

2. 学会発表

- 1) 阿部雅則, 恩地森一: 原発性胆汁性肝硬変の治療と予後 第44回日本肝臓学会総会シンポジウム, 松山, 2008.
- 2) Abe M, Azemoto Y, Murata Y, et al. Clinical profile of primary biliary cirrhosis complicated with portal hypertension at the onset of symptoms. The 7th JSH single topic conference. 福岡, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

IV-2. 原発性胆汁性肝硬変分科会

10. 原発性胆汁性肝硬変 全国調査 (第29報)
関西医科大学 内科学第三講座 廣原 淳子
11. 臨床調査個人票と全国疫学調査結果の比較
札幌医科大学 公衆衛生学教室 森 満
12. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測のためのバイオマーカーの同定
国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 石橋 大海
13. NOD C3 C4マウスにおける胆管障害について
東北大学病院 消化器内科 上野 義之
14. PBC 肝臓における CX3CL1の産生
九州大学大学院医学系研究院臨床医学部門 病態修復内科学 下田 慎治
15. PBC 患者における膜トランスポーターの発現
福岡大学医学部 消化器内科 向坂彰太郎
16. PBC における MDR3の発現意義
国立病院機構九州医療センター 消化器科 中牟田 誠
17. PBC における脂質代謝の検討(2): ステロールのメタボローム解析による病態の評価
東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科 松崎 靖司
18. 原発性胆汁性肝硬変におけるエストロゲン代謝
高知大学医学部 消化器科 西原 利治
19. PBC の胆管破壊の免疫学的機序: エストロゲンの関与
金沢大学医薬保健研究域医学系 形態機能病理学 中沼 安二

20. PBC の病態形成に関わる自然免疫異常の研究
帝京大学医学部附属病院溝口病院 第四内科 宮川 浩
21. ① PSC の全国調査
② PBC 患者の疲労度・QOL の国際比較
帝京大学医学部 内科 滝川 一
22. 原発性硬化性胆管炎に対する生体部分肝移植
東京大学大学院医学系研究科 臓器病態外科学 國土 典宏
23. 難治性肝疾患に対する肝移植後長期成績
京都大学医学部附属病院 臓器移植医療部 江川 裕人
24. 肝移植後原発性胆汁性肝硬変再発の機序解明
九州大学大学院 消化器・総合外科学 前原 喜彦

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 全国調査（第29報）

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学 内科学第三講座 講師

研究要旨：本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査の長期追跡症例の検討により、本邦におけるPBCの実態と予後の変遷を明らかにすることにある。今回はPBC全国調査（第1～13回）登録例における性差による病像と予後の相違について検討した。診断年次推移において男女比は1:6.9と変化なかった。男性例は診断時年齢が比較的高齢で無症候性の占める割合がやや多い傾向にあった。診断時に合併する自己免疫疾患は女性例に多く、悪性腫瘍の合併は男性例に多い。予後解析では、5年生存率は男性91.3%、女性92.3%、10年生存率は各々80.7%、85.0%であり、男性例群は女性例群に比較してやや予後不良の傾向にあり、HCC累積発癌率はPBC診断後20年で男性20.1%、女性5.6%と男性に有意に高率であった。

共同研究者

仲野 俊成 関西医科大学大学情報センター医療情報部
關 壽人 関西医科大学 内科学第三講座
岡崎 和一 関西医科大学 内科学第三講座

A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis, PBC）の全国調査は1980年より実施され、その集計・解析を継続して行なってきた。病態に自己免疫機序の関与する疾患の多くは女性に好発し、PBCも同様であることはよく知られた事実である。今回は全国調査結果をもとに本邦PBCにおける性差による病像および予後の相違について検討した。

B. 方法

1. 研究方法

全国480施設の登録施設に対し2007年2月に実施した第13回PBC全国調査登録症例6676例中、データ充足例6650例（平均観察期77.5ヶ月）を対象とした。なお、経過中に肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）を発症した例についての解析では診断時あるいは経過観察時においてHCC発生に関する情報が確認されており診断時にはHCCの合併のない症例（平均観察期間81.5ヶ月）3003例を対象とした。なお、B型、C型肝炎ウイルス感染例は解析対象から除外した。生存率はKaplan-Meier法により解析し、統計学的解析にはSAS JMP Ver.5を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2. 個人情報の管理

「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省告示第2号、平成14年6月17日付け）告示以降の本研究にあたっては同告示を遵守し、「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（厚生労働省、平成16年12月24日付け）に則り、研究グループ外に個人情報管理者を設置することを含めた厳格な個人情報管理システムを構築し、研究対象とした登録症例の個人情報漏洩等について十分な配慮を行った。第13回調査はこの個人情報管理シ

ステム構築後に実施された調査である。

C. 研究結果

1. 基礎統計における性差

- 1) 診断年次別発生数と男女比の推移（図1）：登録例では男性839例、女性5811例であり、男女の比率は約1:6.9であった。診断年次推移でも調査開始時から男女比に大きな変化はない。
- 2) 臨床病期別にみた診断時年齢分布（図2）：男女とも好発年齢は50歳台であり診断時平均年齢は男性58.4±11.7歳、女性55.1歳±11.1歳であった。なお診断時病期では症候性PBC（symptomatic PBC；s-PBC）の占める割合は男性26.6%、女性29.8%であった。
- 3) 自己免疫疾患の合併（表1）：診断時の主な自己免疫疾患の合併頻度はいずれも女性が有意に高かった。
- 4) 悪性腫瘍の合併：診断時に合併する悪性腫瘍は、男性では799例中54例、6.8%、女性では5428例中149例、2.7%であった。その内訳と頻度は図3に示すごとくで、HCCの合併は男性33%、女性23%であった。
- 5) 予後：死亡例数と死因を表2に生存率を図4に示す。男女とも肝不全と消化管出血が主たる死因であった。肝細胞癌による癌死は男性4.2%、女性1.5%であった。男女における5年生存率は男性91.3%、女性92.3%、10年生存率は各々80.7%、85.0%であった。

2. HCC発症症例の検討

- 1) 解析対象となった3003例（男性365例、女性2638例）中、経過中にHCCが発生した症例は男性15例、女性38例、計53例であった。累積発癌率はPBC診断後10年で男性5.0%、女性1.9%、20年では男性20.1%、女性5.6%と有意差（ $p < 0.0001$ ）が認められた（図3）。
- 2) 診断時組織学的病期（Scheuer分類I～IV期）をHCC非発生群と発生群について男女別に比較検討した結果を図6に示す。HCC非発生群では

Ⅲ+Ⅳ期の占める割合が男性13%、女性15%と性差は認められなかった。一方HCC発生群ではⅢ+Ⅳ期の占める割合が男性18%に対し女性51%と明らかな有意差 ($p<0.05$) が認められ、女性の発癌例は男性に比較して有意に診断時組織学的進行例の占める割合が多かった。

D. 考察

自己免疫性疾患は一般的に女性に多い傾向があり、PBCでもその頻度においては明らかな性差がある。病態や臨床経過には大きな相違は認められないとされているが、自己免疫性疾患の合併率は女性で高いとの報告があり、PBC全国調査登録症例においても同様の結果であった。

PBCではHCCの発生は稀とされてきたが、全国調査における登録例においても肝細胞癌合併例の報告が集積されつつある。既に我々は診断時HCC合併例に関して(第26, 27報)、経過中HCCを発症した症例について(第28報)解析結果を報告してきた。これまでの累積発癌率の検討では診断時組織学的病期進展に伴って発癌率が上昇するという結果が得られている。今回の性差に着目した検討からは、累積発癌率は男性に高率であることまた、女性例に関しては組織学的病期の進展とともに発癌の危険性が高まるが男性例では必ずしもあてはまらないことが示された。男性では発癌率が高く死因として癌死が多い傾向にあることが生命予後に影響を及ぼしている可能性が示唆される。このような性差の生じる機序としては外的要因や性ホルモンなどの因子が想定されているが、不明の点が多く今後の課題である。

