

200936139A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の
生体試料等の収集に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

中村 稔

平成22(2010)年 3月

目 次

I. 研究班員名簿	1
II. 統括研究報告	
難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料等の収集に関する研究 研究代表者 中村 稔	2
III. 分担研究報告	
1. 原発性胆汁性肝硬変に対する生体部分に肝移植する研究 東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科 田村 純人.....	6
2. 難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料等の収集に関する研究 京都大学医学部附属病院 肝胆膵・移植外科 森 章	8
3. 難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料などの収集に関する研究 九州大学大学院 消化器・総合外科 副島 雄二	11
4. 胆管上皮細胞の産生するCX3CL1に関する研究 九州大学大学院 病態修復内科学 下田 慎治	13
5. 肝組織の保存、遺伝子増幅、免疫染色に関する研究 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 伊東 正博	15
6. 長崎医療センターにおけるPBC-AIH overlap 症候群の特徴と予後に関する研究 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 小森 敦正	18
IV. 研究計画書	20
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
VI. 研究成果の刊行物・別刷	38

I. 研究班員名簿

平成 21 年度 厚生労働省難治性疾患克服研究事業
 難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料等の収集に関する研究班
 構成員名簿

区分	氏名	所属など	職名
研究代表者	中村 稔	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻 肝臓病学講座 国立病院機構長崎医療センター	教授
研究分担者	田村 純人	東京大学医学部付属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科	助教
	森 章	京都大学医学部付属病院 肝胆膵・移植外科	助教
	副島 雄二	九州大学大学院消化器・総合外科学	助教
	下田 慎治	九州大学大学院病態修復内科学	助教
	伊東 正博	国立病院機構長崎医療センター	研究検査部長
	小森 敦正	国立病院機構長崎医療センター	病態制御研究室長

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料等の収集に関する研究

研究代表者 中村 稔

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

新興感染症病態制御学系専攻

肝臓病学講座 教授

研究要旨

難治性肝臓疾患のひとつである原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、約 1-2 割の症例は肝不全に至る予後不良の疾患であるが、未だに病因の解明や画期的治療法の開発には成功していない。その理由として、PBC が稀な疾患であるだけでなく、経過が長いために予後判定に長期間を要し、少数の施設の症例を用いた研究には限界があることが考えられる。そこで本研究では、多施設で患者情報と検体を共有し、基礎と臨床の専門家が共同して研究に取り組むための生体試料バンクの設立に向けた基盤整備を開始することを目的とした。本年度は、①倫理規定に厳格に対処するための倫理指針の作成、②患者情報の収集、保存、管理方法の整備、③検体（血清、末梢血、肝組織）の収集、保存、管理方法の整備を目的として“原発性胆汁性肝硬変の病型分類と予後予測のための基盤整備”とのタイトルの研究計画を作成し、本研究参加施設での倫理委員会への申請を開始した。本年度は新たに、長崎医療センター、京都大学、鹿児島大学などでの承認が得られ、DNA 収集を開始できた。今後は、本研究参加施設を増やして全国規模で生体試料および患者情報を収集するとともに、本生体試料バンクの検体を用いた研究計画の公募を開始する必要がある。難治性肝臓疾患のための生体試料バンク設立は我が国では初めての試みであり、本研究により PBC の病因解明や画期的治療法の開発が可能になるものと期待される。

A. 研究目的

難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変:PBC）の肝組織（生検ならびに摘出組織）、血清、末梢血 DNA を収集するための全国規模の組織を構築し、“難病研究資源バンク（独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部）”にこれらの生体試料を患者情報と共に提供（連結可能匿名化）することを目的とする。そのために必要な倫理的基盤整備、検体の至適運搬・保存方法の確立、安全かつ正確な患者情報の提供方法の確立などを行なう。

B. 研究方法

すでに組織されていた国立病院機構肝

疾患ネットワーク研究・PBC 共同研究班（全倫理審国 28 施設）（研究代表者：中村 稔）と厚生労働省難治性疾患克服研究事業“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究“班（研究代表者：坪内博仁）の PBC 分科会（会長：中沼安二）の中に組織されていた gp210working group（研究代表者：中村 稔）を主なフィールドとして、PBC の患者登録、定期的血清保存、DNA 採取及びこれらの生体試料の難病資源バンクへの提供を目的として臨床研究計画“原発性胆汁性肝硬変の病型分類と予後予測のための基盤整備“を立案した。今年度は、特に希少な PBC 重症症例の検体を収集するために、上記施設に加えて、新たに肝臓移植外科（東京大学、京

