

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 分科会総括研究報告書

### 肝内結石症に関する研究

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

#### A. 研究目的

肝内結石症分科会は（１）疫学・予後調査ワーキング、（２）診断・治療ワーキング、（３）発癌ワーキング、（４）発癌予知ワーキングの４つのワーキンググループを組織し、肝内結石症の現状把握、診断・治療成績の向上と診療ガイドライン作成、発癌機序の解明と発癌予測を主な研究課題とし研究を遂行してきた。本年度の班会議では以下に述べる各ワーキンググループ研究の進捗状況と個別研究の成果が報告された。

#### B. 研究成果

##### 1. ワーキンググループ

###### （１）疫学・予後調査ワーキング

（代表：森研究協力者）

前回の肝内結石症の全国調査より５年が経過し、肝内結石症診療の現状と過去の結果との異同を把握し解析することを目的として新規の多施設全国調査（横断調査）を行う。調査は多施設による診療録ベースのretrospective studyである。１次調査にて肝内結石症例の有無、胆嚢結石症・肝外胆管結石症例数を調査する。引き続き２次調査として患者背景、肝内結石の病状、合併症、肝内胆管癌の有無、治療内容、転帰など詳細な症例調査を行う。現在、倫理審査を通過し、１次調査の発送準備中である。来年度中には２次調査の中間報告を行える見込みである。

###### （２）診断・治療ワーキング

（代表：田妻研究協力者）

診療実績に基づくガイドライン改訂にあたり以下の観点からの検証を行う。

（Ⅰ）肝内結石の診断・治療の現状の把握－第３次調査によるガイドラインの課題検証（ハイポリウムセンター中心の継続的な実態調査）

（Ⅱ）新規の診断・治療 modality の発掘と検証－診療ガイドラインの策定・改訂に向けて（日本消化器病学会診療ガイドラインと整合）

（Ⅲ）データベース作成－診療指針の立案と改訂に向けた継続的な予後・合併症調査

###### （３）発癌ワーキング

（代表：中沼研究分担者）

従来からの肝内結石症からの発癌に関する病理学的、生化学的アプローチを継続して行う。病理学的アプローチとして、病理検体を用いた胆管癌や前癌病変の診断に関する検討、ならびに病理診断マニュアルの作成を目指す。生化学的アプローチとして、胆管癌診断のバイオマーカーの商品化の実現を目指し、胆汁と

血清を用いた新規バイオマーカーの探索を引き続き行う。本年度の生化学的検討では、WFA-MY.1E12（レクチン-抗体）による簡易サンドイッチアッセイ系の構築し、これを用いて解析を行ったところ、従来の胆管癌マーカーであるCA19-9と比較して感度の面で優れていることが示された。次年度は簡易測定キットを用いて、多数の胆管癌症例の胆汁と血清によるバリデーションを実施する予定である。

###### （４）発癌予知ワーキング

（代表：佐田研究協力者）

肝内胆管癌合併肝内結石症の予後は不良で、その原因は診断される症例の過半数がStage IVbで発見され、早期発見する手段が確立されていないことにある。昨年度までの検討で、従来型の診断 modality（ERC、PTC（S））は肝内胆管癌早期発見に有効ではなく、FDG-PET、Diffusion MRI、Perfusion CTなどの新たな modality の有効性もいまだ確立していない。今年度以降の３年間で、実臨床に寄与する鑑別診断情報を提供すべく、肝内胆管癌合併肝内結石症および肝内胆管癌非合併肝内結石症のアトラス作成を行う。

#### 2. 個別研究

##### （１）疫学・予後

森研究協力者は、肝内胆管癌の危険因子について新規の多施設全国調査（横断調査）を行い、発癌および胆管癌合併からみた肝内結石症の取扱いに関する調査を開始した。

八坂研究協力者は、肝内結石症と胆道癌のリスク集団ベースの追跡研究を行った。10年間の追跡期間中、肝内結石症患者の15.4%および比較コホート患者の1.0%が胆道癌を発症し、肝内結石症患者の7.7%に肝内胆管癌を発症した。比較コホートの患者に比べ肝内結石症患者は10年間の胆道癌の発生率、死亡率が有意に高かった。患者の人口統計学的特性、選択した併存疾患などの補正を行ったところ、肝内結石症患者は対応する比較コホートの患者に比べて胆管癌発症リスクが18.2倍高かった。

##### （２）診断・治療

榎野研究協力者は、術前に肝門部胆管癌と診断して根治切除を施行したが、実際は肝内結石症であった6症例について解析し、肝門部胆管癌との鑑別が困難な肝内結石症に対する肝切除術+肝外胆管切除による治療は妥当であるとした。

露口研究協力者は、CT/MRCPで上部胆管～肝門部の胆管癌の鑑別が必要であった高齢発症の肝内結石

症例を報告，供覧した。いずれも胆道系酵素の軽度上昇のみで胆管炎の発症はなく，IgG4は高値でなかった。胆道鏡で繰り返して観察することで早期から除外診断を行い，不要な手術を回避できる可能性が示唆された。

内山研究協力者は，肝内結石症の術式を決定する際最も重要な因子である胆管狭窄の有無および部位に関して，大阪医科大学における肝内結石症手術症例を胆管狭窄の部位別に病型分類し，術式と遠隔成績（QOL）の観点から検討を行った。

### （3）病態・発癌

中沼研究分担者は，肝内結石症からの発癌過程におけるS100ファミリータンパク質の発現を病理組織学的に検討し，BilIN-1,2,3から浸潤癌へと異型度が増すにしたがってS100ファミリータンパク質の発現が増加すること，さらに検討した分子の中でS100Pの免疫染色がBilINの組織診断における診断補助マーカーとして有用であることを示した。

本多研究協力者は，胆汁中の遺伝子発現解析で胆道系悪性腫瘍合併を検出する目的で，胆汁中の遺伝子発現解析を行った。その結果，胆汁を用いたmiRNA発現解析は胆道癌の診断に有用である可能性を示した。

海野研究協力者は，LC-MS/MSを用いた肝細胞トランスporter発現の解析を行い，胆汁酸を投与したマウス肝では細胞増殖が生じたが，複数の血管側膜トランスporterが低下し，基質薬剤の輸送および薬効に影響を与えること，および胆汁酸投与による肝再生促進には合成酵素誘導による肝内GSH濃度の上昇とoatp1の発現減少が寄与していることを明らかにし，肝内GSH増加作用のある薬剤は肝再生促進に作用する可能性があることを示した。

田妻研究協力者は，肝内胆管障害とGタンパク共役型受容体に関する検討を行い，lysoPCは胆管上皮細胞に対し細胞障害性を示すこと，およびlysoPCはox-FFAをリガンドとするG2A受容体の発現を誘導し，lysoPCの作用にG2Aが関与している可能性を示した。

正田研究協力者は，胆管癌細胞に対する新しいバイオ療法として，膜融解性ハイブリッドペプチドIL-4lyticの抗腫瘍効果を*in vitro*および*in vivo*モデルにおいて検討した。IL-4lyticは用量依存性に胆管癌細胞の増殖を抑制した。また，皮下腫瘍モデルにおいても，IL-4lyticの腫瘍内投与により容量依存性に腫瘍の増大を抑制した。これらの結果より，IL-4lyticは胆管癌に対する新しいバイオ治療薬として有用である可能性を示した。

### Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

## Ⅲ-1. 自己免疫性肝炎分科会

### 【ワーキンググループ (WG) 研究報告】

#### 1. 病態解析 WG

愛媛大学大学院 先端病態制御内科学 恩地 森一

#### 2. 診断 WG 総括：全国集計結果に基づく新診断指針作成

東京慈恵会医科大学大学院 消化器内科 銭谷 幹男

#### 3. 治療指針の作成 WG 治療指針の作成

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学 山本 和秀

### 【分担研究報告】

#### 1. 自己免疫性肝炎における骨髄由来抑制細胞の機能

愛媛大学大学院 先端病態制御内科学 恩地 森一

#### 2. 自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討

昭和大学医学部 消化器内科 笹川 綾子

#### 3. 自己免疫性肝炎の臨床経過とサイトカインネットワーク

国立病院機構信州上田医療センター 吉澤 要

#### 4. 自己免疫性肝炎の肝内遺伝子発現動態の検討

東京慈恵会医科大学大学院 消化器内科 銭谷 幹男

#### 5. 自己免疫性肝疾患における miRNA の検討

福島県立医科大学 消化器・リウマチ膠原病内科 大平 弘正

#### 6. 自己免疫性肝炎の診断 - 慶応関連施設症例集積での検討

国際医療福祉大学 塩谷病院 森實 敏夫

#### 7. 自己免疫性肝炎の病態と予後の解明

慶應義塾大学医学部 消化器内科 日比 紀文

#### 8. 自己免疫性肝炎の長期予後 - 国立病院機構肝疾患ネットワークの成績 -

国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 石橋 大海

#### 9. 自己免疫性肝炎進行例の解析

虎の門病院分院 臨床検査部 鈴木 義之

#### 10. 自己免疫性肝炎における抗 HLA 抗体に関する研究

新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学 青柳 豊

11. 自己免疫性肝炎の診断マーカーとしての新規自己抗体

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学 山本 和秀

12. 自己免疫性肝疾患における転写抑制因子に関する研究

福井大学医学部 第二内科 中本 安成

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

自己免疫性肝炎分科会

分担研究報告書

病態解析 WG

研究分担者 恩地 森一 愛媛大学大学院先端病態制御内科学 教授

**研究要旨**：「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班では、日本肝臓学会の理事・評議員の所属する施設を対象に全国アンケート調査を行い、現在の本邦における自己免疫性肝炎の病態および診療の実態を明らかにした。今回、自己免疫性肝炎の長期予後についての班内調査を行い、肝細胞癌合併を含めた長期予後について解析する予定である。すでに愛媛大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得て、各施設に調査を依頼している。また、急性発症例についても今後班内調査を行って実態を明らかにするとともに、診療についての指針を示したい。

## 共同研究者

青柳 豊 新潟大学大学院消化器内科学  
広石 和正 昭和大学消化器内科  
吉澤 要 国立病院機構信州上田医療センター  
阿部 雅則 愛媛大学大学院地域医療学

## A. 研究目的

「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班（2008年～2010年）では、日本肝臓学会の理事・評議員の所属する施設を対象に全国アンケート調査を施行し、現在の本邦における自己免疫性肝炎の病態および診療の実態を明らかにした（J Gastroenterol 46: 1136-1141, 2011）。しかし、その長期予後については明らかとなっていない。本ワーキンググループでは、肝細胞癌合併を含む自己免疫性肝炎の長期予後を明らかにするとともに、急性肝炎発症自己免疫性肝炎の診療指針を作成することを目的とした。また、病態を解明するために基礎的解析についてもサブワーキンググループを立ち上げて行うこととした。

## B. 研究方法

- 1) 自己免疫性肝炎の長期予後を明らかにする目的で、班内調査を計画した。
- 2) 自己免疫性肝炎の病態解析に関するサブワーキンググループの第1回会合を開催した。

## C. 研究結果

- 1) 自己免疫性肝炎の予後調査の調査表を作成し、愛媛大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得た（愛大医病倫 1112007号）。「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班の班員・共同研究者の所属する施設に調査表を配布した。
- 2) 自己免疫性肝炎の病態解析に関するサブワーキンググループの第1回会合を開催した（2011年10月）。参加者は18名。3名の演者が発表し、活発な討論が行われた。

## D. 考察

自己免疫性肝炎の長期予後に関する調査は20年以上

行われていない。この間に疾患概念の普及と適切な治療により予後が改善していることが予想される。また、以前の調査では肝細胞癌の合併については調査されておらず、その臨床像などについても明らかにする必要がある。

また、前回の全国調査で増加していることが明らかになった急性発症例についても今後班内調査を行って実態を明らかにするとともに、診療指針を作成したいと考えている。

## E. 結論

前回の全国調査の結果を受け、自己免疫性肝炎の予後を明らかにする目的で班内調査を継続している。また、急性発症例についても班内調査を計画しており、自己免疫性肝炎の病態解析をすすめていく予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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）

自己免疫性肝炎分科会

分担研究報告書

診断 WG 総括：全国集計結果に基づく新診断指針作成

研究分担者 銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学大学院消化器内科 教授

**研究要旨**：2008年に本研究班で施行された自己免疫性肝炎の全国アンケート調査により、1000症例を越えるという、これまでの調査よりはるかに多い症例の集積がなされた。それらの臨床像の検討により、従来の診断指針では包含されない症例の存在、急性発症症例の取り扱いなどの問題点が明確になった。全国集計の症例データを基に新たな、かつ臨床的に有用性の高い診断指針作成と国際診断指針との整合性を図ることを目的として作業を開始している。また本研究班で過去に策定された自己免疫性肝疾患の診断判別式の有用性を、今回のアンケート結果をもとに検証を行うべく検討中である。

## 共同研究者

日比 紀文 慶應義塾大学医学部 消化器内科  
松崎 靖司 東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科  
森實 敏夫 国際医療福祉大学 塩谷病院

## A. 研究目的

最新の全国アンケートデータにより明らかにされた、現在の本邦における自己免疫性肝炎の臨床像を踏まえ、それらに合致する、臨床的により有効な診断指針を策定することを目的とする。

なお、広く臨床の場で利用されている国際自己免疫性肝炎グループ (IAIHG) のスコアリングシステム、同簡易型、アメリカ肝臓学会 (AASLD) の診療ガイドラインとの整合性をとることに十分な留意をする。

## B. 研究方法

全国アンケート調査により得られた症例データに基づく診断指針を作成する。また本研究班で過去に策定された診断判別式の妥当性を再検証するとともに、国際診断スコア、簡易型診断スコアとの整合性も検証する。

## C. 研究結果

診断上重要な抗核抗体の測定法は原法として新鮮凍結ネズミ肝細胞を用いて測定することとなっているが、臨床現場では原法を用いることは現状では困難である。樹立化肝細胞株である HEp-2細胞を用いた測定が診断上問題ないことを明らかにし、診断指針策定の基礎を確立した。

