursodeoxycholic acid (UDCA) は胆管系酵素、例えば ALP や  $\gamma$ -GTP を低減させる効果があるため、今日では本症に対する世界の標準治療と見なされている。UDCA 療法により多くの症例で臨床的効果が得られるものの、一部の症例では改善が小幅に留まり、治療抵抗性を示す症例も観察される。このような症例の多くでは、fibrate 系薬剤の併用で著効が得られることも、近年、明らかにされ、さしもの難治性疾患においても、一步一步予後の改善が進んでいるとの実感を得るに至っている。

そこで、本年度の研究事業では、UDCA 抵抗性を示した症例につき胆管あるいは肝細胞における PPAR- $\alpha$  を介するシグナルの活性化の程度を系統的に検討し、bezafibrate に抵抗性を示す PBC に特徴的な遺伝子座を特定できた。

### B. 研究方法

分子 imaging system は Bezafibrate が PPAR- $\alpha$  の ligand であることを念頭に、bezafibrate 治

療によって生じる肝臓の機能変化を非観血的に体外計測する方法である。肝臓は肝細胞、胆管上皮細胞、血管内皮細胞、間質細胞のみならず、血液細胞由来の Kuffer 細胞をはじめとする細胞からなる集合体であり、構成する細胞相互間で密な signaling が行われている。このため、Bezafibrate 抵抗性の肝臓では PPAR- $\alpha$  の signal 伝達に何らかの機能低下が存在している可能性が想定され、われわれは PBC に対する bezafibrate 治療の有用性の発見を契機として、PPAR- $\alpha$  signaling pathway の差が治療反応性を規定しているのではないかと考えるに至った。

PPAR- $\alpha$  は多機能性 transcription factor であり、肝細胞の脂肪酸  $\beta$  酸化に関連する一群の遺伝子の転写を促進するのみならず、肝細胞における transporter 機能を亢進させたり、局所における抗炎症作用など高次機能をも誘導する因子である。そこで今回は、PBC における PPAR- $\alpha$  の活性化の度合いを検討する目的で、保険収載の検査法を用いて 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 を開発し、bezafibrate 抵抗性の予知におけるその機能評価の有用性を検討した。即ち、 $^{131}\text{I}$  で標識した長鎖脂肪酸アナログを静脈内投与した後、経時的に肝臓への脂肪酸の取り込みと減衰速度を計測し、肝臓における脂肪酸  $\beta$  酸化能の半定量化を行い、PPAR- $\alpha$  signalling の指標とした。このような指標を用いて、この形質を規定する遺伝子座の特定に成功した。

### C. 研究結果

標識した長鎖脂肪酸アナログ投与 1 分後には、標識された長鎖脂肪酸アナログはすでに心腔内

に滞留して5分後には、血中の標識された長鎖脂肪酸アナログ量は激減した。肝臓における血中の標識された長鎖脂肪酸アナログの取り込みは3-5分を極値として、以後脂肪酸の $\beta$ 酸化による消費を反映して漸減した。投与後5-30分ではすべての症例で、減衰曲線は直線で近似できた。そこで、この部分のデータを用いて、長鎖脂肪酸アナログの減衰速度を検討したところ、0.2-1.1%/分に分布し、その内の3症例は0.2-0.4%/分と極めて低値を示した。

UDCA 投与では長鎖脂肪酸アナログの代謝速度の改善は得られず、前値と同一の再現性のある検査値を得ることができた。他方、PPAR- $\alpha$  の ligand である bezafibrate を投与すると、長鎖脂肪酸アナログの代謝速度の改善と共に、脂肪肝も明らかな改善を示した。

#### D. 考察

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。この system の開発を受けて、高知大学知的財産本部は国際特許を申請中である。この技術は標識化合物を置換するだけで、他の標的臓器における in vivo での機能評価を可能にする汎用性の高い技術であり、評価に値すると自負している。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。従来、この検査はたくさんの症例に行われ、検査の安全性は保証されているが、今回提唱した理論に基づくデータ収集は従来行われておらず、健常者を含む基礎データの収集が本検査法の PBC における有用性を確立する上で課題となる。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M Fukumoto, M Ono, H Masuda, Y Ogawa, Y Nemoto, S Onishi, T Saibara. In vivo imaging of fatty acid metabolism in the liver: using semiquantitative  $^{123}\text{I}$ -BMIPP liver scan.