都大学、九州大学)に本研究への参加を依頼した。本臨床研究計画が当施設の査委員会承認された後、上記施設での倫理審査委員会への申請を開始し、承認の得られた施設から検体の収集を開始した。

(倫理面への配慮)

生体試料を取り扱うために、倫理規定には厳格に対処した。即ち、“臨床研究に関する倫理指針”(厚生労働省・平成20年7月改正)、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号)を遵守した。

C. 研究結果及び考案

- ① 長崎医療センターでの倫理審査委員会では本臨床研究計画“原発性胆汁性肝硬変の病型分類と予後予測のための基盤整備”が承認された(承認番号21043)。
- ② 分担研究者の所属施設では、京都大学肝胆膵移植外科で本臨床研究計画が承認されたが、東京大学医学部肝胆膵人工臓器移植外科、九州大学消化器総合外科では、現在、倫理審査委員会へ申請中であり、未だ承認が得られていない。
- ③ 分担協力者の鹿児島大学消化器内科でも本臨床研究計画が倫理委員会に承認され、DNA収集を開始した。
- ④ 長崎医療センター所属の分担研究者(伊東正博博士、小森敦正博士)は、 -80°C と -30°C の冷凍庫を整備、生体試料の保存(連結可能匿名化)を開始し、患者情報のデータベース作成も開始した。
- ⑤ 現在、平成20年12月に難病資源バンクから提供された生体試料の収集と提供に関する資料を基に、“難病資源バンクへの試料提供”のために研究計画、同意書の記載を追加、修正を行い、倫理審査委員会へ再申請している。
- ⑥ 厚生労働省の研究計画の見直しにより、本研究は平成21年度で終了することとなったが、本研究計画は、PBCの病型分類、予後予測、新しい治療法の開発を目的とした難病克服のための重要な研究と考えられるため、今後は厚生労働省難治性疾患克服研究事業“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究(研究代表者:坪内博仁)“班の中で活動を継続する予定である。

D. 評価

1) 達成度について

難病資源バンクへの試料提供は、未だ倫理審査委員会からの承認が得られておらず、生体試料の難病資源バンクへの提供は開始していないが、承認され次第、開始する予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

我が国には、肝臓難病の生体試料バンクは未だ存在せず、本研究はきわめて重要な意味を持つ。また、本生体試料バンクの検体を用いてPBCの原因解明や治療法の確立がなされたら、PBC患者にとって福音となるだけでなく、医療費の削減にもつながる。

3) 今後の展望について

本研究は平成21年度1年限りで終了することとなったが、来年度からは厚生労働省難治性疾患克服研究事業“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究“班の中で同様の活動を続ける予定である。

4) 研究内容の効率性について

希少疾患の生体試料バンク構築は、長い年月を要するきわめて労の多い研究事業であるが、一旦構築されれば、それを利用した医学研究を効率的に進めることができる。

E. 結論

難治性肝臓疾患であるPBCの生体試料を収集し、難病資源バンクへ提供するための研究活動を開始した。未だ、難病資源バンクへ生体試料の提供を開始するには至っていないが、平成22年度には生体試料の提供が可能になるものと思われる。本研究は、PBCの病型分類、予後予測、新しい治療法の開発につながる重要な研究と思われるので、今後は厚生労働省難治性疾患克服研究事業“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究“の中で活動を継続する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

総説

1, 中村 稔、塚元和弘、安波道郎、近藤久義、中牟田 誠 et al. Multidrug resistant

protein 3(MDR3)遺伝子多型による原発性胆汁性肝硬変の予後遺伝子診断、消化器疾患におけるエピゲノミクス、第16回浜名湖シンポジウム論文集、p81-83, アークメディア、東京。(2009.10.9発行)

2, 中村 稔、石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の長期予後診断と治療. 自己免疫性肝胆膵疾患—最新知見. 医学のあゆみ Vol 228 No9:889-894, 2009. 2. 28