また、判別式の有用性、ことに病理組織所見を含まない場合の有用性を確認した。

## D. 考 察

今回の全国アンケート調査により、従来から自己免疫性肝炎の臨床的特徴とされた血清 IgG 高値、抗核抗体などの自己抗体高力価陽性所見を示さない症例の割合が、以前に比し増加していることが明らかになった。そのため、そのような現状に即した新たな診断指針策定は必然であり作業を継続中である。

また、急性発症例、劇症化例の報告が増えているが、それらの多くは血清 IgG 低値、抗核抗体低力価なため、そうした症例の診断を指針に織り込む必要がある。一方、薬剤性肝障害、NASH と自己免疫性肝炎の鑑別が困難なことも少なくないため、その点についても言及する必要があると考えられる。

新診断指針策定に当たっては国際的な診断指針との整合性が不可欠であり、この点の検討も進行中である。

さらに本研究班で策定された診断判別式の有用性の確認により、診断における病理所見の必要性に関する考察も含めた、より客観的な診断指針の確立が期待できる。

## E. 結 論

最新の全国アンケート結果を基に、臨床に即した新たな診断指針の策定が進行中である。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

高橋宏樹 銭谷幹男 自己免疫性肝炎の診断におけるスコアリングシステムの位置付け 日消誌 108:1837-1844. 2011

Takahashi H, Zeniya M : Acute form of autoimmune hepatitis; Does it exist? A literature review. Hepatol Res 41:498-504. 2011

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

自己免疫性肝炎分科会

分担研究報告書

治療指針の作成 WG 治療指針の作成

研究協力者 山本 和秀 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学 教授

**研究要旨：**自己免疫性肝炎（AIH）における治療指針の作成を目的に検討を行った。治療開始後早期の ALT 正常化を得るためには、0.9～1.2mg/kg/day のプレドニゾン導入量が必要であることが示された。また、治療経過中の再燃には、診断時の年齢や抗平滑筋抗体、組織中の centrilobular necrosis が関与している可能性が示された。再燃例では61%でアザチオプリン（AZP）の併用が行われており、AZP 併用群では再燃時の PSL 投与量が5mg/day と非併用例に比べて高容量であった。最後に、免疫抑制療法中止後には、67%の症例で再燃が認められること、UDCA 併用により再燃を予防できる可能性が示された。AIH 患者数が増加傾向にあることから今後も治療指針作成のための検討が必要であるが、より詳細な検討を行うためにも解析対象数を増加することが課題である。

## A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）治療における第一選択薬はステロイド剤であり、全国調査の結果でも75%の症例がプレドニゾン（PSL）で治療されていることが示されている。一方、AIHにおけるPSLの適切な導入量や中止後の予後については不明な点も多く、今後の検討が必要である。また、一部のAIH症例ではアザチオプリン（AZP）が使用されているが、適切な治療適応についての検討も今後の課題である。そこで、これらの問題を解決し、わが国独自のAIH治療指針を作成することを目的に検討を行った。

## B. 研究方法

岡山大学、福島県立医科大学、虎の門病院でAIHと診断され治療を受けている症例について検討を行った。

今回の検討項目は、i) ALT 早期正常化に寄与する因子、ii) 再燃例におけるAZPの有用性、iii) 免疫抑制療法中止後の予後、の3項目とした。

## C. 研究結果

### i) ALT 早期正常化に寄与する因子

治療開始時点でALTが正常値上限を超えており、初期治療にPSLが使用された76例について、治療開始後からALT正常化日までの期間に関連する因子を検討した。76例中16例（21%）でAZP、27例（36%）でウルソデオキシコール酸（UDCA）が併用されていた。

治療開始1か月、3か月、6か月、12か月におけるALT正常化率は、それぞれ48%、83%、92%、97%であった。

ALT 早期正常化に寄与する因子をUnivariate Cox proportional Hazard modelで検討したところAZP 併用のみが有意な因子であり（HR 0.36; 95%CI 0.20-0.64）、AZP 併用群でALT 正常化が有意に遅い結果であった。また、AZP 併用群では非併用群に比べてPSL 導入前ALTが有意に高値であった（276 IU/l vs

172 IU/l）。よって、AZP 併用の有無により層別化し stepwise Cox proportional Hazard model を行ったところ、PSL 導入量： $>0.9\text{mg/kg/day}$ （HR 2.53; 95%CI 0.95-6.70）とPSL 導入前AST： $\leq 400\text{IU/l}$ （HR 1.56; 95%CI 0.93-2.63）がALT 早期正常化に寄与している傾向が示された。

次に、治療開始時にAST  $\geq 200\text{IU/l}$  の42例で stepwise Cox proportional Hazard model を行ったところ、PSL 導入量： $>0.9\text{mg/kg/day}$ （HR 3.40; 95%CI 1.01-11.5）とAZP：併用あり（HR 0.28; 95%CI 0.12-0.65）がALT 早期正常化と有意に関連しており、年齢： $\geq 50$ 歳（HR 1.85; 95% CI 0.93-3.66）がALT 早期正常化に関連している傾向が示された。

### ii) 再燃例におけるAZPの有用性

治療開始後3年以上経過観察された131例について検討した。再燃については、ALTが正常化後に正常値上限の2倍以上への上昇を少なくとも2回以上認めた場合と定義した。

再燃は49%の症例で認められ、非再燃例に比べて再燃例は若年（46.5歳 vs 56.0歳）であり、抗平滑筋抗の陽性率が高く（77.1% vs 57.1%）、PSL 導入量が多く（40mg vs 30mg）、生検組織中でのcentrilobular necrosisが高頻度（55.9% vs 35.4%）であった。

また、再燃例のうち61%でAZPが使用され、AZP 使用例の39%で寛解が得られた。AZP 非投与群に比べてAZP 投与群では診断時のIgGが高値であり（2834 mg vs 2460 mg）、抗平滑筋抗体の陽性率が高く（89.3% vs 66.7%）、PSL 導入量が多く（40mg vs 30mg）、生検組織中でのcentrilobular necrosisが高頻度（67.6% vs 40.9%）で、再燃時のPSL 投与量が多かった（5 mg/day vs 2.5mg/day）。

### iii) 免疫抑制療法中止後の予後

1日PSL維持量が5mg以下かつ1年以上にわたりALTが30IU/l以下で推移している症例を対象にPSLの中止を行った。

本検討では、6例でPSLの中止が行われた。6例中3例ではUDCA 併用が行われていた。PSL 中止後



に、UDCA 併用群の 1 例と非併用群 3 例で再燃を認めた。

#### D. 考 察

##### i) ALT 早期正常化に寄与する因子

今回の検討では、PSL 導入量 (>0.9 mg/kg/day) が ALT 早期正常化に関与していることが示された。一方、PSL 導入量が 0.9 mg/kg/day を超えていた症例は解析対象の 8% と少数であり、本検討の妥当性の検証が必要である。

