

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Egawa H, Ozawa K, Takada Y, Teramukai S, <u>Mori A</u> , et al.	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.	Mar 16. [Epub ahead of print]		2010
Kamo N, Kaido T, <u>Mori A</u> , Hatano E, Takada Y, Egawa H, Uemoto S.	Factors affecting postoperative hyperbilirubinemia in the donor after living donor liver transplantation.	Hepatogastroenterology	56 (91-92)	840-3	2009
Egawa H, Ozawa K, Takada Y, Teramukai S, <u>Mori A</u> et al.	Impact of preexisting circulating effector T cells on the outcome of ABO-incompatible adult LDLT.	Dig Dis Sci.	54 (10)	2253-63	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikegami T, <u>Soejima Y</u> , Taketomi A, Kawanaka H, Yoshizumi T et al.	Hypersplenism after living donor liver transplantation	Hepatogastroenterology	56(91-92)	778-82	2009
Ikegami T, <u>Soejima Y</u> , Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H et al.	Potential risk in using hepatic veins of a native liver for reconstructing accessory veins in right lobe living donor graft.	Transplantation	88(1)	143-4	2009

Harada N, <u>Soejima Y</u> , Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H et al.	Recurrent familial hypobetalipoproteinemia-induced nonalcoholic fatty liver disease after living donor liver transplantation.	Liver Transpl.	15(7)	806-9	2009
Sugimachi K, <u>Soejima Y</u> , Morita K, Ueda S, Fukuhara T et al.	Rapid normalization of portopulmonary hypertension after living donor liver transplantation	Transplant Proc.	41(5)	1976-8	2009
Ikegami T, <u>Soejima Y</u> , 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.	22(8)	853-5	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Shimoda S</u> , Harada K, Niuro H, Taketomi A, Maehara Y et al.	CX3CL1 (fractalkine): A signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis.	Hepatology	51(2)	567-75	2010
Borchers AT, <u>Shimoda S</u> , Bowlus C, Keen CL, Gershwin ME	Lymphocyte recruitment and homing to the liver in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.	Semin Immunopathol.	31 (3)	309-22	2009
<u>Shimoda S</u> , 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 (2)	110-5	2008

<u>Shimoda S</u> , 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	47 (3)	958-65	2008
---	--	------------	--------	--------	------

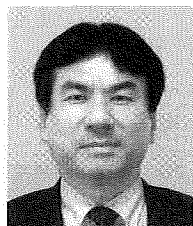
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Ito M</u> .	Review of Chernobyl Tissue Bank Project	REA Symposium2008: Twenty Years of Surveillance on Health Effects of Chernobyl Accident、Radiation Effects Association		59-68	2008
Nakashima M, Suzuki K, Meirmanov S, Naruke Y, Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Saenko V, Kondo H, Hayashi T, <u>Ito M</u> et al.	Foci formation of P53-binding protein 1 in thyroid tumors: activation of genomic instability during thyroid carcinogenesis.	Int J Cancer.	122(5)	1082-8	2008
Williams ED, Abrosimov A, Bogdanova T, Demidchik EP, <u>Ito M</u> et al.	Morphologic characteristics of Chernobyl-related childhood papillary thyroid carcinomas are independent of radiation exposure but vary with iodine intake.	Thyroid	18	847-852	2008
Miura S, Nakashima M, Kondo H, Merimanov S, <u>Ito M</u> et al.	Significance of HER2 and C-MYC oncogene amplifications in breast cancer in atomic bomb survivors: associations with radiation exposure and histologic grade.	Cancer	112(10)	2143-2151	2008

Migita K, Ueda-Nakata-R, Masuda T, Miyashita T, Ito M et al.	Macrophagic myofascitis associated with rheumatoid arthritis.	Rheumatol Int.	30(7)	987- 989	2010
伊東正博	チェルノブイリ甲状腺組織バンクについて	放影響シンポジウム 2008:チェルノブイリ事故の健康影響調査 20 年」	3	59-68	2008
伊東 正博、 山下俊一	チェルノブイリ甲状腺組織バンクと小児甲状腺癌の病理像	ホルモンと臨床	秋季増刊号	68-72	2009
成毛有紀、 伊東正博、 山下俊一、ほか	甲状腺腫瘍での 53BP1 フォーカス形成の意義：甲状腺癌化過程と遺伝子安定性	ホルモンと臨床	秋季増刊号	88-91	2009

VI. 研究成果の刊行物・別刷

原発性胆汁性肝硬変の長期予後診断と治療

Diagnosis of the long-term outcome and treatment for primary biliary cirrhosis



中村 稔(写真) 石橋大海

Minoru NAKAMURA and Hiromi ISHIBASHI

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臨床研究センター

◎原発性胆汁性肝硬変(PBC)は肝内小葉間胆管を標的とした臓器特異的自己免疫性疾患と考えられているが、生涯ほとんど進行しない症例から、進行して肝移植が必要となる症例まで、種々な重症度の症例が存在する。これまでに、Mayo risk score などの短期予後診断に有用な指標は知られていたが、発症早期において長期予後診断に有用な血清や遺伝子バイオマーカーは知られていなかった。最近、著者らのコホート研究(国立病院機構肝疾患共同研究グループ：NHOSLJ)やイタリア、アメリカ、フランスのコホート研究から、PBCの長期予後診断に有用な自己抗体や遺伝子多型が明らかとなりつつある。これらのPBC進行に関与するバイオマーカーの同定は、病態解明だけでなくPBC治療の分子標的の同定につながる可能性がある。本稿では、PBCの長期予後を規定する分子同定の現状を著者らのデータを中心に紹介し、新しい治療法選択への応用の可能性について述べる。

Key word : 原発性胆汁性肝硬変(PBC), 長期予後, 抗gp210抗体, 抗セントロメア抗体, 多剤耐性蛋白3(MDR3), バイオマーカー, 多施設共同研究

原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis : PBC)は、病理学的に肝内小葉間胆管の障害・破壊を呈する慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする慢性の肝疾患である。中年女性に好発し、初期には無症状のことが多いが、進行すると全身の掻痒感、食道静脈瘤、腹水、黄疸、脳症が出現して肝不全に至り、最終的には肝移植以外に救命方法がない。わが国では平成2年(1990)から特定疾患に指定され、医療費の公費負担対象となる症候性PBC患者の登録は年間約500人程度と、比較的可成りな疾患である。

病因に関しては、抗ミトコンドリア抗体(AMA)や抗核抗体などの自己抗体が高率に出現することや、門脈域に小葉間胆管を攻撃しているようにみえるリンパ球の浸潤を認めることから、小葉間胆管を標的とする自己免疫疾患と考えられているが、その発症・進展機構の詳細についてはいまだ明らかではない。

近年、診断法の普及により、肝機能異常を契機にAMAを測定されて早期診断される症例や、ウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid : UDCA)投与により肝機能が正常化し長期間の経過観察でも病状の進行を認めない無症候性の症例が増加しているが、種々の治療にもかかわらず病状が進行し、肝硬変・肝不全に至る症例がいまだ約10～20%存在すると推定されている。

これまでに、Mayo risk score や MELD score などの短期予後診断に有用な指標は知られていたが、発症早期において長期予後診断に有用な血清や遺伝子バイオマーカーは知られていなかった。最近、著者らのコホート研究(国立病院機構肝疾患共同研究グループ：NHOSLJ)やイタリア、アメリカ、フランスのコホート研究から、PBCの長期予後診断に有用なマーカーとして自己抗体や遺伝子多型、治療反応性の指標などの報告があいついでいる¹⁻⁷⁾。これらのPBCの進行に関与するバイオ

マーカーの同定は、病態解明だけではなく PBC の治療の分子標的の同定につながる可能性があるため、現在、活発な研究が展開されている。

本稿では、著者らが最近同定した予後予測抗体 (抗 gp210 抗体、抗セントロメア抗体) と病期の進行に関与する multidrug resistance protein 3 (MDR3) 遺伝子多型を中心に、PBC の長期予後診断に有用な分子同定の現状と最新の治療の試みについて紹介する。