3, 中村 稔、相葉佳洋、小森敦正、石橋大海. 肝疾患難病“原発性胆汁性肝硬変”の新規マーカーによる予後予測. 医療 Vol63, No6:357-362, 2009

4, 大石裕樹、中村 稔、塚元和弘. MDR3 遺伝子多型と PBC. 肝胆膵 2009;59:1207-1216

5, 石橋大海、小森敦正、中村 稔、下田慎治. 原発性胆汁性肝硬変ガイドラインの作成. 肝胆膵 2010;60:257-264

6, Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* 2009;48:741-7

原著

1, Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Nakamura M et al. Association analysis of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Hepatol* in press

2, Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Horie H, Aiba Y et al. Analysis of HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with primary biliary cirrhosis (PBC): the HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of antinuclear antibodies for disease progression in PBC. *Hepatol Res* 2010, Mar30. (Epub ahead of print)

3, Migita K, Ilyassova B, Kovzel EF, Nersesov A, Abiru S et al. Serum Baff and APRIL levels in patients with PBC. *Clin Immunol* 2010;134:217-225

4, Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H et al. Long term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Lab Invest*

2010; 90:577-588

2. 学会発表

1, 中村 稔、塚元和弘、安波道郎、近藤久義、相葉佳洋 et al. 原発性胆汁性肝硬変の予後診断法の確立のための遺伝子診断. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009. 6. 4-5. 肝臓 50 巻 2009, suppl. (1), A162, 0-78.

2, 小森敦正, 中村 稔、本吉康英、橋本 悟 et al. 当科における PBC-AIH overlap 症候群の特徴と予後. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009. 6. 4-5. 肝臓 50 巻 2009, suppl. (1), A391, P-291.

3, 右田清志、中村 稔、阿比留正剛、小森敦正、矢野公士 et al. PBC 患者における血清 BAFF の測定. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸, 2009. 6. 4-5. 肝臓 50 巻 2009, suppl. (1), A392, P-293.

4, 中村 稔、安波道郎、近藤久義、相葉佳洋、小森敦正 et al. HLA-DRB1 遺伝子多型が抗核抗体による原発性胆汁性肝硬変の予後予測に及ぼす影響の検討. 第46回日本消化器免疫学会総会. 松山, 2009. 7. 23-4.

5, 相葉佳洋、中村 稔、小森敦正、右田清志、八橋 弘 et al. 日本人原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者の CTLA-4 一塩基多型 (SNP) の解析. 第46回日本消化器免疫学会総会. 松山, 2009. 7. 23-4.

6, 中村 稔、塚元和弘、安波道郎、中牟田誠、小森敦正 et al. Multidrug resistance protein 3(MDR3) 遺伝子多型による原発性胆汁性肝硬変の予後の遺伝子診断. 第16回浜名湖シンポジウム、2008.12.20-1, 浜松

7, Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Aiba Y, Komori A et al. Analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Japanese patients with primary biliary cirrhosis- HLA-DRB1 polymorphism determines the relative risk of anti-nuclear antibodies for the disease-progression in PBC. *Hepatology*, Volume 50, Number 4 (Suppl), October 2009, 1004A, 1521. Boston 2009.11.3

8, Nakamura M, Ito M, Aiba Y, Komori A, Migita K et al. Hepatic expression of peroxisome proliferators activated receptors A(PPAR) in primary biliary cirrhosis. Joint EASL-AASLD Monothematic

Conference. Nuclear Receptors and Liver Disease. Abstract page 87. Vienna 2009. 2. 28

9, Higa S, Inamine T, Noguchi F, Kawauchi A, Hashiguchi H et al. The cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene susceptible to the severe progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. 59th annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu 2009. 10. 20-24

10, Inamine T, Higa S, Noguchi F, Kawauchi A, Hashiguchi H et al. Diplotype polymorphisms of the bile salt export pump gene are associated with susceptibility to the severe progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. 59th annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu 2009. 10. 20-24

11, Noguchi F, Inamine T, Higa S, Kawauchi A, Hashiguchi H et al. Haplotype and diplotype polymorphisms of HNF-4a as a genetic biomarker for susceptibility to the severe progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. 59th annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu 2009. 10. 20-24