Hepatol Res (in press)

#### 2. 学会発表

- 1) Fukumoto, Et al. Molecular imaging of hepatic fatty acid beta-oxidation in vivo. 3rd Japan Society of Hepatology Single Topic Conference, 2004
- 2) T. Saibara, M. Fukumoto, Y. Ogawa, M. Ono, S. Onishi International Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Live Pathophysiology Molecular imaging of fatty acid beta-oxidation in vivo in the liver of patients with nonalcoholic steatohepatitis, 2005
- 3) 小野正文, 増田弘誠, 西原利治: 分子標的イメージングを用いた肝臓の機能解析. 第47回日本消化器病学会大会, シンポジウム. 神戸, 2005. 10. 5-7

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 1件  
米国仮出願 60/675, 605  
2005. 4. 28 出願, 本出願準備中.

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

分担研究者 中村 稔 国立病院機構長崎医療センター 先端技術研究部長

**研究要旨：** 国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期間経過観察されている原発性胆汁性肝硬変患者の昨年度までの臨床研究で、核膜孔蛋白(gp210)に対する自己抗体の出現、持続が、肝不全への進展と正の相関があることが明らかとなった。本年度は、原発性胆汁性肝硬変の進展における 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（ウイルス肝炎、自己免疫性肝炎）に比し有意に上昇していた。また、原発性胆汁性肝硬変における gp210 蛋白の発現は、門脈炎や interface hepatitis の強さと相関していた。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、肝不全に進行する原発性胆汁性肝硬変の特徴と考えられた。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。今後は、これらのマーカーの臨床的意義の確認とこれらを分子標的とした治療法の開発研究が必要と思われる。

#### A. 研究目的

近年、診断法（AMA）や治療法（ウルソデオキシコール酸）の普及により、長期間の経過観察でもほとんど進行を認めない無症候性の原発性胆汁性肝硬変症例が増加傾向にある。しかし、未だ約 10 - 20%の症例は、肝硬変や肝不全に進行する予後不良群であり、これらの症例の早期診断と画期的治療法の開発は、難治性疾患克服研究事業の重要な課題と思われる。

我々は、昨年度の研究で、国立病院機構肝疾患共同研究グループで長期経過観察が可能であった原発性胆汁性肝硬変症例の解析から、核膜孔蛋白(gp210)に対する自己抗体が持続陽性の症例は、抗体が陰性あるいは陰性化した症例に比べ肝不全に進行する頻度が有意に高いことを見出し、抗 gp210 抗体が原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測に有用な血清マーカーであることを見出した。

そこで本年度は、原発性胆汁性肝硬変の病態の進展における gp210 蛋白と抗 gp210 抗体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。

また、抗 gp210 抗体が持続陰性でも肝不全に至る症例が存在する（肝不全に至った症例の約 20%）ことから、これらの症例における新たな予後予測マーカーの探索も行った。

#### B. 研究方法

対象は、当院で過去 23 年間に肝針生検を施行された原発性胆汁性肝硬変のうち、AMA 陰性症例と自己免疫性肝炎合併症例を除外した 52 症例（男 7、女 45、年齢 35-84、median57）。Gp210 に対するモノクローナル抗体は、gp210-C 末ペプチド(SSPTSPNALPPARKASPPSGLW SPAYASH)をマウスに免疫して作製した。免疫染色はパラフィン包埋切片を用いて行い、胆管細胞の核膜の染色強度から、陰性(0)、弱陽性(1)、陽性(2)、強陽性(3)とスコアリングした。疾患コントロールとして、自己免疫性肝炎 19 症例、慢性 C 型肝炎 40 症例、慢性 B 型肝炎 20 症例の肝生検組織を用いた。

新たな血清マーカーの探索は、HEp2 細胞を用いた間接蛍光抗体法、HepG2 細胞ライセートを用いたイムノブロット法で行い、centromere A&B, SP100, M2(MIT3)に対する抗体は、ペプチドあるいはリコンビナント蛋白を用いた ELISA 法(INOVA)で測定した。