PBC に出現する自己抗体と長期予後

PBC ではミトコンドリアや核成分に対する、さまざまな自己抗体が出現することが知られている。AMA はきわめて疾患特異性が高く、PBC 患者の 90% 以上に陽性となるため、その診断には不可欠の検査項目となっている。核膜孔蛋白 (gp210) や核小体蛋白 (sp100) に対する自己抗体も陽性率は約 20~30% と高くはないが、PBC 患者にきわめて特異的に検出されるため、その診断に有用である。特異性は高くはないが抗セントロメア抗体も 20~40% の症例で陽性となる。

PBC の活動性の評価や予後の診断に有用な自己抗体としては、gp210 や sp100 などの核抗原に対する自己抗体の有用性を示唆する少数の報告があったが、いずれも横断的研究からの結論であり、PBC 症例を長期間観察したコホート研究の報告はなかった。著者らは、AMA のおもな標的抗原であるピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント (PDC-E2) と gp210 蛋白との間に EIEXDK モチーフを介する分子相同性を見出していたことから、gp210 蛋白に着目し、抗 gp210 抗体の測定を開始した^{1,8)}。

まず、長崎医療センターで過去 30 年間に定期的に血清が保存されていた PBC 症例の抗 gp210 抗体価を経時的に測定したところ、gp210 抗体が持続陽性の 10 症例のうち 6 症例は観察期間中に肝不全死か肝移植に至っていたが、抗 gp210 抗体が UDCA 投与により陰性化した症例は一例も肝不全や肝移植には至らず全例生存していた。NHOSLJ の 71 症例の解析では、抗 gp210 抗体が持続陽性の症例 (group A) は経過中に陰性化した症例 (group B) や診断時より抗 gp210 抗体が陰性であった症例

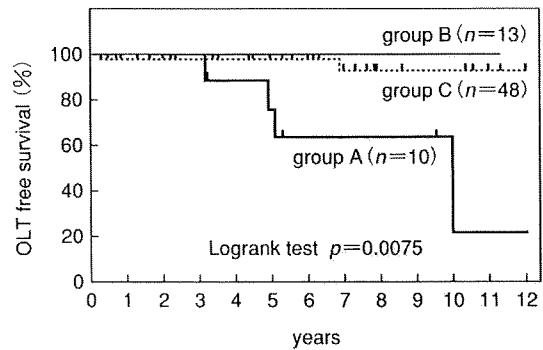


図 1 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者の生存率¹⁾

抗 gp210 抗体が持続陽性の症例 (group A) は、経過中に陰性化した症例 (group B) や診断時より抗 gp210 抗体が陰性であった症例 (group C) に比べて、有意に肝移植や肝不全死に至る症例の割合が多かった。OLT: 肝移植。

(group C) に比べて、有意に肝移植や肝不全死に至る症例の割合が多かった (図 1)。以上から、抗 gp210 抗体の測定は PBC 患者の長期予後を予測するための有用な血清マーカーであることが示唆された¹⁾。

つぎに PBC 進行における抗核抗体の意義を解析するために、NHOSLJ に登録された 276 症例について詳細に自己抗体を検討したところ、抗 gp210 抗体陽性群は陰性群に比べて有意に肝不全死、肝移植に至った症例が多かったが、抗 sp100 抗体、抗セントロメア抗体、抗クロマチン抗体の陽性群、陰性群の間には転帰に有意差を認めなかった²⁾。

観察開始時に早期 (Scheuer's stage 1, 2) であった 217 症例について、進行のエンドポイントを胃食道静脈瘤の出現 (門脈圧亢進症型進行 or 非黄疸型進行) と黄疸・肝不全の出現 (肝不全型進行 or 黄疸型進行) とに分けて解析を行ったところ、抗 gp210 抗体陽性は肝不全型 (or 黄疸型) 進行の強い危険因子であり、抗セントロメア抗体陽性は門脈圧亢進症型 (or 非黄疸型) 進行の有意な危険因子であることが明らかとなった (表 1)²⁾。また病理学的には、抗 gp210 抗体陽性は病理学的活動性の指標とされる限界板の破壊 (interface hepatitis) あるいは肝小葉内炎症 (lobular inflammation) の有意な危険因子であり、抗セントロメア抗体陽性は細胆管-小葉間胆管の増殖反応 (ductular reaction) の有

表 1 PBCの進行に対する危険因子²⁾

因子	オッズ比(95%信頼区間)		
	全	門脈圧亢進症 (非黄疸型)	肝不全 (黄疸型)
性, 男	—	—	—
年齢(one year ⁻¹)	—	1.08 (1.01~1.16)	—
gp210 抗体陽性	7.09 (2.65~20.21)	—	33.78 (5.93~636.75)
セントロメア抗体陽性	4.49 (1.66~12.78)	4.20 (1.31~14.76)	—

Unconditional step-wise logistic regression analysis. 抗 gp210 抗体陽性は肝不全型(or 黄疸型)進行の強い危険因子であり, 抗セントロメア抗体陽性は門脈圧亢進症型(or 非黄疸型)進行の有意な危険因子であった。

表 2 PBCにおけるMDR3遺伝子一塩基多型(SNPs)の頻度⁴⁾

SNP ID	アリル	アリル頻度(%)		アリル頻度の比較* オッズ比(95%信頼区間)	p-value
		非黄疸期	黄疸期		
rs31658	C	192(69.6)	6(30.0)	5.33(1.98~14.36)	0.0003
	T	84(30.4)	14(70.0)		
rs31672	T	195(70.7)	9(45.0)	2.94(1.17~7.37)	0.017
	C	81(29.3)	11(55.0)		
rs1149222	T	165(59.8)	8(40.0)	2.23(0.88~5.63)	0.083
	G	111(40.2)	12(60.0)		

* : chi-square test. MDR3 遺伝子の SNPs サイトのなかから 7 カ所の Tag SNP を選択して解析を行った。PBC の進行に有意に関連している SNPs が 3 カ所(rs31658, rs31672, rs11492)同定され, そのなかで rs31658 SNP は黄疸型進行ととくに強い相関を示した。

意な危険因子であった²⁾。

PBC患者の遺伝子多型と長期予後

一卵性双生児における PBC 発症の concordance rate が 60%以上ときわめて高いことから, PBC 発症には強い遺伝的素因が関係していることが示唆されているが, いまのところ PBC の発症と強く相関する疾患感受性遺伝子はみつかっていない。著者らは, 長期間経過観察しても進行しない予後良好群と肝硬変, 黄疸・肝不全に進行する予後不良群との遺伝的素因の違いを明らかにする目的で, 候補遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphisms : SNPs)解析を開始した。

Multidrug resistance protein 3(MDR3/ABCB4)は肝細胞の毛細胆管側に特異的に発現し, リン脂質(ホスファチジルコリン)を胆汁中へ排泄するためのトランスポーター型 ATP binding cassette

(ABC)蛋白であり, その遺伝子変異により進行性家族性肝内胆汁うっ滞 3 型(PFIC3)や妊娠時肝内胆汁うっ滞症(ICP)が発症することが知られている。そのため, MDR3 遺伝子の異常あるいは多型が PBC の発症や進行に影響している可能性が推測されていたが, これらに関連する有意な遺伝子多型は同定されていなかった。

著者らは国際 HapMap 計画と integrated Analysis Pipeline (iHap)の遺伝子情報に基づき, MDR3 遺伝子の SNPs サイトのなかから 7 カ所の Tag SNP を選択して解析を行った。PBC の進行に有意に関連している SNPs が 3 カ所(rs31658, rs31672, rs11492)同定され, そのなかで rs31658 の SNP は黄疸型進行ととくに強い相関を示した(表 2)⁴⁾。ハプロタイプ・ディプロタイプ解析からは, rs31658 が T のホモである HAP2/HAP2 を有する症例が, 有しない症例に比べて約 17 倍, 黄疸期へ進行する