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変に対する生体部分肝移植に関する研究

分担研究者 田村純人
東京大学医学部附属病院肝胆膵外科・人工臓器移植外科助教

研究要旨

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の終末像である肝硬変肝不全に対し肝移植は有効な治療法である。東京大学では2010年3月末までPBCに対する成人生体肝移植を73例に施行した。5年生存率は83.8%であり、非PBC症例の生存率と差を認めていない。今後、内科的加療継続の適応や肝移植のタイミングを含めた包括的な治療戦略の検討が必要である。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（以下 PBC）に対する生体肝移植の有効性を検討する。

B. 研究方法

東京大学にて生体肝移植が検討された（PBC）の予後を検討した。

C. 研究結果

1996年1月から2010年3月の間に、当院において369例の成人生体肝移植を施行し、そのうち73例（20%）がPBCに対する肝移植であった。年齢は51(18-67)歳、男性10例女性63例。全例初回移植例であった。潰瘍性大腸炎合併例は4例。移植術前における Total bilirubin 値は9.5(1.4-38.6)、PT INR 値は1.41 (1.0 - 2.6)であった。

術後経過観察期間の中央値は122ヶ月(0.2 - 201)であり、1年、3年、5年、そして

10年生存率はそれぞれ90.2%、85.5%、83.8%、そして82.3%であった。同期間中の非PBC症例の成績は、同様に、90.4%、89.0%、86.3%、そして82.3%であり、有意差を認めなかった（log-rank 検定、 $p=0.8558$ ）。

（倫理面への配慮）

研究対象患者に対する倫理面への配慮はヘルシンキ宣言に基づき、管轄省庁の策定する臨床研究に関する倫理指針に従った。また、分担研究者は当該指針遵守を目的とした規定に従い、部局長の主催する東大倫理セミナーを定期的に受講し、修了している。さらに、個人情報の扱いについても部局長の定めるところにより、管轄省庁の策定する医療・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に従った。

D. 考察

肝硬変肝不全に至ったPBCに対する内

科的治療手段は限られており、予後は極めて不良である。今回、我々は自検例を検討し、肝移植を施行し得た症例に関しては、極めて良好な成績を示し得た。

一方、PBCの臨床経過は長期にわたり、本研究班の疫学的調査の成果によれば内科的加療のみで比較的良好な経過をたどる症例も多いことが判明している。

今後は、PBCの重症化に関与する因子を明らかにし、将来的に肝移植を要する症例を見極めた上で、肝臓内科医と移植外科医の連携を深めていくことが重要であると考えられる。

E. 結論

PBCに対する生体肝移植の成績は良好であり、確立された治療法である。内科的治療が無効な末期肝不全症例については肝移植を積極的に考慮するべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

1.1 Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Kokudo N, Makuuchi M. Left liver with right paramedian sector--can it be an option in living donor liver transplantation? *Transplantation*. 2009 Oct 15;88(7):952.

1.2 Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Ohki T, Yoshida H, Omata M, Makuuchi M, Kokudo N. Noninvasive estimation of hepatic steatosis in living liver donors: usefulness of visceral fat

area measurement.

Transplantation. 2009 Aug 27;88(4):575-81.

1.3 Inoue Y, Sugawara Y, Tamura S, Ohtsu H, Taguri M, Makuuchi M, Kokudo N. Validity and feasibility of transient elastography for the transplanted liver in the peritransplantation period. *Transplantation*. 2009 Jul 15;88(1):103-9.

1.4 Masuzaki R, Yamashiki N, Sugawara Y, Yoshida H, Tateishi R, Tamura S, Kaneko J, Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Omata M. Assessment of liver stiffness in patients after living donor liver transplantation by transient elastography. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(9):1115-20.