E. 結論

PBC全国調査(第1~13回)登録例における性差による病像と予後の相違について検討した。診断年次推移において男女比率(男女比=1:6.9)に変化は認められなかった。男性例は診断時年齢が比較的高齢で無症候性の占める割合がやや多い傾向にあった。診断時に合併する自己免疫疾患は女性例に多く、悪性腫瘍の合併は男性例に多い。予後解析では、5年生存率は男性91.3%、女性92.3%、10年生存率は各々80.7%、85.0%であり、男性例群は女性例群に比較してやや予後不良の傾向にあり、HCC累積発癌率はPBC診断後20年で男性20.1%、女性5.6%と男性に有意に高率であった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 廣原淳子, 仲野俊成, 關壽人, 岡崎和一: 原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis, PBC). 井村裕夫他編, 文光堂(東京), わかりやすい内科学(第3版), pp645-649, 2008

2. 学会発表

- 1) 廣原淳子, 仲野俊成, 大西三朗: 合併する自己免疫疾患別にみた原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病態の相違-PBC全国調査結果から-, ワークショップ3. 多臓器病変を呈する消化器疾患, 第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008
- 2) 廣原淳子, 仲野俊成, 大西三朗: 原発性胆汁性肝硬変における性差による病態と予後の相違-PBC全国調査結果から-, パネルディスカッション4性差からみた消化器疾患の病態と予後, 第50回日本消化器病学会大会, 東京, 2008

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

図1 診断年次別発生数と男女比の推移

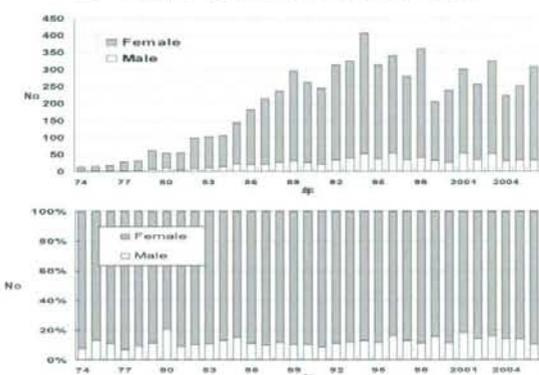


図2 臨床病期別にみた診断時年齢分布

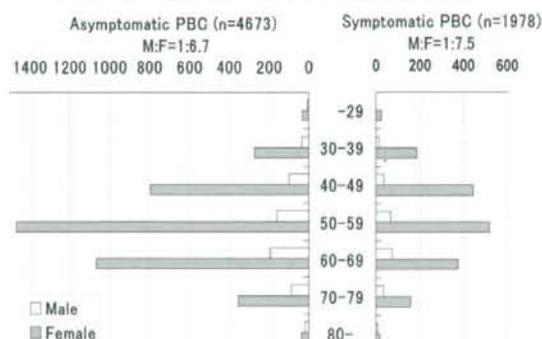


表1 診断時自己免疫疾患の合併

(記載のあった6207例中)

	Male(799)	Female(5428)	Total
Sjogren症候群	31 (4.0)	767 (14.1)	798
橋本病	29 (3.7)	370 (6.8)	399
関節リウマチ	8 (1.0)	220 (4.1)	228
Raynaud現象	3 (0.4)	185 (3.4)	188
強皮症	8 (1.0)	139 (2.6)	147
	78 (10.0)	1397 (25.7)	1475

(): %

図3 診断時悪性腫瘍の合併

(203/6207例, 3.3%)

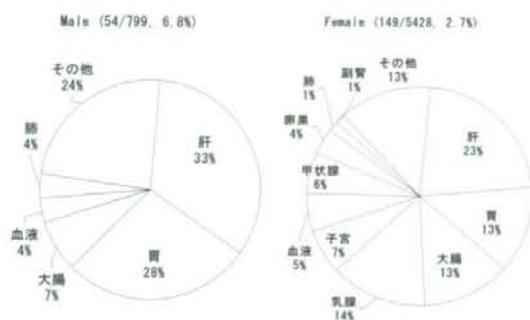


表2 予後 (不明を除く5252例)

	Male	Female	Total
生存中	483	3637	4120
死亡	166	863	1029
肝不全	66 (39.8)	481 (55.7)	547
消化管出血	26 (15.7)	112 (13.0)	138
肝不全+消化管出血	2 (1.2)	11 (1.3)	13
肝細胞癌	7 (4.2)	13 (1.5)	20
その他	65 (39.2)	246 (28.5)	311
肝移植	8	94	103

(): 死亡例における比率

図4 男女別生存率

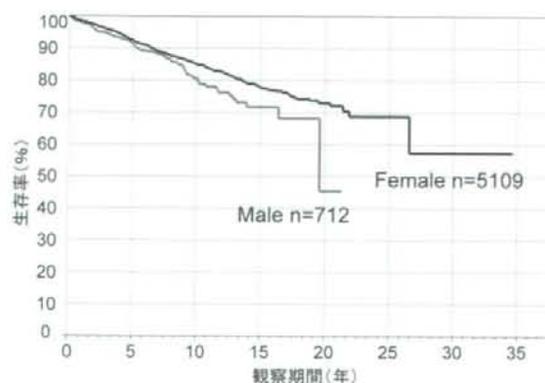


図5 肝細胞癌累積発癌率

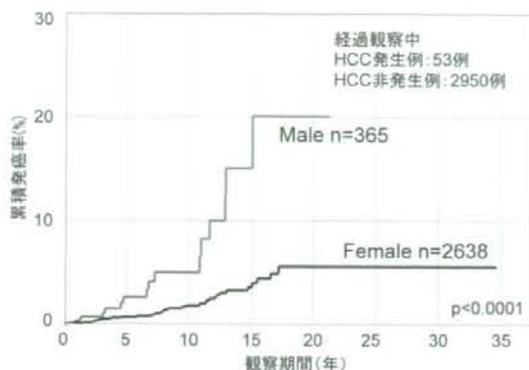
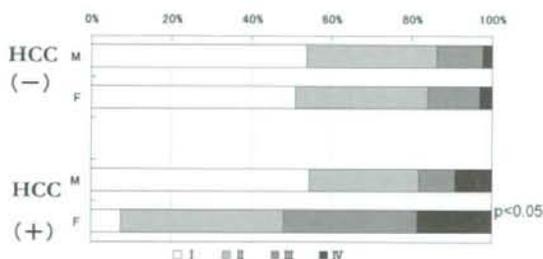


図6 肝細胞癌発癌群・非発癌群における男女別診断時組織学的の病期 (Scheuer分類)



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

臨床調査個人票と全国疫学調査結果の比較

研究協力者 森 満 札幌医科大学 公衆衛生学 教授

研究要旨：2005年度の臨床調査個人票のデータが電子ファイルにある6,877人のうち、2005年の検査成績を有する5,828人と、2005年に行われたPBC全国疫学調査の2次調査対象者1,115人中、症候性PBCであった341人を集計解析した。

結果：両者には、男女比と平均年齢に有意な差は見られなかった。しかし、全国疫学調査の症例は総ビリルビン値が高く、肝不全兆候を有する者の割合が多かった。

A. 研究目的

特定疾患治療研究事業の対象疾患では、臨床調査個人票に症例の基本的属性および臨床所見が記載されている。そして、今日では厚生労働省に申請することにより、電子ファイル化された入力済みデータを利用することができる。一方、特定疾患対策として、臨床班と疫学班が協力して全国疫学調査が行われており、原発性胆汁性肝硬変（PBC）に関しては2005年（平成17年）に実施されている。しかし、臨床調査個人票のデータと全国疫学調査結果が比較される機会は少ない。そこで、今回は、臨床調査個人票と全国疫学調査で得られたPBC症例のデータを比較検討することを試みた。

B. 研究方法

対象：2005年度（平成17年度）の臨床調査個人票のデータが電子ファイルにある6,877人のうち、2005年の検査成績を有する5,828人と、2005年5月に行われたPBC全国疫学調査の2次調査対象者1,115人中、症候性PBCであった341人を集計解析した。

方法：臨床調査個人票中の症例と全国疫学調査の2次調査対象者について性別、年齢、自覚症状、臨床検査成績、受療状況を比較した。

（倫理面への配慮）厚生労働省から提供されたデータのみを使用した。

C. 研究結果

1. 性別：臨床調査個人票（個人票）と全国疫学調査（全国調査）について男女比に差は認められなかった（以下表参照）。
2. 年齢：両者について全体および男女の平均年齢に差は認められなかった。
3. 検査成績：総ビリルビンは全国調査のほうが高値であったが、総コレステロールとアルブミン値に差は認められなかった。
4. 肝不全兆候：腹水、肝性脳症は全国調査のほうに多く認められた。
5. 受療状況：個人票では「主に通院」が多く、全国調査では「通院と入院」が多かった。

D. 考察

個人票データと全国調査を比較した結果、男女比と平均年齢に有意な差は見られなかった。しかし、全国調査の症例は総ビリルビン値が高く、肝不全兆候を有する者の割合が多かった。その理由として、全国調査の2次調査では、大学病院など専門性が高い施設のやや重症な症例が多く報告されたためと推測される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

大浦麻絵：全国疫学調査による難治性の肝疾患の日本の患者推定。肝胆膵 54：425-430, 2007.

