

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

日本人 PBC 患者における疾患感受性遺伝子の検討

研究分担者 滝川 一 帝京大学医学部内科 教授

研究要旨：イタリア人 PBC 患者を対象として行われたゲノムワイド関連解析の結果、PBC の発症と関連があると報告された 7 遺伝子・8 SNP について、303 例の日本人 PBC 患者および年齢・性をマッチさせた 298 例の対照を用いて関連を検討した。検討した 8 SNP のうち、IRF5-TNPO3 は日本人では全く多型が存在しなかった。Bonferroni 法による多重比較の修正後、日本人 PBC においても対照と比較して有意差がみられたのは IKZF3 と ZBPB2 のみであり、それぞれの P 値は 0.017, 0.011 であった。ORMDL3 と SPIB は修正前の P 値は 0.029, 0.041 であったが、修正後は有意とはならなかった。IL12A, IL12RB2 はいずれも全く関連がみられなかった。これらの遺伝子は日本人 PBC では発症に関与していないのか、あるいは他の SNP を検討すれば有意となるのかは不明である。今回有意差がみられた 2 つの遺伝子、IKZF3 と ZBPB2 については今後機能解析を行う必要がある。

共同研究者

田中 篤 帝京大学医学部内科

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis; PBC）の病因は未だ不明であるが、遺伝的因子と環境要因の双方が関与していると推定されている。遺伝的因子については過去さまざまに報告されているが、未だ決定的なものは報告されていない。近年、遺伝的因子を解明するため全ゲノム上の SNP を網羅的に探索するゲノムワイド関連解析（genome-wide association study; GWAS）の成績がカナダ人・イタリア人 PBC 患者を対象として発表され、HLA クラス II 遺伝子、*IL12A*, *IL12RB*, *IRF5-TNPO3*, *SPIB*, さらに 17q12-21 上の遺伝子（*IKZF3-ZBPB2-ORMDL3*）と PBC との強い関連が示された。しかし、人種によって疾患感受性に関与している遺伝子が異なることも他疾患および PBC ではしばしば報告されており、これらの遺伝子についても日本人において再検討することが必要である。今回われわれは、イタリア人を対象とした GWAS で PBC の発症と有意な関連があると報告された 8 遺伝子の SNP について、日本人 PBC でもやはり関連がみられるかどうかにつき検討した。

B. 研究方法

303 例の日本人 PBC 患者、および年齢・性をマッチさせた対照 298 例を対象とした。末梢血から DNA を分離し、6 遺伝子座の 7 SNP（表）について、Taqman Assay により遺伝子多型を決定した。多重比較による P 値の修正は Bonferroni 法を用いた。本研究はヒトゲノムを対象とする遺伝子解析研究であり、本研究計画は帝京大学医学部遺伝子研究倫理委員会において承認されている（平成 17 年 11 月 28 日付）。

C. 研究結果

結果を表に示す。検討した SNP のうち *IRF5-TNPO3* は日本人では全く多型がみられずここには示

していない。Bonferroni 法による多重比較の修正後、日本人 PBC においても対照と比較して有意差がみられたのは *IKZF3* と *ZBPB2* のみであり、それぞれの P 値は 0.017, 0.011 であった。*ORMDL3* と *SPIB* は修正前の P 値は 0.029, 0.041 であったが、修正後は有意とはならなかった。*IL12A*, *IL12RB2* はいずれも全く関連がみられなかった。

D. 考察

今回の検討では欧米で報告された遺伝子座に存在する SNP の多くは日本人では有意差が再現されなかった。この結果はおそらく 2 通りに解釈できる。まず、これらの遺伝子はイタリア人やカナダ人 PBC では発症に関与しているものの、日本人 PBC では関与していないという可能性が考えられる。もう一つは、遺伝子としては日本人でも発症に関与しているものの、真に疾患感受性に関与している遺伝子変異と今回検討した SNP とがイタリア人では連鎖しているものの日本人では連鎖しておらず、有意差が出てこなかったという可能性である。現在のところいずれが正しいのかは不明である。ともあれ、今回有意差がみられた 2 つの遺伝子、*IKZF3* と *ZBPB2* については欧米人でも日本人でも有意差がみられたことになり、今後機能解析を行う必要がある。

E. 結論

日本人 PBC 患者を対象とした解析では、欧米の PBC 患者を対象とした GWAS によって発症と関連が見いだされた 7 遺伝子座・8 SNP のうち、有意な関連がみられたのは 2 遺伝子（2 SNP）のみであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka A, et al. Genetic association of FCRL3

polymorphisms with susceptibility to primary biliary cirrhosis; ethnic comparative study in Japanese and Italian patients. Tissue Antigen, in press.

2. 学会発表

Tanaka A, et al. The association of genetic polymorphisms of the IL12-related pathway with primary biliary cirrhosis in Japanese. (AASLD, 2010, Boston)

田中 篤, 他. PBCにおけるFc receptor-like 3 (FCRL3) プロモーター領域の遺伝子多型. 第46回日本肝臓学会総会 (2010.5.27, 山形)

Tanaka A, et al. Replicative study of genome-wide association studies in primary biliary cirrhosis in Japanese. (APASL, 2011, Bangkok)

Tanaka A, et al. Replicated association of 17q12-21 with susceptibility of primary biliary cirrhosis in a Japanese cohort. (EASL, 2011, Berlin)

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

表 本研究において検討した遺伝子座・SNP, およびその結果

Gene	SNP ID	Minor Allele ^a	MAF in PBC	MAF in controls	Replication in Japanese			
					P	Pc ^b	OR	95%CI
IL12RB2	rs3790567	A	0.24	0.25	0.82	NS		
IL12A	rs574808	C	0.14	0.18	0.11	NS		
IL12A	rs1075498	A	0.19	0.19	0.72	NS		
IKZF3	rs9303277	C	0.35	0.27	0.0024	0.017	1.46	1.14-1.87
ZBP2	rs11557467	T	0.31	0.22	0.0015	0.011	1.54	1.19-2.00
ORMDL3	rs2305480	A	0.28	0.22	0.029	NS		
SPIB	rs3745516	A	0.12	0.17	0.041	NS		

^a Minor allele base pair in forward strand.

^b Pc, corrected P value according to Bonferroni's correction.

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 の病態形成に関わる自然免疫異常の研究

研究協力者 宮川 浩 帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科 非常勤講師

研究要旨：PBCにおける血清IgMの上昇は脾臓からの産生によると仮説し、剖検例等の脾臓切片を用いて免疫組織化学的検討を行った。PBC 9例中4例（44%）において、リンパ濾胞内にIgM陽性細胞の集簇を認めた。コントロールにおいても脾臓内にIgM陽性細胞を認めたが、その局在は主に動脈周囲リンパ球鞘（PALS）であった。PBCではIgM陽性細胞の集簇したリンパ濾胞の中央に、CXCL13陽性細胞を認めた。以上からPBCの高IgM血症は、脾臓のリンパ濾胞由来の可能性があると考えた。

共同研究者

菊池健太郎 帝京大学医学部附属溝口病院
第四内科 准教授

A. 研究目的

我々はPBCの高IgM血症の原因として、バクテリアに対する自然免疫反応の亢進が関与していると報告してきた（Gastroenterology, 2005）。昨年までにCpG刺激によるB細胞のIgM産生に、単球由来のB cell activating factor（BAFF）が関わり、PBCの単球では膜表面のBAFF発現が高く、IgMの高産生性に関わることを報告した。しかしながら、患者体内のどこからIgMが多く産生されているのかは不明であった。血流中の抗原を認識する主要な免疫臓器として脾臓があげられ、B細胞は白脾髄において成熟・分化し、肺炎球菌の莢膜多糖などの自然免疫刺激に应答してはIgMを産生する。そこで今回、PBCにおける血清IgMの上昇は、脾臓からの産生によると仮説し、免疫組織化学的検討を行った。

B. 研究方法

手術または剖検により得られたPBC 9例、肝疾患コントロールとしてC型肝炎9例、および非肝疾患コントロール10例のホルマリン固定脾臓切片を用い、抗IgM抗体とリンパ濾胞のマーカーとして抗CD21抗体の染色を行い、陽性細胞の頻度と局在を比較検討した。またB細胞のホーミングと分化に関わるケモカインとして抗CXCL13抗体の染色も行った。なお、本研究は研究者の所属する帝京大学医学部倫理委員会の審査・承認を得ている（帝医倫10-082号）。