1.5 Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. *Pseudomonas aeruginosa* infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis*. 2009 Feb;11(1):11-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料等の収集に関する研究

分担研究者 森 章

京都大学肝胆膵・移植外科

研究要旨

難病のひとつである原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者の中で、黄疸・肝不全に至る予後不良群の遺伝子バイオマーカーを同定するために、肝臓移植目的で当科を受診したPBC進行症例の生体試料（末梢血 DNA）を採取し、PBCの進行に関与する遺伝子の解析（SNPs解析）を行う。同定された遺伝子バイオマーカーをPBCの病型分類や予後予測式の作成に使用する。また、採取した生体試料を将来、公的バンクに提供することを可能にするための基盤整備にも取り組む。

A. 研究目的

本研究では、①PBCの進展様式に基づく新たな病型分類の確立、②PBC進行の血清および遺伝子バイオマーカーの同定、③バイオマーカー（自己抗体や遺伝子多型）を用いたPBCの予後予測式の作成、④肝移植後のPBC再発マーカーの同定、を目的として、PBC進行症例の患者情報、生体試料（血清およびDNA）を収集・解析するための研究班を組織し、多施設共同研究を行う。

また、本研究で収集・保存したPBC進行症例の生体試料（血清、DNA）を、将来、公的バンクへ提供することを可能とするために、“難病研究資源バンク（独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部）”の倫理的基盤整備、患者情報と研究成果のデータベースの構築、検体の至適保存法の確立などにも平行して取り組む。

B. 研究方法

本研究に対する「京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会」の承認を得たのち、患者登録、検体採取を開始する。症例は、肝生検で確定診断がついたPBC進行患者で、当院で肝移植術を受ける症例を対象とし、患者の同意を得て、術前、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年、4年、5年後に採血を行い、血清分離及びDNA精製を行う。連結可能匿名化を行った後、患者情報とともに難病研究資源バンクに送付する。

解析項目は、以下の通りである。①病歴、年齢、性別など、②自己抗体：抗gp210抗体（ELISA法）、抗ミトコンドリア抗体（ELISA法）、抗セントロメア抗体価（ELISA法）③一塩基多型（SNPs）：MDR3, CTLA4, RXRb, HNF4 など、④肝生検組織および摘出肝組織の病理学的評価、⑤血液生化学データ：Albumin, T.Bil., D.Bil., AST, ALT, ALP, g-GTP, T.Chol., IgG, IgM, IgA, platelet, PT など。

(倫理面への配慮)

生体試料を取り扱うために、倫理規定には厳格に対処した。即ち、“臨床研究に関する倫理指針”（厚生労働省・平成 20 年 7 月改正）、”ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”（平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号）を遵守した。

C. 研究結果

- ①本研究は、ヒト遺伝子解析研究として「京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会」の承認を得た。（平成 22 年 1 月 13 日 第 G335 号）
- ②検体の採取、精製、輸送及び連結可能匿名化データ管理のシステムを構築した。
- ③倫理委員会承認後、当院において肝移植対象となる PBC 患者がいないため、患者登録は行っていない。

D. 評価

- 1) 達成度について
倫理審査委員会承認後、未だ対象患者がいないため、生体試料の難病資源バンクへの提供は開始していない。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について
我が国には、難病の生体試料バンクが未だ存在せず、本研究はきわめて重要な意味を持つ。
- 3) 今後の展望について
当院では成人生体肝移植術を年間約 60 例行っており、そのうち PBC 症例は、6-8 例である。今後、本研究に患者登録、検体収集が進むものと思われる。
本研究は平成 21 年度 1 年限りで終了することであるが、来年度からは厚生労働

省難治性疾患克服研究事業”難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究“の中で同様の活動を続ける予定である。

E. 結論

難治性肝臓疾患である PBC の生体試料を収集し、難病資源バンクへ提供するための研究活動を開始した。倫理委員会の承認が得られたため、今後、難病資源バンクへ生体試料の提供が可能になった。本研究は、PBC の病型分類、予後予測、新しい治療法の開発につながる重要な研究と思われるので、今後は厚生労働省難治性疾患克服研究事業”難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究（坪内班）“の中で活動を継続する予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1: Egawa H, Ozawa K, Takada Y, Teramukai S, Mori A, Ogawa K, Kaido T, Fujimoto Y, Kawaguchi Y, Hatano E, Sato H, Ono M, Takai K, Tanaka K, Uemoto S. Coupled regulation of interleukin-12 receptor beta-1 of CD8 central memory and CCR7-negative memory T cells in an early alloimmunity in liver transplant recipients. Clin Exp Immunol. 2010 Mar 16. [Epub ahead of print]
- 2: Kamo N, Kaido T, Mori A, Hatano E, Takada Y, Egawa H, Uemoto S. Factors affecting postoperative hyperbilirubinemia in the donor after living donor liver transplantation.

Hepatogastroenterology.