表 3 PBCにおけるMDR3遺伝子のハプロタイプ・ディプロタイプの頻度¹⁾

ハプロタイプ

	SNP ID			ハプロタイプ頻度(%)		ハプロタイプ頻度の比較*	p-value
	rs31658	rs31672	rs1149222	非黄疸期	黄疸期	オッズ比(95%信頼区間)	
Hap 1	C	T	T	140(50.7)	5(25.0)	0.32(0.11~0.92)	0.033
Hap 2	T	C	G	56(20.3)	10(50.0)	3.93(1.56~9.90)	

ディプロタイプ

	SNP ID			ディプロタイプ頻度(%)		ディプロタイプ頻度の比較*	p-value
	rs31658	rs31672	rs1149222	非黄疸期	黄疸期	オッズ比(95%信頼区間)	
Hap 1/Hap 1	C	T	T	35(25.4)	0	—	—
	C	T	T				
Hap 2/Hap 2	T	C	G	5(3.6)	4(40.0)	17.73(3.77~83.42)	0.0003
	T	C	G				

* : Logistic regression analysis. ハプロタイプ・ディプロタイプ解析からは, rs31658 が T のホモである HAP2/HAP2 が non-HAP2/HAP2 に比べて黄疸期へ進行する危険性が約 17 倍高かった。

表 4 PBCの進行に影響するSNPs

遺伝子	SNP ID		OR(95%CI)	p-value	文献
CTLA4	rs231775	A vs. G	OR 2.46(1.05~5.76)	0.04	6)
CTLA4	rs3087243	A vs. G	OR 0.44(0.24~0.81)	0.008	6)
PDCD1	rs11568821	AA vs. AG+GG	OR 14.74(1.89~114.9)	0.01	6)
TNF- α	rs1799724	C vs. T	—	0.011	5)
TNF- α	rs1800629	G vs. A	OR 4.9(1.4~17.1)	0.014	10)
IL-1 β	rs1143634	CC vs. CT+TT	OR 3.03(1.45~6.36)	0.022	12)
SLC4AE2(AE2)	rs2303932	T vs. A	—	0.009	5)
MDR3(ABCB4)	rs31658	T vs. C	OR 5.33(1.98~14.36)	0.0003	4)
CYP2E1	rs2031920	c1 vs. c2	OR 11.39(1.09~119.47)	0.043	13)
Apolipoprotein E	exon4	ϵ 4 vs. ϵ 2+ ϵ 3	—	<0.01	11)
eNOS	rs1799983	G vs. T	—	0.032	9)
eNOS	T-786C	T vs. C	—	0.038	9)

いままでに PBC の進行に有意に関与していることが報告されている SNPs を示す, 免疫関連分子の SNPs に加えて最近, PBC の進行に対して強く影響するトランスポーターの SNPs がみつかったことが注目される。

危険性が高いことが明らかとなった(表 3)⁴⁾, リン脂質は胆汁毒性を下げるために重要な胆汁の構成成分であることから著者らは, rs31658SNP が MDR3 の機能, すなわちリン脂質の排泄能力の個人差を介して黄疸への進行リスクを規定していると推測している。

いままでに報告された遺伝子多型のなかから, PBC の進行に有意に関与していると思われる SNPs を表 4 にまとめた^{4,6,9-13)}。従来, 自己免疫疾患の遺伝子多型の解析で注目されてきた免疫関連分子に加えて最近, トランスポーターやその発現

を制御する核内レセプター(未発表データ)のなかに, PBC の進行に対して強く影響する SNPs がみつかったことは, PBC の病因や病態形成を考えるうえできわめて興味深いと思われる^{4,5)}。今後は予後予測抗体やこれらの SNPs を組み合わせることにより, より正確な予後不良群の同定が可能になるものと思われる。

PBCの治療

1980 年代末に PBC の治療薬として UDCA が登場して以来, PBC の予後は著明に改善してき

た^{7,14)}。UDCA のおもな作用機序は、毒性の強い疎水性の胆汁酸を水溶性で毒性のない UDCA で置換することにより胆汁毒性を低下させることと考えられている。しかし、UDCA は進行例にはあまり有効ではなく、また発症早期の症例のなかにも UDCA に治療抵抗性の症例が約 20% 存在する。このような症例に対する新しい治療薬として最近、PPAR α のリガンドである bezafibrate の有効性が報告されている¹⁵⁾。Bezafibrate は元来、高脂血症の薬物であるが、MDR3 蛋白の発現を誘導し胆汁中へのリン脂質の排泄を増加させる作用を有することから、胆汁毒性を低下させることがおもな作用機序と推測される。一方、スタチン系の高脂血症の治療薬である atorvastatin も、核内レセプターである PXR/SXR や PPAR α の活性化を介する胆汁酸代謝改善効果を期待されて UDCA 抵抗性の PBC 症例に投与されたが、胆汁うっ滞に対する有効性は認められていない¹⁶⁾。今後、これらの治療薬への反応性と胆汁酸代謝に関連した遺伝子の SNPs との相関解析は、PBC 治療の新しい分子標的的同定のために必須の研究課題と思われる。

PBC の 10~20% の症例は程度の差こそあれ自己免疫性肝炎 (AIH) 様の病態を合併するが、最近、PBC-AIH overlap syndrome に対しては UDCA と副腎皮質ステロイド薬との併用療法の有効性が報告されている¹⁷⁾。AIH の合併は UDCA に対する治療抵抗性や急激な進行の原因となるため、その診断と適切な治療は PBC の予後改善のための重要な因子と思われる。また、肝を 1 回通過することによりそのほとんどが分解されるため全身への副作用が少なく肝への効果が増強される副腎皮質ステロイド薬 (budesonide) の PBC 患者への投与試験が行われたが、UDCA と budesonide の併用療法は、明らかな AIH を合併していない PBC 症例に対しても肝・胆管系酵素の正常化や肝の線維化の予防に有効であった¹⁸⁾。今後、PBC に対する適切な治療法選択のためにも、正確な長期予後予測や PBC の進行や薬物反応性を規定している遺伝的素因の同定はきわめて重要な研究課題と思われる。

PBCの病型分類と進行仮説

PBC は、①比較的急速に進行し肝不全、肝移植に至る抗 gp210 抗体陽性群 (肝不全型 or 黄疸型進行群) と、②比較的緩徐に進行し門脈圧亢進症に至る抗セントロメア抗体陽性群 (門脈圧亢進症型 or 非黄疸型進行群)、および③長期経過観察でもほとんど進行しない非進行群の 3 群に分類されることから、著者らはつぎのような PBC の進行仮説を提唱している^{1-4,8)}。

① ミトコンドリア抗原 (PDC-E2) に対する免疫寛容の破綻は発症早期に生じ、門脈域の炎症細胞浸潤の持続に必須であるが、それだけでは肝硬変への進行には不十分である。

② 肝硬変への進行には gp210 に対する免疫寛容の破綻が必要であり、とくに黄疸、肝不全への進行には gp210 に対する免疫寛容の破綻が必須である。

③ PDC-E2 に対する免疫寛容の破綻から gp210 に対する免疫寛容の破綻に至る過程 (intermolecular epitope spreading) で、分子擬態 (molecular mimicry) や小葉間胆管細胞における gp210 抗原の発現の変化 (aberrant expression) が重要な役割を果たしている可能性がある。

④ セントロメアに対する免疫寛容の破綻は PBC の発症早期に生じており、抗セントロメア抗体陽性群では発症早期に将来の肝硬変への進行のリスクが規定されている。

⑤ これらの免疫異常 (自己免疫現象) の関与のほかに、胆汁酸の合成や排泄に関するトランスポーターや核内受容体 (MDR3/ABCB4, AE2, RXR, LXR など) の SNPs が PBC の進行の個人差に重要な役割を果たしている可能性がある。