C. 研究結果

PBC 4例（44%）において、CD21陽性のリンパ濾胞内にIgM陽性細胞の集簇を認めた。コントロールにおいても約半数にIgM陽性細胞を認めたが、その局在は主にCD21陰性の、動脈周囲リンパ球鞘（PALS）であった。CXCL13陽性細胞は特に、PBCのIgM陽性細胞の集簇したリンパ濾胞の中央部に認めた。

D. 考察

リンパ濾胞はmemory B細胞の形成、維持の場であり、近年ではmarginal zone B細胞がそこに進入した後に、自己抗体産生細胞として生存するという研究報告もある。本検討は現段階で、PBCにおけるIgM産生細胞は、脾臓のリンパ濾胞内で形成される可能性が高いと結論する。今後は、その細胞の由来、AMAとの関係や、病態への関与について検討を行いたい。

E. 結論

PBCにおけるIgM産生細胞への分化は、脾臓のリンパ濾胞内で行われ、その過程にCXCL13が関わ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 なし
2. 学会発表 第47回日本肝臓学会総会、発表予定。

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

PBC の胆管破壊の免疫学的機序

－胆管細胞における estrogen-related receptor 発現と病態形成への関与－

研究分担者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）発症の性差に関する基礎的研究として、胆管細胞におけるエストロゲン受容体（ER）とエストロゲン関連受容体（ERR）について検討し、PBC胆管ではERR γ 発現が亢進していることを報告してきた。本年度、PBCの障害胆管におけるERR γ 発現亢進の意義について検討した結果、胆管細胞はERR γ アゴニスト刺激にて転写因子SP1の活性化が見られ、アポトーシス誘導に関わるBcl-2ファミリー分子の発現亢進が見られた。また、PBC胆管ではSP1の核発現が亢進していた。以上の結果より、胆管細胞におけるERR γ 発現亢進は、転写因子SP-1を介してアポトーシス感受性を亢進させ、胆管消失を来しやすい因子として作用していることが示唆された。

共同研究者

原田 憲一 金沢大学形態機能病理

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は中高年女性に好発し、胆管細胞を標的とする自己免疫性疾患である。組織学的に、免疫介在性の胆管炎およびアポトーシス促進による胆管消失を特徴とし、傷害胆管におけるFasやBcl-2などのアポトーシス関連分子の発現異常が報告されている。我々は、昨年度まで胆管細胞におけるエストロゲン受容体（ER）やエストロゲン関連受容体（ERR）について検討してきた。ERRはERと高い相同性を示す受容体で、エストロゲン非依存性にエストロゲン様効果を示し、またER介在性のエストロゲン応答を競合的に抑制することによりエストロゲン作用を調節する。昨年度の研究成果としてPBCの障害胆管ではERR γ の発現亢進が見られることを報告した。今年度、PBCの障害胆管におけるERR γ 発現亢進の意義について、ERR γ 作用の観点から解析した。

B. 研究方法

in vitro study: PBCの末梢肝より樹立したヒト培養胆管細胞を用いた。ERR γ アゴニストとして、GSK4716 (10mM), DY131 (10mM)で刺激後、エストロゲン関連転写因子であるER, AP-1, SP-1の活性化をTransAMキット（Active Motif社）にて測定した。また、Bcl-2ファミリーのアポトーシス関連分子について、リアルタイムPCRにてmRNA発現量の変化を定量評価した。

in vivo study: PBC18例（全例女性、42-72歳）および対照として非PBC女性22例（33-64歳）の肝組織を用いて、SP1の免疫染色を施行し、傷害胆管および小葉間胆管における発現を観察した。

C. 研究結果

培養ヒト胆管細胞はERR γ アゴニスト刺激にて、SP-1の活性化が見られたが、明らかなER, AP1の活性化は認めなかった（図1）。また、ERR γ アゴニスト

刺激にて、アポトーシス誘導分子であるBax, Bidなどの発現亢進が誘導されたが、アポトーシス抑制分子として作用するMcl-1やBcl-XLの発現亢進は認めなかった（図2）。ヒト肝組織を用いた免疫染色にて、胆管には種々の程度にSP1の核発現を認めたが、PBCの傷害胆管では特に発現亢進が見られた（図3）。

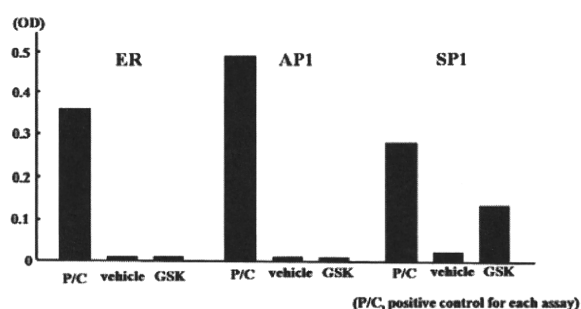


図1 ERR γ agonist (GSK4716) 刺激による核内転写因子の活性化

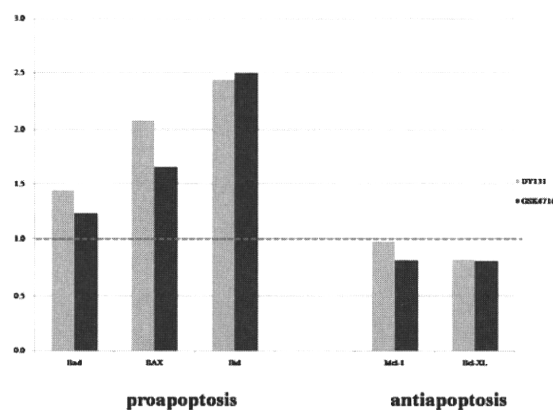


図2 ERR γ agonist 刺激によるアポトーシス関連分子の発現動態

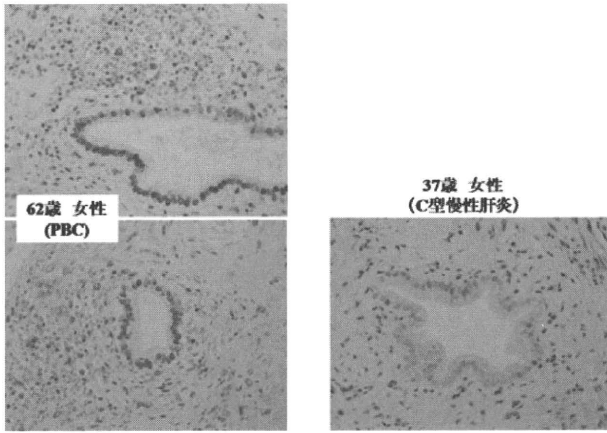


図3 SP-1免疫染色

D. 考 察

ERと高い相同性を示すERRはエストロゲンと結合することなくエストロゲン応答を示し、エストロゲン存在下ではERと競合することによりER介在性のエストロゲン応答を抑制する。昨年度まで、胆管細胞におけるER、ERR発現およびPBCの胆管病変形成における関与について検討してきた。その結果、胆管細胞はERおよびERR α 、 γ を発現しており、胆管におけるエストロゲンシグナル伝達系を制御していることが明らかとなった。さらに、エストロゲン存在下では胆管細胞はERR γ の発現が低下し、中高年に比べ若年女性の胆管でERR γ 発現が低下していることから、若年女性の胆管ではエストロゲン効果が出やすい状態と推測された。また、中高年女性では胆管でのERR γ 発現は亢進し、特にPBCの障害胆管では高度であった。今年度、PBCの障害胆管におけるERR γ 発現亢進の意義について検討した結果、培養胆管細胞はERR γ アゴニスト刺激にて転写因子SP1の活性化が見られたが、明らかなERやAP1の活性化は認めなかった。今回、ER関連の転写因子として報告されているER、AP1、SP1について検討したが、胆管細胞におけるERR γ 関連の転写因子はSP1のみが関与しており、SP1介在性のシグナリングおよび発現分子調節においてERとERR γ との相互関係が示唆された。また、多くのアポトーシス関連分子のプロモーター領域にSP1結合部位が存在することから、今回アポトーシス誘導に関わるBcl-2ファミリー分子の発現について検討した。その結果、ERR γ アゴニスト刺激にて胆管細胞におけるアポトーシス誘導分子(Bax, Bid)の発現亢進が見られたが、アポトーシスを抑制する分子(Mcl-1, Bcl-XL)の発現亢進は認めなかった。さらに、PBCの傷害胆管では、活性型SP1発現(核発現)が亢進していた。以前、我々はPBCの傷害胆管でMcl-1, Bcl-XLよりもBaxの発現が優位に見られる事を既に報告しており(Iwata et al, Hum Pathol. 2000), PBCの傷害胆管ではERR γ およびSP1が関連したアポトーシス誘導の存在が示唆された。

E. 結 論

胆管細胞におけるERR γ 発現亢進は、転写因子SP-1を介してアポトーシス感受性を亢進させ、PBC女性の胆管消失を来しやすい因子として作用していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・Harada K, et al. Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3 α in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2011;31 (2) :245-53.
- ・Harada K, Nakanuma Y. Biliary innate immunity: function and modulation. *Mediators Inflamm.* 2010
- ・Harada K, Nakanuma Y. Biliary innate immunity in the pathogenesis of biliary diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2010;9 (2) :83-90.
- ・Harada K, Nakanuma Y, et al. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2009;157 (2) :261-70.
- ・Shimoda S, Harada K, Nakanuma Y, et al. CX3CL1 (fractalkine) : A sign post for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2010; 51 (2) : 567-75.