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案 なし

3. その他 なし

表 臨床調査個人票と全国疫学調査結果の比較

	個人票	全国調査	P value
性別：%	n = 5,826	n = 303	
男性	12.3	9.3	
女性	87.7	90.7	
男：女	1:7.1	1:9.8	0.12 ^a
平均年齢：歳			
全体	n = 5,403	n = 339	
平均値±標準偏差	62.4±10.9	61.9±10.4	0.39 ^b
男性	n = 678	n = 31	
平均値±標準偏差	63.5±11.7	63.7±11.2	0.90 ^b
女性	n = 4,725	n = 301	
平均値±標準偏差	62.2±10.7	61.9±10.3	0.55 ^b
検査成績			
総ビリルビンmg/dl	n = 5,659	n = 330	
中央値 (25パーセンタイル, 75パーセンタイル)	0.63 (0.5, 0.9)	0.70 (0.5, 1.0)	<0.01 ^c **
総コレステロールmg/dl	n = 5,270	n = 295	
中央値 (25パーセンタイル, 75パーセンタイル)	197 (171, 222)	200 (174, 224)	0.16 ^c
アルブミンg/dl	n = 5,058	n = 321	
中央値 (25パーセンタイル, 75パーセンタイル)	4.1 (3.8, 4.4)	4.1 (3.7, 4.4)	0.38 ^c
肝不全兆候：人 (%)			
腹水あり	n = 5,751	n = 314	
212 (3.7)	32 (10.2)	<0.01 ^a **	
肝性脳症あり	n = 5,756	n = 314	
137 (2.4)	18 (5.7)	<0.01 ^a **	
最近1年間の受診状況：%			
主に通院	n = 5,826	n = 337	
入院と通院	92.1	86.9	<0.01 ^a **
主に入院	25	95	
不明他	0.9	1.2	
4.6	2.4		

a: χ^2 検定

b: Student t 検定

c: U 検定

**: 有意水準1%未満

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の長期予後予測のためのバイオマーカーの同定

研究分担者 石橋 大海 長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) には、長期間経過を観察してもほとんど進行しない症例 (予後良好群) から、黄疸、肝硬変、肝不全へ進行し肝移植以外に救命方法がない症例 (予後不良群) までさまざまな重症度の症例が存在する。しかし、PBC の発症早期に、これらの予後良好群と不良群を鑑別するために有用なバイオマーカーは知られていなかった。我々は、国立病院機構肝疾患共同研究グループ (NHOSLJ) による多施設共同研究を行い、昨年度までに抗 gp210 抗体と抗セントロメア抗体の測定が、PBC の病型分類や予後予測に有用であることを報告してきた。今年度は、原発性胆汁性肝硬変の進行を規定している遺伝的素因を明らかにするために、遺伝子多型の多施設共同研究を開始し、黄疸型進行に関与する multidrug resistance protein 3 (MDR3) 遺伝子多型を見出した。

共同研究者

中村 稔 長崎医療センター臨床研究センター
小森 敦正 長崎医療センター臨床研究センター
右田 清志 長崎医療センター臨床研究センター

A. 研究目的

PBC の予後予測に有用な遺伝子バイオマーカーを同定する。

B. 研究方法

国立病院機構肝疾患共同研究グループ (24施設) を組織し、PBC の予後予測に有用な遺伝子バイオマーカーを同定することを目的として多施設共同研究を開始した。PBC の患者登録、定期的血清保存、DNA 採取は、各参加施設の倫理審査委員会による承認後、患者から書面で同意を得た後に行った。血清中の抗 gp210 抗体、抗セントロメア抗体は、長崎医療センター臨床研究センターで一括して測定し、遺伝子解析は、長崎大学医歯薬学総合研究科薬物治療学講座との共同研究で行った。

C. 研究結果

① MDR3 rs31658 SNP の T allele が C allele に比べて、黄疸型進行の強い危険因子 (OR : 5.33, 95% CI : 1.98, 14.36) であることが明らかとなった。② MDR3 rs31658, rs31672, rs1149222 を組み合わせたハプロタイプ解析では、HAP1 (C-T-T) が黄疸型進行の最も低リスク群 (OR : 0.32, 95% CI : 0.11, 0.92), HAP2 (T-C-G) が黄疸型進行の最も高リスク群 (OR : 3.93, 95% CI : 1.56, 9.90) であった。③ デイプロタイプ解析では、HAP1/HAP1 が最も低リスク群で黄疸型進行症例は一例もなく、HAP2/HAP2 が最も高リスク群 (OR : 17.73, 95% CI : 3.77, 83.42) であった。④ 抗 gp210 抗体が黄疸型進行の危険因子 (OR : 11.05, 95% CI : 2.49, 66.73) であり、抗セントロメア抗体が非黄疸型進行の危険因子 (OR : 3.13, 95% CI : 1.10, 9.46) であることも gp210 working group 参加施設による多施設共同研究で確認された。

D. 考察

以上のことから、抗 gp210 抗体、抗セントロメア抗体の測定に加えて MDR3 遺伝子の一塩基多型を調べることは、PBC の予後予測、特に黄疸型進行の予測に有用であることが示唆された。今後は、症例数を増やしてこれらのデータの再現性を検証するとともに、PBC の予後に関する新しい血清および遺伝子バイオマーカーを同定する必要がある。

E. 結論

MDR3 遺伝子多型は、PBC の予後予測、特に黄疸型進行群の同定に有用な血清バイオマーカーであることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura M, Funami K, Komori A, Yokoyama T, Aiba A et al: Increased expression of toll-like-receptor 3 in intrahepatic biliary epithelial cells at sites of ductular reaction in diseased livers. *Hepatology International* 2008; 2:222-230
- 2) Ohishi Y, Nakamura M, Iio N, Higa S, Inayoshi M et al: Single-nucleotide polymorphism analysis of the multidrug resistance protein 3 gene for the detection of clinical progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2008; 48:853-62.
- 3) Shimoda S, Harada K, Niuro H, Yoshizumi T, Soejima Y et al: Biliary epithelial cells and primary biliary cirrhosis: the role of liver-infiltrating mononuclear cells. *Hepatology* 2008; 47:958-65.
- 4) Shimoda S, Miyakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K et al: CD4 T-cell

autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 31: 110-115, 2008.