#### C. 研究結果

5 個以上の小型胆管を含み胆管の評価が可能であった肝生検標本は、原発性胆汁性肝硬変 73 標本(52 症例)、自己免疫性肝炎 24 標本(19 症例)、慢性 C 型肝炎 40 標本(40 症例)、慢性

B型肝炎 20 標本 (20 症例) であった。胆管細胞の gp210 免疫染色スコアは、0, 1, 2, 3 が順に、原発性胆汁性肝硬変 1, 9, 36, 27 標本、自己免疫性肝炎 10, 3, 7, 3 標本、慢性 C 型肝炎 25, 9, 6, 0 標本、慢性 B 型肝炎 18, 2, 0, 0 標本であった。原発性胆汁性肝硬変における gp210 免疫染色スコアは自己免疫性肝炎、慢性 C 型肝炎、慢性 B 型肝炎に比べ有意に増加していた。また、gp210 免疫染色スコアと門脈の炎症、interface hepatitis、lobular inflammation、血清 ALP 値との間に有意な相関を認めた。一方、gp210 免疫染色スコアと Scheuer's stage や gp210 抗体の有無との間には相関を認めなかった。

また、新たな予後予測マーカーの候補として、centromere 抗体、SP100 抗体、新規の p80 蛋白に対する抗体が同定された。

#### D. 考案

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、原発性胆汁性肝硬変症例の中で、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、原発性胆汁性肝硬変の肝局所での 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。

小型胆管上皮細胞での gp210 蛋白の発現増加に伴う何らかの抗原提示の異常や molecular mimicry を介する自己反応性 T 細胞の活性化を介して、抗 gp210 抗体が産生されるものと我々は推定している。さらには、gp210 蛋白に対する自己免疫応答が出現、持続する症例が肝不全に進行することから、gp210 蛋白は胆管細胞障害の標的抗原になっている可能性がある。今後は、gp210 蛋白を分子標的とした治療法の開発研究が必要と思われる。

一方、gp210 蛋白以外にも、原発性胆汁性肝硬変の病態の進展と関連した標的抗原が存在する可能性があり、その探索も開始した。今回同定した候補蛋白の予後予測マーカーとしての臨床的意義を、国立病院機構肝疾患共同研究グループに登録されている原発性胆汁性肝硬変症例で確認するとともに、これらを分子標的とした治療法の開発研究も必要になるものと思われる。

#### E. 結論

胆管周囲の炎症に伴い胆管上皮細胞の 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、肝不全に進行する原発性胆汁性肝硬変の特徴と考えられた。今後は、gp210 蛋白以外の予後予測マーカーの探索を含めて、原発性胆汁性肝硬変の進展に関与する分子標的の同定とそれに対する画期的治療法の開発が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, et al: 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*, 2006 (in press)
- 2) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T et al: Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmunity* 26:138-145, 2006
- 3) Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A et al: Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab. Invest* 85:908-920, 2005
- 4) 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*, 42:386-392, 2005
- 5) Wang A-P, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M et al: Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmunity* 25:85-91, 2005
- 6) Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A et al: Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases. *Hepatology* 41:151-159, 2005
- 7) 中村 稔, 瀧井 康, 伊東正博, 小森敦正, 右田清志, 大黒 学, 八橋 弘, 石橋大海: 原発性胆

- 汁性肝硬変における肝病変の局所遺伝子発現の解析. 消化器と免疫 42, 2006 (in press)
- 8) 中村 稔:原発性胆汁性肝硬変における抗核膜(gp210)抗体の意義. 日本臨床免疫学会会誌 28(3):117-122, 2005
- 9) 中村 稔:原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測因子. 国立病院機構長崎医療センター医学雑誌 8:1-4, 2005
- 10) 中村 稔, 上平幸史, 下田慎治, 石橋大海:潜在的免疫組織としての肝内胆管系. 肝胆膵 51(4):517-522, 2005
- 11) 小森敦正, 中村 稔, 石橋大海:原発性胆汁性肝硬変/原発性硬化性胆管炎. 肝疾患と免疫, 各務伸一編. 医薬ジャーナル社 133-140, 2005