2. 学会発表

- ・Harada K, Nakanuma Y et al. Significance of estrogen-related receptors on human biliary epithelial cells and its relation to the pathogenesis in cholangiopathy of primary biliary cirrhosis. AASLD Annual Meeting 2010.
- ・原田憲一, 中沼安二ら. ヒト培養胆管細胞の細胞動態におけるエストロゲンの影響. 第45回日本肝臓学会総会

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

特になし

PBC の胆管破壊の免疫学的機序

－原発性胆汁性肝硬変の胆管病変におけるオートファジー異常－

研究分担者 中沼 安二 金沢大学大学院 医学系研究科 形態機能病理学 教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）の障害胆管細胞は細胞老化を示し、その過程にはオートファジーが関与することが明らかになりつつある。今回、PBC 胆管の細胞老化過程におけるオートファジー機構の異常を検討した。PBC の炎症性小型胆管には、PBC の非炎症性胆管、対照疾患の胆管と比較して有意に高率にオートファジー異常マーカー p62/sequestosome-1 (p62) の顆粒状沈着を認めた ($p < 0.01$)。培養胆管細胞では、各種ストレスにより p62, LC3発現の亢進を認めた。また、siRNA を用いた p62発現抑制により、ストレス誘導性のオートファジー、細胞老化は有意に抑制された ($p < 0.01$)。PBC の胆管病変ではオートファジー異常が細胞老化の促進に関与する可能性が示唆された。

共同研究者

佐々木素子 金沢大学医学系研究科形態機能病理学

A. 研究目的

私どもは原発性胆汁性肝硬変（PBC）の障害胆管細胞は細胞老化を示すこと、胆管細胞老化は胆管消失の要因となる可能性があることを報告してきた (Hepatology 2008)。また、PBC 胆管病変ではオートファジー亢進が発生すること、細胞老化の過程にオートファジーが関与することを明らかにした (Lab Invest 2010)。最近、細胞老化の促進にオートファジー機構の異常が関与する可能性が示唆されている。p62/sequestosome-1 (p62) はオートファジーに関与する蛋白で、オートファジー欠損細胞では p62過剰蓄積がみられ、ROS 発生の亢進などを介して細胞障害にも関与するとされる。そこで今回、PBC の胆管病変における p62発現とオートファジー、細胞老化の関与を検討した。

B. 研究方法

1) 病理組織学的検討：PBC 症例 (n=46) と対照肝疾患症例 (n=87) の外科的生検、切除肝における p62の発現を免疫組織化学的に検討した。肝内小型胆管を炎症性（非化膿性破壊性胆管炎、CNSDC の病変部など）、非炎症性の2群に分類して染色結果を半定量的に評価した。また、オートファジー関連分子 microtubule-associated proteins-light chain 3b (LC3)、ライソゾームマーカー LAMP- との共発現を二重免疫組織化学的に検討した。

2) 培養胆管細胞を用いた検討：培養胆管細胞に過酸化水素添加 (100 μ M, 2hr) による酸化ストレス、エトポシド添加 (100 μ M) による DNA 傷害、血清除去により、培養胆管細胞に細胞老化を誘導した。p62発現とオートファジー関連分子との共発現の検討、ストレス誘導性細胞老化における siRNA を用いた p62発現抑制効果を検討した。

C. 研究結果

1) 病理組織学的検討：PBC の肝内小型胆管では、胆管炎部の障害胆管核上部に p62陽性顆粒の沈着を認め、PBC 非炎症性胆管、対照肝の小型胆管と比較して有意に高率であった ($p < 0.01$) (図 1)。LC3, LAMP-1発現も同様に障害胆管で亢進していたが、p62と LC3, LAMP-1との細胞内局在はほとんど一致しなかった。

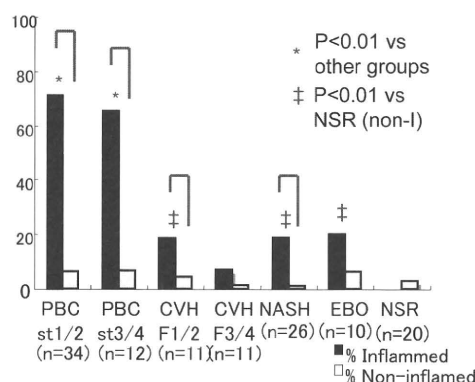
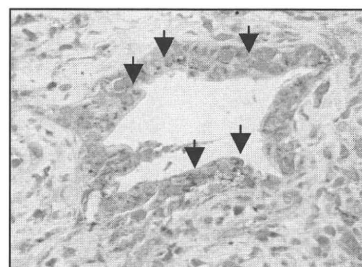


図 1 PBC 炎症性胆管には p62が蓄積する

2) 培養胆管細胞を用いた検討：培養胆管細胞では、各種ストレスにより、p62, LC3発現の mRNA, 蛋白レベルでの亢進を認めた ($p < 0.01$)。ライソゾーム阻害剤 bafilomycin A は血清除去による p62発現, LC3発現亢進をさらに亢進し、特に p62陽性顆粒の増加が目立った。siRNA を用いた p62発現抑制によ

り、各種ストレスによるオートファジー、細胞老化誘導は有意に抑制された ($p < 0.01$) (図2)。

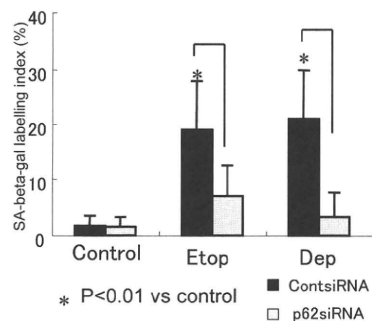


図2 p62発現抑制によるストレス誘導性細胞老化の抑制

D. 考察

今回の検討より、PBCの胆管障害部にはオートファジー活性化と同時にp62蓄積を伴うオートファジー異常が生じていることが明らかになった。オートファジー、アポトーシス、細胞老化はいずれも細胞ストレスに対する反応であり、ストレスによって生じた蛋白やミトコンドリアなどの障害はオートファジー機構により修復される。このオートファジーによる修復が不完全な場合に細胞老化やアポトーシスに移行すると考えられている(Whiteら, Genes Dev 2009)。今回の免疫組織学検討の結果も、PBCの胆管病変部に生じたオートファジー異常が細胞老化の要因となる可能性を示唆している。

また、今回の培養胆管細胞を用いた検討では、p62発現抑制により、各種ストレスによる細胞老化誘導は抑制された。この結果はp62蓄積が細胞老化の誘導に関与することを示唆している。オートファジー欠損細胞ではp62蓄積が生じ、さらに酸化ストレス反応をおこすことが知られている(Komatsuら, Nat Cell Biol 2010)。PBCの胆管病変における酸化ストレス亢進は以前より報告されている。従って、胆管病変におけるp62蓄積は酸化ストレス亢進を介して細胞障害を増悪させる可能性も示唆される。今回明らかになった胆管病変でのオートファジー異常とPBCの自己免疫性反応、発症機序との関係は今後の検討課題と考えられる。

E. 結論

PBCの胆管病変ではオートファジー機構に異常が生じており、これが細胞老化の促進に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki M, et al. Bile ductular cells undergoing

cellular senescence increase in chronic liver diseases along with fibrous progression. Am J Clin Pathol. 2010;133: 212-23.

- 2) Sasaki M, et al. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. Lab Invest. 2010;90:835-43.

- 3) Sasaki M, et al. Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. J Hepatol. 2010 53:318-25.

- 4) Sasaki M, Nakanuma Y. Biliary epithelial apoptosis, autophagy, and senescence in primary biliary cirrhosis. Hepat Res Treat. 2010;205128.