2009;56 (91-92):840-3.

3: Egawa H, Ozawa K, Takada Y, Teramukai S, Mori A, Kasahara M, Ogawa K, Ogura Y, Oike F, Kaido T, Ono M, Sato H, Takai K, Uemoto S.

Impact of preexisting circulating effector T cells on the outcome of ABO-incompatible adult LDLT.

Dig Dis Sci. 2009;54(10):2253-63.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変）の生体試料などの収集に関する研究

分担研究者 副島 雄二
九州大学大学院 消化器・総合外科学

研究要旨

原発性胆汁性肝硬変の病型分類と予後予測のための基盤整備を行うために患者登録、検体採取、保存を行う。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変の病型分類と予後予測のための基盤整備を行うために患者登録、検体採取、保存を行う。

B. 研究方法

現在、九州大学遺伝子解析研究・研究計画

C. 研究結果

現在九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて審査中である。

D. 考察

なし。

E. 結論

なし。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikegami T, Soejima Y, Taketomi A, Kawanaka H, Yoshizumi T, et al. Hypersplenism after living donor liver transplantation

Hepatogastroenterology.

2009;56(91-92):778-82

2. Ikegami T, Soejima Y, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Nagata S, Maehara Y

Potential risk in using hepatic veins of a native liver for reconstructing accessory veins in right lobe living donor graft.

Transplantation. 2009; 88 (1):143-4

3. Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Saibara T, Nishizaki T, Maehara Y

Recurrent familial

hypobetalipoproteinemia-induced nonalcoholic fatty liver disease after living donor liver transplantation.

Liver Transpl. 2009; 15(7):806-9

4. Sugimachi K, Soejima Y, Morita K, Ueda S, Fukuhara T, Nagata S, Ikegami T, Taketomi A, Maehara Y

Rapid normalization of portopulmonary hypertension after living donor liver transplantation.

Transplant Proc. 2009; 41(5): 1976-8

5. Ikegami T, Soejima Y, Nagata S, Taketomi A, Maehara Y

The use of autologous vena cava patch graft for reconstructing multiple outflow orifices in right hemiliver living donor graft.

Transpl Int. 2009;22(8):853-5

1. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

胆管上皮細胞の産生するCX3CL1に関する研究

分担研究者 下田 慎治

九州大学大学院病態修復内科学

研究要旨

肝臓を構築する細胞の中で血管内皮細胞、胆管上皮細胞が自然免疫の感作で CX3CL1 を産生した。胆管上皮細胞からの産生には TNF- α と自己肝臓浸潤単核球の共存が必要であり、自己肝臓浸潤単核球もまた自然免疫の感作で TNF- α を産生した。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)においては、肝臓病変部位の免疫染色の結果から、胆管上皮細胞(BEC)での CX3CL1 の発現亢進と、胆管上皮周囲への CX3CR1(CX3CL1 受容体)陽性細胞の浸潤を認め、また血中 CX3CL1 濃度も上昇していることが明らかとなっているため、BEC が CX3CL1 を産生する機序を明らかとする。また BEC 以外の支持組織を構築する血管内皮細胞(EC)や肝類洞内皮細胞(LSEC)における CX3CL1 の産生も検討する。さらには、肝臓浸潤単核球(LMNC)の TNF- α 産生能について検討した。

B. 研究方法

九州大学で施行された生体肝移植の摘出肝臓(PBC:9 例、HBV:3 例、HCV:7 例、PSC:2 例)を無菌的に均質化後、密度勾配法で単核球分画を採取し、壁非付着細胞は LMNC として液体窒素に使用まで保存とした。壁付着細胞は、CD326 陽性の BEC、CD31 陽性の EC、CD31 陰性

CD105 陽性の LSEC にイムノビーズで分離後培養した。

各々の細胞分画を、各種 Toll like receptor (TLR) ligand や、初期炎症に関係した IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β での刺激、さらには自己肝臓単核球との共培養を介しての CX3CL1 産生を ELISA にて検討した。さらには LMNC を TLRL で刺激した際の TNF- α の産生を ELISA にて検討した。