## 2. 学会発表

- 1) 中村 稔, 森 剛志, 瀧井 康, 伊東正博, 小森敦正, 横山照史, 松山睦美, 小藪真紀子, 右田清志, 大黒 学, 八橋 弘, 下田慎治, 石橋大海:原発性胆汁性肝硬変における抗核膜抗体の産生機序. 第 35 回日本免疫学会総会, 横浜. 2005. 12. 13
- 2) Terufumi Yokoyama, Atsumasa Komori, Minoru Nakamura, Yasushi Takii, Takashi Kamihira, Tsuyoshi Mori, Shinsuke Fujiwara, Makiko Koyabu, Hiroshi Yatsuhashi, Hiromi Ishibashi. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kB and -MAPK signaling pathways. 第 28 回日本分子生物学会, 福岡. 2005. 12. 7
- 3) 中村 稔, 森 剛志, 瀧井 康, 小藪真紀子, 横山照史, 小森敦正, 右田清志, 大黒 学, 八橋 弘, 石橋大海:抗 gp210 抗体と抗セントロメア抗体の組み合わせによる原発性胆汁性肝硬変の高リスク群の同定. 第 33 回日本臨床免疫学会総会, 京都. 2005. 10. 28
- 4) 中村 稔, 瀧井 康, 伊東正博, 小森敦正, 横山照史, 森 剛志, 小藪真紀子, 松山睦美, 上平幸史, 阿比留正剛, 大黒 学, 松本武浩, 右田清志, 八橋 弘, 石橋大海:原発性胆汁性肝硬変における肝病変の局所遺伝子発現の解析, シンポジウム II 慢性肝疾患の病態にせまる免疫学的アプローチ. 第 42 回日本消化器免疫学会, 東京. 2005. 8. 4
- 5) 中村 稔, 瀧井 康, 小森敦正, 横山照史, 伊東正博, 大黒 学, 阿比留正剛, 上平幸史, 長岡進矢, 大畑一幸, 楠本浩一郎, 矢野公士, 松本武浩, 藤岡ひかる, 右田清志, 吉田由紀, 下田慎治, 八橋 弘, 石橋大海:原発性胆汁性肝硬変における gp210 蛋白の発現の解析. 第 41 回日本肝臓学会総会, 大阪. 2005. 6. 16
- 6) 瀧井 康, 中村 稔, 伊東正博, 小森敦正, 横山照史, 中尾瑠美子, 楠本浩一郎, 長岡進矢, 大畑一幸, 矢野公士, 阿比留正剛, 松本武浩, 大黒 学, 右田清志, 藤岡ひかる, 八橋 弘, 原田実根, 石橋大海:原発性胆汁性肝硬変における Toll-like receptor と type1 IFN についての解析. 第 41 回日本肝臓学会総会, 大阪. 2005. 6. 16
- 7) 小森敦正, 横山照史, 瀧井 康, 上平幸史, 下田慎治, 中村 稔, 藤岡ひかる, 石橋大海:培養ヒト肝内胆管細胞における遺伝子発現パターンの多用性. 第 41 回日本肝臓学会総会, 2005. 6. 17, 大阪
- 8) Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Shimoda S et al. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. AASLD Abstract #683, November 13, 2005. San Francisco
- 9) 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

To11 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

分担研究者 市田 隆文 順天堂大学医学部附属静岡病院・消化器内科 教授

**研究要旨：**原発性胆汁性肝硬変（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 To11 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）、lipopolysaccharide（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。その様な TLR リガンド刺激による炎症性サイトカイン高産生について検討した今年度の研究により、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。以上の結果より、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。

**共同研究者：**

山際 訓, 本田 穰  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
消化器内科学

**A. 研究目的**

昨年度までに行った原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態における自然免疫応答の検討により、PBC 進行に NKT 細胞を中心とした自然免疫応答の活性化が関与している可能性とともに、無症候性 PBC（aPBC）症例の末梢血単核球は To11 様レセプター（TLR）を介した刺激に対して健常人と比較して高い活性化を示すことを報告している。TLR は自然免疫系における微生物病原体構成成分の認識に関与し、TLR による活性化の結果、炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 など）や補助機能分子（CD40、CD80、CD86 など）の発現が誘導される。今年度は、aPBC 症例に認められた TLR を介した刺激に対する高活性化に関して、その原因の解明とともに、症候性 PBC（sPBC）症例における反応性の相違を検討し、最終的に自然免疫応答の制御が PBC 進展を抑制する治療法となりうるかどうか検討することを目的とした。