2. 学会発表

- 1) 佐々木素子ら. 原発性胆汁性肝硬変の老化胆管細胞によるケモカイン発現とその意義 第99回病理学会総会(2010年4月, 東京)
- 2) 佐々木素子ら. 原発性胆汁性肝硬変の胆管細胞老化におけるオートファジーの関与 第46回肝臓学会総会(2010年6月, 山形)
- 3) 佐々木素子ら. 原発性胆汁性肝硬変での老化胆管細胞による免疫調節 第47回消化器免疫学会(2010年7月, 大津)
- 4) Sasaki M, et al. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis(61th Annual Meeting of the AASLD, 2010, November, Boston)
- 5) Sasaki M, et al. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis (61th Annual Meeting of the AASLD, 2010, November, Boston)

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

研究要旨：我々がこれまでに構築した ex vivo でヒトの体内を模倣する系を用いて原発性胆汁性肝硬変での胆管炎の原因を探索した結果、TLR3リガンドとTLR4リガンドで刺激後の肝臓浸潤単核球、特にNK細胞が自己の胆管上皮細胞を傷害することが明らかとなった。

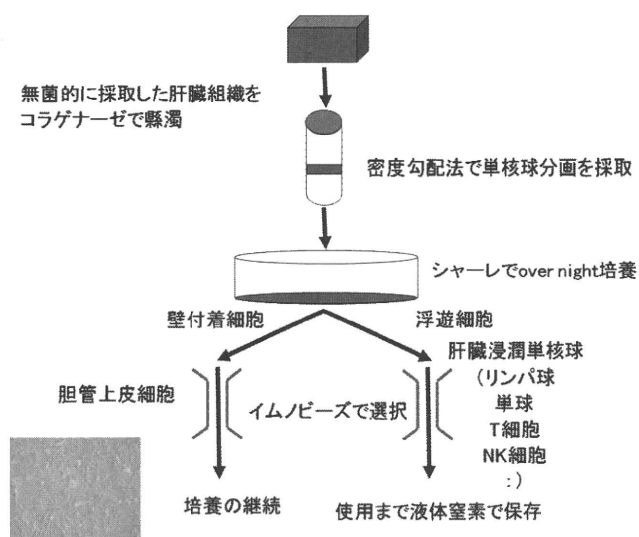
A. 研究目的

我々はこれまでに、生体肝移植症例の摘出肝臓より、無菌的に胆管上皮細胞、肝臓浸潤単核球を分離することに成功している。

原発性胆汁性肝硬変では胆管上皮細胞を肝臓浸潤単核球が攻撃することが病変の首座であることから、今回肝臓浸潤単核球が自己の胆管上皮細胞を攻撃するかを検討した。

B. 研究方法

図1のように摘出肝臓を無菌的にコラゲナーゼ処理後、密度勾配法で単核球分画を採取した。

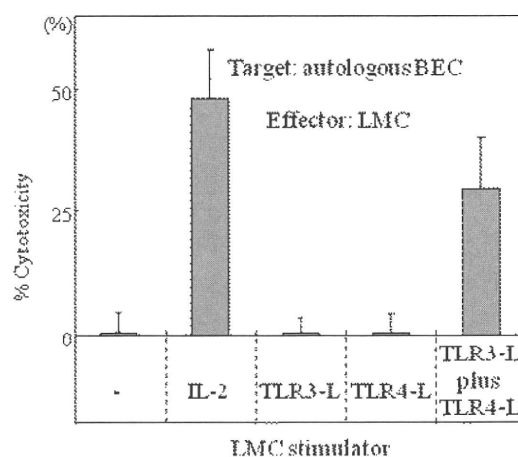


Over night incubate で壁附着細胞と非附着細胞に分離して、非附着細胞は一旦液体窒素で凍結保存した。壁附着細胞はEpCAM陽性細胞をイムノビーズで positive selection し、胆管上皮細胞とし継代培養を行い、十分に増えたところで、液体窒素で保存していた肝臓浸潤単核球を解答し、肝臓浸潤単核球が自己の胆管上皮細胞を攻撃するかの細胞傷害活性を51Cr release assay として行った。細胞傷害活性を行う際に、あらかじめ肝臓浸潤単核球は無刺激、IL-2刺激、各種の Toll like receptor (TLR) リガンド刺激を行った。また肝臓浸潤単核球の中でどの分画が自己胆管上皮細胞を攻撃するかを検討するために、TLR リガンドで刺激した後、イムノビーズで単球、T細胞、NK

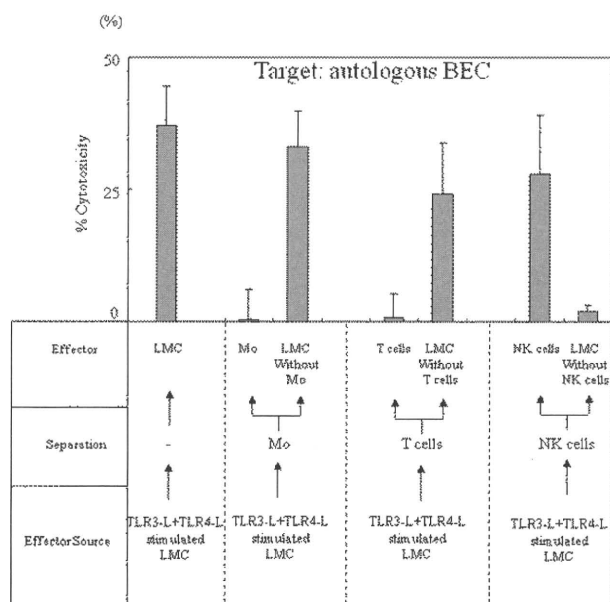
細胞にわけて細胞傷害活性を検討した。

C. 研究結果

肝臓浸潤単核球は無刺激では自己胆管上皮細胞を傷害しなかった。しかしIL-2で刺激後自己胆管上皮細胞を傷害した。IL-2に代えてTLRリガンドで検討した結果、単一のTLRリガンドでは肝臓浸潤リンパ球は自己胆管上皮細胞を傷害しなかったが、TLR3リガンドとTLR4リガンドを組み合わせた場合でのみ傷害を認めた。



次に、自己胆管上皮細胞を傷害している細胞の同定を行った。その結果NK細胞が自己胆管上皮細胞を傷害していることが明らかとなった。



D. 考察

我々は実際に生体内で起こっている反応に関係する細胞集団を試験管内で再構築し、どのような刺激の元で病態が再現できるかを確認することで、結果としてしか捉えられない病態の上流を探索する系をヒトにおいて樹立することができた。この系によると、原発性胆汁性肝硬変での胆管障害は、TLR3リガンドとTLR4リガンド刺激で感作されたNK細胞が発症に関与していることが示唆された。

E. 結論

TLR3リガンドとTLR4リガンドの異所性発現が原発性胆汁性肝硬変の発症に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Risk Factors and Prediction of Long-term Outcome in Primary Biliary Cirrhosis.

Ishibashi H, Komori A, Shimoda S, Ambrosini YM, Gershwin ME, Nakamura M.

Intern Med. 2011;50(1):1-10.

Intracellular B7-H4 Suppresses Bile Duct Epithelial Cell Apoptosis in Human Primary Biliary Cirrhosis. Chen Y, Guo G, Guo S, Shimoda S, Shroyer KR, Tang Y, Wu Y.

Inflammation. 2010 Dec 1.

Significance of periductal Langerhans cells and biliary epithelial cell-derived macrophage inflammatory protein-3 α in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis.

Harada K, Shimoda S, Ikeda H, Chiba M, Hsu M,

Sato Y, Kobayashi M, Ren XS, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y.

Liver Int. 2011 Feb;31(2):245-53.

Primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: apotopes and epitopes.

Leo A, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME.

J Gastroenterol. 2011 Jan;46

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.

Nakamura M, Yasunami M, Kondo H, Horie H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsushashi H, Ito M, Shimoda S, Ishibashi H; PBC Study Group in NHOSLJ*.

Hepatology. 2010 May;40(5):494-504.

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

Shimoda S, Harada K, Niuro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K.

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

Serum BAFF and APRIL levels in patients with PBC.

Migita K, Ilyassova B, Kovzel EF, Nersesov A, Abiru S, Maeda Y, Komori A, Ito M, Yano K, Yatsushashi H, Shimoda S, Ishibashi H, Nakamura M. Clin Immunol. 2010 Feb;134(2):217-25.