おわりに

PBC の病型の違いにより異なる自己抗体が危険因子となる現象は、病型により標的となる自己抗原や自己抗原の提示機構が異なることを示唆しており、PBC の病態を考えるうえできわめて興味深い現象と思われる。また、PBC の進行に関与する遺伝子多型のひとつが MDR3 遺伝子のなかに見出されたことは、胆汁酸の代謝に関係したトランスポーターやそれを制御している核内受容体

が PBC 治療の分子標的となる可能性を示唆しており、きわめて興味深い。今後は、PBC の病型分類に基づき、それぞれの病型に特徴的な血清および遺伝子バイオマーカーの探索を進めると同時に、これらの自己抗原に対する免疫寛容の破綻機構の解明や新しい分子標的治療の開発が重要な研究課題と思われる。

文献

- 1) Nakamura, M. et al. : Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.*, **42** : 386-392, 2005.
- 2) Nakamura, M. et al. : Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **45** : 118-127, 2007.
- 3) Nakamura, M. et al. : Predictive role of anti-gp210 and anti-centromere antibodies in long-term outcome of primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Res.*, **37** : S412-419, 2007.
- 4) Ohishi, Y. 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*, **48** : 853-862, 2008.
- 5) Poupon, R. et al. : Genetic factor of susceptibility and of severity in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.*, **49** : 1038-1045, 2008.
- 6) Juran, B. D. et al. : Interacting alleles of the coinhibitory immunoreceptor genes cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell-death 1 influence risk and features of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **47** : 563-570, 2008.
- 7) Corpechot, C. et al. : Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **48** : 871-877, 2008.
- 8) Shimoda, S. et al. : Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, **124** : 1915-1925, 2003.
- 9) Selmi, C. et al. : Genetic variants of endothelial nitric oxide synthase in patients with primary biliary cirrhosis : association with disease severity. *J. Hepatol.*, **30** : 232-236, 1999.
- 10) Tanaka, A. et al. : The tumor necrosis factor- α promoter correlates with progression of primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.*, **30** : 826-829, 1999.
- 11) Corpechot, C. et al. : Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis? *J. Hepatol.*, **35** : 324-328, 2001.
- 12) Donaldson, P. et al. : HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis : association with disease progression and disease susceptibility. *Gut*, **48** : 397-402, 2001.
- 13) Kimura, Y. et al. : Genetic polymorphisms influencing xenobiotic metabolism and transport in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **41** : 55-63, 2005.
- 14) Pares, A. et al. : Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology*, **130** : 715-720, 2006.
- 15) Iwasaki, S. et al. : The efficacy of ursodeoxycholic acid and bezafibrate combination therapy for primary biliary cirrhosis : A prospective, multicenter study. *Hepatol. Res.*, **38** : 557-564, 2008.
- 16) Stojakovic, T. et al. : Atorvastatin in patients with primary biliary cirrhosis and incomplete biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology*, **46** : 776-784, 2007.
- 17) Chazouilleres, O. et al. : Long term outcome and response to therapy of primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome. *J. Hepatol.*, **44** : 400-406, 2006.
- 18) Rautiainen, H. et al. : Budesonide combined with UDCA to improve liver histology in primary biliary cirrhosis : A three-year randomized trial. *Hepatology*, **41** : 747-752, 2005.

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

中村 稔¹⁾²⁾ 相葉佳洋¹⁾ 小森敦正¹⁾²⁾ 石橋大海¹⁾²⁾

IRYO Vol. 63 No. 6 (357-362) 2009

要旨

原発性胆汁性肝硬変：primary biliary cirrhosis (PBC) はいまだ根治的な治療法が確立していない肝疾患難病の一つであるが、生涯ほとんど進行しない症例や進行して肝移植が必要となる症例が存在する。PBCの診断には、本疾患に特異的に出現する抗ミトコンドリア抗体：anti-mitochondrial antibodies (AMA)の測定がきわめて有用であるが、AMAはPBCの活動性や長期予後の診断には有用ではないとされ、PBCの長期予後診断に有用なバイオマーカーは知られていなかった。最近われわれは、国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ：National Hospital Organization Study Group for Liver Disease in Japan (NHOSLJ)のコホート研究により、PBCの長期予後の診断には、核膜孔蛋白（gp210抗原）に対する自己抗体（抗gp210抗体）の測定が有用であることを明らかにした。さらに、抗gp210抗体が黄疸を呈し肝不全へ進行するタイプ（肝不全型）の強い危険因子であるのに対して、抗セントロメア抗体が黄疸を呈さないが門脈圧亢進症へ進展するタイプ（門脈圧亢進症型）の危険因子であることも明らかにした。抗gp210抗体と抗セントロメア抗体の測定で予後を推定することが可能となり、より早い時期から対策（治療計画）を立てることができるようになった。

キーワード 原発性胆汁性肝硬変 (PBC), 抗gp210抗体, 抗セントロメア抗体, 予後予測, 多施設共同研究

はじめに

現在、わが国では、いわゆる“難病（昭和47年の難病対策要綱によって定義）”の中から123疾患が難治性疾患克服研究事業対象疾患（特定疾患）に指定され、うち45疾患の医療費が公費負担助成の対象と

なっている。原発性胆汁性肝硬変：primary biliary cirrhosis (PBC)も、公費負担助成対象となっている特定疾患の一つであり、厚生労働科学研究費補助金により調査研究班が組織され、実態調査や原因究明、治療法の確立などに関する研究が行われている（難病情報センター <http://www.nanbyou.or>）

1) 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 2) 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

別刷請求先：中村 稔 長崎医療センター 臨床研究センター内 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科肝臓病学講座 〒856-8562 長崎県大村市久原 2-1001-1

（平成20年8月2日受付，平成21年2月13日受理）

New Biomarkers for the Detection of Disease-progression in Primary Biliary Cirrhosis, an Intractable Liver Disease Minoru Nakamura¹⁾²⁾, Yoshihiro Aiba¹⁾, Atsumasa Komori¹⁾²⁾ and Hiromi Ishibashi, NHO Nagasaki Medical Center and Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

Key Words: primary biliary cirrhosis (PBC), anti-gp210 antibody, anti-centromere antibody, prediction of prognosis, multicenter cohort study

表1 原発性胆汁性肝硬変で出現する自己抗体とその対応抗原

自己抗体	対応抗原
・抗ミトコンドリア抗体 抗PDC抗体	PDC-E 2 (74kD) PDC-E 3 BP (50kD) PDC-E 1 a (41kD)
抗OGDC抗体 抗BCOADC抗体	OGDC-E 2 (48kD) BCOADC-E 2 (52kD)
・抗核抗体 抗核膜抗体	gp210 (核膜孔蛋白210kD) p62 (核膜孔蛋白62kD) Lamin B Receptor (58kD)
抗核小体抗体	sp100 (100kD)
抗セントロメア抗体	PML. SUMO CENP-B (80kD)

jp/).