**B. 研究方法**

1. 対象

2004 年 4 月より 2005 年 12 月の間に新潟大学医歯学総合病院を受診された無症候性 PBC（aPBC）30 例、症候性 PBC（sPBC）6 例、ウイルス性肝炎 8 例と健常人 20 例を対象とした。

2. 方法

十分なインフォームドコンセントにより文書による同意を得た後、末梢血より単核球（PBMC）を Ficoll-Paque による比重遠心法にて分離した。CD14 陽性細胞における TLR2、TLR4 発現とともに活性化マーカーである CD83 などを FACS により解析するとともに、TLR mRNA とそのアダプター分子である MyD88 mRNA については real-time PCR 法により定量した。また、培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70 を cytometric beads array（CBA）により測定し、活性化した NF- $\kappa$ B を測定するため、核抽出分画における NF- $\kappa$ B p65 を ELISA により測定した。これらを分離直後の単核球および血清中と、TLR2、4 のリガンドである peptidoglycan（PGN）、lipopolysaccharide（LPS）にて刺激後の単核球および培養上清を用いて検討した。



### C. 研究結果

#### 1. FACSによるTLRおよび活性化マーカー発現

aPBC症例の末梢血中CD14陽性細胞におけるTLR2発現は、無刺激の状態で健常人と比べて有意に高かったが、TLR4発現は健常人と有意な変化は認められなかった。TLR4はLPS刺激後早期にinternalizationによると思われる発現低下を認めるが、aPBC症例ではLPS刺激後の発現が健常人と比較して有意に高かった。しかしTLR2発現はPGNおよびLPS刺激によっても発現に有意な変化は認めなかった(図1)。

CD14細胞におけるCD83発現は、LPS、PGN刺激により健常人およびウイルス性肝炎症例と比較して有意に増強が認められた(図2)。

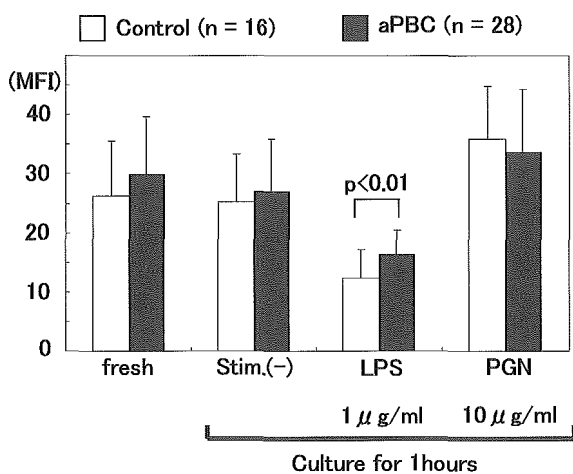


図1. 末梢血CD14陽性細胞におけるLPS、PGN刺激前後でのTLR4発現。

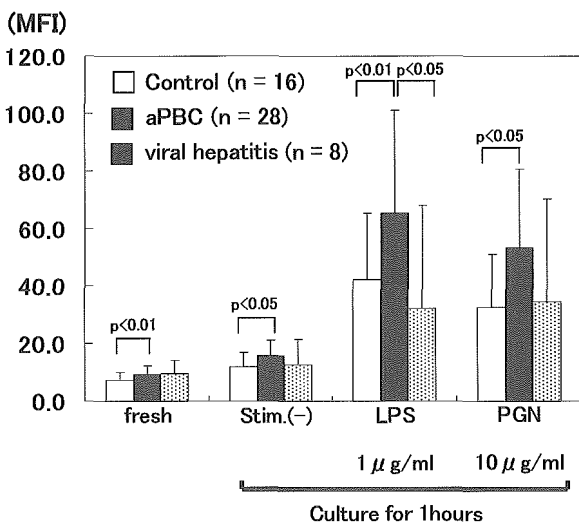


図2. 末梢血CD14陽性細胞におけるLPS、PGN刺激前後でのCD83発現。

#### 2. TLRとMyD88 mRNA定量

TLR2 mRNAは健常人と比較して有意な変化は認められなかったが、TLR4 mRNAはLPSで刺激後に健常人よりも有意に発現が高くなった。MyD88 mRNAはLPS刺激後に健常人と比べ有意に高発現となり、PGN刺激でも高い傾向が認められた(図3)。