2. 学会発表

JDDW 2010 下田慎治, 他

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における免疫異常の基礎とそれに基づく予後予測について

第46回日本肝臓学会総会 下田慎治, 他

原発性胆汁性肝硬変における胆管 CX3CL1発現に必要な TNF α は、主に TLR4リガンドで単球から産生される

第96回日本消化器病学会総会 下田慎治, 他

原発性胆汁性肝硬変における CX3CL1産生の機序

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

胆汁うっ滞におけるコレステロールの実態－ABCA1トランスポーターの働き

研究協力者 向坂 彰太郎 福岡大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：胆汁うっ滞時に血清コレステロール値が上昇するが、その機序については明らかではない。以前の研究で、ラットの胆管結紮モデル肝を用いて肝内 ABCA1トランスポーターの発現について検討し、ラットモデル肝で ABCA1トランスポーターの発現が増強している事を報告した。今回は高コレステロール血症の PBC 患者肝を用いて検討した。PBC 患者肝 ABCA1mRNA 発現は、増強しており、胆汁うっ滞時の高コレステロール血症の機序として、ABCA1トランスポーターが関わっている事を示した。さらに核内ホルモンレセプター LXR β mRNA 発現と相関関係が認められ、その調節遺伝子として LXR β が関わっている事を示した。

共同研究者

竹山 康章 福岡大学医学部消化器内科 講師

ABCA1mRNA 発現と HDL コレステロール値には相関を認めなかった ($r=0.108, R^2=0.011$; Fig.4)。

A. 研究目的

胆汁うっ滞では、胆汁の流出または生成の障害により、通常胆汁中に排出される物質の血中濃度の上昇をきたす。胆汁うっ滞性疾患である原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) や原発性硬化性胆管炎 (PSC) などの患者では、血清コレステロール値が増加する事が知られている。その機序に関しては胆汁中コレステロールの大循環への逆流と考えられており、我々は PBC、PSC 患者の胆管細胞あるいは肝細胞間の tight junction の破綻を形態学的に確認し報告した (Sakisaka S. et al. *Hepatology* 2001)。さらに肝細胞内の ABCA1トランスポーターに着目し、培養肝細胞、ラットモデル、PBC 患者肝 (*in vivo*) において、ABCA1トランスポーターの発現を検討し、胆汁うっ滞時における高コレステロール血症に関わる事を報告した。今回は、PBC 患者肝を用いて、ABCA1トランスポーターの発現と調節遺伝子である LXR β の発現を検討した。

B. 研究方法

PBC 患者より針生検にて得られた肝組織より ABCA1 mRNA, LXR β mRNA レベルを、real-time RT PCR 法を用いて測定した。

C. 研究結果

① PBC 患者の血清脂質

総コレステロール値は、 200.18 ± 48.36 mg/dl, HDL コレステロール値は、 60.36 ± 20.46 mg/dl であった。

② 高コレステロール血症 (220mg/dl 以上) を呈する PBC 患者の肝内 ABCA1mRNA 発現

肝組織中 ABCA1mRNA の発現は、コントロールに比べて優位に増加していた ($p < 0.05$; Fig.1)。

③ 肝内 ABCA1 mRNA と肝内 LXR β mRNA 発現

ABCA1mRNA と LXR β mRNA の発現は、有意の相関関係が認められた ($r=0.639, R^2=0.409$; Fig. 2)

④ ABCA1発現と脂質

肝内 ABCA1mRNA 発現と総コレステロール値にはやや相関関係を認めたが ($r=0.28, R^2=0.08$; Fig.3),

D. 考察

PBC 患者肝を用いた結果から、ABCA1トランスポーターは、肝細胞外へのコレステロールの排出に重要な役割をなし、その調節には核内ホルモンレセプター LXR β の関与が考えられた。ABCA1と総コレステロール値との間には相関関係がみられたが、ABCA1と HDL コレステロール値には相関関係は認められなかった。

E. 結論

胆汁うっ滞時の高コレステロール血症の機序として、ABCA1トランスポーターは、コレステロールの肝細胞外への排出に関わっている事が示された。また、その調節遺伝子として核内ホルモンレセプター LXR β が関与している事を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeyama Y, Kanegae K, Inomata S, et al. Sustained upregulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and bile salt export pump and downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver of patients with end-stage primary biliary cirrhosis. *Medical Molecular Morphology* 43:134-138, 2010
- 2) Takeyama Y, Yokoyama K, Takata K, et al. Clinical features of Wilson disease: Analysis of 10 cases. *Hepatol Res* 40:1204-1211, 2010
- 3) 竹山康章, 向坂彰太郎. 「肝移植と免疫抑制剤」肝胆膵61: 861-869, 2010
- 4) 竹山康章, 向坂彰太郎 「胆汁うっ滞におけるコレステロールの動態」薬理と治療 38 : S137-S138, 2010
- 5) 竹山康章 「胆汁酸のトランスポーター」たん

じゅうさん 9 : 18-19, 2010

2. 学会発表

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

PBCにおけるコリン代謝の検討

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内科 医長

研究要旨：フィブレート系薬剤はPBC治療において、UDCAのセカンドドラッグとして使用されている。フィブレート系薬剤の作用機序としては、MDR3によるリン脂質分泌を促進させ、疎水性胆汁酸による胆管障害を軽減することが考えられている。リン脂質の代表であるフォスファチジルコリンはコリンより産生されるが、PBC肝におけるコリン代謝の変化はよく知られておらず、今回検討を行った。PBC肝ではフォスファチジルコリン産生関連遺伝子の発現は正常肝に比べて明らかに低下していた。一方、肝細胞内にコリンを取り込むOCT1の発現には変化を認められなかった。肝内にコリンが蓄積する脂肪肝（フォスファチジルコリン産生関連遺伝子の発現増加とOCT1の発現低下）との比較からは、PBC肝でのコリンは不足しており、そのためにフォスファチジルコリン産生関連遺伝子の発現は低下しており、本来増加すべきOCT1の発現が増加していないことが推測された。PBC肝ではコレステロール貯留の方向にあり、リポ蛋白VLDL中のコレステロールとフォスファチジルコリンの含有は正常者に比べて増加していた。従って、PBCにおいてはMDR3のみならずVLDL（コレステロール）排出のためにフォスファチジルコリンが利用されており、コリン不足を来しているものと推測された。フィブレート系薬剤は、OCT1の発現を増加させることが知られており、PBC肝においては、MDR3は代償性にすでにフルアクチベートされており、フィブレート系薬剤はむしろOCT1の発現を増加させ、細胞内にコリンを供給することでフォスファチジルコリンの産生を高め、最終的に胆管障害を軽減している可能性があることが示唆された。

共同研究者

国府島庸之	国立病院機構九州医療センター	臨床研究センター
福島 伸良	国立病院機構九州医療センター	臨床研究センター
大石 裕樹	国立病院機構九州医療センター	臨床研究センター
矢田 亮子	国立病院機構九州医療センター	臨床研究センター
吉本 剛志	国立病院機構九州医療センター	臨床研究センター
福泉公仁隆	国立病院機構九州医療センター	臨床研究センター
武富 紹信	九州大学大学院	消化器・総合外科学
前原 喜彦	九州大学大学院	消化器・総合外科学
野崎 雄一	横浜市立大学大学院	分子消化管内科学
中島 淳	横浜市立大学大学院	分子消化管内科学

A. 研究目的

PBCの治療においては、ウルソデオキシコール酸（UDCA）が第一選択薬であり、親水性胆汁酸に胆汁酸組成を変化させることが作用機序として考えられている。UDCAで十分な効果が得られない場合には、フィブレート系薬剤が現在使用されている。フィブレート系薬剤は転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) のリガンドであり、胆汁へのリン脂質排出ポンプであるmultidrug resistance gene 3 (MDR3) の発現を増加させることにより、胆管障害を来す疎水性胆汁酸をミセル化することで作用を発揮すると考えられている。我々は、PBC肝においては、ステージの初期よりMDR3の遺伝子発現は増加しており、さらにその発現は胆管障害の血清指標であるALPと強い正の相関を示すことを報告して来た。リン脂質の代表であるフォスファチジルコリン（PC）は、コリンとジアシルグリセロール（DG）より生成されるが、実際のPBC肝でのコリン代謝については不明な点が多い。今回、コ

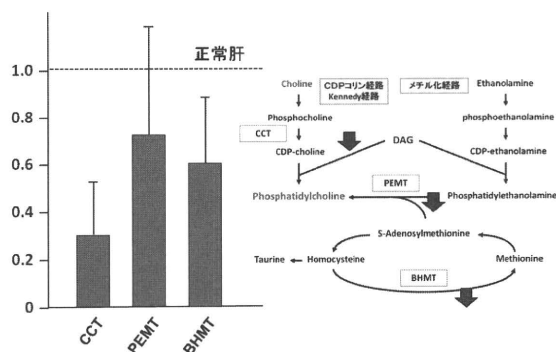
リン～PC代謝につき検討したので報告する。

B. 研究方法

未治療のPBC肝生検サンプル（38例）と正常肝（30例）よりRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによりコリン～PC代謝に関連する遺伝子の発現を比較検討した。