今回の検討では、肝炎の活動性が高い症例に AZP 併用例が多いというバイアスが存在したため、AZP 併用例で ALT 正常化までの期間が長くなっていたものとする。しかし、解析対象を PSL 単剤治療例に絞ると、対象症例数が小さくなり、十分な検討が出来なくなるといった問題も存在した。適切な PSL 導入量を検討するためには、初期治療が PSL 単剤で行われた症例数を増やしての再検討が必要と思われた。

##### ii) 再燃例における AZP の有用性

本検討では、診断時の年齢や抗平滑筋抗体、組織中の centrilobular necrosis が再燃と関連していることが示された。一方、海外では、診断時よりも PSL 中止時の AST や IgG が再燃に強く関連していることが報告されている。わが国においても、診断時のみならず治療経過中の因子についての解析も必要と思われる。

再燃後に AZP を併用された症例では、再燃時の PSL 投与量が 5mg/day と非併用群の 2.5mg/day よりも高容量であった。わが国では約 70% の症例で PSL 5mg/day 以下での維持療法が行われており、PSL 5mg/day 以上での再燃が PSL 抵抗性として認知されている可能性が推測される。また、AIH 症例の 85% が女性であり、診断時年齢の中央値が 60 歳であることを考慮すると、骨粗鬆症など副作用の予防のためにも「PSL 5mg/day 以上での再燃」が AZP の治療適応の一つになる可能性が有る。

##### iii) 免疫抑制療法中止後の予後

AIH では、治療中止後 80% の症例で再燃が認められると報告されている。本検討においても、PSL 中止により 67% で再燃が認められた。一方、UDCA 投与群では、非併用群に比べて再燃率が低い可能性が示された。今後、より多数例での検討が必要である。

#### E. 結 論

本邦における自己免疫性肝炎の治療指針の作成を目的に今後も検討を行う予定であり、解析対象数を如何にして増やすことが出来るかが課題である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得 なし

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 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

### 自己免疫性肝炎における骨髄由来抑制細胞の機能

研究分担者 恩地 森一 愛媛大学大学院先端病態制御内科学 教授

**研究要旨：**免疫応答を抑制する骨髄由来抑制細胞（MDSC）の肝疾患における役割を解析した。マウス肝臓では定常状態において多数の MDSC が存在しており、免疫応答抑制能を有していた。また、Con A 肝炎マウスモデルでは肝臓に MDSC 数が増加し、T 細胞増殖誘導能を容量依存性に抑制した。以上から、MDSC は肝臓における免疫寛容誘導に関与する細胞群であることが示された。今後は AIH 患者における MDSC の役割についても解析をすすめていく予定としている。

#### 共同研究者

阿部 雅則 愛媛大学大学院地域医療学 准教授

#### A. 研究目的

肝臓は免疫寛容を誘導しやすい臓器であり、その誘導には肝実質細胞や免疫担当細胞などによる肝臓の微小環境が関与している。近年、肝細胞癌患者や肝癌マウスモデルの解析で、骨髄由来細胞の一分画である骨髄由来抑制細胞（myeloid-derived suppressor cells: MDSC）が末梢血、リンパ組織および腫瘍局所に増加しており、免疫抑制に関与していることが報告された。我々は肝臓における免疫寛容の誘導に MDSC が関与しているのではないかと考え、マウス、ヒトにおける肝疾患と MDSC との関連についての解析を行った。

#### B. 研究方法

1) C57BL/6マウスの肝非実質細胞から MDSC (CD11b+Gr1+) を FACS で単離した。① MDSC の割合を肝臓と脾臓で比較した。② Allogeneic MLR の系に MDSC を添加して、T 細胞増殖誘導能の抑制について解析した。③ C57BL/6マウスに Con A を投与した後、肝臓から MDSC を単離した。MDSC の割合と allogeneic MLR の系を用いて免疫応答抑制能を解析した。

2) AIH, C 型慢性肝炎 (CH-C), 肝細胞癌 (HCC), 健常者の PBMC を用い、CD14+HLA-DR-/low の分画を MDSC として、PBMC に占める割合を解析した。

#### C. 研究結果

1) マウス肝臓では脾臓に比べて MDSC の占める割合が多かった。また、肝 MDSC はアロ T 細胞の増殖誘導能を容量依存性に抑制した。

2) Con A 肝炎マウスモデルでは、肝 MDSC はコントロールに比べ有意に増加していた。この MDSC はコントロールマウスと同様にアロ T 細胞の増殖誘導能を容量依存性に抑制した。

3) HCC 患者では、健常者、CH-C, AIH 患者に比し有意に末梢血 MDSC 数が増加していた。AIH 患者では健常者と MDSC 数に差はなかった。

#### D. 考察

肝臓には多数の MDSC が存在しており、肝臓における免疫寛容の誘導に関与していることが示唆された。また、Con A 肝炎マウスモデルでは MDSC が増加しており、過剰な免疫応答を抑制している可能性がある。今後は、他の肝炎マウスモデルでの解析や Con A 複数回投与による免疫寛容誘導における役割を解析していく予定としている。

また、ヒトでの解析では、AIH 症例を集積するとともに、治療に伴う変化についても解析していく予定である。

#### E. 結論

MDSC は肝臓における免疫寛容誘導に関与する細胞群であり、AIH の病態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

- 1) Abe M, Mashiba T, Zeniya M, Yamamoto K, Onji M, Tsubouchi H, the Autoimmune Hepatitis Study Group, a subgroup of the Intractable Hepato-Biliary Disease Study Group in Japan: Present status of autoimmune hepatitis in Japan: a nationwide survey. J Gastroenterol 2011; 46: 1136-1141.
- 2) Onji M, Autoimmune Hepatitis Study Group. Proposal of autoimmune hepatitis presenting with acute hepatitis, severe hepatitis and acute liver failure. Hepatol Res 2011; 41:497.
- 3) 恩地森一, 阿部雅則：自己免疫性肝炎診療・研究の現状と今後 日本消化器病学会雑誌 2011; 108: 7-20.
- 4) 恩地森一：急性肝炎ないしは重症肝炎，急性肝不全として発症する自己免疫性肝炎の病態についての提唱 肝臓 2011; 52: 327.
- 5) 阿部雅則, 恩地森一：自己免疫性肝炎 消化器診療ガイドライン第2版 高橋信一編, 総合医学

社, p174-177, 2011.

6) 阿部雅則, 多田藤政, 恩地森一: 異時性 PBC/AIH オーバーラップ 肝胆膵 2011; 62: 693-698.