PBCのような稀有で慢性に経過する疾患では、その原因究明や治療法の確立のためには、長期間にわたる全国規模での共同研究が不可欠である。われわれは、平成15年度から国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ (NHOSLJ) の中にPBC研究班 (参加25施設) を組織し、多施設共同研究を開始した。

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、さまざまな病態ないしは重症度の症例が存在することから、まず、これらの予後良好群と不良群とを発症早期に鑑別するための血清および遺伝子バイオマーカーの同定を目指して臨床研究を開始した。

今までに、核膜孔蛋白の構成成分のひとつであるgp210に対する自己抗体 (抗gp210抗体) がPBCの肝不全型 (黄疸型) 進行の強い危険因子であること、抗セントロメア抗体が門脈圧亢進症型 (非黄疸型) 進行の危険因子であることを見出し、自己抗体をバイオマーカーとしたPBCの新しい病型分類を提唱している¹²⁾。

本総説では、この病型分類提唱のきっかけとなった抗gp210抗体の臨床的意義についてわれわれのデータを中心に紹介するとともに、PBCの進展機構に関する現時点での考え方についても紹介する³⁾。

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) とは

PBCは肝内小葉間胆管の障害・破壊を呈する慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする慢性の肝疾患である。中年女性に好発し、初期には無症状のことが多いが、典型例では、進行すると全身の掻痒感、食道静脈瘤、腹水、黄疸、脳症が出現して肝不全に至り、究極的には肝臓移植以外に救命方法がない。平成2年からは特定疾患に指定され、医療費の公費負担対象となる症候性PBC患者は年間約500-1,000人で、現在までに約15,000人が登録されている。病因に関しては、AMAや抗核抗体などの自己抗体が高率に出現することや門脈域に小葉間胆管を攻撃しているように見えるリンパ球の浸潤を認めることから、小葉間胆管を標的とする自己免疫疾患と考えられているが、その発症・進展機構の詳細についてはいまだ明らかではない。

近年、健診と診断法の普及により、肝機能異常を契機にAMAを検査し早期診断される症例や、ウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid (UDCA)) 投与により肝機能が正常化し、長期間の経過観察でも病状の進行を認めない無症候性の症例が増加しているが、種々の治療にもかかわらず病状が進行し、肝硬変・肝不全に至る症例が約10-20%存在すると推定されている。

PBCに出現する自己抗体

本症では、ミトコンドリアや核成分に対するさまざまな自己抗体が出現することが知られている (表1)。AMAはきわめて疾患特異性が高く、PBC患

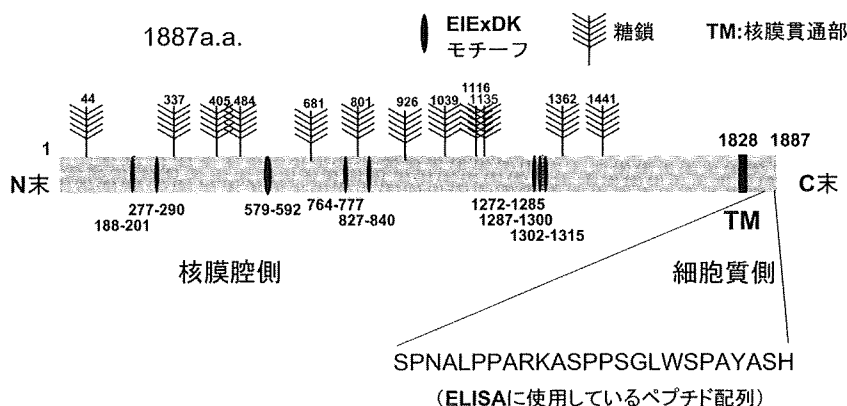


図1 核膜孔蛋白 gp210の構造

者の90%以上に陽性となるため、その診断には不可欠の検査項目となっている。核膜孔蛋白 (gp210) や核小体蛋白 (sp100) に対する自己抗体も、陽性率は約20-30%と高くはないが、PBC患者にきわめて特異的に検出されるため、その診断に有用である。特異性は高くはないが、抗セントロメア抗体も20-40%の症例で陽性となる。

一方、PBCの活動性の評価や予後の診断に有用な自己抗体としては、gp210やsp100などの核抗原に対する自己抗体の有用性を示唆する少数の報告はあったが、いずれも横断的研究からの結論であり、PBC症例を長期間観察したコホート研究の報告はなかった。そこでわれわれは、AMAの主要標的抗原であるピルビン酸脱水素酵素E2コンポーネント (PDC-E2) とgp210蛋白との間にEIExDKモチーフを介する分子相同性があることを見出していたことから (図1)⁴⁾、gp210蛋白に対する免疫応答の出現とPBCの進展との関係に興味を持ち、抗gp210抗体の測定を開始した²⁾。

抗gp210抗体測定系の確立とPBCの長期予後

gp210は、核膜孔を構成する一回膜貫通型の1,887アミノ酸よりなる分子量21,000の糖蛋白で、N末が核膜腔に、C末が細胞質側に局在する (図1)。膜貫通部よりN末は、約1,800のアミノ酸より構成され糖鎖を多く含むのに対し、C末は60個のアミノ酸からなるペプチドで糖鎖結合部位は存在しない。その機能については核膜孔の構成成分であること以外はいまだ明らかになっていない。

gp210に対する自己抗体が結合する抗原部位はN末とC末の両方に存在することが報告されていたが、われわれは、C末のペプチド (SPNALPPAR-

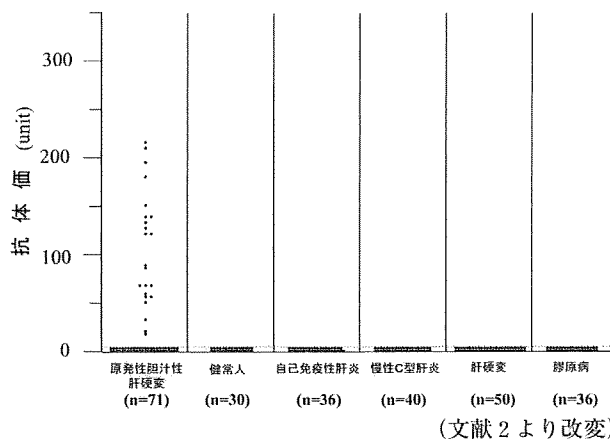


図2 gp210-C末ペプチドに対する血清抗体価

KASPPSGLWSPAYASH) (図1) を用いた enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) が、精製あるいはコンビナント gp210蛋白を用いた免疫プロット法やELISAに比べて、抗gp210抗体検出の感度ははるかに優れていたことから、この25-merのgp210-C末のペプチドを用いたELISAを用いてgp210抗体の測定を開始した²⁾。このアッセイ系では、抗gp210抗体はPBC患者でのみ検出され、他の疾患 (自己免疫性肝炎、慢性C型肝炎、肝硬変、膠原病) ではまったく検出されず、PBCにきわめて特異性の高い自己抗体を検出していることが確認された (図2)²⁾。

次に、長崎医療センターで過去30年間に定期的に血清が保存されていたPBC症例の抗gp210抗体価を経時的に測定した (図3)。gp210抗体が持続陽性の10症例のうち6症例は観察期間中に肝不全死か肝移植に至っていたが (group A)、抗gp210抗体がUDCA投与により陰性化した症例は1例も肝不全や肝移植には至らず全例生存していた (group B)。NHOSLJでの71症例のKaplan-Meier法による解析