C. 研究結果

PCはコリン（CDP-コリン経路、Kennedy経路）とエタノールアミン（methylation経路）により産生されるが、その合成関連酵素（CCT: CTP phosphocholine cytidylyltransferase；PEMT: PE N-methyltransferase；BHMT: betaine homocystein methyltransferase）の遺伝子発現を解析すると、いずれの遺伝子発現も正常に比べて低下していた（図）。



コリンは肝細胞類洞側に存在するトランスポーターである OCT1 (low affinity polyspecific organic cation transporter) や CTL1 (choline-specific transporter-like protein) により細胞内へ供給される (正常肝では OCT1 の発現は CTL1 の発現の 10 倍以上であり、OCT1 が主なコリンのトランスポーターと考えられている)。PBC 肝においては、OCT1 の発現は正常肝と変化なく、CTL1 は軽度に上昇していた。ところでコリンが肝内に蓄積すると報告されている脂肪肝においては、MDR3 の発現は PBC 同様に亢進しているが、フォスファチジルコリン合成関連酵素の発現は逆に亢進していた。また、OCT1 の発現は著明に低下していた。

PC は先述のように MDR3 により胆汁中へ排出されるが、同時に PC は細胞膜やリポ蛋白 (VLDL) 膜の主要な構成成分である。我々は PBC 肝においてコレステロールが過剰にある傾向にあることを報告して来た。この過剰なコレステロールは毛細胆管側にあるトランスポーター (ATP-binding cassette G5/G8) より胆汁中へ排出され、我々はすでにこのトランスポーターの発現が PBC 肝で増加していることを報告しているが、コレステロールは VLDL としても血液中に排出される。そこで、リポ蛋白の脂質組成を HPLC にて解析すると、PBC 症例では、VLDL 中のコレステロールと PC の含有量が正常者に比べて明らかに高値であることが分かった。さらに、脂肪肝では血清コリン値が正常者に比べて高値であることが報告されているが、PBC 症例においても同様に高値であることが認められた (慢性 C 型肝炎などの他肝疾患では増加しない)。

D. 考 察

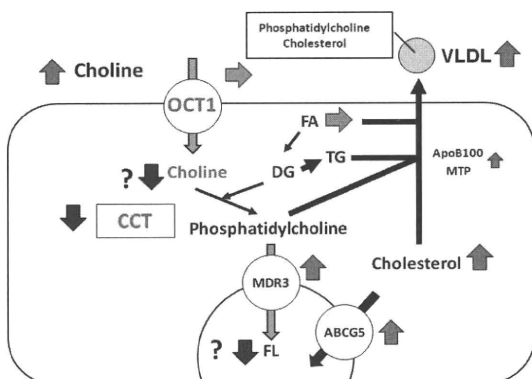
今回の我々の検討では、PBC 肝におけるコリン～PC 代謝に関しては、①合成系は低下している (合成関連酵素の発現低下)、② PC 排出系は増加している (MDR3 の発現増加と VLDL 中の PC 増加)、③コリン取り込みは変化しておらず (OCT1 の発現不変)、血清コリンは増加している、ということが明らかになった (図)。一方、PBC 同様にコリン～PC 代謝に変化

を来す脂肪肝では、①合成系は増加、② PC 排出系は増加、③コリン取り込みは低下し、血清コリンは増加、していることが明らかになった。

PBC 肝におけるコリン～PC 代謝を理解するために脂肪肝における代謝と比較すると、脂肪肝では肝細胞内における過剰なコリンを排出するために、PC へ変換し、それを MDR3 により胆汁中へ、また VLDL として排出するとともに、OCT1 による取り込みを抑制していることが推測された。一方、PBC 肝においては、胆管障害を軽減するための MDR3 による PC 排出増加と、細胞内コレステロール排出のための VLDL 形成による PC 消費が増加しており、細胞内の PC 不足ひいてはコリン不足が推測された。従って、本来であれば、OCT1 によるコリン取り込みが増加して代償すべきであるのに、それができていない状況が PBC 肝で起こっていると思われる。胆汁中へ排出された PC は腸管より再吸収され、血中へコリンとして供給されるが、PBC においては OCT1 の増加がなく、最終的には蓄積され血清コリン値が上昇するものと考えられる。

以上のことは、PBC の病態形成にコリン取り込み、すなわち OCT1 が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。興味あることに、OCT1 は種々の要因により発現が変化する。OCT1 の発現は、①胆管うっ滞や胆管障害により発現が低下、② PPAR α と PPAR γ により発現増加、③女性ホルモンにより発現低下し男性ホルモンにより発現増加、④ LPS により発現低下、などにより変化する。従って、まず、PBC による胆管障害はコリン欠乏を助長し、胆汁中の PC 低下にともない更なる胆管障害を惹起する可能性がある。先述のようにフィブレート系薬剤は PPAR α のリガンドであるが、フィブレート系薬剤は MDR3 の発現を増加させるのみならず、OCT1 の発現を増加させることで、最終的に胆汁中の PC を増加させることでその作用を発揮している可能性がある。すでに我々が報告しているように、フィブレート系薬剤を投与しない時点ですでに、MDR3 の発現は増加しており、しかも血清 ALP 値と正の相関を示す。このことは、PBC 肝においては、MDR3 はすでにフルアクチベートされた状況であり、実際のフィブレート系薬剤のターゲットは OCT1 であるように思われる。PBC は周知のように女性に圧倒的に多い疾患であるが、女性ホルモンが OCT1 の発現を低下させることは興味もたれる。さらに、PBC の発症に細菌感染が関与している可能性が報告されているが、LPS が OCT1 の発現を低下させることも興味もたれる。

ところで、OCT1 の発現は上述の要因のみならず、遺伝的背景 (SNP) により遺伝子発現や蛋白機能が規定されている。OCT1 は糖尿病治療薬であるメトホルミンの取り込みに関与しており、その SNP と発現や蛋白機能の変化が多く報告されている。PBC における OCT1 の発現が上昇しない理由は、環境要因のみならず遺伝的背景が関与している、すなわち OCT1 発現が遺伝的に低下している人に発症している、という



可能性がある。今後、PBC 症例における OCT1 の SNP の解析を行っていく予定である。

今回我々が検討したコリン～PC 代謝の観点から治療を考えていくと、セカンドドラッグであるフィブレート系薬剤の次の薬剤、サードドラッグになりうる薬剤もみえてくる。先述のように OCT1 は PPAR γ によりその発現が増加するので、PPAR γ のリガンドである糖尿病治療薬のピオグリタゾン は PBC 治療の候補となる。特に、PBC 症例で糖尿病や脂肪肝を合併する症例では有効かもしれない。次に細胞内の過剰なコレステロールを VLDL として排出させるために PC が消費されているので、細胞内コレステロールを減少させる薬剤は有効である可能性がある。まずは、コレステロール合成を抑制するスタチンが挙げられる。我々はフィブレート系薬剤が使用できなかった UDCA 服用 PBC 症例にスタチンを使用し、長期にわたり肝機能の改善を認めた症例を報告している。ただし、PBC 肝ではすでにスタチンのターゲットである HMG-CoA 還元酵素の遺伝子発現は低下しており、効果は十分でない可能性はある。次にコレステロール吸収抑制剤であるエゼチミブがあげられる。エゼチミブはコレステロールポンプである NPC1L1 の特異的阻害剤であるが、小腸での吸収を阻害するとともに、胆汁からのコレステロールの再吸収も阻害し、PBC に有効である可能性がある。イオン交換樹脂であるコレステラミンも小腸でのコレステロール吸収を阻害するが、胆汁酸を吸着するので UDCA との同時服用はできないので、現実的には使用できないと思われる。最後に PC そのものを補給するという観点からは、PC が構成成分になっている EPL (リン脂質) もその候補になりうる。報告によると PC そのものは小腸で吸収され血中にも PC の形で存在すると言われているが、PC が更に分解されてコリンになり十分に効果を発揮しない可能性もある。

最後に、PBC は慢性非化膿性破壊性胆管炎 (chronic non-suppurative destructive cholangitis : CNSDC)、抗ミトコンドリア抗体などに象徴される免疫性肝疾患として考えられているのは周知の事実である。しかしながら一方、ステロイドに代表される免疫抑制剤が効果を示さないのも事実であり、実際の PBC の治療は、UDCA やフィブレート系薬剤による胆汁の親水性化 (疎水性胆汁酸による胆管障害の抑制) である。さらに、PBC の病態 (病期) 進行には、組織学的な胆管炎 (浸潤リンパ球) の程度は関連がなく、むしろ胆管消失が関連するとの報告もある。従って、免疫応答は PBC の発症というよりも病態進行に関与している、すなわち CNSDC 出現前にすでに胆管障害は生じており、障害された胆管細胞に免疫応答が生じている、という大胆な仮説もとりうるのではないかと思われる。そして、その初期の胆管障害 (発症) に胆汁酸組成 (PC など) が大きく関与していると考えられる。