- 5) Nakamura M, Ohishi Y, Iio N, Aiba Y, Komori A et al: Identification of serological and genetic biomarkers for predicting the prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC). -A homozygous "Hap2/Hap2" diplotype in multidrug resistance protein 3 (MDR3) gene confers a strong susceptibility to jaundice-type progression of PBC- *Hepatology*, Volume 48, Number 4 (Suppl), October 2008, 597A, 650.
- 6) Shimoda S, Miakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K et al: Redefining AMA negative primary biliary cirrhosis: CD4 T cell autoreactivity to the dominant mitochondrial autoantigen PDC-E2. *Hepatology*, Volume 48, Number 4 (Suppl), October 2008, 603A, 663.
- 7) Komori A, Uemura T, Fujiwara S, Aiba Y, Nakamura M et al: Osteopontin, A Putative Marker for Ductular Reaction is Induced by JAK/STAT3 Activation in Human Biliary Epithelial Cells. *J. Hepatology*, Volume 48, Number 2 (Suppl), April 2008, S173, 456.
- 8) 中村稔, 下田慎治, 小森敦正, 石橋大海, <クリニカル・トピックス>原発性胆汁性肝硬変における抗 gp210抗体の臨床的意義, *BIO Clinica* 23 (12): 1136-1143, 2008.
- 9) 石橋大海, 中村稔, 下田慎治. 原発性胆汁性肝硬変の病因と予後, 第4章: 非ウイルス性肝障害, 肝疾患 Review 2008-2009, 日本メディカルセンター, 75-81, 2008.6.10
- 10) 石橋大海, 下田慎治, 中村稔. 免疫学的機序 - 原発性胆汁性肝硬変の病態と免疫機序, PBC, PSC と肝移植 <第4回伊豆肝臓カンファレンス記録>, 市田隆文編, アークメディア, 東京, 55-64, 2008.6.19

2. 学会発表

- 1) Nakamura M, Ohishi Y, Iio N, Aiba Y, Komori A et al: Identification of serological and genetic biomarkers for predicting the prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC). -A homozygous "Hap2/Hap2" diplotype in multidrug resistance protein 3 (MDR3) gene confers a strong susceptibility to jaundice-type progression of PBC- The 59th Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), San Francisco, 2008.10.31-11.4.
- 2) Komori A, Uemura T, Fujiwara S, Aiba Y, Nakamura M et al: OSTEOPONTIN, A PUTATIVE MARKER FOR DUCTULAR REACTION, IS INDUCED BY JAK/STAT3 ACTIVATION IN HUMAN BILIARY

EPITHELIAL CELLS. The 43rd Annual Meeting of the European Association For the Study of the Liver, Milan, Italy, 2008.

- 3) Shimoda S, Miakawa H, Nakamura M, Ishibashi H, Kikuchi K et al: Redefining AMA negative primary biliary cirrhosis: CD4 T cell autoreactivity to the dominant mitochondrial autoantigen PDC-E2. The 59th Annual meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), San Francisco, 2008.10.31-11.4.
- 4) 中村稔, 大石裕樹, 相葉佳洋, 小森敦正, 右田清志, 八橋弘, 竿代丈夫, 中牟田誠, 本田浩一, 島田昌明, 小林正和, 渡部幸夫, 林茂樹, 古賀満明, 森本日出雄, 正木尚彦, 近藤久義, 大曲勝久, 安波道郎, 塚元和弘, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の予後予測診断法の確立. 第44回日本肝臓学会 総会, 松山, 2008. 6. 5-6. 肝臓49巻 2008, suppl. (1), A184, O-115.
- 5) 小森敦正, 植村隆, 藤原神祐, 相葉佳洋, 中村稔, 矢野公士, 藤岡ひかる, 右田清志, 八橋弘, 石橋大海: 培養ヒト肝内胆管上皮細胞の急性相反応からみた遺伝子発現の可能性. 一般演題, セッション60: 胆管・胆汁うっ滞2, 第44回日本肝臓学会総会, 愛媛, 2008.6.5-6. 肝臓 49 Suppl. (1): A235, 2008. 04. 30

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

NOD C3 C4マウスにおける胆管障害について

研究協力者 上野 義之 東北大学病院 講師

研究要旨: 原発性胆汁性肝硬変におけるレトロウイルス感染症の関与が提唱されているが、その実態は不明である。抗ミトコンドリア抗体産生と胆管病変を認める NOD C3C4マウスは、病変を NOD-SCID マウスに transfer するなど感染症の要素も併せ持つため、このマウスモデルと、ヒト PBC における内因性レトロウイルス由来遺伝子の検索を行った。その結果、雌の NOD C3C4マウス肝臓より内因性レトロウイルス遺伝子断片が検出された。今後、さらにこの内因性遺伝子の機能解析を行う必要がある。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の原因は不詳であり、遺伝的要因ともに、環境要因が示唆されている。環境要因には細菌、xenobiotics、ウイルス等が候補として想定されている。原発性胆汁性肝硬変におけるレトロウイルス感染症の関与が提唱されているが、その実態は不明である。とりわけ、原因ウイルスとして Mouse Mammary tumor virus が PBC で報告されているが、これを否定する意見も強い。一方、抗ミトコンドリア抗体産生と胆管病変を認める NOD C3C4マウスは、病変を NOD-SCID マウスに transfer するなど感染症の要素も併せ持つため、このマウスモデルと、ヒト PBC における内因性レトロウイルス由来遺伝子の検索を行った。

B. 研究方法

ヒト PBC 末梢血と肝組織、また、NOD C3C4マウス末梢血、リンパ球、各種組織より型のごとく RNA の抽出を行い、既報のプライマーセットを用いて RT-PCR 法で検討した。

C. 研究結果

ヒト血清について、HERV-K については PBC、control 双方で PBMC で gag 領域の転写が認められ、W についても同様の結果であった。MMTV については血清中では認められず、同様に MMTV gag 領域の転写が PBC、control 双方の PBMC 前例で認められ、差を認めなかった。

一方、PBC モデルマウスである NOD C3C4 については雌の肝臓は特異的に gag、env、pol の発現が認められたが、血清中には認めなかった。

D. 考察

これらのマウスモデルの病態とレトロウイルスとの関連としていくつかの機序が想定される。LTR 配列にはプロモーター活性が存在するため、host genome の転写に影響を与え、また、integration site によっては host の遺伝子に障害を与える可能性がある。さらに、rec や np9 は oncogenesis に関連し、gag や envelope は免疫、炎症に影響を与えることが知られており、Superantigen は V β 特異的な T リンパ球の

活性化を誘導する可能性報告されている。したがって、今回認められた内因性レトロウイルスの機能解析をして、病態と関連するかについて更なる検討が必要である。

E. 結論

雌の NOD C3C4マウス肝臓より内因性レトロウイルス遺伝子断片が検出された。今後、さらにこの内因性遺伝子の機能解析を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Francis H, Glaser S, Demorrow S, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Dostal D, Onori P, Franchitto A, Marzioni M, Vaculin S, Vaculin B, Katki K, Stutes M, Savage J, Alpini G. Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H1 histamine receptor stimulation by activation of the IP3/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C499-513.
- 2) Demorrow S, Francis H, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Onori P, Franchitto A, Vaculin B, Vaculin S, Alpini G. Anandamide inhibits cholangiocyte hyperplastic proliferation via activation of thioredoxin 1/redox factor 1 and AP-1 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G506-19.
- 3) Chuang YH, Ridgway WM, Ueno Y, Gershwin ME. Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:333-47.
- 4) Glaser S, Demorrow S, Francis H, Ueno Y, Gaudio E, Vaculin S, Venter J, Franchitto A, Onori P, Vaculin B, Marzioni M, Wise C, Pihanthanond M, Savage J, Pierce L, Mancinelli R, Alpini G. Progesterone stimulates the proliferation of female and male cholangiocytes via autocrine/paracrine mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:

G124-G136.