## 2. 学会発表

1) 阿部雅則, 眞柴寿枝, 銭谷幹男, 海老沼浩利, 広石和正, 吉澤要, 鈴木義之, 山本和秀, 大平弘正, 青柳豊, 松崎靖司, 森實敏夫, 恩地森一: 自己免疫性肝炎の新しい病態への診療上の対応について 第47回日本肝臓学会総会 ワークショップ 東京, 2011年

2) 阿部雅則, 眞柴寿枝, 青柳豊, 広石和正, 吉澤要, 恩地森一: 本邦の自己免疫性肝炎における肝細胞癌の合併 第47回日本肝臓研究会 ワークショップ 静岡, 2011年

3) 越智裕紀, 阿部雅則, 眞柴寿枝, 徳本良雄, 多田藤政, 廣岡昌史, 松浦文三, 日浅陽一, 恩地森一: ステロイド治療中止後に長期間の寛解を維持していたが再燃した自己免疫性肝炎の2例 第39回日本肝臓学会西部会 岡山, 2011年

## 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

### 自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討

研究分担者 笹川 綾子 昭和大学医学部消化器内科 助教

**研究要旨：**自己免疫性肝炎患者において、末梢血リンパ球の抑制性マーカーである CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現と患者の臨床経過との関連を検討した。自己免疫性肝炎患者、原発性胆汁性肝硬変患者、慢性C型肝炎患者、健常者の末梢血より CD4陽性、CD8陽性細胞を auto MACS でそれぞれ分離し、細胞表面の CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現を観察した。健常者と比較し自己免疫性肝炎患者で CTLA-4, DR-5, PD-1分子の発現が増強しており、中でも特に著明に増強している症例が認められた。臨床経過の検討を行うと、これらの増強症例は比較的経過の安定している症例であった。以上より抑制性マーカーが自己免疫性肝炎の炎症軽減に関与している可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

自己免疫性肝疾患において患者リンパ球の活性が増強していることが多く報告されている。一方で患者リンパ球の抑制性マーカーの増減についての報告は少ない。本研究は、末梢血リンパ球の抑制性マーカーである CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現と患者の臨床経過との関連を検討し、自己免疫性肝炎の病態との関連を検討することを目的に行った。

#### B. 研究方法

末梢血（自己免疫性肝炎（AIH）10例、原発性胆汁性肝硬変（PBC）10例、慢性C型肝炎（CHC）10例、健常コントロール（Control）10例）より CD4陽性、CD8陽性細胞を auto MACS でそれぞれ分離し、フローサイトメトリーを用い細胞表面の CTLA-4, DR-5, Fas, PD-1分子の発現を観察した。そして、発現と臨床経過との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

昭和大学倫理委員会に研究実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、研究実施の承認を得た。肝癌患者に研究内容を説明し、研究への参加同意書を書面で取得した。

#### C. 研究結果

- ・肝疾患患者では健常者と比較し CTLA-4, DR-5, PD-1分子の発現が増強していたが、AIH ではより増強していた。
- ・特に AIH10例中 3例で著明な発現の増強が認められた。
- ・特に発現が増強していた 3症例の臨床データ、経過、治療内容等につき検討したところ、3例とも比較的安定した症例であった。

#### D. 考察

研究開始前には AIH における抑制性マーカーの発現低下を推察したが、実際には増強しているという結果が得られた。特に増強していた症例の臨床経過は比較的安定しており、症例数が少ないため今後追加検討を要するが、抑制性マーカーが AIH の炎症軽減に関

与している可能性もあると考えられた。

#### E. 結論

- ・ AIH では抑制性マーカーの発現が増強していた。
- ・特に増強していた症例の臨床経過は比較的安定しており、抑制性マーカーが AIH の炎症軽減に関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kajiwara A, Doi H, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Omori R, Hiroishi K and Imawari M. IL-4 and CpG therapy suppresses the outgrowth of tumors by activating tumor-specific Th1-Ttype immune responses. *Oncology Reports* (in press)

##### 2. 学会発表

- 1) Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Kajiwara A, Imawari M. Efficacy and mechanism of Dendritic cell based immunotherapy in combination with Programmed cell death 1 blockade on murine hepatocellular carcinoma model. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 2) Sasagawa A, Kajiwara A, Ohmori R, Ishii S, Eguchi J, Hiroishi K, Imawari M. Expression of inhibitory molecules on peripheral blood lymphocytes are up-regulated in autoimmune hepatitis. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 3) 大森里紗, 江口潤一, 梶原敦, 土肥弘義, 坂木理, 平出綾子, 石井成明, 広石和正, 井廻道夫. IFN- $\alpha$  と抗 PD-1抗体を用いた消化器癌に対する免疫療法の検討. 第53回日本消化器病学会大会.

福岡. 2011.

4) 平出綾子, 広石和正, 井廻道夫. 自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡. 2011.

5) 石井成明, 広石和正, 江口潤一, 平出綾子, 大森里紗, 梶原敦, 井廻道夫. マウス肝癌に対するサイトカイン遺伝子導入 allogenic 癌細胞による免疫療法. 第47回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.

#### 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

### 自己免疫性肝炎の臨床経過とサイトカインネットワーク

研究協力者 吉澤 要 信州大学医学部附属病院消化器内科 特任教授  
国立病院機構信州上田医療センター地域医療教育センター部長

**研究要旨：**自己免疫性肝炎（AIH）の病態として、多くのサイトカインの関与を（サイトカインネットワーク）昨年度報告した。今回、AIH治療の臨床経過におけるサイトカインの動向を経時的に解析し、病態との相関について検討した。治療介入によりIL-12p40、IP-10は速やかに低下、Th2系はいったん上昇し、低下を示した。劇症化例ではIFN- $\gamma$ は一時上昇後低下、感染を合併した2例では感染後IL-6、IL-10が上昇し、IL-12p40、IP-10は変化せず、その動向が異なることが判明した。サイトカインネットワークの解析により、重症化、劇症化の機序が解明され、新しい治療につながると考えられる。

#### 共同研究者

梅村 武司 信州大学医学部 消化器内科講師  
城下 智 信州大学医学部 消化器内科助教

#### A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）の発症・病態にサイトカインの関与が示唆されている。昨年度、AIH治療前および治療後寛解期におけるサイトカインを包括的に測定し、IL12p40やIP10、IL17がAIH活動期に高値であり寛解期には低下していることを報告した。今年度は、治療介入前および治療後の臨床経過中、経時的にサイトカイン・ケモカインの動向（サイトカインネットワーク）を解析し、AIHの病態との関係を明らかにすることを目的とした。特に、劇症化・重症化した症例の検討は、今後の治療法の開発に重要と考えられ、その病態をサイトカインネットワークの面から解析する。

#### B. 研究方法

ステロイド単独治療で完全寛解に至ったAIH12例を対象とした。AIH臨床経過中の数ポイントでLuminex サイトカインアッセイシステムにより9種類のサイトカイン・ケモカイン（IFN- $\gamma$ 、IP-10、IL-4、IL-5、IL-17、IL-23、IL-12p40、IL-6、IL-10）を同時に測定し解析した。倫理委員会にて承認された文章を示し、患者から文章にて同意を得た。サイトカインは少量の血清のみで測定できるため、ルーチンの採血の一部を用いた。そのため、患者への不利益、危険はないと判断した。

#### C. 研究結果

IL-12p40は治療前には高値で、ステロイド投与後速やかに低下することが判明した。また、IP-10も同様であった。IFN- $\gamma$ は測定感度以下が多く、IL-17は治療後低下傾向であった。IL-4、IL-5は治療後に上昇し、ゆるやかに低下した。なお、劇症化症例において、IL-12p40、IP-10は低下したが、IFN- $\gamma$ は一時上昇後低下していた。この症例は感染症で死亡したがIL-6、IL-10が感染後急上昇していた。寛解後結核で死亡し