C. 研究結果

EC は TLR2L、TLR3L、TLR4L、TLR5L で刺激した際に CX3CL1 を産生した。

PBC と非 PBC でその産生量に有意な差を認めなかった。

BEC は TLR3L 刺激に TNF- α が加わり、更に自己 LMNC の存在下で CX3CL1 を産生した。PBC と非 PBC でその産生量に有意な差を認めなかった。

LSEC は上記の刺激では CX3CL1 を産生しなかった。

次に LMNC は、TLR2L、TLR3L、TLR4L、TLR5L、TLR7/8L で刺激した際に TNF- α

を産生した。中でも TLR4L での刺激で最も強く TNF-a を産生し、PBC と非 PBC でその産生量に有意な差を認めた。

D. 考察

自然免疫(TLR3L)の感作で EC や BEC から細胞接着分子としてもケモカインとしても作用する CX3CL1 の産生を認めた。BEC が CX3CL1 を産生するためには TNF-a と自己 LMNC を必要としたが、LMNC は TLR4L の刺激で TNF-a を産生していたことから、BEC と LMNC が共存した場合、TLR3L と TLR4L の感作で CX3CL1 が産生されることが考えられた。また TNF-a の産生は PBC の LMNC で有意に高いことから、PBC では免疫系の異常があることが考えられた。

E. 結論

PBC において TLR3 や TLR4 からの刺激を制御すること、あるいは直接的に TNF-a を制御することで疾患コントロールができ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. Shimoda S, Harada K, Niino H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K.

CX3CL1 (fractalkine): A signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis.

Hepatology. 2010;51(2):567-75.

2. Borchers AT, Shimoda S, Bowlus C, Keen CL, Gershwin ME

Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.

Semin Immunopatol. 2009;31 (3) 309-22

2. 学会発表

1. CX3CL1 を産生する肝臓構築細胞の検索

下田慎治、酒井健司

第 45 回日本肝臓学会総会(2009 年 6 月 4、5 日。神戸)

2. 原発性胆汁性肝硬変における胆管上皮細胞での CX3CL1 産生の検討

下田慎治、酒井健司

第 95 回日本消化器病学会総会(2009 年 5 月 7、8、9 日。札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

肝組織の保存、遺伝子増幅、免疫染色に関する研究

分担研究者 伊東 正博
独立行政法人国立病院機構長崎医療センター

研究要旨

収集された難治性肝臓疾患の肝組織（生検ならびに摘出組織）、血清、末梢血 DNA の組織バンクの構築と肝組織の保存、遺伝子増幅、免疫染色に関する研究のための基盤整備を目的とする。組織の収集、インフォームドコンセントの取得、組織保存、保存組織の質的管理、収集資料の共同利用、研究課題の承認、研究成果の公開、リスク評価などに関する網羅的な Standard Operating Procedure の明文化の準備、一部試料収集を開始した。

A. 研究目的

収集された難治性肝臓疾患（原発性胆汁性肝硬変:PBC）の肝組織（生検ならびに摘出組織）、血清、末梢血 DNA の組織バンクの構築と肝組織の保存、遺伝子増幅、免疫染色に関する研究のための基盤整備を目的とする。

B. 研究方法

チェルノブイリ組織バンクは 1998 年に国際的に確立した組織で、組織バンク事業のモデル的な存在となっている。分担者はこの組織バンクの立ち上げから参画し、組織バンク構築、運用に精通している。外部評価に耐え透明性の高い組織バンクの運用にはしっかりとした Standard Operating Procedure (SOP) の明文化が重要になる。

バンク組織構築、組織の収集、「説明と同意」の取得、組織保存、保存組織の質的管理、収集資料の共同利用、研究課題の承認、研究成果の公開、リスク評価な

ど、網羅的な SOP の作成が研究開始に先立って必要になる。

施設機器整備として -80°C と -30°C の冷凍庫を整備した。倫理委員会の承認の得られた生体試料の保存（連結可能匿名化）を開始し、患者情報のデータベース作成も開始した。

（倫理面への配慮）

生体試料を取り扱うために、倫理規定には厳格に対処した。即ち、“臨床研究に関する倫理指針”（厚生労働省・平成 20 年 7 月改正）、”ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”（平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号）を遵守した。

C. 研究結果及び考案

① 当長崎医療センターでの倫理審査委員会では本臨床研究計画が承認された（承認番号 21043）。

② 分担研究者の所属施設（東京大学