2. 学会発表

- 1) Kido O, Fukushima K, Ueno Y, Inoue J, Jefferson DM, Shimosegawa T. Compensatory role of inducible annexin A2 for impaired biliary epithelial anion exchange activity of inflammatory cholangiopathy. DDW San Diego
- 2) Glaser S, Gaudio E, Francis H, Ueno Y, Onori P, Franchitto A, Venter J, Alvaro D, Vaculin BT, Kopriva S, Savage J, Alpini G. Bile acid feeding prevents hepatic artery ligation-induced bile duct injury in bile duct ligated rats (BDL) by PI3K/AKT-dependent activation of cholangiocyte VEGF-a expression. DDW San Diego
- 3) Kido O, Fukushima K, Ueno Y, Inoue J, Jefferson DM. Compensatory role of inducible annexin A2 for impaired biliary epithelial anion exchange activity of inflammatory cholangiopathy. Journal of Hepatology 2008;48: S173-S173. EASL, Milan
- 4) Alpini G, Gaudio E, Supowit S, Ueno Y, Franchitto A, Onori P, Venter J, Francis H, Vaculin B, Kopriva S, Wise C, Mancinelli R, Savage JM, Chiasson V, DiPette DJ, Glaser S. LACK OF alpha-CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (alpha-CGRP) REDUCES BILE ACID-INDUCED INCREASE IN BILIARY PROLIFERATION. AASLD San Francisco
- 5) Kokazu E, Ueno Y, Kondo Y, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kogure T, Inoue J, Tamai K, Shimosegawa T. An Imbalance in Plasma Amino Acids of Advanced Cirrhotic Patients Influences the Intracellular Amino Acids of Peripheral Blood Mononuclear Cells, and the Imbalance Suppresses the Maturation of Dendritic Cells Via Mtor/S6k Signaling Pathway. AASLD San Francisco
- 6) Lam IP, Glaser SS, Gaudio E, Ueno Y, Chow BK, Antonello V, Sferra R, Onori P, Alvaro D, Vaculin B, Venter J, Francis H, Mancinelli R, Carpino G, Chiasson V, Alpini G. Knockout of Secretin Receptor Decreases the Proliferation of Large Cholangiocytes in Bile Duct Ligated (Bdl) Mice. AASLD San Francisco
- 7) Mancinelli R, Gaudio E, Onori P, Franchitto A, Carpino G, DeMorrow S, Ueno Y, Alvaro D, Francis H. Taurocholate Feeding to Bile Duct Ligated (Bdl) Rats Prevents Caffeic Acid-Induced Bile Duct Damage by Increased Cholangiocyte Vegf Expression. AASLD San Francisco
- 8) Moritoki Y, Lian ZX, Tsuneyama K, Wakabayashi K, Yang GX, Yoshida K, Ueno Y, Gershwin ME. B Cell Deficiency Exacerbates Liver and Intestinal Inflammation in a Murine

Model of Autoimmune Cholangitis. AASLD San Francisco

- 9) Woo K, Sathe MN, Kresge C, Parameswara V, Esser V, Ueno Y, Venter J, Alpini G, Feranchak AP. Functional Differences in Atp Release and P2 Receptor-Mediated Secretion between Small and Large Mouse Cholangiocytes: Potential Existence of a Purinergic Signaling Axis Along the Intrahepatic Biliary Tract. AASLD San Francisco
- 10) Xia XF, Xiao YH, Gao DB, Ueno Y, LeSage GD. DIFFERENTIAL EFFECTS OF RETINOIC ACID (RA) ON RAR AND PPAR delta SIGNALING INCREASES APOPTOSIS IN LARGE CHOLANGIOCYTES AND PROMOTES SURVIVAL IN SMALL CHOLANGIOCYTES. AASLD San Francisco

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他

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

PBC 肝臓における CX3CL1 の産生

研究協力者 下田 慎治 九州大学大学院医学系研究院臨床医学部門 病態修復内科学 助教

研究要旨: PBC において細胞接着分子としての側面も持つケモカイン CX3CL1 の関与が明らかとなっている。今回血管内皮細胞が TLR2, 3, 4, 5 のリガンド刺激で CX3CL1 を産生することを明らかとした。しかし免疫染色で CX3CL1 陽性が明らかな PBC 胆管上皮細胞の *in vitro* での産生条件は TLR リガンド刺激のみではなく、今後の検討課題である。

A. 研究目的

CX3CL1 は産生細胞膜上では細胞接着分子として働き、膜から切断後はケモカインとして働くユニークな分子であり、Rheumatoid Arthritis での関節炎局所をはじめ多くの自己免疫疾患での病態への関与が明らかとなっている。PBC においても、血清中での CX3CL1 の上昇、炎症胆管での CX3CR1 陽性細胞の有意な浸潤、胆管上皮細胞での CX3CL1 の産生が明らかとなっている。しかし CX3CR1 陽性細胞がいかんして肝臓内へ浸潤してくるか、胆管上皮細胞がいかん条件で CX3CL1 を産生するかなどは明らかとなっていない。そこで今回は CX3CR1 陽性細胞が肝臓内へ浸潤する機序と胆管上皮細胞が CX3CL1 を産生する条件について検討した。

B. 研究方法

9名の PBC 患者、対照として7名の C 型肝硬変、3名の B 型肝硬変患者の生体肝移植時の摘出肝を用いた。肝臓は無菌的にコラゲナーゼ処理後単核球分画を密度勾配法で分離後、付着細胞を回収した。付着細胞のうち上皮抗体陽性細胞を分離し胆管上皮細胞 (BEC) とした。残った細胞のうち CD31 陽性細胞を分離し血管内皮細胞 (EC) とした。最後に残った細胞のうち CD105 陽性細胞を分離し肝臓類洞内皮細胞 (LSEC) とした。全ての分離は特異的抗体のついたイムノビーズで行った。BEC, EC, LSEC への刺激として、TLR2, 3, 4, 5, 7/8, 9 リガンドを用いて、刺激後48時間で上清を回収し、CX3CL1 の測定には ELISA を用いた。

C. 研究結果

EC は TLR2 リガンド刺激で (PBC: 対照 = 1.7 ± 0.3 ; 1.6 ± 0.3 ng/ml), TLR3 リガンド刺激で (PBC: 対照 = 7.8 ± 0.3 ; 7.9 ± 0.5 ng/ml), TLR4 リガンド刺激で (PBC: 対照 = 4.9 ± 0.3 ; 5.1 ± 0.3 ng/ml), TLR5 リガンド刺激で (PBC: 対照 = 0.5 ± 0.1 ; 0.6 ± 0.1 ng/ml) の産生を認めしたが全ての刺激で PBC と対照群で有意差を認めなかった。LSEC, BEC は TLR リガンドのみの刺激では CX3CL1 を産生しなかった。

D. 考察

CX3CR1 陽性細胞は、様々な TLR 刺激で血管内皮

細胞が産生する CX3CL1 によって捕捉されその後肝内へ浸潤することが示唆された。しかし PBC と対照で血管内皮細胞が産生する CX3CL1 の量に有意差がないため、恐らく PBC 胆管上皮細胞での CX3CL1 の産生により CX3CR1 陽性細胞を肝内、とくに胆管周囲に定着させていることが予想された。しかし現在のところ、胆管上皮細胞が CX3CL1 を産生する機序が明らかではなく、一旦肝臓内へ浸潤してきた CX3CR1 陽性細胞が、胆管周囲へ遊走するための条件設定は今後の検討課題である。

E. 結論

PBC において、CX3CR1 陽性細胞は血管内皮細胞の TLR リガンド刺激で産生される CX3CL1 によって肝臓内にリクルートされるが、その後の傷害胆管周囲に浸潤する機序の解明は今後の検討を必要とする。

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 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記事項なし

研究要旨:胆汁うっ滞動物モデルにおいて肝内 OSTa/b の発現増強の報告はあるが, ヒトにおいて肝内 OSTa/b 発現の報告は未だ少ないのが現状である。そこで我々は PBC 患者治療前の肝内 OSTa/b mRNA の発現について検討した, さらに, 転写因子である FXR mRNA についても併せて検討した。PBC 未治療患者において, 肝内 OSTa/b の発現は早期より代償的に増強しており, その発現は晩期においても保たれていた。その代償機構は, 肝内 FXR 発現によって調節されている可能性が示唆された。

共同研究者

竹山 康章 福岡大学医学部 消化器内科

A. 研究目的

OSTa/b は, 類洞側肝細胞膜に存在する胆汁取り込みに関わるトランスポーターで, 通常発現は少なく胆汁うっ滞時に増強することが知られている。胆管結紮ラットモデルでは, 肝内 OSTa/b の発現は増強することが知られている。マウスの胆汁うっ滞モデルでも, 肝内 OSTa/b 発現は増強しており, 種による差異は認められない。しかしながら, ヒトにおいては PBC の進行期で肝内 OSTa/b 発現増強しているという報告はあるが, その他の疾患についての報告はみられない。そこで PBC 患者の治療前肝生検組織より, RNA を抽出し, 肝内 OSTa/b mRNA の発現について検討を行った。さらに OSTa/b 発現の転写因子として, 核内ホルモンレセプターである FXR mRNA の発現についても検討した。