た症例も同様なサイトカインの動向を示していた。

#### D. 考察

AIHの肝障害においてIL-12p40は重要な働きをしている。IL-12p40の作用としては制御性T細胞の抑制が報告されているが、十分解明されているとは言えない。AIHの病態におけるIL-12p40の役割を解明することが必要である。また、炎症性ケモカインIP-10も病態に重要な役割を演じている可能性が示唆された。炎症性ケモカインは肝細胞障害と関連している可能性がある。IFN- $\gamma$ など主要なTh1サイトカインは測定感度以下のものが多かったが、発症早期には上昇している可能性は否定できない。Th2系のサイトカインが治療直後に上昇することは、炎症の鎮静化に関連している可能性がある。また、AIHの病態と感染症におけるサイトカインの動向が異なることは興味深い。

#### E. 結論

AIHの病態と治療後の臨床経過にサイトカインネットワークが重要な役割を演じていることが示唆された。それぞれのサイトカインには多様な作用があり、また、相互作用（ネットワーク）も複雑であるが、包括的なサイトカインの経時的な変化を、劇症化例、治療遷延、無効例、再発予知も含めて検討することにより、AIHの病態が明らかとなり、新しい治療につながると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Umemura K, Joshita S, Ichijo T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Ota M. Human leukocyte antigen class II molecules confer both susceptibility and progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2012; 55: 506-511

- 2) Aiba Y, Nakamura M, Joshita S, Inamine T, Komori A, Yoshizawa K, Umemura T, Horie H, Migita K, Yatsuhashi H, Nakamuta M, Fukushima N, Saoshiro T, Hayashi S, Kouno H, Ota H, Muro T, Watanabe Y, Nakamura Y, Komeda T, Shimada M, Masaki N, Komatsu T, Yagura M, Sugi K, Koga M, Tsukamoto K, Tanaka E, Ishibashi H, The PBC Study Group in NHOSLJ. Genetic polymorphisms in CTLA4 and SLC4A2 are differentially associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. J Gastroenterol 2011; 46: 1203-1212.
- 3) Kamijo A, Yoshizawa K, Joshita S, Yoneda S, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Ota M, Tanaka E. Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients. Hepatol Res 2011; 41: 350-357
2. 学会発表
- 1) Joshita S, Umemura T, Nakamura M, Yoshizawa K, Ota M, Ishibashi H, Tanaka E. Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. APASL 2011 Singapore.
- 2) Joshita S, Ota M, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ichijo T, Tanaka E. Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. AASLD 2011 San Francisco
- 3) 吉澤要, 城下智, 梅村武司, 上條敦, 一條哲也, 松本晶博, 田中榮司 自己免疫性肝炎の病態とサイトカインネットワーク (ワークショップ) 第47回日本肝臓学会総会 東京
- 4) 阿部雅則, 眞柴寿枝, 銭谷幹男, 海老沼浩利, 広石和正, 吉澤要, 鈴木義之, 山本和秀, 大平弘正, 青柳豊, 松崎靖司, 森實敏夫, 恩地森一 自己免疫性肝炎の新しい病態への診療上の対応について (ワークショップ) 第47回日本肝臓学会総会 東京
- 5) 相葉佳洋, 稲嶺達夫, 城下智, 小森敦正, 右田清志, 八橋弘, 中牟田誠, 福島伸良, 竿代丈夫, 林茂樹, 渡部幸夫, 矢倉道泰, 高野弘嗣, 室豊吉, 太田肇, 島田昌明, 米田俊貴, 山下晴弘, 竹崎英一, 古賀満明, 小松達司, 小林正和, 杉和洋, 高橋正彦, 正木尚彦, 吉澤要, 塚元和弘, 石橋大海, 中村稔 日本人原発性胆汁性肝硬変における免疫関連分子の遺伝子多型の解析 (ワークショップ) 第47回日本肝臓学会総会 東京
- 6) 吉澤 要, 松本晶博, 一條哲也, 城下智, 木村岳史, 市川雪, 森田進, 上條敦, 小松通治, 梅村武司, 田中榮司, 阿部雅則, 恩地森一 長期経過からみた自己免疫性肝炎からの肝発癌 (ワークショップ) 第47回日本肝臓学会 静岡
- 7) 梅村武司, 城下 智, 吉澤 要 原発性胆汁性肝硬変における HLA の検討 (ワークショップ) 第15回日本肝臓学会大会 福岡
- 8) 城下 智, 山田 雪, 木村岳史, 森田 進, 小松通治, 梅村武司, 一條哲也, 松本晶博, 吉澤要, 田中榮司 人間ドック・健康診断を含む肝機能検査値異常と原発性胆汁性肝硬変の診断および病期・病態との関連 第52回日本人間ドック学会学術大会 大阪
- 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

### 自己免疫性肝炎における肝内遺伝子発現動態の検討

研究分担者 銭谷 幹男 東京慈恵会医科大学大学院 消化器内科 教授

**研究要旨：**ヒトの自己免疫性肝炎（AIH）発症時における肝内免疫動態を明らかにする目的で、副腎皮質ステロイド治療未施行の生検肝組織を用い、Expression microarrayによる肝内遺伝子発現プロファイル解析を行った。その結果、コントロールに用いた病理学的異常所見を示さない肝組織に比しAIHの肝内ではCXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3などのTh1細胞遊走に関わるケモカイン、ケモカイン受容体、IFN- $\gamma$ , T-betなどのTh1細胞が産生するサイトカイン、マスター転写因子の遺伝子発現増加が見られた。一方、CTLA-4, PD-1, Foxp3といった制御性T細胞（Treg）の機能発現に関わる分子、マスター転写因子の遺伝子発現増加も認めた。以上より、AIH発症時にはTh1反応増強がみられるとともに、Tregの増強もみられ、発症時の免疫病態形成に関わる可能性が示唆された。

#### 共同研究者

高橋 宏樹 東京慈恵会医科大学 内科学講座  
消化器・肝臓内科 講師  
佐伯 千里 東京慈恵会医科大学 内科学講座  
消化器・肝臓内科 助教

#### A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）の発症機序は明らかにされていない。本研究ではヒトAIHの発症に関わる発症初期における肝内免疫動態を明らかにする目的で、副腎皮質ステロイド治療未施行の生検肝組織を用い、肝内遺伝子発現プロファイル解析を行った。

#### B. 研究方法

対象は、診断が確定した副腎皮質ステロイド治療を施行していないAIH症例4例（男性1例：女性3例、平均年齢 $63.8 \pm 17.9$ 歳、ALT： $574 \pm 257$ IU/l、IgG： $1953 \pm 62$ mg/l、抗核抗体80倍3例・640倍1例、全例DR4陽性、AIHスコア平均18.7点）で、診断時に施行した生検肝組織切片を用いた。コントロールとして、他疾患（肝膿瘍2例、炎症性偽腫瘍1例、直腸癌1例、男性1例：女性3例、平均年齢 $63.8 \pm 20.5$ 歳）により肝切除術を施行した症例の正常部位の肝組織（いずれも病理学的異常所見がないことを確認済み）を用いた。コントロール群の肝組織採取時の肝機能はALT： $13.5 \pm 3.4$ IU/l、ALP： $281 \pm 85$ IU/lと基準値内にあった。