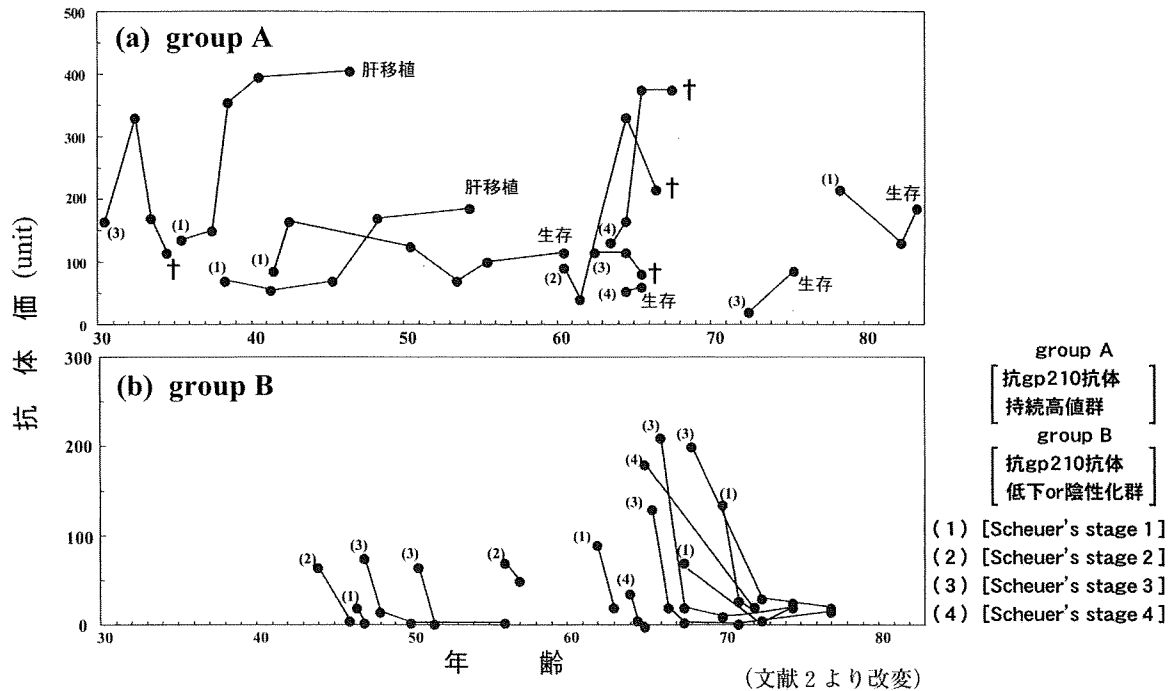


図3 PBC患者の抗gp210抗体価の経時的変化と転帰

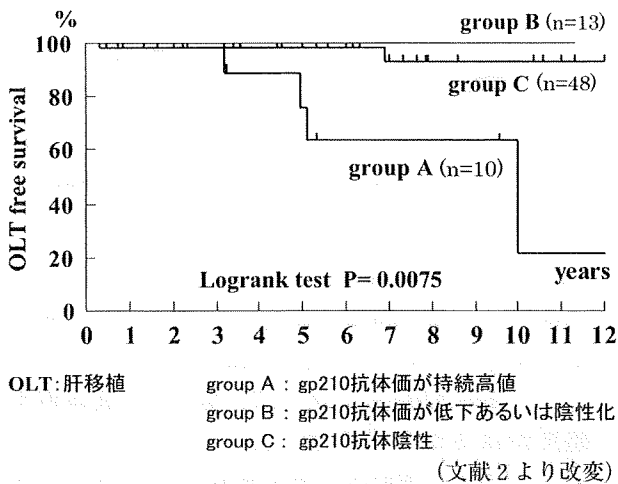


図4 PBC患者の生存率

では、抗gp210抗体が持続陽性の症例 (group A) は、経過中に陰性化した症例 (group B) や診断時より抗gp210抗体が陰性であった症例 (group C) に比べて有意に肝移植や肝不全死に至る症例の割合が多かった (図4)。以上から、抗gp210抗体の測定は、PBC患者の長期予後を予測するためのきわめて有用な血清マーカーであることが示唆された¹⁾。

PBCの進行と抗核抗体

PBCの進行における抗核抗体の意義をさらに詳細に解析するために、NHOSLJに登録された276症

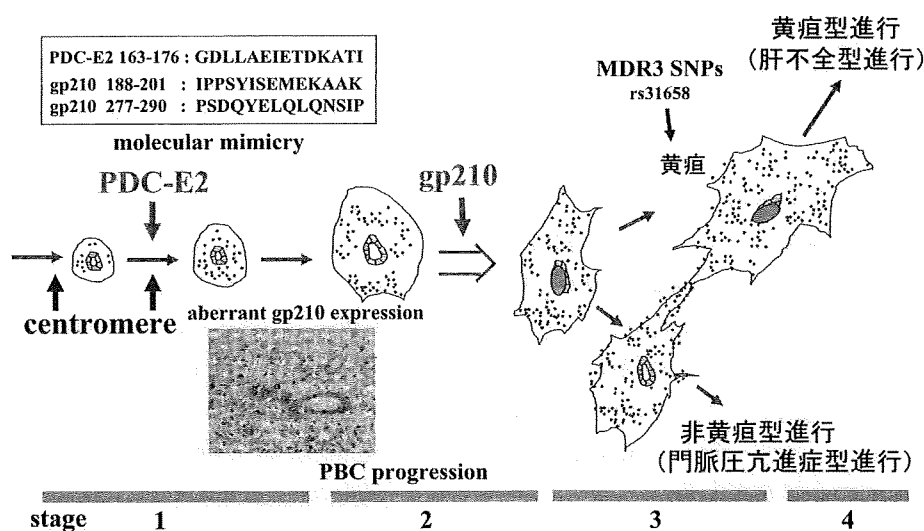
例の血清抗gp210抗体、抗セントロメア抗体、抗sp100抗体、抗クロマチン抗体を経時的に測定した¹⁾。これらの自己抗体の有無とPBCの予後についてのKaplan-Meier法による解析では、抗gp210抗体陽性群は陰性群に比べて有意に肝不全死、肝移植に至った症例が多かったが、抗sp100抗体、抗セントロメア抗体、抗クロマチン抗体の陽性群、陰性群の間には、転帰に有意差を認めなかった¹⁾。

次に、観察開始時に早期 (Scheuer's stage 1, 2) であった217症例について、進行のエンドポイントを胃食道静脈瘤の出現 (門脈圧亢進型進行 or 非黄疸型進行)、黄疸・肝不全の出現 (肝不全型進行 or 黄疸型進行) に分けて解析を行ったところ、抗gp210抗体陽性は肝不全型進行の強い危険因子であり、抗セントロメア抗体陽性は門脈圧亢進型 (または非黄疸型) 進行の有意な危険因子であることが明らかとなった (表2)¹⁾。また、病理学的には、抗gp210抗体陽性は病理学的活動性の指標とされる限界板の破壊 (interface hepatitis) あるいは肝小葉内炎症 (lobular inflammation) の有意な危険因子であり、抗セントロメア抗体陽性は胆細管-小葉間胆管の増殖反応 (ductular reaction) の有意な危険因子であった¹⁾。

表2 原発性胆汁性肝硬変の進行に対する危険因子 (n=217)

因子	Odds ratio (95% confidence interval)		
	全	門脈圧亢進症 (非黄疸型)	肝不全 (黄疸型)
性, 男	-	-	-
年齢 (one year ¹)	-	1.08 (1.01 - 1.16)	-
抗gp210 抗体陽性	7.09 (2.65 - 20.21)	-	33.78 (5.93 - 636.75)
抗セントロメア抗体陽性	4.49 (1.66 - 12.78)	4.20 (1.31 - 14.76)	-
抗sp100 抗体陽性	-	-	-
抗クロマチン抗体陽性	-	-	-

(unconditional step-wise logistic regression analysis)
(文献1より改変)



(文献1, 2, 3, 4, 5, 6より改変)

図5 PBCの進行仮説

PBCの病型分類と進行仮説

以上のことから、PBCは比較的急速に進行し肝不全、肝移植に至る抗gp210抗体陽性群、比較的緩徐に進行し門脈圧亢進症に至る抗セントロメア抗体陽性群、および長期経過観察でもほとんど進行しない非進行群の3群に分類されることが示唆された¹⁾³⁾。また、肝生検組織におけるgp210蛋白の局在を、gp210-C末に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、免疫染色にて検討したところ、核膜のgp210の染色性は、PBCだけでなく、自己免疫性肝炎やウイルス肝炎においても門脈域の炎症細胞に囲まれた小葉間胆管細胞において亢進しており、炎症を介した何らかの機序によりgp210の発現に変化が生じていることが推測された⁵⁾。

われわれは現在、図5に示すような進行仮説を提唱している³⁾。①PDC-E2に対する免疫寛容の破綻は発症早期に生じ、門脈域の炎症細胞浸潤の持続に必須であるが、それだけではstage3, 4への進行には不十分である。②stage3, 4への進行にはgp210に対する免疫寛容の破綻が必要であり、とくに黄疸、肝不全への進行にはgp210に対する免疫寛容の破綻が不可欠である。③PDC-E2に対する免疫寛容の破綻からgp210に対する免疫寛容の破綻に至る過程 (intermolecular epitope spreading) で、分子擬態 (molecular mimicry) や小葉間胆管細胞におけるgp210抗原の発現の変化 (aberrant expression) が重要な役割を果たしている可能性がある。④セントロメアに対する免疫寛容の破綻はPBCの発症早期に生じており、抗セントロメア抗体陽性群