B. 研究方法

対象は, PBC 治療前患者 (十分な informed consent のもと同意を得られた) 34 名。肝組織は, 針生検組織の一部を用いた。(Scheuer 組織学的分類: I 期 5 名, II 期 17 名, III 期 8 名, IV 期 4 名)。肝内 h OSTa, OSTb mRNA, FXR mRNA を real-time RT PCR 法 (Applied Bio. 7500 Fast) にて測定した。Normal control として Human RNA (n=5) を使用し, 内因性遺伝子として GAPDH を用い補正を行った。

C. 研究結果

肝内 OSTa/b mRNA の発現は, 早期より有意に増強しており, さらに晩期においても, 増強は保たれていた (図 1, 2)。核内ホルモンレセプターである FXR mRNA 発現と OSTa/b mRNA 発現の間には, 相関関係を認めた (表 1)。

D. 考察

PBC 未治療患者において, OSTa/b mRNA は晩期になっても保たれていた, しかしながら針生検では十分な量の蛋白が得られないため, 今後高感度の蛋白解析の研究が望まれる。今回は未治療患者の解析を行っ

図1 PBC患者肝におけるOSTa mRNA発現

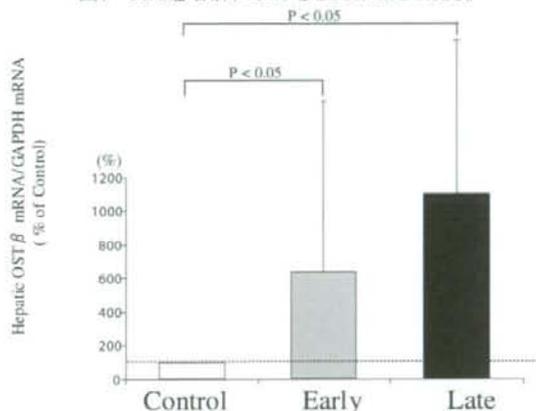


図2 PBC患者肝におけるOSTβ mRNA発現

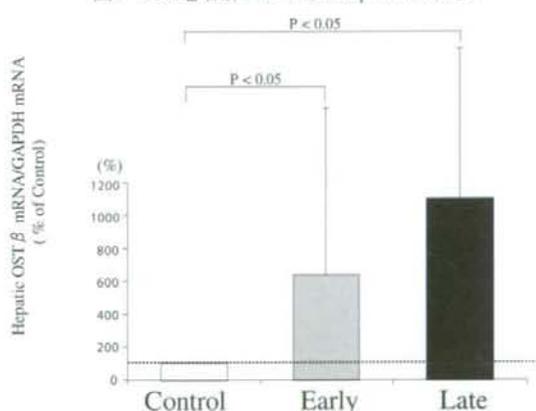


表1. PBC患者肝におけるOSTaβ発現と転写因子

	CAR	FTF	FXR
OST α	r = 0.18 r ² = 0.03	r = 0.68 r ² = 0.46	r = 0.66 r ² = 0.43
OST β	r = 0.26 r ² = 0.07	r = 0.37 r ² = 0.14	r = 0.38 r ² = 0.15

たが、UDCA 治療により改善のみられた PBC 患者における、治療前後のトランスポーター発現の解析を行い、UDCA が肝内トランスポーターの発現にどのような影響を与えているのかを解析することが、今後の課題である。

E. 結論

PBC 未治療患者において、肝内 OSTa/b の発現は早期より代償的に増強しており、その発現は晩期においても保たれていた。その代償機構は、肝内 FXR 発現によって調節され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) Takeyama Y, Uehara Y, Inomata S, Morihara D, Nishizawa S, Ueda SI, Matsumoto T, Tanaka T, Anan A, Nishimura H, Irie M, Iwata K, Shakado S, Sohda T, Sakisaka S. Alternative transporter pathways in patients with untreated early-stage and late-stage primary biliary cirrhosis. *Liver International* in press

2) 竹山康章, 向坂彰太郎 PSC と PBC に再発が存在し、それが移植成績を左右するか 肝胆膵, 56 (4): 585-590, 2008. Review

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

PBCにおけるMDR3の発現意義

研究協力者 中牟田 誠 国立病院機構九州医療センター 消化器科 医長

研究要旨：我々は、肝における脂質代謝の変化が原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態形成に関与していると考え、PBC肝における脂質代謝関連遺伝子発現の検討を行って来た。今回は、MDR3（multidrug resistance protein 3）とLXR α （liver X receptor α ）について注目し、これらの遺伝子発現と臨床データを比較検討した。また、コントロールとした正常肝におけるMDR3遺伝子の一塩基多型（SNPs: single nucleotide polymorphisms）とその遺伝子発現との関連について検討した。PBC肝（n=17）においては、正常肝（n=67）に比較して、MDR3とLXR α の発現は著明に亢進していた。MDR3遺伝子発現は血清ALP、LDLコレステロール、HDLコレステロール値とそれぞれ正、正、負の相関を認めた。一方、LXR α は血清IgM値と正の相関を示した。正常肝におけるSNP解析では、報告されているdiplotype間での発現の差は認めなかった。

A. 研究目的

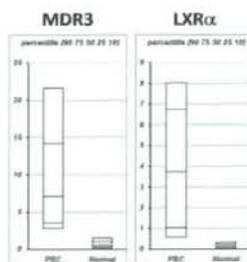
原発性胆汁性肝硬変症（PBC）においてはしばしば脂質代謝異常が合併することより、我々はPBC肝における脂質代謝関連遺伝子の発現を検討してきた。その結果として、PBC肝においては、細胞内コレステロールは貯留しており、コレステロール代謝産物であるオキシコレステロールをリガンドとするLiver X receptor α （LXR α ）の発現が亢進していること、また、胆汁中へのリン脂質排出ポンプである multidrug resistance protein 3（MDR3）の発現が亢進していることを見いだした。今回はこれらLXR α とMDR3のPBC肝における発現と臨床データとの関連を検討した。また、正常肝におけるMDR3遺伝子の一塩基多型（SNPs: single nucleotide polymorphisms）とその遺伝子発現との関連について検討した。

B. 研究方法

国立病院機構九州医療センターにて2007年12月より2008年12月までにPBCと診断された17症例の肝生検の一部よりRNAを抽出した。また、コントロールとして九州大学大学院消化器・総合外科学（武富紹信講師、前原喜彦教授）より正常肝67例のRNAとDNAの提供を受けた。遺伝子発現に関しては、real time RT-PCRにより解析を行った。DNAのSNPs解析は長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬物治療学（塚元和弘教授）において行われた。

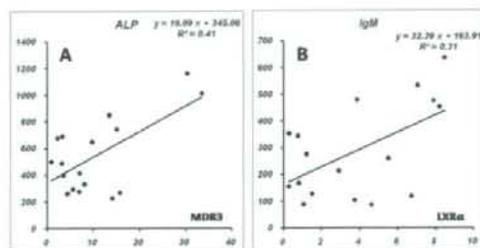
C. 研究結果

PBC肝においてはMDR3とLXR α ともに正常肝に比べて著明に発現が亢進していた（図1）。しかしながらScheuer分類のステージ1（n=10）とステージ2以上（n=7）の間での差は認められなかった。なお、これらの間での血清総コレステ



ロール値、LDLコレステロール値、中性脂肪値においても差を認めなかった。

次に、PBC肝におけるMDR3またはLXR α と血清マーカー（AST、ALT、 γ GTP、ALP、総コレステロール、LDLコレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、IgM、AMA-M2）との相関を検討した。MDR3発現に関しては、AST（ $r=0.529$, $p=0.029$ ）、ALP（ $r=0.637$, $p=0.006$ ）、LDLコレステロール（ $r=0.677$, $p=0.003$ ）、HDLコレステロール（ $r=-0.655$, $p=0.004$ ）との間に有意な相関が認められた（図2A）。またLXR α に関しては、IgM（ $r=0.554$, $p=0.021$ ）