各肝組織切片からDNAを分離し、Expression microarrayを用いて肝内遺伝子発現プロファイル解析を行い、発現変動遺伝子群をGene Ontology解析により分類し、AIH肝内でコントロールに比し発現増強している遺伝子を明らかにした。

なお、本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会における審査の承認を受けて行った（受付番号23-0336494）。検体を提供していただく際に患者さんには主治医より、検体提供者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除に関して書面を用いて説明と理解（インフォームド

コンセント）を充分に行い、書面にて承諾を得ている。

#### C. 研究結果

(i) 肝内遺伝子発現プロファイルパターンは、AIHとコントロールで有意に異なっていた。

(ii) コントロールに比しAIH肝内で最も発現増強が強かった遺伝子はCXCL9（Fold change 39.27）で、CXCL9（同24.23）、CXCL11（同19.19）といったTh1細胞遊走に関わるケモカイン、ケモカイン受容体遺伝子の強い発現増強が認められた。またそれほど強くはないが、CXCR3（同4.54）、CCL5（同3.42）、CCR5（同2.66）などのTh1系ケモカイン、ケモカイン受容体遺伝子発現増強がみられた。またIFN  $\gamma$ （同5.51）、TNF  $\alpha$ （同2.65）などのTh1サイトカイン、Th1細胞のマスター転写因子T-bet（同2.18）遺伝子の発現増強もみられた。

(iii) AIH肝内ではCTLA-4（Fold change 11.66）、PD-1（同3.88）などの制御性T細胞（Treg）の機能発現に関与する分子、Tregのマスター転写因子Foxp3（同2.03）遺伝子の発現増強もみられた。

#### D. 考察

ヒトAIHの発症時の肝内遺伝子発現プロファイル解析により、発症時肝内ではTh1細胞遊走関連ケモカイン、ケモカイン受容体、Th1サイトカイン、Th1細胞分化マスター転写因子の遺伝子発現増強がみられ、Th1反応が増強していることが明らかとなった。

我々が昨年までに行った樹状細胞と高分化型肝癌細胞の融合細胞とIL-12投与により作製したマウスAIHモデルの肝内免疫動態の検討でも、発症時肝内ではCXCR3、CXCL9発現が遺伝子、タンパクレベルで増強していることを報告したが、今回の検討によりヒトでも発症時にはTh1免疫反応増強がみられることが示された。

一方、Th1反応抑制に関わるTreg機能発現に関わる分子、Treg分化のマスター転写因子の遺伝子発現増強もAIH発症時肝内でみられた。上述したマウスAIHモデルでは発症時に肝内Tregの増加がみられた



が、ヒトでも同様の現象がみられることが明らかになった。

以上よりヒト AIH 肝内ではマウスモデルでみられたのと同様に、Th1反応関連遺伝子、Treg 反応関連遺伝子の両方の発現増強がみられ、それら免疫応答がヒト AIH 発症に関与している可能性が示された。

#### E. 結 論

ヒト AIH の発症時肝内では Th1細胞遊走関連ケモカイン、ケモカイン受容体の遺伝子発現の強い増強がみられ、Th1転写因子、Th1サイトカインの遺伝子発現増強もみられたことから、Th1免疫応答の発症への強い関与が示唆された。一方で Treg 反応関連遺伝子の発現増強もみられ、Treg 応答も発症時に誘導される可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Zeniya M, Takahashi H : Characteristics of autoimmune hepatitis in the Asia-Pacific Region: historical review. Hepatol Int 6:342-349. 2012
- 2) Takahashi H, Zeniya M : Acute form of autoimmune hepatitis; Does it exist? A literature review. Hepatol Res 41:498-504. 2011
- 3) Zeniya M, Takahashi H : Diagnostic criteria for autoimmune hepatitis : Historical review and present problems. Jikeikai Medical Journal 58:89-93. 2011
- 4) 高橋宏樹 銭谷幹男 自己免疫性肝炎の診断におけるスコアリングシステムの位置付け 日消誌 108:1837-1844. 2011

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# 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

### 自己免疫性肝疾患における miRNA の検討

研究協力者 大平 弘正 福島県立医科大学消化器・リウマチ膠原病内科 教授

**研究要旨：**近年、microRNA (miRNA) は生体維持機能や種々の病態に関与することが報告されているが、自己免疫性肝疾患の領域では、その機能や病態との関連についてはほとんど不明である。今回、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者における miRNA の末梢血での発現について検討し、自己免疫性肝疾患における miRNA の意義について検討した。その結果、健常人と比較し各疾患で有意に増減している miRNA が認められ、AIH、PBC で有意に増減する miRNA を認めた。さらに miR-299-5p と miR-99a の発現においては、PBC と AIH は相反する増減を呈していた。これらの結果から miRNA の解析は自己免疫性肝疾患の病態解明に寄与する可能性が示唆された。

#### 共同研究者

高橋 敦史 福島県立医科大学  
消化器・リウマチ膠原病内科  
勝嶋 史子 福島県立医科大学  
消化器・リウマチ膠原病内科

miR299-5p の発現が減少した症例では IgG 値が有意に高値であった。

#### D. 考 察

今回の検討で PBC に有意に増加していた miR146a, miR132 について文献を検索してみると、RA でも同様の発現を示していることがわかった。これまでの種々の免疫学的な検討から、AIH と SLE、PBC と RA がそれぞれ類似した免疫病態を示していることが報告されているが、今回の miRNA 発現においても、同様の傾向を示すものがあることが明らかとなった。また、PBC と AIH における miRNA 発現において miR299-5p の発現が全く逆の増減を呈していたことから、疾患特異的な miRNA 発現パターンが自己免疫性肝疾患で認められる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

miRNA は細胞周期、分化、アポトーシス、発癌や免疫機能という様々な分野で重要な細胞機能に大きく影響を与えていることが明らかとなってきた。しかし、自己免疫性肝疾患における検討はほとんどなく、その役割や病態との関連は不明である。今回、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の疾患における miRNA の発現について検討し、その意義について検討した。

#### B. 研究方法

対象は AIH17例、PBC38例、AIH-PBC オーバーラップ6例、SLE23例と健常人20例である。方法は、はじめに末梢血単核球細胞から mirVanaTMmiRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて total RNA を分離した。次に TaqMan MicroRNA Assay, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems) を用いて miRNA を精製し、real-time RCR 法にて miR-26a, miR-328, miR-299-5p, miR-99a, miR-146a, miR-155, miR-16, miR-132 の発現を比較検討した。

なお、本研究は研究者の所属する福島県立医科大学倫理委員会の承認を得ている。

#### C. 研究結果

健常人と比較し AIH では miR 132 と miR 99a が増加し、miR299-5p が減少していた。PBC では miR 132 と miR 146a が増加していた。更に SLE では AIH と同様に miR99a の増加と miR299-5p の減少を認めた。他に miR16 も増加していた。特に miR299-5p の発現を比較すると、AIH、AIH-PBC オーバーラップ、SLE では有意に減少しているが、PBC では増加傾向であり、相反する発現を呈していた。また、AIH で