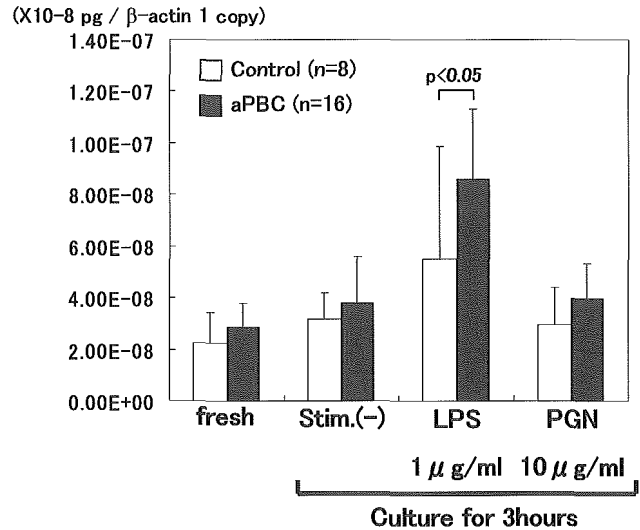


図3. 末梢血単核球のLPS、PGN刺激によるMyD88 mRNA定量。

### D. 考察

TLRはそのリガンドによる活性化の結果、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12など)や補助機能分子(CD40、CD80、CD86など)の発現が誘導される。aPBC末梢血単核球は分離直後の無刺激の状態ですでに活性化マーカーの発現やNF- $\kappa$ B p65が高値を示し、活性化状態にあると考えられたが、PGN、LPS刺激後のサイトカイン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。同様の結果は、Maoらによっても報告されており(*Hepatology* 2005; 42(4): 802.)、彼らは我々が検討したTLR2とTLR4以外のTLRを介した刺激に対する反応性も、PBC症例では高いことを報告しているが、その原因については明らかとなっていない。本研究の結果からは、aPBC症例ではTLR自体の発現が健常人よりも高い可能性と、刺激後のMyD88 mRNAが有意に高いことから、TLRとそのアダプター分子の発現の違いが、刺激後の高活性化に関与している可能性が示唆される。しかしながら、TLRからのシグナル伝達にはその抑制分子も含めて種々の分子が報告されており、aPBC症例で認

められた高活性化の原因については更に検討が必要と考えられる。現在、TLR を介したシグナル伝達経路、特に MyD88 に加えてシグナル伝達を阻害する IL-1R-associated kinase (IRAK) などとともに LPS の反応性に関与する分子群について検討を行っており、今後、TLR 刺激に対する高反応性の機序を解明することにより、それを標的とした新規の治療法の開発につながる可能性があると考えている。本年度に目標としていた sPBC 症例、特に s1-PBC 症例の検討は症例数が少なく十分行えなかったため、更に検討したい。

抗ミトコンドリア抗体 (AMA) は PBC にきわめて特異性の高い自己抗体であるが、臨床像・血液生化学検査・肝組織からは PBC が強く疑われるにも関わらず AMA 陰性例が存在する。そのような AMA 陰性 PBC でも IgM の高値は認めることが多いが、Kikuchi らはそのような高 IgM 血症と TLR9 との関連を示唆するデータを報告している。彼らは PBC 症例の末梢血単核球を TLR9 のリガンドである CpG-B で刺激することにより、CD27 陽性メモリー B 細胞における IgM 高産生を認め、また、メモリー B 細胞における TLR9 発現はナイーブ B 細胞よりも高いことを示している。無刺激な状態では、末梢血中の CD27 陽性 IgM 陽性 B 細胞の頻度と B 細胞における TLR9 発現は PBC と健常人とで差が見られないものの、PBC 症例では CpG-B 刺激により TLR9 の発現と IgM 産生が有意に高くなることから、PBC 症例における高 IgM 血症は長期間の細菌感染に伴う細菌 DNA による TLR9 刺激が原因である可能性が示唆されている (*Gastroenterology* 2005; 128: 304-312.)。PBC では aPBC 症例でもエンドトキシン血症が認められるという報告もあり、腸管滅菌などによるエンドトキシン血症の改善を含めて TLR を介した自然免疫系の活性化を抑制することが、PBC 進行を抑制する治療になりうるかどうか、また、TLR を介した刺激に対して高反応となる機序の解明とその制御を目指したいと考えている。