では発症早期に将来の stage 3, 4 への進行のリスクが規定されている。

また、最近われわれは、黄疸、肝不全への進行に Multidrug resistance protein 3 (MDR 3/ABCB 4) の遺伝子多型 (SNPs) が関与していることも明らかにした⁶⁾。

おわりに

抗 gp210 抗体は PBC の病理学的活動性を反映する血清マーカーであり、その出現は、PBC における胆管障害、さらには肝硬変、肝不全への進展の重要な危険因子であることを明らかにした。血清抗 gp210 抗体の陽性化は、PBC の病理学的活動性とも相関しており、gp210 蛋白に対する免疫応答が PBC の胆管障害、さらには肝硬変、肝不全への進展に重要な役割を果たしていることが推定される。一方、抗セントロメア抗体の出現は、門脈圧亢進症への進行の危険因子であることが判明した。病型の違いにより異なる自己抗体が陽性となる現象は、病型により標的となる自己抗原や自己抗原の提示機構が異なることを示唆しており、PBC の病因を考える上できわめて興味深い現象と思われる。今後は、病型分類に基づく血清および遺伝子バイオマーカーの探索と同時に、これらの自己抗原に対する免疫寛容の破綻機構の解析をすすめる必要がある。

謝 辞

本研究は、国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ (NHOSLJ) ・PBC 研究班の共同研究として平成15年度から行われているものです。以下の参加25施設の担当の先生方に深謝致します。

参加施設：国立病院機構・長崎医療センター、大阪医療センター、九州医療センター、東京病院、呉医療センター、小倉医療センター、大分医療センター、

仙台医療センター、西埼玉中央病院、東京医療センター、災害医療センター、横浜医療センター、相模原病院、まつもと医療センター松本病院、金沢医療センター、名古屋医療センター、京都医療センター、岡山医療センター、東広島医療センター、嬉野医療センター、熊本医療センター、別府医療センター、米子医療センター、西札幌病院、国立国際医療センター国府台病院

[文献]

- 1) Nakamura M, Kondo H, Mori T et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 118-27.
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y et al. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2005; 42: 386-92.
- 3) Nakamura M, Komori A, Ito M et al. Predictive role of anti-gp210 and anti-centromere antibodies in long-term outcome of primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* 2007; 37: S412-19.
- 4) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H et al. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1915-25.
- 5) Nakamura M, Takii Y, Ito M et al. Increased expression of nuclear envelope gp 210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmunity* 2006; 26: 138-45.
- 6) Ohishi Y, Nakamura M, Iio N 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.

Original Article

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

Minoru Nakamura,^{1,2,3} Michio Yasunami,⁴ Hisayoshi Kondo,⁵ Hitomi Horie,⁴ Yoshihiro Aiba,¹ Atsumasa Komori,^{1,2} Kiyoshi Migita,^{1,2} Hiroshi Yatsushashi,^{1,2} Masahiro Ito,^{1,2} Shinji Shimoda,⁶ Hiromi Ishibashi,^{1,2} and PBC Study Group in NHOSLJ*

¹Clinical Research Center, National Hospital Organization (NHO) Nagasaki Medical Center, ²Department of Hepatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, ³Headquarters of PBC Research in the National Hospital Organization Study Group for Liver Disease in Japan (NHOSLJ), ⁴Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University, ⁵Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, ⁶Department of Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

Aims: Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis (PBC). However, the association of human leukocyte antigen (HLA) polymorphisms with these risk factors is unknown.

Methods: We determined the HLA-DRB1 genotype in 334 Japanese PBC patients and studied their serum antibodies to gp210 and centromere during the 1–452-month observation period.

Results: Anti-gp210 (odds ratio [OR] 46.56, 95% confidence interval [CI], 9.20–850.1) and anti-centromere antibodies (OR, 2.36, 95% CI, 1.28–4.35) were significant risk factors for jaundice- and nonjaundice-type progression, respectively.

HLA-DRB1*0405 and *0803 predisposed patients to anti-gp210 (OR, 1.61, 95% CI, 1.08–2.39) and anti-centromere (OR, 2.30, 95% CI, 1.41–3.73) antibody production, respectively. HLA-DRB1*1502 and *0901 patients were predisposed to nonjaundice-type progression (OR, 1.98, 95% CI, 1.13–3.40 and OR, 1.78, 95% CI, 1.02–3.03), while HLA-DRB1*0803 and *0405 patients were predisposed to disease development (OR, 2.24, 95% CI, 1.48–3.41 and OR, 1.53, 95% CI, 1.11–2.11, respectively). Stratifying patients by HLA-DRB1 alleles revealed that anti-gp210 antibodies was a strong risk factor, regardless of the HLA-DRB1 alleles for jaundice-type progression, while anti-centromere antibodies was a significant risk factor for nonjaundice-type progression in patients with

Correspondence: Dr Minoru Nakamura, Headquarters of PBC Research in NHOSLJ, Clinical Research Center, National Hospital Organization (NHO) Nagasaki Medical Center and Department of Hepatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Kubara 2-1001-1, Omura, Nagasaki 856-8562, Japan. Email: nakamuram@nmc.hosp.go.jp

*Members of PBC Study Group in NHOSLJ are as follows: Drs Takeo Saoshiro and Akira Saito (NHO Nishisaitama Chuo Hospital), Dr Makoto Nakamura (NHO Kyushu Medical Center), Dr Naohiko Masaki (Kokusai Medical Center), Dr Michiyasu Yagura (NHO Tokyo Hospital), Drs Yukio Watanabe and Yoko Nakamura (NHO Sagami Hospital), Drs Koichi Honda and Toyokichi Muro (NHO Oita Medical Center), Dr Shigeki Hayashi (NHO Saigai Medical Center), Dr Masaaki Shimada (NHO Nagoya Medical Center), Dr Masakazu Kobayashi (NHO Matsumoto Medical Center), Dr Yukio Ohara (NHO Nishisapporo Hospital), Dr Tatsuji Komatsu (NHO Yokohama

Medical Center), Drs Hajime Ota and Hideo Morimoto (NHO Kanazawa Medical Center), Drs Hirotsugu Kouno and Hirofumi Kouno (NHO Kure Medical Center), Drs Haruhiro Yamashita and Tomohiko Mannami (NHO Okayama Medical Center), Drs Takeaki Sato and Akihide Masumoto (NHO Kokura Medical Center), Dr Toshiki Komeda (NHO Kyoto Medical Center), Dr Michiaki Koga (NHO Ureshino Medical Center), Dr Masahiko Takahashi (NHO Tokyo Medical Center), Dr Tetsuo Yamamoto (NHO Yonago Medical Center), Dr Kazuhiro Sugi (NHO Kumamoto Medical Center), Dr Michio Kato (NHO Osaka Medical Center), Dr Hiroshi Mano (NHO Sendai Medical Center), Eiichi Takesaki (NHO Higashi Hiroshima Medical Center), Drs Shinya Nagaoka, Seigo Abiru, Koji Yano (NHO Nagasaki Medical Center).

Received 2 October 2009; revision 29 October 2009; accepted 9 November 2009.

HLA-DRB1*0405 (OR, 6.89, 95% CI, 2.18–26.56) and -DRB1*0803 (OR, 5.42, 95% CI, 1.47–24.62) but not other HLA-DRB1 alleles.

Conclusions: HLA-DRB1 polymorphisms are significantly associated with not only disease development and progression but also antinuclear antibody production and the

determination of the relative risk of antinuclear antibodies that contribute to PBC disease progression.