#### E. 結 論

自己免疫性肝疾患の病態は未だ不明なところが多く、miRNA の解析はその病態解明に大きく寄与する可能性があると思われた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

勝嶋史子, 物江恭子, 菅野有紀子, 齊藤広信, 阿部和道, 高橋敦史, 大平弘正. 自己免疫性肝疾患におけるマイクロ RNA の検討. 第15回日本肝臓大会

#### 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

### 自己免疫性肝炎の診断－慶應関連施設症例集積での検討

研究協力者 森實 敏夫 国際医療福祉大学塩谷病院 教授

研究要旨：慶應関連施設症例集積で検討した結果から、血清 ALT、ALP、AMA の3つの血液検査による多変量3因子モデルによる AIH の診断能は、国際自己免疫性肝炎グループの1999年度版スコアリングシステムとほぼ同等で、簡便で有用と考えられた。肝組織所見を含む多変量7因子モデルによる診断の正診率は有意に高かった。

#### 共同研究者

高橋 正彦 独立行政法人国立病院機構東京医療センター

海老沼浩利 慶應義塾大学医学部

日比 紀文 慶應義塾大学医学部

#### A. 研究目的

自己免疫性肝炎 (AIH) 診断における、International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) 1999年度版スコアリングシステム、同2008年度シンプル版、本研究班で昨年度まで発表してきた多変量モデルに基づく3因子、7因子診断法の診断能を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

慶應関連施設で AIH が疑われた症例において感度・特異度、正診率を解析する。対象は慶應関連施設でウイルス肝炎、アルコール性肝障害、胆石、腫瘍性肝疾患などの診断が確定した症例以外の肝障害の症例である。

診断のゴールドスタンダードは IAIHG1999年度版スコアリングシステムで確診、または疑診に相当する例で、ステロイド治療応答性の判定も含めた主治医の診断とした。

AIH 146例、AIH 疑診25例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 12例、AIH-PBC オーバーラップ症例18例、薬剤性肝障害などを含むその他の肝障害28例を対象とした。

AIH および AIH 疑診例計171例を AIH 群、その他の肝疾患68例を対照群として感度・特異度、正診率を求めた。

#### C. 研究結果

##### 慶應関連施設症例集積と全国調査例の比較

全国調査例<sup>1)</sup> と比べ、性別、年齢、AIH 家族内発症、プレドニゾン治療歴、治療効果に関して差は認められなかったが、他の自己免疫疾患の合併率は慶應関連施設症例の方が高かった (表1)。

表1. 慶應関連施設 AIH 症例集積の背景因子

	慶應 AIH	全国調査
症例数	171	1056
男性 / 女性	16/130 (1 : 8)	150/906 (1 : 6)
年齢 (平均 ± SD*)	524 ± 165	60.1 ± 165
AIH 家族内発症	3/69 (4.3%)	11/110 (1.0%)
自己免疫性疾患合併	60/141 (42.6%)	287/1037 (27.7%)
PSL 治療歴	118/146 (80.8%)	741/995 (74.5%)
PSL 著効例	74/91 (81.3%)	694/741 (93.7%)

\*SD Standard deviation.

また、初診時の臨床検査成績では、血清 ALT、ALP、IgG、ANA、M2抗体には差を認めなかったが、DR4陽性例の割合は慶應関連施設症例の方が高かった (表2)。

表2. 慶應関連施設 AIH 症例集積の臨床検査成績

	慶應 AIH	全国調査
ALT (平均 ± SD*)	471.0 ± 537.6	368.0 ± 432.5
ALP	464.6 ± 289.7	481.1 ± 323.1
IgG	2478.6 ± 939.8	2399.8 ± 1015.1
ANA 陽性率	115/122 (94.3%)	886/994 (89.1%)
M2抗体	8/55 (14.5%)	112/569 (19.7%)
HLA DR4	31/56 (56%)	22/219 (10%)

\*SD Standard deviation.

上記以外の項目では差が無く、慶應関連施設症例はわが国の AIH をほぼ代表していると考えられた。

##### 各診断法の診断能

慶應関連施設症例に IAIHG1999年度版、シンプル版、多変量3因子モデル、7因子モデルを適用した場合、感度は IAIHG1999年度版で77.4% に対して、多変量7因子モデルは90.5% と有意に後者が優れていた (P=0.02759)。また、正診率も前者で71.1% に対して後者は84.3% と有意に後者が優れていた (P=0.042) (表3)。これら以外の指標は4つの診断法の間で差は認められなかった。

表3. 各診断法の診断能

	IAIHG 1999年度版	IAIHG シンプル版	多変量 3因子モデル	多変量 7因子モデル
感 度	113/146 (77.40%)	85/134 (63.40%)	105/128 (82.00%)	67/74 (90.50%)
特異度	26/58 (44.80%)	34/56 (60.70%)	24/48 (50.00%)	7/15 (46.70%)
正診率	145/204 (71.10%)	107/190 (56.30%)	129/176 (73.30%)	75/89 (84.30%)

#### D. 考 察

平成22年度本班会議研究報告書で述べたように、血清 ALP, ALT, 抗ミトコンドリア抗体 (AMA) の 3 因子モデルで, AIH, PBC, C 型慢性肝炎の鑑別が可能である。今回の研究でも, 3 因子モデルが一般的な臨床状況で AIH の診断に十分適用可能であることが示された。

今回の検討では, 表3の解説に示すような多項式に基づいて AIH の疾患確率を計算したが, 表3に示すスコアを加算し, 3 以上を AIH としても同じ結果が得られる。

表3. 3 因子スコア加算モデル

項目	値	スコア*
1. ALP/ 基準値上限	<13	+1
	≥13	0
2. ALT	≥120	+2
	<120	0
3. AMA	<20倍	+2
	≥20倍	0

\*多変量ロジスティック回帰モデルの, 項目1, 2, 3に対する係数は  $b_1=1.20213582$ ,  $b_2=1.83947487$ ,  $b_3=1.72945375$  である。  $Y = -0.5839365 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$  の多項式にそれぞれの症例の値に基づき, 上の値の場合には+1, 下の値の場合には-1を x に代入して Y を算出し,  $P(\text{AIH}) = 1 / [1 + \exp(-Y)]$  で疾患確率を算出し, 0.5以上の場合 AIH と診断する。

なお R-square=0.61 である。

今回, ウイルス肝炎, アルコール性肝障害, 胆石, 腫瘍性肝疾患などが除外された場合, ALT, ALP, AMA の値に基づいて, AIH かどうかを診断することは簡便な方法であり, なおかつ, 十分な診断能を有することを示した。

#### E. 結 論

血清 ALT, ALP, AMA の3つの血液検査による多変量3因子モデルによる AIH の診断は簡便で有用と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

- 論文発表  
なし

- 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- その他 なし

#### 文献

- Present status of autoimmune hepatitis in Japan: a nationwide survey. J Gastroenterol 2011 Sep;46 (9) :1136-1141. Epub 2011 May 20.