E. 結 論

PBC 肝においてはコリン～PC 代謝は大きく変化しており、特にコリントランスポータである OCT1 が病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Yasutake K, Yoshimoto T, Harada N, Yada M, Higuchi N, Kato M, Kohjima M, Taketomi A, Maehara Y, Nishinakagawa T, Machida K, Matsunaga K, Nakashima M, Kotoh K, Enjoji M Therapeutic effect of bezafibrate against biliary damage: a study of phospholipid secretion via the PPARalpha-MDR3 pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010;48(1):22-8
- 2) Enjoji M, Yada R, Fujino T, Yoshimoto T, Yada M, Harada N, Higuchi N, Kato M, Kohjima M, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Kotoh K, Nakamuta M. The state of cholesterol metabolism in the liver of patients with primary biliary cirrhosis: the role of MDR3 expression. *Hepatol Int.* 2009; 3(3): 490-496.

2. 学会発表

- 1) 中牟田誠, 野崎雄一, 遠城寺宗近: シンポジウム 5 自己免疫性肝胆道疾患・最近のトピックス ホスファチジルコリン代謝 (OCT1～合成～MDR3) からみた PBC の病態形成 第14回日本肝臓学会大会 (JDDW2010) 横浜 2010/10/13

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

PBCにおける脂質代謝の検討(4)：ベザフィブラート治療が胆汁酸代謝に与える影響

研究協力者 松崎 靖司 東京医科大学茨城医療センター 消化器内科 教授

研究要旨：ベザフィブラートがPBCの治療に有効な理由を明らかにするために、ベザフィブラートの胆汁酸代謝への影響を検討した。ベザフィブラートはFXR非依存性のメカニズムによって胆汁酸合成を抑制した。その結果、UDCAと併用するとUDCAの比率を上昇させ、UDCAの効果を高めた可能性がある。さらに、CYP3A4の発現を促すことによって、二次胆汁酸など細胞傷害物質の解毒を促進する作用も有していると考えられた。

A. 研究目的

UDCAで効果が不十分なPBCにはベザフィブラートの併用が有効である。ベザフィブラートの作用機序として、PPAR α を介したリン脂質の分泌亢進や免疫調節作用が報告されているが、まだ十分に解明されていない。昨年度我々は、ベザフィブラートは胆汁酸合成を抑制することによって胆汁酸に対する肝臓の負荷を軽減している可能性を報告した。本年度は、1)ベザフィブラートの胆汁酸合成抑制機序の解明、2)ベザフィブラート治療による胆汁酸組成の変化を明らかにすること、3)その他の治療効果発現メカニズムの探索、の3点に絞り検討を行った。

B. 研究方法

対象：正常対照52例、未治療PBC患者(Stage1 or 2) 32例、UDCA治療(600mg/day) 3ヶ月後のPBC患者(Stage1 or 2) 31例、UDCA(600mg/day) +ベザフィブラート(400mg/day)併用治療3ヶ月後のPBC患者(Stage1 or 2) 18例。

分析項目：胆汁酸合成を反映する血清マーカーとして7 α -ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン(C4)、核内胆汁酸レセプターであるFarnesoid X receptor (FXR)の活性化の程度を評価するための血清マーカーとして、Fibroblast growth factor 19 (FGF-19)を定量した。また、末梢血の胆汁酸分画の分析を行った。さらに、LC-MS/MSを用いて血清ステロールのメタボローム解析を行い、PBC患者またはベザフィブラート治療時に特徴的に変化するステロールの探索を行った。

C. 研究結果

胆汁酸合成のマーカーであるC4濃度は、未治療およびUDCA単独治療群では、正常対照と比較して有意な変化を認めなかった。しかし、ベザフィブラートの併用群では有意に低下していた。

FXR活性化のマーカーであるFGF-19濃度も、未治療およびUDCA単独治療群では、正常対照と比較して有意な変化を認めなかったが、ベザフィブラートの併用群では有意に低下していた。

血清の胆汁酸組成をUDCA単独治療群とベザフィブラート併用群と比較すると、非抱合体、グリシン抱

合体、タウリン抱合体のいずれの分画においても、ベザフィブラート併用群でUDCA単独治療群よりもUDCAの比率が増加し、逆にCDCA、DCA、LCAの比率が低下していた。

血清ステロールのメタボローム解析では、対照群と比較して、未治療のPBC群で有意な4b-ヒドロキシコレステロールの増加を認めた。また、UDCA単独治療群では未治療群と変化がなかったが、ベザフィブラート併用群では4b-ヒドロキシコレステロール濃度のさらなる上昇が認められた。

D. 考察

1)ベザフィブラートの胆汁酸合成抑制機序について：ベザフィブラート治療は胆汁酸合成を抑制し、FXRの活性も抑制した。通常、FXRの活性が抑制されれば胆汁酸合成は促進するはずであるが、両者共に抑制されていることから、FXR非依存性の胆汁酸合成抑制がベザフィブラートの主作用で、それに伴って腸肝循環する胆汁酸が減り、FXRの活性が低下しているものと考えられた。FXR非依存性の胆汁酸合成抑制機序としてはPPAR α を介するもの、他、pregnane X receptor (PXR)を介する機序が報告されており、今後解明を進めたいと考えている。

2)ベザフィブラート治療による胆汁酸組成の変化について：UDCAにベザフィブラートを併用すると、UDCA単独の時よりもUDCA比率の上昇を認めた。これは1)に示したように、ベザフィブラートによって内因性胆汁酸合成が抑制されることが原因と考えられた。同時にCDCAや二次胆汁酸分画は減少し、胆汁酸プール全体の親水度もUDCA単独の時よりも増加していると推測された。このことがベザフィブラートの併用がUDCA単独治療よりも有効な理由の1つと考えられた。しかし、個々の症例を見てみると、ベザフィブラートの併用でもUDCAの比率が増大していない症例もあり、そのような症例でもALPやgGTPの値は低下していることから、これだけではベザフィブラートの効果をすべて説明できない。

2)その他の治療効果発現メカニズムについて：未治療のPBCで増加し、ベザフィブラート治療でさらに増加していた血清4b-ヒドロキシコレステロールは、コレステロールを基質に薬物代謝酵素CYP3A4

によって生成されるステロールである。肝組織中に LCA など疎水性で細胞傷害性のある胆汁酸が増加すると、PXR を介して CYP3A4 が誘導され、2 次胆汁酸の水酸化による親水性胆汁酸への変換が行われると考えられている。すなわち PBC では、未治療であっても既にそのような機序が働き、CYP3A4 が活性化されているものと考えられた。また、ベザフィブラート治療は CYP3A4 の活性をさらに上昇させ、2 次胆汁酸など細胞傷害性物質の解毒を促進させている可能性がある。

E. 結 論

ベザフィブラートは FXR 非依存性のメカニズムによって胆汁酸合成を抑制した。また、内因性胆汁酸合成の抑制によって UDCA の比率を上昇させ、UDCA の効果を高めた可能性がある。さらに、CYP3A4 の発現を促すことによって、二次胆汁酸など細胞傷害物質の解毒を促進する作用も有すると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Honda A, Miyazaki T, Ikegami T, Iwamoto J, Yamashita K, Numazawa M, Matsuzaki Y. Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010; 121: 556-564.

Maeda T, Honda A, Ishikawa T, Kinoshita M, Mashimo Y, Takeoka Y, Yasuda D, Kusano J, Tsukamoto K, Matsuzaki Y, Teramoto T. A SNP of NPC1L1 affects cholesterol absorption in Japanese. *J. Atheroscler. Thromb.* 2010; 17: 356-360.

2. 学会発表

本多 彰, 池上 正, 中牟田誠, 宮崎照雄, 齋藤吉史, 平山 剛, 松崎靖司. 原発性胆汁性肝硬変に対する UDCA およびベザフィブラートによる治療効果発現メカニズムの比較. 第46回日本肝臓学会総会(ワークショップ). 2010年5月, 山形.

Honda A, Ikegami T, Miyazaki T, Nakamuta M, Takikawa H, Matsuzaki Y. Ursodeoxycholic acid and fibrate make an excellent combination for the treatment of cholestasis in patients with primary biliary cirrhosis. 第21回 International Bile Acid Meeting (Falk Symposium). 2010年10月, Freiburg, Germany.