Key words: anti-gp210 antibodies, anti-centromere antibodies, Primary biliary cirrhosis, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*1502

INTRODUCTION

PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS (PBC) is a chronic, progressive, cholestatic autoimmune liver disease characterized by intrahepatic bile duct destruction, portal inflammation, and the development of cirrhosis and hepatic failure.^{1,2}

A hallmark for the diagnosis of PBC is the presence of anti-mitochondrial antibodies (AMAs), which are detected in approximately 90% of PBC patients.³ In addition, antinuclear antibodies (ANAs) such as anti-gp210, anti-sp100, and anti-centromere antibodies are specifically detected in 30–50% of PBC patients.^{4–12}

We previously found that anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of PBC in a cohort study of Japanese PBC patients who were registered at the National Hospital Organization Study Group for Liver Disease in Japan (NHOSLJ); the presence of anti-gp210 antibodies is a strong risk factor for jaundice-type progression, while anti-centromere antibody seropositivity is a significant risk factor for nonjaundice-type progression in PBC.¹¹ Based on these findings, we proposed that PBC can be classified at least into two distinct clinical types: (i) jaundice-type (or hepatic failure-type) progression, distinguished by the presence of anti-gp210 antibodies and (ii) nonjaundice-type (or portal hypertension-type) progression, represented by the presence of anti-centromere antibodies.^{11,12} However, the molecular mechanisms underlying these two different types of PBC disease progression are largely unknown.

The major histocompatibility complex (MHC) class I and class II constitute the susceptibility loci in many autoimmune diseases, including ankylosing spondylitis (*B27*), psoriasis (*Cw6*), rheumatoid arthritis (*DR4*), type 1 diabetes mellitus (*DR3*, *DR4*), multiple sclerosis (*DR2*), autoimmune thyroid disease (*DR2*), and SLE (*DR2*, *DR3*).^{13–15} Accordingly, human leukocyte antigen (HLA) genotypes have also been intensively studied in PBC patients.^{16–30} In Caucasians, HLA-DR8 (*DRB1*08*) was identified as a risk factor for the development of PBC, while other MHC class II molecules, including

HLA-DR3 and -DPB1*0301, were also reported to be associated with a greater susceptibility to PBC.^{16–22} In Japanese patients, HLA-DPB1*0501 and -DRB1*0803 are reportedly associated with the development of PBC.^{23–25} However, an association between these HLA molecules and susceptibility to PBC was not identified in other ethnic groups including Italian and Chinese patients.^{26,27} Nevertheless, a significant association between HLA-DRB1*08 and PBC development was recently reported.²⁸ In addition, a strong association between PBC development and the HLA class II locus was recently identified in a genome-wide association study in Canadian and US subjects, indicating that HLA-DQB1, -DPB1, -DRB1, and -DRA are associated with susceptibility to PBC.²⁹ However, only a limited number of studies have examined the association of HLA-DRB1 polymorphisms with disease progression and autoantibody production.^{16,20,28,30} Further, to date, a long-term cohort study of PBC patients has not examined the association of the HLA-DRB1 polymorphisms with the relative risk of ANAs for disease progression.

In the present study, to further understand the role of HLA-DR in the pathogenesis of PBC in Japanese patients, we studied the association of HLA-DRB1 polymorphisms with disease development, progression and ANA production in 334 well-characterized PBC patients who were registered with NHOSLJ from August 1982 to September 2009. The results indicated that HLA-DRB1 polymorphisms are significantly associated with the pathogenesis of PBC at multiple steps in disease development, progression and ANA production. Further, stratifying the PBC patients by their HLA-DRB1 alleles revealed that the relative risk of anti-gp210 and anti-centromere antibodies for disease progression is strongly influenced by HLA-DRB1 polymorphisms, indicating that the value of relative risk of these ANAs for disease-progression may differ among different ethnic groups. We propose the importance of determining the HLA-DRB1 genotype in order to predict the disease prognosis when ANAs are used as a serological biomarker for disease progression in PBC.

METHODS

Patients

A TOTAL OF 334 PBC patients (45 males, 289 females, age 30–85 years, median 58 years., mean \pm standard deviation [SD] 58.4 ± 11.4) who were registered in the PBC cohort study at the National Hospital Organization Study Group for Liver Disease in Japan (NHOSLJ) were analyzed (Table 1). This cohort consisted of 27 tertiary referral centers in each prefecture around Japan from August 1982 to September 2008. The date of entry was defined as the time of the initial PBC diagnosis. All patients met at least two of the following criteria for a definite diagnosis of PBC: increased enzymes indicating cholestasis (ALP > two-times the upper normal limit) at the time of initial diagnosis, positive for AMAs, and a liver biopsy showing florid duct lesions that are compatible with PBC. A liver biopsy was performed in 247 of the 334 patients (74.0%) at the initial diagnosis. The histological diagnosis was based on internationally accepted PBC criteria, and histological staging was performed according to Scheuer's classification.¹ Patients who showed episodes of autoimmune hepatitis (AIH) during the observation period were included in this study as cases with PBC-AIH overlap. The criteria established by Poupon R *et al.* were used to diagnosis the AIH overlap, and patients were included in this group if they had at least two of the following accepted criteria: alanine aminotransferase

(ALT) > five-times the upper normal limit, IgG > 1.5-times the normal upper limit or anti-smooth muscle antibody (ASMA)-positive, and a liver biopsy specimen showing moderate or severe periportal or periseptal lymphocytic piecemeal necrosis.³¹ Patients with positive serological markers for persistent hepatitis B or C virus infection were excluded from this study.

PBC patients were classified into the following three different clinical stages based on the liver biopsy and/or clinical manifestations: (i) clinical stage I (early stage), a Scheuer's stage 1 or 2 liver biopsy or unknown histological stage without signs of portal hypertension or liver cirrhosis (ii) clinical stage II (late stage without jaundice), Scheuer's stage 3 or 4 liver biopsy or any histological stage with signs of portal hypertension or liver cirrhosis but without jaundice (total bilirubin <2 mg/dL) (iii) clinical stage III (late stage with jaundice), any Scheuer's stage with persistent jaundice (total bilirubin >2 mg/dL). The presence of esophageal varices, liver cirrhosis, ascites and hepatocellular carcinoma was evaluated by gastro-intestinal endoscopy, ultrasound sonography, and computed tomography.

Progression to late stage disease without jaundice was defined as nonjaundice-type (or portal hypertension-type) progression, while progression to late stage disease with jaundice was defined as jaundice-type (or hepatic failure-type) progression.¹¹ The observation period began at the time of initial diagnosis and ended at the

Table 1 Demographic features of primary biliary cirrhosis patients at the time of entry and at the end of observation

	Time of entry <i>n</i> = 334	End of observation <i>n</i> = 334
Total		
Female (%)	289 (86.5%)	289 (86.5%)
Age, years (range, median)	58.4 \pm 11.4 (30–85, 58)	64.1 \pm 11.2 (31–87, 65)
Clinical stage† <i>n</i> (%)		
I	283 (84.5)	238 (71.3)
II	49 (14.7)	78 (23.4)
III	2 (0.6)	18 (5.4)
AMA – positive	299 (89.5)	296 (88.6)
Anti – gp210 – positive	103 (30.8)	107 (32.0)
Anti – centromere – positive	84 (25.1)	82 (24.6)
Anti – sp100 – positive	40 (12.0)	38 (11.4)
Complications from other autoimmune diseases	87 (26.0)	99 (29.6)
Observation period (months) (range, median)		69.6 \pm 63.1 (1–452, 57)

†Clinical stage I: Scheuer's stage 1 or 2 in liver biopsy or unknown histological stage without signs of portal hypertension or liver cirrhosis; clinical stage II: Scheuer's stage 3 or 4 in liver biopsy or any histological stage with signs of portal hypertension or liver cirrhosis but without jaundice (total bilirubin <2 mg/dL); clinical stage III: any Scheuer's stage with persistent jaundice (total bilirubin >2 mg/dL).

AMA, anti-mitochondrial antibodies.