と相関が認められた（図2B）。なお、MDR3とLXR α の発現間には相関を認めなかった。

正常肝における、MDR3のSNPsと遺伝子発現の関連については、PBCの進行に差があると報告（Hepatology. 2008;48(3):853-62）されている。Hap1/Hap1とHap2/Hap2間には発現の差を認めなかった

	n (%)	MDR3 expression
Hap1 / Hap1	18 (27%)	0.69 ± 0.46
Hap2 / Hap2	8 (12%)	0.67 ± 0.58

（表1）。

D. 考察

近年、MDR3のSNPsがPBCの進行に関与していると報告されており、また、PBCの治療薬とされるフィブレート系薬剤（PPAR α リガンド）がMDR3を活性化させる点を考えると、MDR3はPBCの病態形

成に重要な役割を果たしているものと思われる。本解析ではMDR3の発現と胆管系障害のマーカーである血清ALP値が強い正の相関を認めしめたことは、生体はMDR3をより活性化することで、胆管障害に代償的に働いている可能性がある。しかしながら、肝におけるMDR3の遺伝子発現亢進は脂肪肝やC型肝炎においても観察され(未発表データ)、PBCに特異的な現象ではなく、MDR3の発現亢進は肝障害における一般的な代償機構なのかもしれない。

MDR3発現と血清LDL値との正の相関、血清HDL値との負の相関に関しては、MDR3が深くコレステロール代謝に関わっていることが示唆されるが、その具体的な関連については今後の検討が必要であると思われるし、スタチン(コレステロール合成阻害剤)がPBCに有効であるとの報告(J Hepatol. 2002;36(4):454-8)があるが、この効果もMDR3に起因する可能性もある。また、MDR3の発現亢進により胆汁中のリン脂質が増加し胆汁の性状が変化して、コレステロールの腸管での吸収を変化させている可能性も考えられる。

LXR α の発現に関しては、血清IgM値と正の相関を示したが、具体的な理由については不明である。元来LXR α はSREBP1cを介しての脂肪酸合成において重要な役割を果たしているが、動脈硬化巣(マクロファージ)においては、抗アポトーシス作用(api6/Aim/Spaの発現亢進)やNF- κ Bを抑制するなどの免疫系に対する作用も報告されている。従って、PBC肝においても何らかの免疫作用がIgMの上昇に関与しているのかもしれない。

MDR3発現とそのSNPsの関連については、このSNPsがFunctional SNPsすなわちSNPsが直接MDR3の発現に関与しているのではないかという考えから解析を行ったが、少なくとも正常肝においてはその関連は認められなかった。しかしながら前述のように、正常肝においてはMDR3の発現は非常に低く、平均値ではPBC肝の約14分の1である。従って、PBCのような病的な状況でその発現が亢進した場合には、SNPsの相違により、発現の差が出てくる可能性は十分にあるものと考えられる。現在、PBC症例におけるSNPsとMDR3発現の関連を検討している。

E. 結論

PBCにおいてはMDR3とLXR α の発現は著明に亢進しており、これらの変化はPBCの病態形成や治療に深く関与している可能性があり、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) The state of cholesterol metabolism in the liver of PBC patients: the role of MDR3

expression (投稿中)

2. 学会発表

- 1) 中牟田誠, 加藤正樹, 遠城寺宗近: 肝疾患における肝脂質代謝異常とその病態形成への関与 特別企画1 地味領域(小児・代謝・線維化など) 秀逸研究ハイライト: 近い将来に予想される肝臓学のパラダイムシフトにそなえて 第12回日本肝臓学会大会(東京)2008年10月1日
- 2) 遠城寺宗近, 福泉公仁隆, 中牟田誠: PBC肝における脂質代謝関連遺伝子発現の検討: 特にMDR3発現の病態形成への関与 シンポジウム: 胆管&肝の自己免疫性あるいは薬物性病態形成: 基礎と臨床の最新展開第12回日本肝臓学会大会(東京)2008年10月1日
- 3) Nakamura M, et al. Lipid metabolism-related gene expression in PBC liver: The implications of MDR3 expression for PBC development and treatment. The 19th Annual Meeting of the AASLD (San Francisco) 2008/11/01
- 4) Nakamura M, et al. Identification of serological and genetic biomarkers for predicting the prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC). -A homogenous "Hap2/Hap2" diplotype in multidrug resistance protein 3 (MDR3) gene confers a strong susceptibility to jaundice. The 19th Annual Meeting of the AASLD (San Francisco) 2008/11/01

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

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

PBCにおける脂質代謝の検討(2):ステロールのメタボローム解析による病態の評価

研究協力者 松崎 靖司 東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科 教授

研究要旨: 血清ステロールのメタボローム解析方法を開発し、それを用いてPBC患者のステロール代謝の特徴、およびUDCA治療の影響を検討した。PBC患者では、胆汁うっ滞に伴う腸肝循環の減少によって胆汁酸合成が亢進し、胆汁うっ滞をさらに悪化させているものと考えられた。UDCAは胆汁酸の腸肝循環を増加させ、胆汁酸合成を抑制し、胆汁うっ滞には有効であったが、コレステロールの腸管吸収を促進し、結果としてコレステロール合成や血清コレステロール値は有意な変化を認めなかった。

A. 研究目的

PBCでは、コレステロールを中心とした脂質代謝の異常が認められることが多いが、その詳細は明らかにされていない。また、治療にはウルソデオキシコール酸(UDCA)が用いられ、その有効性が明らかにされているが、作用機序にはいまだ不明な点が多い。本研究は、血清ステロールのメタボローム解析方法を開発し、脂質代謝の面からPBCの病態とUDCAの作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

血清ステロールを用いたメタボローム解析方法の開発: 血清5 μ Lに内部標準としてコプロスタノールおよび重水素標識されたオキシステロールを添加し、37 $^{\circ}$ Cの1N ethanolic KOH中で60分間加水分解を行った。n-Hexane抽出後、2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride (10mg), 4-dimethylamino pyridine (3 mg), picolinic acid (8mg), pyridine (150 μ L) および triethylamine (20 μ L) を添加し、80 $^{\circ}$ Cで60分間反応させ、誘導体化を行った。n-Hexane添加と遠心により過剰の誘導体化試薬を沈殿除去し、回収したn-Hexane層を窒素ガスにて蒸発させ、残渣に50 μ Lのアセトニトリルを添加して、その1/5をLC-MS/MSで分析した。HPLCのカラムはサーモフィッシャーサイエンティフィックのHyperSIL Gold (2.1 x 150 mm, 粒径3 μ m)を使用し、移動相はA:0.1%の酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水(40:40:20), B:0.1%の酢酸を含むアセトニトリル:メタノール:水(45:45:10)とし、0から20分かけてBを0%から100%まで増加させるグラジエントプログラムを流速300 μ L/minで組んだ。Selected reaction monitoring (SRM)では、主なステロールを網羅することができる32種類のイオンペアを同時にモニターした。

臨床検体の分析: 上記方法を用いて、研究協力病院より提供を受けたPBC患者27例のUDCA治療前後の血清および正常コントロール血清を分析し、主なステロールの濃度を定量した。

C. 研究結果

高感度化のために誘導体化したサンプルをLC-MS/MSで分析することにより、約60種類の血清ステロ

ールを高い信頼性の下で同時分析できるようになった。最小検出感度はステロールの水酸基の数に依存し、水酸基1つを有するステロールでは1pg以下、水酸基2つを有するステロールでは100fg以下と従来のHPLC法の1000倍以上高い感度であった。また、再現性、添加回収共に良好な結果が得られた。

コレステロール合成系について: コレステロール合成系の血清マーカーであるLathosterol濃度は、正常対照と比べて未治療のPBC患者で有意に低下していた。また、UDCA治療によって変化せず、低下したままであった。

コレステロール吸収系について: コレステロール吸収系の血清マーカーであるSitosterolおよびCampesterol濃度は、未治療のPBC患者でも正常対照者と有意差がなかった。しかし、UDCA治療によって有意な上昇を認めた。