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

免疫抑制剤・UDCA 抵抗性慢性 GVHD における胆管上皮傷害低減に関する研究

研究協力者 西原 利治 高知大学消化器内科 教授

研究要旨：慢性 GVHD は胆管上皮に発現する allo 抗原を認識して胆管上皮細胞の破壊を生じ、非化膿性破壊性胆管炎から胆管の消失をきたす骨髄移植症例の合併症であり、生命予後を大きく左右する。プレドニゾロンをはじめとする免疫抑制剤が著効を示すが、時に免疫抑制剤に対して抵抗性を示すため UDCA の併用療法が試みられている。しかし、その有用性は限定的であり、1 割の症例は両者に抵抗性を示すため新たな治療法の確立が求められている。本症の肝組織像は原発性胆汁性肝硬変（PBC）と極めて類似性の高い肝組織像を呈することから、今回、UDCA 抵抗性 PBC に対して使用されるベザフィブラートをを用いて免疫抑制剤・UDCA 抵抗性慢性 GVHD の治療を行い良好な結果を得たので報告する。

A. 研究目的

慢性 GVHD は種々の臓器を傷害するが、胆管もその標的臓器の一つであり、非可逆的病変を肝臓に惹起する。そのため、胆管傷害を可及的速やかに軽減することが求められるが、免疫抑制剤抵抗性症例の治療では難渋する。PBC の治療に基づいて UDCA の併用が行われるが、その有効性は限定的である。そこで、今回免疫抑制剤・UDCA 抵抗性慢性 GVHD に対してベザフィブラートの治療を行い、有効性を示す所見を得たので報告する。

B. 研究方法

慢性 GVHD87症例の内、免疫抑制剤・UDCA 治療に抵抗性の胆管病変を示した 8 症例に対してベザフィブラートの投与を行い、胆管傷害を反映する血清マーカー（ALP, γ -GTP）値を経時的に観察した。

C. 研究結果

ベザフィブラート治療開始後 1 ヶ月以内に全例で著効が得られた。（ALP $964.9.0 \pm 306.9$ to 597.8 ± 102.5 IU/l, P.0.012; γ -GTP 528.8 ± 299.0 to 269.0 ± 119.9 IU/l, P<0.012）。

D. 考 察

ベザトールは決して免疫抑制剤ではないけれども、免疫抑制剤・UDCA 抵抗性骨髄移植後慢性 GVHD の治療に有用であった。慢性 GVHD には抗白血病作用もあるため、白血病の再燃を抑制するという重要な働きもある。正常な免疫応答を保ちながら胆管傷害を緩和する作用のあるベザフィブラートは極めて魅力的な新しい魅力的な治療と考えられた。

E. 結 論

抗白血病作用を持つ慢性 GVHD に伴う胆管病変の緩和に有用なベザフィブラート療法の有用性を今回明らかにした。今後、本療法は胆管病変を伴う慢性 GVHD に対する標準治療として広い臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Ariei S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T; The Japan NASH Study Group, Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011 Feb 11.
- 2) Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Yamaguchi K, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Imai S, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Yasui K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol. 2011;46:257-268.
- 3) Takeuchi T, Iwasaki S, Miyazaki J, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Saibara T, Furihata M. Matrix metalloproteinase-1 expression in splenic angiosarcoma metastasizing to the serous membrane. Int J Clin Exp Pathol. 2010;3:634-639.
- 4) Yoshioka S, Hamada A, Jobu K, Yokota J, Onogawa M, Kyotani S, Miyamura M, Saibara T, Onishi S, Nishioka Y. Effects of Eriobotrya japonica seed extract on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. J Pharm Pharmacol. 2010;62:241-246.
- 5) Toda K, Hayashi Y, Saibara T. Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor type 1 exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis in aromatase knockout mice. Biochim Biophys Acta. 2010;1801:655-664.

- 6) Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben JA. Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2010;59:258-266.
- 7) Hidaka M, Iwasaki S, Matsui T, Kawakita T, Inoue Y, Sakai T, Harada N, Takemoto S, Nagakura S, Kiyokawa T, Takahashi M, Saibara T, Onishi S, Kawano F. Efficacy of bezafibrate for chronic GVHD of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:912-918.
- 8) 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;15:806-809.
- 9) Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee GH. Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. *Cell Tissue Res*. 2008;334:219-226.
- 10) Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Yokoi N, Yamagata K, Shihara N, Iizuka K, Saibara T, Seino S, Takeda J. Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. *Hum Mutat*. 2008;29:E271-277.
- 11) Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara T. Preserved tissue structure of efferent ductules in aromatase-deficient mice. *J Endocrinol*. 2008;199:137-146.

2. 学会発表

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

レトロウイルス感染症と原発性胆汁性肝硬変

研究協力者 上野 義之 東北大学大学院医学系研究科消化器病態学 准教授

研究要旨：PBCの病態とレトロウイルス感染についてはその意義は不明である。レトロウイルス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、hostの遺伝子に障害を与える可能性がある。モデルマウスやヒト検体を用いてその遺伝子組込みについて調べた。ヒトPBCでは末梢血PBMCに一部のHERV配列の活性化を認めるが、MMTV、XMRVの転写活性化は認めず、病因との因果関係は検討した範囲では明確でない。ヒト末梢血PBMCにはMMTV、などのprovirusは検出されず、germ lineへの組み込みは否定的であった。PBC動物モデルであるNODC3C4マウスでは肝臓ほぼ特異的にMMTVの転写活性化が認められ、NODC3C4での転写活性化は性差が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

MMTVなどの内在性レトロウイルスとPBCの関連ではMasonらにより末梢血リンパ球や肝付属リンパ節から転写産物が同定され、LTRのプロモーター活性はエストロゲンなど性差に関連する可能性があり、さらに、PBCモデルマウスでの活性化が認められていることや、胆管細胞への感染性が認められることなどより、病態形成への関与といった仮説が提唱されている。これに対して、SelmiやGershwinらは彼らの検討ではレトロウイルス転写は同定されず、ヒトにおける病因としての関連は無いと対抗した主張をしており、その評価は定まっていない。今回我々はモデルマウスと本邦における関与を検討いたしました。

B. 研究方法

MMTVなどのレトロウイルスの検出は、既法のプライマーを用いてヒトPBC58名の血清、及び末梢血単核球由来のDNAからEnv配列、XMRV（異種指向性マウス白血病関連ウイルス）及びMLV-Related virusesのGag配列についてPCR法にて検出を試みた。

C. 研究結果

上記のPCR検出系のうち、Single PCRでは特異的なバンドは検出されなかった。

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。PBCモデルマウスであるNODC3C4についてはメスの肝臓ほぼ特異的に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

ヒトPBCでは末梢血PBMCに一部のHERV配列の活性化を認めるが、MMTV、XMRVの転写活性化は認めず、病因との因果関係は検討した範囲では明らかではなかった。ヒト末梢血PBMCにはMMTV、

XMRV、MLV-related virusのprovirusは検出されず、germ lineへの組み込みは否定的であった。PBC動物モデルであるNODC3C4マウスでは肝臓ほぼ特異的にMMTVの転写活性化が認められた。NODC3C4での転写活性化は性差が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

以上の結果から、現時点ではPBCの病態形成にレトロウイルス族の関与は明白ではなく、モデル動物などを用いたより詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno Y, Ambrosini YM, Moritoki Y, Ridgway WM, Gershwin ME. Murine models of autoimmune cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26:274-9.
- 2) KGlaser S, Wang M, Ueno Y, Venter J, Wang K, Chen H, Alpini G, Holterman A. Differential transcriptional characteristics of small and large biliary epithelial cells derived from small and large bile ducts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G769-77.
- 3) Glaser S, Lam IP, Franchitto A, Gaudio E, Onori P, Chow BK, Wise C, Kopriva S, Venter J, White M, Ueno Y, Dostal D, Carpino G, Mancinelli R, Butler W, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Alpini G. Knockout of secretin receptor reduces large cholangiocyte hyperplasia in mice with extrahepatic cholestasis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 2010;52:204-14.
- 4) Woo K, Sathe M, Kresge C, Esser V, Ueno Y, Venter J, Glaser SS, Alpini G, Feranchak AP. Adenosine triphosphate release and purinergic (P2) receptor-mediated secretion in small and

large mouse cholangiocytes. Hepatology
2010;52:1819-28.

- 5) Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T.
Treatment of Primary Biliary Cirrhosis: A new
challenge? Hepatol Res 2010;40:61-8.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他