## E. 結論

aPBC 症例では TLR2、4 リガンド刺激に対し、CD14 陽性細胞の活性化が有意に高く、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、aPBC 症例における TLR リガンド刺激による高活性化の原因の更なる解明と、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。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoneyama H and Ichida T: Recruitment of dendritic cells to pathological niches in inflamed liver. *Med Molecular Morphol* 2005, 38(3):136-144
- 2) 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* 2005, 20(7):1126-30
- 3) 山際 訓, 本田 穰, 高村昌昭, 松田康伸, 市田隆文: Toll-like receptors: PBC 病態形成への関与. *肝胆膵* 2005, 51(4): 565-572

### 2. 学会発表

- 1) 本田 穰, 山際 訓, 青柳 豊, 松田康伸, 石本結子, 高村昌昭, 野本 実, 市田隆文: 原発性胆汁性肝硬変における Toll 様レセプターを介した単核球活性化の検討. 第 41 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2005. 6. 17

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

## 原発性胆汁性肝硬変における PPAR $\alpha$ の発現

分担研究者 伊東 正博 国立病院機構長崎医療センター 研究検査部長

**研究要旨：** PPAR $\alpha$ には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、抗アポトーシス作用があることが知られている。ウルソ抵抗性 PBC 症例には PPAR $\alpha$  のリガンドであるフィブレート系の薬剤が選択される場合が多い。本研究ではフィブレート系の薬剤選択の理論的根拠を検討する目的で、PBC における PPAR $\alpha$  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。**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のみみられなかった。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。考察：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。今後、進行した PBC 症例の治療薬としてフィブレート系の薬剤をはじめ、安定的に蓄積した PPAR $\alpha$  を効率的に活性化する分子・製剤の開発が期待される。

### A. 研究目的

PBC には無症候性症例と進行性症例が存在し、進行性症例にはウルソ抵抗性で肝不全や肝移植が必要になる症例が散見される。ウルソ抵抗性症例には PPAR $\alpha$  のリガンドであるフィブレート系の薬剤が選択される場合が多く、PPAR $\alpha$ には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用などが知られている。本研究ではフィブレート系の薬剤選択の理論的根拠を検討する目的で、PBC における PPAR $\alpha$  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。

### B. 研究方法

#### ①組織学的解析

本院において過去生検がなされた PBC 122 症例の形態学的な再評価を行い、進行例、非進行例に分けて各群での病理学的な特徴を解析した。進行度分類は Scheuer 分類を採用し、実質炎、piecemeal necrosis (interface hepatitis)、線維化、銅沈着、肉芽腫形成、胆管消失などをスコア化し判定量的な解析を 2 名の病理医、肝臓専門医で施行した。

#### ②免疫組織化学

パラフィン包埋切片を用い PPAR $\alpha$ 、catalase、CK7、Tol4、Ubiquitin、HSP90 $\alpha$  の発現を PBC、

CHC、CHB、AIH、正常肝で比較検討した。培養細胞を用い PPAR $\alpha$ 、catalase の発現を検討した。

③レーザーマイクロダイセクション (LCM) による mRNA 解析

PBC 症例の新鮮凍結検体からレーザーマイクロダイセクション (LCM) で門脈息と実質域に分けて検体を分離採取し、totalRNA を抽出。リアルタイム PCR で PPAR $\alpha$  mRNA を定量化。対象に CHC、AIH 症例をおいた。

#### ④培養細胞レベルでの機能解析

胎児肝から樹立した Primary Human Hepatocyte (PHH)、胆管細胞由来の BEC を用い、LTB4、Bezafibrate 添加による細胞増殖能、PPAR $\alpha$  の発現、catalase 発現を検討した。