胆汁酸合成系について: 胆汁酸合成系の血清マーカーである7 α -hydroxycholesterol濃度は、未治療のPBC患者で正常対照者より有意に上昇しており、UDCA治療によって有意な減少を認めた。さらに、薬物代謝と共に胆汁酸合成にも関与するCYP3A4の血清マーカーである4 β -hydroxycholesterol濃度は、UDCA治療の有無にかかわらず、PBC患者で正常対照者より有意に上昇していた。

D. 考察

血清のメタボローム解析によって約60種類の血清ステロールを分析した。今回はコレステロールの合成系、吸収系、胆汁酸の合成系、および薬物代謝酵素CYP3A4に着目し、各群での比較を行った。その結果、未治療のPBC患者ではコレステロール合成系の抑制と胆汁酸合成系の促進が認められた。

コレステロール合成系抑制の理由としては、胆汁うっ滞による肝からのコレステロールの排泄低下があり、肝組織中コレステロールが増加するため、コレステロール合成系にフィードバックがかかっているためと考えられた。一方、胆汁酸合成系の促進に関しては、以下の仮説が考えられた。すなわち、胆汁うっ滞による肝組織中胆汁酸の増加によってFXRを介して胆汁酸合成系に抑制がかかる一方で、胆汁酸の腸肝循環減少によって、腸由来の胆汁酸合成系抑制因子

(FGF19) 産生が抑制され、胆汁酸合成系の促進作用が生じる。結局、両者の総合的な結果として腸因子の作用のほうが勝り、胆汁酸合成系は上昇しているという仮説である。

PBC 患者への UDCA 投与は、上昇していた胆汁酸合成系の抑制を引き起こしたが、これは胆汁うっ滞の改善による胆汁酸腸肝循環の回復によるものと考えられた。また、腸肝循環の増加はコレステロール吸収を促進した。その結果として、UDCA 投与は胆汁うっ滞を改善するにもかかわらず、コレステロール合成系は抑制されたままであり、血中コレステロール値もあまり低下しない症例が多いものと考えられた。

CYP3A4 は UDCA 治療の有無にかかわらず活性が増加していた。この酵素によって生成される 4β -hydroxycholesterol は核内レセプター LXR α のリガンドとなり、LXR α の標的遺伝子である cholesteryl ester transfer protein (CETP) の活性が PBC で増加しているとの報告もあることから、PBC では LXR α が活性化されている可能性が示唆された。

E. 結論

血清ステロールのメタボローム解析によって、PBC 患者のステロール代謝の特徴、および UDCA 治療の影響を検討した。その結果、未治療の PBC 患者では、胆汁うっ滞に伴う腸肝循環の減少によって胆汁酸合成が亢進し、胆汁うっ滞に悪循環が起きているものと考えられた。UDCA 治療は胆汁酸の腸肝循環を増加させ、胆汁酸合成を抑制した。また、UDCA による腸肝循環の改善は、コレステロールの胆汁排泄を促進すると共に腸管吸収も促進し、結果としてコレステロール合成や血清コレステロール値は有意な変化を示さなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, Shirai M, Ikegami T, Xu G, Numazawa M, Hara T, Matsuzaki Y. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2008; 49:2063-2073.
- 2) Honda A, Yamashita K, Hara T, Ikegami T, Miyazaki T, Shirai M, Xu G, Numazawa M, Matsuzaki Y. Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2009; 50:350-357.

2. 学会発表

- 1) 本多彰, 池上正, 平山剛, 齋藤吉史, 伊藤進一, 溝上裕士, 松崎靖司. SREBP1c を制御する核内レセプター活性の in vivo における評価方法とその応用. 第44回日本肝臓学会総会 (松山), 2008年6月.

- 2) 本多彰, 池上正, 宮崎照雄, 松崎靖司. コレステロール・胆汁酸代謝系に関するメタボローム解析方法の開発. 第12回日本肝臓学会大会 (東京), 2008年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働省科学研究費補助金 (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エストロゲン代謝

研究協力者 西原 利治 高知大学消化器科 准教授

研究要旨: 原発性胆汁性肝硬変は抗ミトコンドリア抗体という極めて疾患特異性の高い標識自己抗体を有する中年女性に好発する自己免疫性肝疾患である。自己免疫疾患では性差、あるいは閉経との関連は従来より認識されてきたが、原発性胆汁性肝硬変についてこのような観点からの報告は少ない。そこで、本年は代表的な女性ホルモンであるエストロゲンに着目し、血中エストロゲン代謝に関与する機能性遺伝子変異と原発性胆汁性肝硬変との関連について臨床例を用いて検討すると共に、エストロゲン欠損マウスを用いてエストロゲンのT細胞分化に及ぼす影響を検討したので報告する。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変は閉経後の女性に好発する自己免疫性肝疾患である。他の自己免疫疾患と同様に本症の発症や進展に関与する因子は未だに明らかでなく、新たな治療法が模索されている。本研究は原発性胆汁性肝硬変の進展に対するエストロゲン補充療法の可能性を探る目的で計画された。自己免疫疾患と性差や閉経の関連については、古くから多数の研究がなされ、閉経に際して代表的な女性ホルモンであるエストロゲンの血中濃度が激減することが自己免疫疾患の臨床経過に影響を与えるのではないかと推測されてきた。しかし、原発性胆汁性肝硬変における影響は未だ検討はなされていない。そこで、今回はエストロゲン代謝に影響を及ぼすことが知られている遺伝子多型が原発性胆汁性肝硬変の発症に関与する可能性について検討すると共に、エストロゲン欠乏が免疫担当細胞であるT細胞の分化に及ぼす影響について検討し、本難病の発症阻止や進展遅延に寄与する新たな治療法の端緒を探りたい。

B. 研究方法

組織学的に原発性胆汁性肝硬変の確定が得られた78例について、エストロゲン代謝に影響を及ぼすことが知られているCYP17遺伝子のvariant 遺伝子の頻度を明らかにし、健常対照群におけるvariant 遺伝子の頻度との差異を検討した。次に、エストロゲン合成酵素cyp19欠損マウスの胸腺細胞の分化過程を単クローン抗体とflowcytometryを用いて解析し、エストロゲン欠乏がもたらす胸腺細胞の分化異常を明かにし原発性胆汁性肝硬変の進展に対するエストロゲン補充療法の可能性を探る。

(倫理面への配慮) 機能性遺伝子多型の検索・動物実験を行うため、実験計画書と検体提供者に対する説明文書、実験動物に対する動物愛護上の配慮などについて文書を作成し、高知大学倫理委員会に提出し承認を得た。これに基づいて、人権擁護上の配慮、不利益、危険性の排除等についてのインフォームドコンセントを文書で得た。

C. 研究結果

原発性胆汁性肝硬変におけるCYP17遺伝子のpromoter regionのT (A1 allele) to C (A2 allele) variant 遺伝子の頻度は41.7%と健常者の53.9%に比し低値を示した ($p=0.014$, odds ratio 0.61)。また、A1/A1の遺伝子型を示したものの16.7%で、健常者の30.0%に比して低値を示した ($p=0.037$, odds ratio 0.47)。cyp19欠損マウスの胸腺では胸腺細胞の分化過程に異常が観察され、間質細胞における異常がその原因の一つである可能性が示唆された。

D. 考察

今回の検討では、原発性胆汁性肝硬変の発症に性ホルモンの代謝に関与するP450の遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。この成績は原発性胆汁性肝硬変の9割が女性であることと何らかの関連があることを示唆する成績と考えたい。今後、この遺伝子多型がどのような臨床所見と関連を示すか検討を行いたい。

E. 結論

原発性胆汁性肝硬変は閉経期以降の女性に発症が集中する自己免疫性肝疾患である。今回、性ホルモンの代謝と関連する機能性遺伝子多型と本症と間に関連を見いだしたので、その意義について今後検討を行いたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki S, Akisawa N, Saibara T, Onishi S. Fibrates for treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 37(Suppl 3):S515- S517. 2007
- 2) Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara T. Preserved tissue-structure of efferent ductules in aromatase deficient mice. *J Endocrinol* 199:137-146. 2008