### C. 研究結果

①PPAR $\alpha$  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のみみられなかった。他の慢性肝疾患に比し PBC では PPAR $\alpha$  の膜、細胞質発現は高かった。肝細胞内 catalase 発現は PBC の進行症例で低下していた。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。

②LCM の結果、mRNA レベルでも PPAR $\alpha$  の発現

は亢進していた。PPAR $\alpha$ 発現は慢性ウイルス性肝炎やAIHに比し亢進していた。

③PHHの培養実験で、PPAR $\alpha$ は培養早期には分裂、増殖する細胞の核内発現のみがみられた。48時間培養で索状配列を呈してくると核のみならず細胞質にも発現がみられた。Bezafibrate添加群でPPAR $\alpha$ の発現は亢進し、細胞増殖効果も有意に認められた。Catalase発現はBezafibrate添加群で有意に亢進していた。

#### D. 考察

PPAR $\alpha$ には脂質代謝改善作用、抗炎症作用、細胞増殖作用、抗アポトーシス作用があることが知られている。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 $\alpha$ はリガンド刺激や自己リン酸化で核親和性が亢進しレチノイドX受容体とdimerを形成し、プロモーター領域のPPREに作用しさまざまな酵素類の転写を調節している。PBCではPPAR $\alpha$ の発現は亢進しているが、核内で転写促進には至っていない。PPAR $\alpha$ が間細胞内で分解されずに安定化している原因に核内移行抑制や分解抑制に関する分子の検討を行ったところ、核内移行抑制に作用するHSP90 $\alpha$ の発現増強、蛋白分解を司るubiquitin蛋白の異常蓄積が観察された。進行したPBCのPPAR $\alpha$ の発現は亢進状態にfibrate製剤を投与すると、PPAR $\alpha$ の核内移行が誘導され、様々な生理作用が連鎖しPBCの炎症反応が抑制されることが推察された。肝細胞培養実験でBezafibrateによるPPAR $\alpha$ の核内発現、細胞増殖、catalase発現亢進が確認され、進行したPBC症例ではBezafibrateの効果が得られやすい状態にあると推察された。CatalaseはPPAR $\alpha$ により誘導された $\beta$ 酸化により産生された過剰な過酸化水素を分解する役割を担っている。過酸化水素は脂肪酸やアルコールなどの $\beta$ 酸化を効率的に行うのに重用な分子であるが、過剰の過酸化水素は細胞毒として存在し、星細胞を活性化し線維化を促進することが知られている。進行したPBC症例では肝細胞内catalaseが低下しており、Bezafibrateの一つの効果にcatalase発現亢進を介する線維化抑制が挙げられる。さらにBezafibrateによる細胞増殖作用は傷害部位の肝細胞再生を誘導していることが推察される。

#### E. 結論

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。今後、進行したPBC症例の治療薬として安定的に蓄積したPPAR $\alpha$ を効率的に活性化する分子・製剤の開発が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ito M, Ishibashi H. Interobserver variation in assessing small bile duct lesions in PBC, CVH, and AIH. *J Gastroenterol*, 2005;40:223-224
- 2) 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 Hepatol*, 2005;42:386-392
- 3) 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*, 2005;85:908-920

##### 2. 学会発表

- 1) 瀧井 康, 中村 稔, 伊東正博, 横山照史, 吉田由紀, 小森敦正, 右田清志, 植木俊仁, 大黒学, 八橋 弘, 原田実根, 石橋大海: LCMを用いたPBCのサイトカインとToll-like receptor(TLR)遺伝子解析. 第93回日本病理学総会, 札幌. 2004. 6. 9-11
- 2) 瀧井 康, 中村 稔, 伊東正博, 小森敦正, 右田清志, 藤岡ひかる, 八橋 弘, 原田実根, 石橋大海: 肝生検組織を用いた原発性胆汁性肝硬変(PBC)におけるToll-like receptors(TRLs)とtype 1 IFNについての解析. 第94回日本病理学会総会, パシフィコ横浜. 2005. 4. 14-16
- 3) Nakamura M, Takii Y, Mori T, Komori A, Yokoyama T, Ito M, 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, November13, 2005, SF, USA

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし