

受性遺伝子に人種差のあることが示された。一方、上皮細胞の増殖、小胞体ストレス、アポトーシスに関連する17q12-21領域 (IKZF3-ZBP2-GSDMB-ORMDL3) は、日本人でも疾患感受性遺伝子であることが確認された。さらには、胆汁酸代謝に関連したOCT1の遺伝子多型が黄疸進行に関連することが示され、PBCの疾患発症、進行には様々な異なった遺伝的素因が関与していることが明らかとなった。

E. 結 論

抗gp210抗体、抗セントロメア抗体の測定に加えて、免疫関連分子や胆汁酸代謝、上皮細胞の増殖、小胞体ストレス、アポトーシスなどに関連した遺伝子多型を調べることにより、より詳細なPBCの病型分類や予後予測が可能になるものと思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aiba Y, Nakamura M, Joshita S, Inamime T, Komori A, Yoshizawa K, Umemura T, Horie H, Migita K, Yatsunami H, Nakamura 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; PBC Study Group in NHOSLJ. Genetic polymorphisms of CTLA4 and SLC4A2 are differently associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2011;46:1203-12.
- 2) Inamine T, Nakamura M, Kawauchi A, Shirakawa Y, Hashiguchi H, Aiba Y, Taketomi A, Shirabe K, Nakamura M, Hayashi S, Saoshiro T, Komori A, Yatsunami H, Kondo S, Omagari K, Maehara Y, Ishibashi H, Tsukamoto K; PBC Study Group in NHOSLJ. A polymorphism in the integrin α V subunit gene affects the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2011;46:676-86.
- 3) 小森敦正, 中村 稔, 石橋大海. 自己免疫性胆管疾患の病態形成への自然免疫の関与. *肝胆膵* Vol.62, No4:639-643, 2011.
- 4) 中村 稔, 相葉佳洋, 小森敦正, 下田慎治, 石橋大海. PBCの予後予測: 自己抗体を基盤に. *肝胆膵* Vol.62, No4:707-714, 2011.
- 5) 石橋大海, 下田慎治, 小森敦正, 中村 稔. PBCの病態の多様性と治療ガイドライン. *肝胆膵* Vol.62, No4:715-722, 2011.
- 6) 中村 稔, 石橋大海, 安波道郎. PBCに關与するHLA 個体差. *肝胆膵* Vol.62, No5:945-952,

2011.

- 7) 中村 稔, 相葉佳洋. 核膜孔複合体タンパク質Gp210. *生体の科学* 62 (5) :386-387, 2011.
- 8) 中村 稔, 石橋大海. 遺伝子多型は自己免疫性肝胆道疾患の病態にせまれるか. *分子消化器病 (先端医学社)* Vol.8, No3, p205-211, 2011.
- 9) 石橋大海, 小森敦正, 下田慎治, 中村 稔. 原発性胆汁性肝硬変 治療と予後. *臨床消化器内科* Vol.26, No11, p1517-1524, 2011.

2. 学会発表

- 1) 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, 福嶋伸良, 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. 第47回日本肝臓学会総会. 東京, 2011.6.2-3. *肝臓*52巻 2011, suppl. (1), WS11-9.
- 2) 中村 稔, 伊東正博, 山本和秀, 大平弘正, 錢谷幹男, 田中 篤, 橋本悦子, 本多政夫, 金子周一, 上野義之, 菊池健太郎, 下田慎治, 小森敦正, 原田憲一, 向坂彰太郎, 滝川 一, 恩地森一, 西原利治, 大西三朗, 坪内博仁, 中沼安二, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の自己抗体, 病理学的スコア, 治療反応性と予後の相関解析. 第47回日本肝臓学会総会. 東京, 2011.6.2-3. *肝臓*52巻 2011, suppl. (1), WS11-12.
- 3) 相葉佳洋, 小森敦正, 右田清志, 八橋 弘, 石橋大海, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変におけるIL12A, IL12RB2, IRF5, 染色体17q12-21領域の遺伝子多型の解析. 第48回日本消化器免疫学会総会. 金沢, 2011.7.21-22. *肝胆膵*1-11.
- 4) 大石裕樹, 石川奈緒子, 石橋 誠, 福嶋伸良, 中牟田誠, 相葉佳洋, 小森敦正, 石橋大海, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変のOCT-1遺伝子の多型解析. 第20回西日本臨床胆汁酸研究会. 大阪, 2011.7.23. Session II -5
- 5) 相葉佳洋, 城下 智, 吉澤 要, 梅村武司, 小森敦正, 右田清志, 八橋 弘, 石橋大海, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変におけるCTLA4, IL12A, IL12RB2, IRF5, 染色体17q12-21領域の遺伝子多型の解析. 第39回日本臨床免疫学会総会. 東京, 2011.9.15-17. *日本臨床免疫学会会誌* Vol.34 No4, W2-6.
- 6) 下田慎治, 中村 稔, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における病因病態の解析. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡, 2011.10.20-21. *肝臓*52巻 2011, suppl. (2), 肝S12-1
- 7) 福嶋伸良, 中村 稔, 福泉 公仁隆, 吉本剛志, 國府島 庸之, 後藤 和人, 河邊 顕, 水谷 孝弘, 小森敦正, 原田直彦, 中牟田誠, 石橋大海, 佐田通夫. 原発性胆汁性肝硬変において抗 gp210

抗体および抗セントロメア抗体は薬物治療効果の予測因子となり得るか. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡, 2011.10.20-21. 肝臓52巻 2011, suppl.(2), 肝 P-215

- 8) Nakamura M, Ito M, Yamamoto K, Zeniya M, Ohira H, Hashimoto E, Honda M, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Onji M, Shimoda S, Takikawa H, Tanaka A, Komori A, Yatsuhashi H, Kondo H, Harada K, Onishi S, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. Positive anti-gp210 antibodies is a risk factor for poor biochemical response to ursodeoxycholic acid treatment in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. EASL The International Liver Congress 2011, April 2, Berlin, Germany. Abstract #1307.
- 9) Nakamura M, Ito M, Kondo H, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Tanaka A, Hashimoto E, Honda M, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Komori A, Harada K, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Onishi S, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. Positive anti-gp210 antibodies is a significant risk factor for bile duct loss, hepatitis and poor biochemical response to ursodeoxycholic acid treatment that lead to more severe progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. AASLD 2011 November 8, San Francisco, USA. Abstract #1798.
- 10) Ohishi Y, Kohjima M, Fukushima N, Yoshimoto T, Fukuizumi K, Yada M, Ishibashi H, Nakamura M, Enjoji M, Nakamura M. Single-nucleotide polymorphism analysis of the organic cation transporter 1 gene for the detection of onset and clinical progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. AASLD 2011 November 8, San Francisco, USA. Abstract #1779.

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

I. 国立病院機構肝疾患共同研究班（NHOSLJ）PBC 共同研究参加施設（31施設）

旭川医療センター, 北海道医療センター, 仙台医療センター, 東京病院, 東京医療センター, 災害医療センター, 西埼玉中央病院, 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, 信州上田医療センター, 高崎総合医療センター, 西群馬病院, 金沢医療センター, 名古屋医療センター, 東名古屋病院, 京都医療センター, 大阪医療センター, 南和歌山医療センター, 岡山医療センター, 米子医療センター, 呉医療センター, 東広島医療センター, 小倉医療センター,

九州医療センター, 大分医療センター, 別府医療センター, 嬉野医療センター, 熊本医療センター, 国立国際医療研究センター戸山病院, 長崎医療センター

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における自己抗原特異的T細胞の分子機構の検討

研究協力者 滝川 一 帝京大学医学部内科 主任教授

研究要旨：PBCにおける疾患感受性遺伝子として数多くの遺伝子が報告されているが、病態との関連が明確に解析されているものはまだ存在しない。今回われわれは、PBC患者から樹立された、PBCにおける代表的自己抗原であるPDC-E2特異的T細胞クローンをを用いたマイクロアレイ解析によって、自己抗原応答性T細胞における責任遺伝子を同定することを目的として実験を行った。側副刺激なしで自己抗原に応答し増殖するT細胞では数多くの転写因子が変動しており、これらの多くを制御している可能性のある転写因子としてCEBPA, CEBPB, MEIS1, TGIF1が同定され、これらの転写因子をさらに上流で制御している遺伝子の候補として、ADAM10とPTPN2が得られた。PTPN2はPBCでは報告されていないものの、他の自己免疫疾患ではGWASにより疾患感受性遺伝子として同定されており、本研究によりPTPN2が自己応答性T細胞の責任遺伝子である可能性が示唆された。

共同研究者

田中 篤 帝京大学医学部内科
下田 慎治 九州大学大学院医学系研究院病態修復内科学

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。われわれは昨年度までPBCの遺伝的素因についての検討を続けており、いくつかの遺伝子が日本人PBC患者の発症に関連している可能性を報告してきた。しかし、その遺伝子が実際にどのようにして発症に関与しているかについてはいまだ明らかになっていない。

共同研究者の下田らは、かねてよりPBC患者の末梢血および肝浸潤単核球から、PBCの自己抗原であるPDC-E2特異的CD4陽性T細胞クローンを樹立し、その解析を続けてきた。このT細胞クローンは健常人の末梢血からも樹立できるが、興味深いことに健常人末梢血から樹立されたT細胞クローンは、抗原提示細胞から提供される側副刺激がないとアナジーに陥る（側副刺激依存性）が、PBC患者末梢血から樹立されたT細胞クローンは側副刺激がなくとも増殖する（側副刺激非依存性）という特徴がある。

今回われわれは、この側副刺激に対する依存・非依存が、GWASによって同定された遺伝子によって決定されているという仮説を立て、それぞれのT細胞クローンのマイクロアレイ解析を通して分子機構の解析を行った。

B. 研究方法

下田によって樹立されたT細胞クローンから、抗原なし、大腸菌OGDCによる抗原刺激、ヒトPDC-E2による抗原刺激の3種、および抗原提示細胞を側副刺激を有するヒトPBMC、側副刺激を有さないマウス

L-DR53細胞の2種、計6種を作成した（それぞれ2-1~2-6）。これらの細胞増殖の状態を図に示す。また、抗原提示細胞をL-DR53、抗原を大腸菌OGDCとしてアナジーの状態とした2-5を、さらに再度ヒトPBMCを抗原提示細胞として大腸菌抗原で刺激して細胞増殖能を復活させ、これを2-7とした。この7種のクローンそれぞれからtotal RNAを抽出し、これをラベリングした後Agilent社のWhole Human GenomeオリゴDNAマイクロアレイ（4x44K）v2にハイブリダイゼーションさせ、マイクロアレイ解析を行った。

C. 研究結果

restingの状態である2-1と2-2および2-3、さらに2-4と2-5および2-6との間で遺伝子発現を比較した。2倍以上の変化があったものを拾い上げたところ、おのおの間で700~1300程度の遺伝子が見いだされた。DAVIDを用いたGene Ontology解析を行ったところ、2-2と2-3では細胞増殖がみられたことを反映して、2-1と2-2、2-1と2-3では細胞増殖・DNA合成に関連した遺伝子が大きく変動していた。また、2-5はアナジーに陥っていたことを反映し、2-4と2-5の比較では主にアポトーシス関連の遺伝子が増殖していた。一方、2-4と側副刺激なしで増殖した2-6との比較では、主に変動していたのはホメオボックスなどに関連した数多くの転写因子であり、2-6の細胞では、側副刺激を伴った通常の細胞増殖では変化しない多くの転写因子の発現量の変化を伴っていることが明らかとなった。さらに、アナジーとなった2-5を再度増殖させた2-7と2-4とを比較したところ、やはり2-4と2-6と同様、数多くの転写因子が増殖していた。

次に、これら変動している転写因子をその上流で制御している可能性のある分子を見出すため、BIOBASE社によって提供されているExPlainという遺伝子・タンパク質発現プロファイル解釈用ソフトウェア（<http://www.biobase.co.jp/explain/index>）

htm#purpose) を利用した。その結果、これらの転写因子の多くを制御している可能性のある転写因子として CEBPA, CEBPB, MEIS1, TGIF1 が同定され、これらの転写因子をさらに上流で制御している遺伝子の候補として、ADAM10 と PTPN2 が得られた。

	1st signal (TCR)	2nd signal (costimulatory)	細胞増殖
2-1(⑦)	なし	あり	なし
2-2(⑧)	大腸菌OGDC	あり	あり
2-3(⑨)	ヒトPDC	あり	あり
2-4(⑩)	なし	なし	なし
2-5(⑪)	大腸菌OGDC	なし	なし
2-6(⑫)	ヒトPDC	なし	あり

図 本実験に用いた各クローンの抗原刺激、及び細胞増殖の状況

D. 考 察

今回の検討により、側副刺激なしで増殖する PBC 患者由来の T 細胞クローンでは数多くの転写因子が変動しており、それらを制御している可能性のある分子として ADAM10 と PTPN2 が同定された。このうち PTPN2 は、PBC における GWAS では疾患感受性遺伝子として報告されてはいないものの、1 型糖尿病、関節リウマチ、クローン病などの他の自己免疫疾患においては GWAS の結果それぞれの疾患感受性遺伝子として報告されている。本研究の結果は、PBC をはじめとする自己免疫疾患における自己応答性 T 細胞における異常の原因が PTPN2 である可能性を示唆するものとして、興味深い。今後本研究に用いた T 細胞クローンにおける PTPN2 の変動や変異、さらに下流の各転写因子の発現レベルなどを解析していく予定である。

E. 結 論

PBC 患者における自己抗原特異的 T 細胞クローンのマイクロアレイ解析により、ADAM10 および PTPN2 が側副刺激なしで増殖する自己応答の原因遺伝子である可能性が示された。

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

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

いわゆる PBC+AIH overlap 症例の臨床的位置づけ—10年以上の観察例から—

研究協力者 宮川 浩 帝京大学溝口病院第四内科 非常勤講師

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自己免疫性肝炎（AIH）の overlap 例の概念，定義は未だ統一されてはいないが，両者の病像を併せ持った非定型例が存在することは確実である。今回，10年以上の長期観察例を対象に，とくに本疾患の臨床的位置づけを考察した。対象は6例（女性5例，男性1例，初診時平均年齢53歳）で，経過から，同時性2例，AIH先行3例，PBC先行1例であった。AMAは最終的に全例に検出されたが，ANA陰性の1例ではASMAが高力価陽性で，他にLKM-1抗体が1例検出された。全例にprednisoloneが投与され，生化学検査や病理像で activity の高い例ではAZPの併用を行ったが，ALTの持続正常化例は半数に過ぎなかった。肝炎の活動性の強い例では通常のAIHと同様にPSL治療に加え，AZPの併用治療が必要であったことから，本疾患は臨床的にAIHのsubtypeとして位置づけて対応することが妥当と考えられた。

共同研究者

菊池健太郎 同准教授

田中 篤 帝京大内科准教授

A. 研究目的

自己免疫性肝炎のうち，原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自己免疫性肝炎（AIH）の overlap 例の概念，定義は未だ統一されてはいない。しかし両者の病像を併せ持った非定型例が存在することは確実である。昨年度の本研究班では，Tanaka, Takikawaらが同時発症例の調査を発表している¹⁾。今回，10年以上の長期観察例を対象に，とくに本疾患の臨床的位置づけを考察した。

B. 研究方法

10年以上観察しPBC/AIH overlapと考えられる6例（女性5例，男性1例，初診時平均年齢53歳）を対象とし，生化学検査の他，各種自己抗体，免疫グロブリンなどの推移と，治療への反応性を評価した。

C. 研究結果

- 1) 経過から病型分類すると，同時性2例，PBC先行1例，AIH先行3例であった。合併症として，成人Still病，橋本病を1例ずつ認めた。
- 2) 経過中の主な生化学検査の最高値は，T-Bil: 1-25 mg/dl, AST: 79-900 I/l, ALT: 79-1225 U/l, AL-P: 381-796 U/l, g-GTP: 123-817 U/lと症例毎に大きな幅があった。
- 3) 自己抗体は，ANAは5例に検出され，陰性の1例はASMA高力価で検出された。LKM-1抗体はANA陽性の1例に併存した。AMAは最終的に全例検出され，AIH先行の3例では陰性期から徐々にAMA力価の上昇が観察された。gp-210抗体は3例，sp-100抗体は1例に検出されたが，SLA/LP抗体やLC1抗体は検出されなかった。なお，Ro52抗体が6例中5例と高率に検出された。
- 4) 経過中の免疫グロブリンの最高値は，IgG: 2.040-

5,117 mg/dl, IgM: 265-1,386 mg/dlと症例毎に大きな幅があった。

5) 肝組織では全例 interface hepatitisを認めたが，検査時期によってその程度は相違した。

6) 6例全例にプレドニゾロン（PSL）が投与され，うち3例ではアザチオプリン（AZP）も併用されたが，ALTの持続正常化例は半数に過ぎなかった。以上の主なデータを表1にまとめた。

D. 考 察

PBCとAIHの両方の特徴を併せ持つ病態の存在は1970年頃から報告されていた。Paris criteriaをはじめ，定義や診断基準などが提唱されている²⁾。しかし，生化学検査値（AL-P, g-GTPやALT値）は必ずしも最高値が記録されているとは限らず，肝生検の病理所見は施行時期によっても差があることが想定され，診断基準は未だ統一されたものはない。2010年，IAIHGは，この病態自体が存在しないという position statementを発表した。

しかしながら，PBC/AIH overlapと考えられる症例は臨床の場では確実に存在する。少なくとも，PBCであることが確実に診断された場合，肝炎の活動性の評価を行ってAIHのoverlapの可能性を考慮することになる。自己抗体についても特異的なものは報告されていない。したがって，本病態の診断的な位置づけはともかく，臨床的—すなわち治療をどうするか，という問題は極めて重要と考えられる³⁾。

今回の長期観察例では，とくにALTの変動例が際立っていた。すなわち，本病態の治療対象の主体はAIH活動性の持続鎮静化が，予後改善に第一であると思われた。従って，本疾患の概念は，短期観察のみでなく長期経過観察例も対象に論ずる必要がある。

いわゆるPBC/AIH overlapの病態は，今回示したように，生化学・免疫検査の結果からもheterogeneityがあるが，肝炎の活動性の強い例では通常のAIHと同様にPSL治療に加え，AZPの併用治療が必要であった。

以上のことから、本疾患は臨床的に AIH の subtype として位置づけて対応することが妥当と考えられた。今後、かかる病態の長期観察例をさらに集積し、とくに治療効果を詳細に検討することが重要な課題と考えられる。

文献

1) Tanaka A, Harada K, Ebinuma H, et al : Primary biliary cirrhosis - Autoimmune hepatitis overlap syndrome : A rationale for corticosteroids use based on a nation-wide retrospective study in Japan. Hepatol Res 41 ; 877—86, : 2011
 2) Chazouillères O, Wendum D, Serfaty L, et al : Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome : clinical features and response to therapy. Hepatology 28 ; 296—301, :1998
 3) 田中 篤：原発性胆汁性肝硬変とのオーバーラップ 日消誌 108:1845-51, 2011

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 作成中
2. 学会発表 第48回日本肝臓学会総会に発表予定

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

表1 PBC/AIH overlap症例のまとめ

症例	観察 期間(y)	先行 病変	ANA (IF)	ASMA (IF)	aLKM-1	AMA			
						IF	ELISA	IB	
1	66, F	15	同時	640(sp, Dis)	(-)	(+)	320	186	(+)
2	63, F	10	同時	160(sp)	80	(-)	320	143	(+)
3	68, F	14	PBC	(-)→320(Ho)	(-)	(-)	320	79.7	(+)
4	36, F	14	AIH	640	(-)	(-)	(-) →20	(-) → 15.5	(+)
5	49, F	10	AIH	320/1280(Ho/sp)	80	(-)	(-) →20	(-) → 58	(+)
6	37, M	23	AIH	(-)	640	(-)	(-) →20	(-) → 98	(+)

症例	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	T-Bil (mg/dl)	ALT (IU)	Al-P (IU)	治療薬剤	反応性
1	2,040	1,384	6.6	548	523	UDCA+PSL	△
2	2,353	478	1.0	39	462	UDCA+PSL	○
3	2,498	915	1.5	333	589	UDCA+PSL	○
4	4,235	419	1.4	172	381	UDCA+PSL+AZP	△
5	5,117	720	24.9	549	445	UDCA+PSL+AZP	○
6	2,889	265	21.3	1225	796	UDCA+PSL+AZP	△

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の胆管病変におけるミトコンドリア蛋白の発現

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）の障害胆管細胞には細胞老化と老化に先行したオートファジー異常が認められる。オートファジーの代表的標的はミトコンドリアであることから、今回、PBCの胆管病変におけるミトコンドリア蛋白の発現とオートファジーの関連を検討した。PBCの肝内小型胆管では、対照肝と比較して有意に高率に、胆管炎部を中心に細胞質内に粗顆粒状のミトコンドリア蛋白発現を認めた（ $p < 0.01$ ）。細胞内のミトコンドリア蛋白は、オートファジーマーカー LC3と共発現を示す傾向にあった。PBCの胆管病変におけるミトコンドリア蛋白のオートファジーは自己免疫性病態形成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

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は血清抗ミトコンドリア抗体（AMA）陽性を特徴とするが、胆管病変の発生機序における AMA の意義は十分解明されていない。私どもは PBC の障害胆管細胞は細胞老化を示すこと、細胞老化に先行してオートファジー異常がみられることを報告してきた（Hepatology 2008, Lab Invest 2010, Liv Int 2010）。ミトコンドリアはオートファジーの代表的な標的小器官のひとつである。そこで今回、オートファジーとミトコンドリアの関連に着目して、PBC と対照肝疾患におけるミトコンドリア蛋白発現と胆管病変の関連を検討した。

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（ $n=77$ ）の外科的生検、切除肝におけるミトコンドリア蛋白 cytochrome c oxidase, subunit I (CCO), E2 component of pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2) の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに 2 重蛍光免疫染色にて CCO, PDC-E2 発現とオートファジーマーカー LC3, ライソゾームマーカー LAMP1, オートファジー異常マーカー p62 との発現局在の比較検討を行った。
- 2) 培養胆管細胞を用いた検討：エトポシド添加（ $100 \mu\text{M}$ ）による DNA 傷害、血清除去により、培養胆管細胞にオートファジーを誘導した。ミトコンドリア蛋白 CCO, PDC-E2 とオートファジー関連分子の局在を 2 重蛍光免疫染色にて検討した。

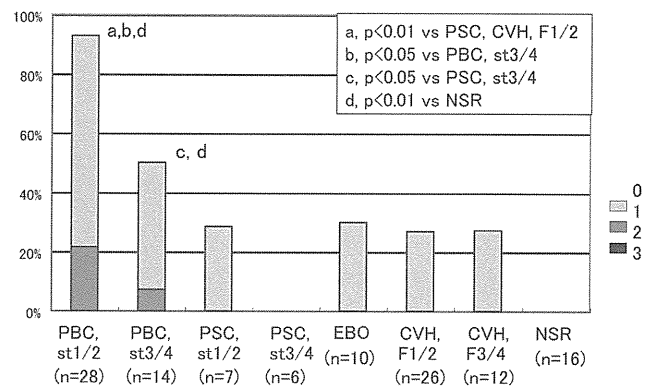
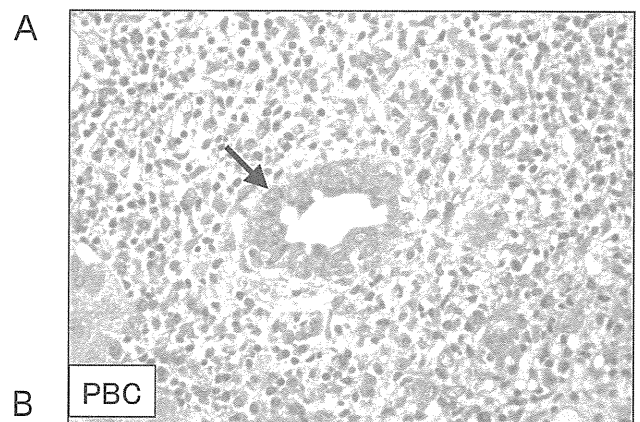
C. 研究結果

- 1) 病理組織学的検討：PBC の肝内小型胆管では、胆管炎部を中心に、細胞質内に粗顆粒状の強い PDC-E2 発現を認めた（図 1）。細胞によって不均一に強弱を示す PDC-E2 発現亢進もみられた。半定量的評価を行い疾患間で比較すると、PBC の小型胆管における粗顆粒状の PDC-E2 発現は、PSC, CVH, 正常肝に比較して有意に高率であった（ $p < 0.01$ ）（図

1）。CCO も同様に、PBC の肝内小型胆管の胆管炎部を中心に、細胞質内に粗顆粒状の強い発現を示し、疾患肝より有意に高率であった。

2 重免疫染色では、PBC 小型胆管での粗顆粒状 CCO 発現、PDC-E2 発現は、オートファジーマーカー LC3 と共発現を示した。また、一部ではライソゾームマーカー LAMP1 との共局在も認めた。オートファジー異常マーカー p62 と CCO, PDC-E2 の細胞内での局在は異なっていた。

図1 PBC 胆管における粗顆粒状ミトコンドリア蛋白発現



2) 培養胆管細胞を用いた検討

2重免疫染色では、オートファジーを誘導した培養胆管細胞では、顆粒状のLC3発現が亢進した。ミトコンドリア蛋白PDC-E2, CCOの発現もやや顆粒状となり、ミトコンドリア蛋白とLC3の共発現を認めた。ミトコンドリアのオートファジーを示唆する所見と考えられた。

D. 考 察

今回の検討より、PBCの胆管病変部の胆管細胞では、ミトコンドリア蛋白を含むオートファゴソームが増加していることが示唆された。興味深いことに、以前より電顕所見上、PBCの胆管病変では細胞質内にオートファゴソームの増加がみられることが報告されている。PBC胆管の電顕所見で初期段階オートファゴソーム内のミトコンドリアを直接とらえた報告はない。しかし、今回の検討結果では、この増加したオートファゴソーム内のミトコンドリア蛋白局在、すなわちミトコンドリアのオートファジーが示唆される。さらに今回の検討では、オートファジーを誘導した培養胆管細胞にミトコンドリアのオートファジーを認め、PBC胆管と同様の所見であった。

最近、オートファジーはMHCクラスI, MHCクラスIIを介した自己抗原の呈示にも重要な役割を持つことが知られている。PBCの病変部胆管におけるMHCクラスII (HLA-DR) 発現の亢進は以前より報告されている。今回の検討結果は、PBCの小型胆管におけるオートファジーはミトコンドリア抗原の呈示を介して自己免疫性病態形成に寄与する可能性を示唆しており、今後より詳細な検討を行う予定である。さらに、胆管病変で生じているオートファジー異常を制御することで、ミトコンドリア蛋白の異常表出を含めたPBCの病態機序の制御が可能になり、PBCの発生、進展を抑制しうるかも知れない。

E. 結 論

PBCでは、胆管病変を中心にミトコンドリア蛋白の発現亢進を認め、オートファジー異常との関連も含め、病態形成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, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2012 32:487-99.
- 2) Sasaki M, Nakanuma Y. Novel approach to bile duct damage in primary biliary cirrhosis: participation of cellular senescence and autophagy. *Int J Hepatol.* 2012;2012:452143.

3) Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Autophagy May Precede Cellular Senescence of Bile Ductular Cells in Ductular Reaction in Primary Biliary Cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2011 Oct 12. [Epub ahead of print]

4) Chiba M, Sasaki M, Kitamura S, Ikeda H, Sato Y, Nakanuma Y. Participation of bile ductular cells in the pathological progression of non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Pathol.* 2011 64:564-70.

2. 学会発表

1) 佐々木素子 中沼安二 パネルディスカッション
2) 自己免疫性肝疾患の病態と治療：原発性胆汁性肝硬変の胆管病変における senescence-associated secretory phenotypes (SASP) の関与 第39回肝臓学会西部会 岡山, 2011年

2) Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Increased expression of mitochondrial proteins associated with autophagy in the biliary epithelial lesions in primary biliary cirrhosis. 62th Annual Meeting of the AASLD, San Francisco 2011

3) 佐々木素子 宮腰菜沙美 佐藤保則 中沼安二 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変におけるミトコンドリア蛋白の発現 第48回消化器免疫学会 金沢 2011

4) 佐々木素子 中沼安二 自己免疫性肝疾患 upgrade: 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 第47回肝臓学会総会

5) 向宗徳, 佐々木素子, 佐藤保則, 北村星子, 中沼安二 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の新しい組織学的病期分類および活動度分類と細胆管反応との関連について 第100回病理学会総会 東京 2011

6) 宮腰菜沙美, 佐々木素子, 佐藤保則, 中沼安二 老化胆管細胞の細胞死 オートファジー, アポトーシスの関与を中心に 第100回病理学会総会 東京 2011

7) 佐々木素子 宮腰菜沙美 佐藤保則 中沼安二 原発性胆汁性肝硬変の細胆管反応におけるオートファジーの関与 第100回病理学会総会 東京 2011

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 での胆管破壊機序の解明

研究協力者 下田 慎治 九州大学病態修復内科学 診療講師

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変では肝臓内小型胆管の慢性非化膿性破壊性胆管炎を病変の首座とする。今回我々は、Toll like receptor (TLR) 3リガンドで刺激された単球が産生するIFN-aと、TLR4リガンドからの刺激とが相俟ってNK細胞が活性化され、自己胆管細胞を破壊することを見出した。今回の知見は病態の初期を模倣していることが予想され、今後これらの自然免疫系の異常がいかんして臓器特異的自己免疫疾患へと進行していくのかを解明するための道具が用意されたものと考えられる。

A. 研究目的

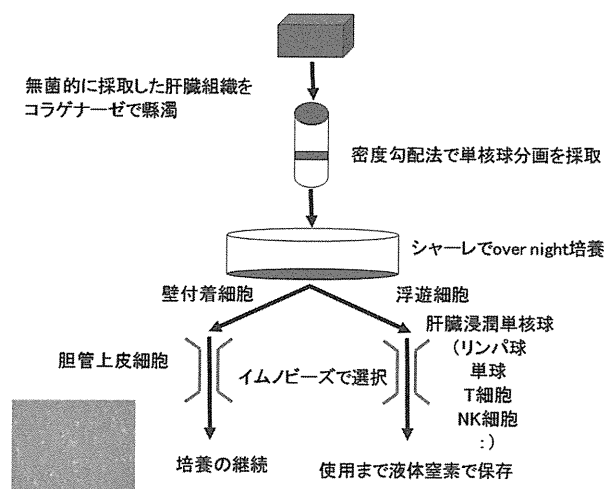
我々はこれまでに、生体肝移植症例の摘出肝臓より、無菌的に胆管上皮細胞、肝臓浸潤単核球を分離することに成功している。

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、昨年度までの研究で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。その結果、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単核球の中でNK細胞が発症に関与していることが示唆された。

そこで本年度は、TLR3リガンド、TLR4リガンド刺激と単核球、NK細胞の関係を詳細に検討し、NK細胞が自己胆管傷害を起こす機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

昨年度までの報告と同様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(図参照)。

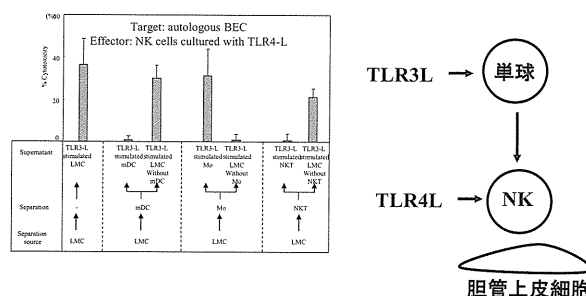


Over night incubate で壁附着細胞と非附着細胞に分離して、非附着細胞は一旦液体窒素で凍結保存した。壁附着細胞はEpCAM陽性細胞を免疫ビーズでpositive selectionし、胆管上皮細胞とし継代培養を行った。液体窒素で保存していた肝臓浸潤単核球を

解凍し、肝臓浸潤単核球をToll like receptor (TLR) リガンド3 (TLR3リガンド) とTLR4リガンド刺激後NK細胞を免疫ビーズで選択し、自己の胆管上皮細胞攻撃を51 Cr release assayで観察した。次に単核球とNK細胞に、TLR3リガンド刺激とTLR4リガンド刺激をそれぞれわけて入れることで、NK細胞が自己の胆管上皮細胞を攻撃する条件を検討した。次にTLR3リガンド刺激を入れた単核球が産生するサイトカインを検討し、詳細にNK細胞が自己の胆管上皮細胞を攻撃する条件を検討した。

C. 研究結果

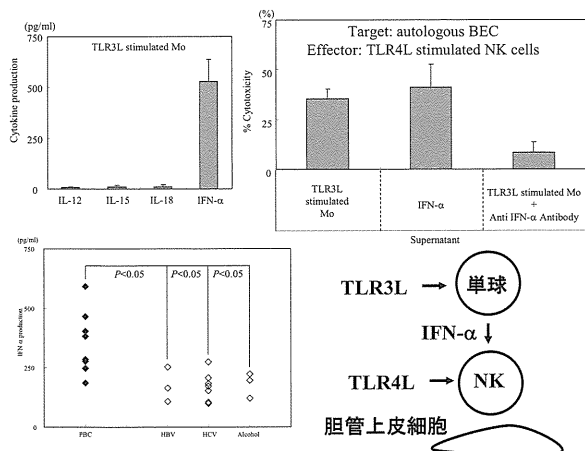
下の図に示すようにNK細胞が自己胆管上皮細胞を攻撃するためには、TLR4リガンドからの刺激と、TLR3L刺激が入った単球から産生されるサイトカインの両方が必要であることが明らかとなった。



また、次の図に示すように単球から産生されるサイトカインはIFN-aであり、TLR4リガンド刺激とIFN-aの存在下で確かにNK細胞は自己胆管上皮細胞を攻撃することが明らかになった。更にはPBC肝臓の単球は他疾患肝臓の単球と比較して有意に多くTLR3リガンド刺激でIFN-aを産生することが明らかとなった。

D. 考察

今回我々が観察した自然免疫系のリガンドと細胞による胆管傷害は、PBC発症のスタートになっていることが考えられた。ただしこの自然免疫系の乱れがどのようにして臓器特異的自己免疫につながるのかが今後の検討課題であると考察した。



東京, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

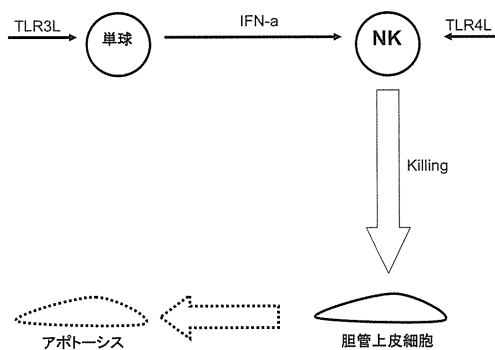
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

E. 結論

下の図に示すように, TLR3リガンド刺激で単球が産生する IFN- α と TLR4リガンド刺激が相俟って NK 細胞が活性化され自己胆管上皮細胞を攻撃することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし



Hepatology 2011 Shimoda S, et al

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimoda S, Harada K, Niuro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2011 Apr;53(4):1270-81.

2. 学会発表

下田慎治, 赤司浩一. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における胆管破壊に関する新規知見. 日本肝臓学会. 東京. 2011.

下田慎治, 赤司浩一. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) における病因病態の解析. 日本肝臓学会大会. 福岡. 2011.

下田慎治, 赤司浩一. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の病態解明と新規治療の可能性. 日本消化器病学会.

研究要旨：PBC 患者肝のトランスポーターの発現は，病状が進行するにつれて変化する。MRI の造影剤である Gd-EOB-DTPA は，OATP1により肝細胞内に取り込まれ，MRP2により排出される。この性質を利用して，PBC のステージを Gd-EOB-DTPA MRI 法を用いて評価することが今後の研究課題である。今回は PBC 患者の OATP1B3トランスポーターの局在と mRNA 発現を観察した。OATP1B3は肝細胞の類洞側細胞膜に局在していた。OATP1B3 mRNA の発現は，進行した PBC 肝では減弱傾向であった。

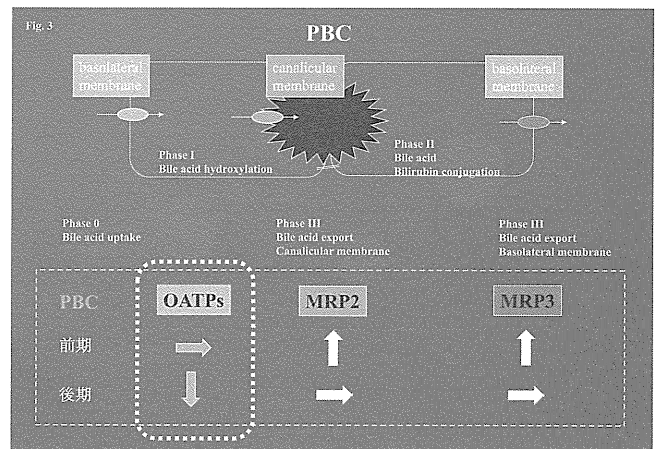
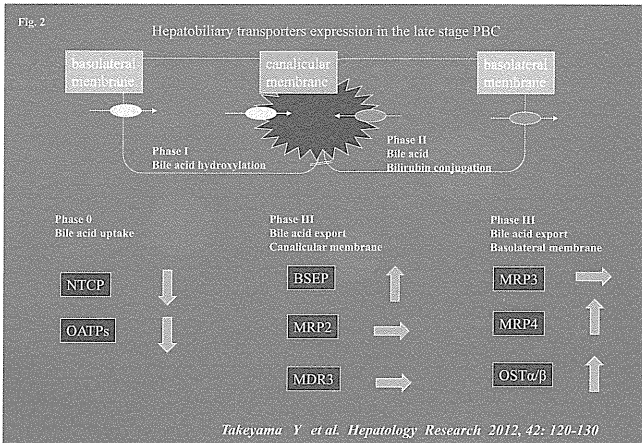
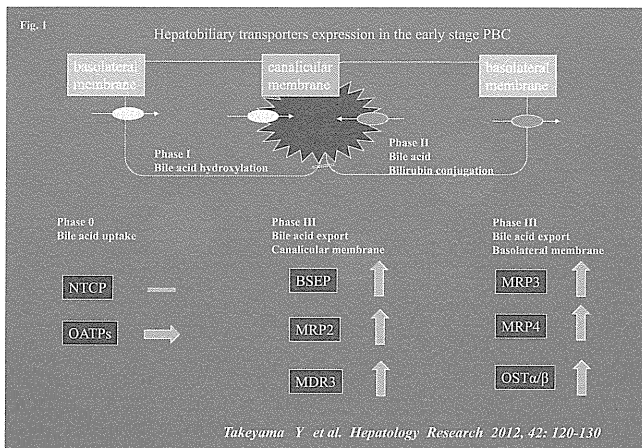
共同研究者

竹山 康章 福岡大学医学部消化器内科

A. 研究目的

我々は，原発性胆汁性肝硬変症（PBC）患者肝の胆汁酸トランスポーターの発現が早期と晩期によって変化することを報告した（Fig. 1, 2）。MRI の造影剤である Gd-EOB-DTPA（gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid）製剤は，肝細胞の類洞側細胞膜に存在する OATP1（organic anion transporter 1）により肝臓内に取り込まれ，胆管細胞側細胞膜の MRP2（multidrug resistance associated protein2）により胆管内に排出される性質がある。PBC 患者肝では，病状が進行すると OATP1の発現が

減弱してゆく（Fig. 3）。今後の研究課題として PBC のステージを，トランスポーターの変化が造影に反映される Gd-EOB-DTPA MRI 法を用いて客観的に評価する。今回は，PBC 患者肝内の OATP1B3トランスポーターの局在と mRNA 発現を観察した。



B. 研究方法

福岡大学臨床研究指針に基づき研究をおこなった。サンプルは針生検より得られた肝臓組織を用いた

① OATP1B3の発現局在

OATP1B3（Anti-SLC01B3抗体：Sigma），類洞側細胞側マーカーとして Desmoplakin 抗体（PROGEN）を用いて，共焦点レーザー顕微鏡「Zeiss 社 LSM5 PASCAL」を使用した。

② OATP1B3mRNA 測定：Real Time PCR

OATP1B3（SLCO1B3：Taqman Applied Biosystem）GAPDH（Taqman Applied Biosystem）を用いて Applied Biosystem 社 7500 FAST Real Time PCR 機器にて測定した。

C. 研究結果

① PBC 患者の OATP1B3トランスポーターは，類洞側細胞膜のマーカーである Desmoplakin と一致して肝細胞に発現していたが，胆管細胞側の膜には発現していなかった（Fig. 4）。OATP1の発現は，PBC 晩期患者において減弱していた（Fig. 5）。

② PBC 患者の OATP1B3 mRNA 発現は，早期，

晩期患者とともに Control とは有意差を認めなかったが、晩期においては Control と比べて低下傾向にあった (Fig. 6)。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yasuaki Takeyama and Shotaro Sakisaka.
Hepatobiliary membrane transporters in primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* 2012; 42:120-130

2. 学会発表

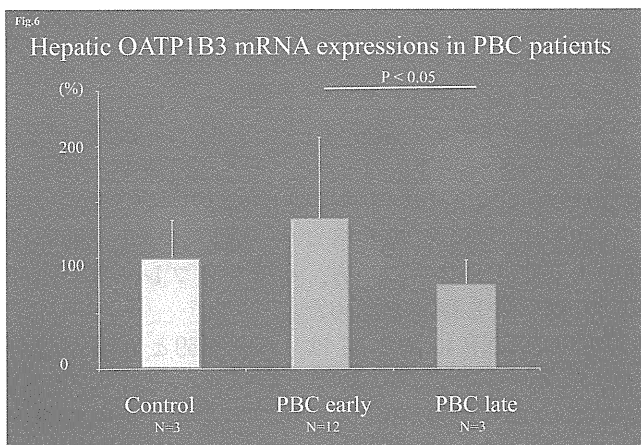
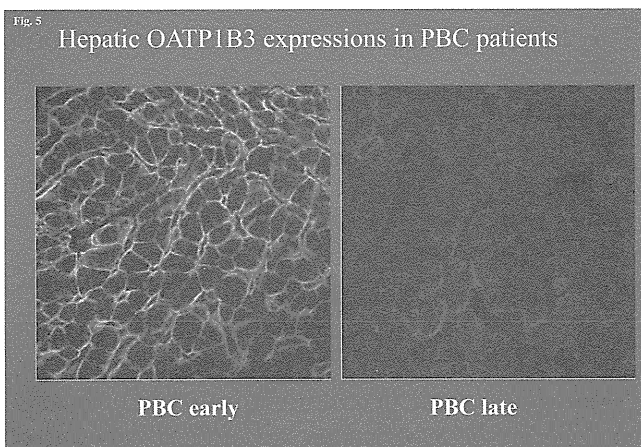
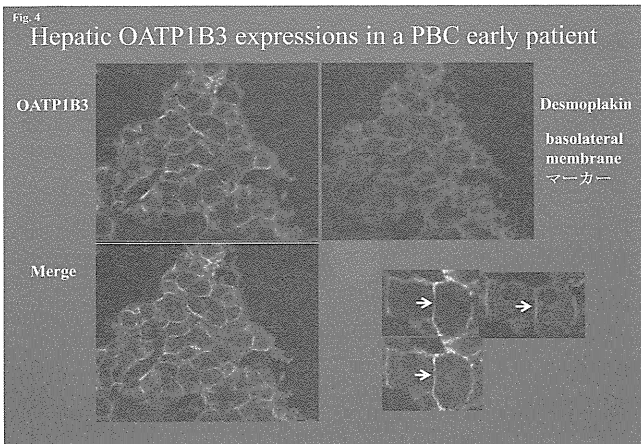
なし

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



D. 考 察

今後、PBC 患者のさらなる検討と閉塞性黄疸患者など対照疾患患者肝における観察が必要である。

E. 結 論

- ① PBC 患者の OATP1B3 トランスポーターは、肝細胞の類洞側細胞膜に局在していた。
- ② OATP1B3 mRNA の発現は、進行した PBC 肝では減弱傾向であった。

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におけるコリントランスポーター OCT1の重要性

研究協力者 中牟田 誠 九州医療センター 医長

研究要旨：我々は、PBCにおいて胆汁中ならびにリポ蛋白 VLDL 中へフォスファチジルコリン（PC）が消費され、各々、胆汁中では疎水性胆汁酸による胆管障害の軽減、ならびに細胞内に貯留したコレステロール排出に寄与していることを報告して来た。PCはコリンを原料に産生されるが、今回、PBCにおけるコリン～PC合成およびコリンの取り込みに関与するトランスポーター OCT1につき検討を行った。PBC肝ではPCの合成関連遺伝子ならびにOCT1の発現は増加していた。一方、細胞内のコリン量は著明に低下し、血清中のコリンは増加していた。従って、PBC肝では、充進したPC消費のために細胞内コリンが欠乏した状況になっており、OCT1の機能不全が推測された。そこでOCT1のSNPを検討すると、rs683369とrs622342のSNPがPBCの進行に関与することが判明した。両者は連鎖不平衡にあり、特に前者はアミノ酸置換を伴い蛋白発現が低下することが報告されている。我々の予備検討でも同様であり、OCT1のSNPや発現がPBCの病態に大きく関与することが示唆された。

共同研究者

国府島庸之 九州医療センター
大石 祐樹 九州医療センター
中村 稔 長崎医療センター
石橋 大海 長崎医療センター
本多 彰 東京医科大学茨城医療センター
松崎 靖司 東京医科大学茨城医療センター
野崎 雄一 横浜市立大学
中島 淳 横浜市立大学
調 憲 九州大学消化器・総合外科
前原 喜彦 九州大学消化器・総合外科

A. 研究目的

PBCは自己免疫性疾患としてとらえられている。しかしながら、実際の臨床においてはステロイド剤などの免疫抑制剤は有効でなく、ウルソ酸やフィブレート系薬剤による胆汁の親水化による治療がなされている。フィブレート系薬剤の作用機序としては、胆汁中へフォスファチジルコリン（PC）などのリン脂質を排出するトランスポーターであるMDR3を活性化させ、リン脂質による疎水性胆汁酸のミセル化が考えられている。さらに、MDR3に関しては、そのSNPがPBCの進行に関与することが報告されている。我々は、本研究班において、MDR3がPBCの病初期よりその遺伝子発現が増加しており、発現レベルが胆管障害のマーカーであるALPと強く相関することを報告してきた。今回、PBC肝における、PCの合成ならびにコリン取り込みを行うトランスポーターであるOCT1（low affinity polyspecific organic cation transporters）につき解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

60例のPBC症例の肝生検材料の一部よりRNAを抽出し、正常肝（30例）とコリン合成関連遺伝子ならびにコリントランスポーターであるOCT1遺伝子の発現を比較検討した。また、肝組織中ならびに血清中の

コリンはHPLCにて解析した。さらに、OCT1のSNPを長崎医療センターに保存されているDNAを用いて解析を行った。

C. 研究結果

PCはコリンを原料とするCDPコリン経路とエタノールアミンを原料とするメチル化経路により合成される。CDPコリン経路に関与するCCT（CTP phosphocholine cytidylyltransferase）の発現は軽度増加傾向ある一方で、メチル化経路に関与するPEMT（PE N-methyltransferase）とBHMT（betaine homocystein methyltransferase）の発現は各々約2倍、4倍と著明に増加していた。

コリンの取り込みに関与するOCT1およびCTL（choline-specific transporter-like proteins）の遺伝子発現は各々4倍、3倍と両者とも増加していた。

肝組織中のコリン濃度はPBC肝では正常肝の数%程度まで著明に低下していた。一方、血清中のコリン濃度は逆に、PBC症例では健常者に比べて2倍程度に増加していた。この血清コリン濃度はウルソ酸の投与により変化はせず、一方、ベザフィブレートの追加により低下する傾向を認めた。

OCT1のSNPに関しては、rs683369とrs622342がPBCステージの進行（黄疸ステージ）に対して、関与している可能性が示唆された。なお、rs683369とrs622342とは連鎖不平衡にあることが報告されている。

D. 考察

以前の報告で、PBC肝においては細胞内にコレステロールが貯留する傾向にあることを、コレステロール代謝関連遺伝子の発現を検討し報告を行った。また、血清中のVLDLの組成をHPLCにて解析することによって、PBC症例のVLDLでは正常に比べて有意にコレステロールとPCの含量が増加していることを報告した。これらのことは、PBC肝においては、

Table 1 OCT1におけるSNP解析

SNP ID	genotype	Number (%) of genotype in		genotype comparison	
		Non-jaundice stage	Jaundice stage	OR (95% CI)	P value
rs683369	C/C	220 (82.0)	9 (60.0)	3.01 (1.03-8.99)	0.034
	C/G, G/G	48 (18.0)	6 (40.0)		
rs683369	Phe160Leu	OCT1 proteinの発現低下			
SNP ID	genotype	Number (%) of genotype in		genotype comparison	
		Non-jaundice stage	Jaundice stage	OR (95% CI)	P value
rs622342	A/A, A/C	263 (98.1)	13 (86.6)	8.09 (1.43-45.8)	0.005
	C/C	5 (1.9)	2 (13.4)		
rs622342	Intron	Cにてメトホルミンの効果が減弱			

肝細胞内に貯留したコレステロールを VLDL として細胞外に排出していることを示唆している。VLDL はリン脂質 (PC) による膜により構成されており、VLDL の増加のために PC がより多く消費されていることが容易に推測される。一方、PBC 肝においては、PC は胆管保護のために、MDR3 を介して胆汁中へも放出されており、VLDL と胆汁中へ大量に PC が消費されていることになる。今回の検討では、PC の原料である細胞内のコリン量は極端に低下しており、PC 合成に消費されたためと推測される。PC 合成系においては、CDP コリン経路の CCT の発現にあまり変化がなく、むしろメチル化経路の PEMT や BHMT の発現が増加していることから、コリン欠乏による CDP コリン経路をメチル化経路が代償しているものと考えられた。

このように PBC 肝では、PC 消費に伴うコリン欠乏の状況にあるが、コリンは主にそのトランスポー

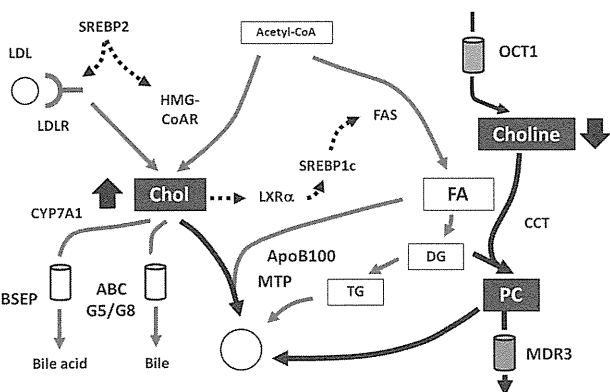


図1 PBC肝における脂質・コリン代謝

OCT1は種々の要因にてその発現が制御されている。男性ホルモン、PPAR α 、PPAR γ などの核内レセプターにより正へ、女性ホルモン、LPS、胆管障害により負に制御されている。フィブレードの作用機序としてMDR3の活性化が言われているが、ベザフィブレードの追加投与により血清コリン濃度が低下する傾向にあることは、MDR3はすでにフルに活性化されており、ベザフィブレードはむしろOCT1に作用し、欠乏したコリンの取り込み増加に作用している可能性がある。

さらにOCT1はメトフォルミンをはじめとする種々の薬剤のトランスポーターでもあり、そのSNPが解析されている。今回の解析では連鎖不平衡にあるrs683369とrs622342が病態の進行に関与されている可能性が示唆された。今後、replication studyによる前者のSNPはアミノ酸置換を伴い、その蛋白発現が低下することが報告されている。我々も予備検討で蛋白発現の低下を認めており、今後更なる検討が必要である。

何らかの胆管へのストレス（感染、化学物質など）が加わった場合に、生体としては、疎水性胆汁酸による胆管障害を軽減するために、胆汁中へのPCの排出を高めて対応するものと思われる。PBCの場合には、その対応が、例えばOCT1の機能不全などにより不十分であり、PCによる疎水性胆汁酸のミセル化が不十分となっている可能性がある。このことは、疎水性胆汁酸による胆管上皮の変性やアポトーシスをもたらし、最終的に胆管上皮による特異抗原の提示やそれに対するリンパ球の浸潤が惹起されている可能性が考えられた。

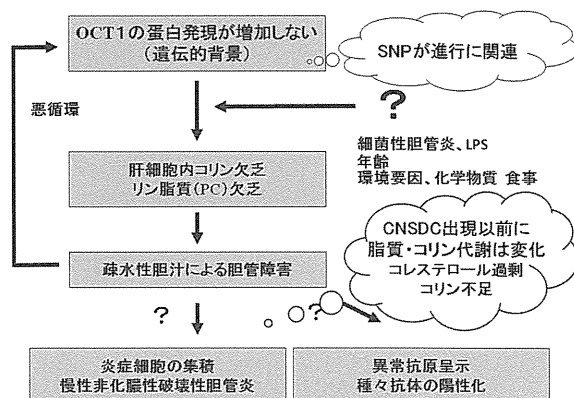


図2 PBCの発症・進展

ターであるOCT1により血液中より細胞内に取り込まれる。PBC肝においては、OCT1とCTLの遺伝子発現は増加しており、細胞内のコリン低下に対応しているものと思われる。しかしながら、細胞内のコリン量が低下している一方で、逆に血清中のコリンはPBC症例においては増加しており、OCT1がうまく代償的に機能していない可能性が示唆された。

E. 結論

PBC肝細胞では、PCの原料となるコリンが枯渇した状況であり、その一因としてOCT1の機能不全が考えられた。コリン欠乏は胆汁中へのPC排出を低下させ、疎水性胆汁酸による胆管障害を惹起・増悪させ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

なし

2. 学会発表

- 1) 本多彰, 中牟田誠, 松崎靖司: ベザフィブラートによる原発性胆汁性肝硬変の治療効果発現メカニズムの解明

第47回日本肝臓学会総会 ワークショップ 自己免疫性肝疾患 upgrade 東京 2011/06/02

- 2) 大石裕樹, 他: 原発性胆汁性肝硬変の OCT-1 遺伝子の多型解析

第15回日本肝臓学会大会 優秀ポスター演題 福岡 2011/10/20

- 3) Ohishi Y, et al: Single-nucleotide polymorphism analysis of the organic cation transporter 1 gene for the detection of onset and clinical progression in Japanese patients with PBC.

The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) Poster, San Francisco, LA, USA. November 8, 2011.

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（5）：脂肪酸代謝の異常

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：PBC患者において高コレステロール血症と共にしばしば認められる高中性脂肪血症のメカニズムを明らかにするために、患者血清中の脂肪酸代謝に関するバイオマーカーを開発し、分析を行った。その結果、PBC患者では脂肪酸合成のマーカーであるマロン酸が有意に上昇し、脂肪酸 β 酸化のマーカーであるアセチルカルニチンが有意に低下していた。ベザフィブラートは血清中性脂肪を有意に低下させたが、脂肪酸の合成と β 酸化のマーカーには明らかな変化を認めなかった。

A. 研究目的

PBC患者ではしばしば高コレステロール血症と共に高中性脂肪血症が認められる。本年度はin vivoで中性脂肪（脂肪酸）の代謝を評価できるバイオマーカーを開発し、PBC患者における脂肪酸代謝の異常を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象：正常対照49例、未治療PBC患者（Stage1 or 2）31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）19例。通常の採血時に血清の一部を臨床研究に使用することを説明し、同意の得られた患者を対象とした。

分析項目：脂肪酸の合成を反映する血清マーカーとして、脂肪酸合成系の律速酵素アセチルCoAカルボキシラーゼの産物であるマロニルCoAからCoAがはずれてできるマロン酸の血中濃度を分析した。また、脂肪酸の β 酸化を反映するマーカーとしては、アセチルカルニチンと3-ヒドロキシ酪酸（ケトン体）を定量した。

分析方法：マロン酸は血清20 μ Lを使用し、除蛋白後にメチルピペリジンで誘導体化し、LC-MS/MSで分析した。アセチルカルニチンは血清5 μ Lを使用し、除蛋白後に誘導体化せず、LC-MS/MSで分析した。また、3-ヒドロキシ酪酸も血清5 μ Lを使用し、除蛋白後に2-ピリジンメタノールで誘導体化して、LC-MS/MSで分析した。

C. 研究結果

まず3つのバイオマーカーの日内変動を検討した。脂肪酸合成マーカーの血中マロン酸濃度は、食後に上昇し、空腹時に低下する傾向があった。しかし夜間睡眠中は、空腹時であるにもかかわらず上昇が見られた。また、脂肪酸 β 酸化マーカーのアセチルカルニチンと3-ヒドロキシ酪酸濃度は、食後に低下し、空腹時に上昇を認めた。一方、夜間睡眠中は、アセチルカルニチン濃度は低下したが、3-ヒドロキシ酪酸濃度は低下せず、ベースラインのレベルを保っていた。正常対照と未治療PBC患者の空腹時血中バイオマ

ーカー濃度を比較すると、PBC患者ではマロン酸濃度が有意に上昇し（+44%, $P < 0.001$ ）、アセチルカルニチン濃度が有意に低下していた（-59%, $P < 0.001$ ）。一方、3-ヒドロキシ酪酸濃度はPBC患者で低下傾向は認められたものの（-6%, NS）、有意な変化ではなかった。

次に治療による血清脂質とバイオマーカーの変化を検討した。UDCA治療は、血清LDLコレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪のいずれにも有意な濃度変化をもたらさなかった。また、ベザフィブラート治療では、LDLコレステロールと中性脂肪濃度に有意な低下が認められた。一方、これら治療時のバイオマーカーの濃度をみると、UDCA治療でもベザフィブラート治療でも有意な変化を示していなかった。

D. 考察

1) マロン酸、アセチルカルニチン、3-ヒドロキシ酪酸の分析法とバイオマーカーとしての意義について：マロン酸の血中濃度は100-200ng/mLと非常に低いが、メチルピペリジンで誘導体化することによって高感度分析が可能となり、20 μ Lの血清で定量することができた。アセチルカルニチンはイオン化率が高く、血中濃度もマロン酸の10倍程度あることから、誘導体化は必要なく、わずか5 μ Lの血清で定量可能であった。3-ヒドロキシ酪酸はアセチルカルニチンのさらに5倍程度の血中濃度を有していたが、誘導体化しないと十分な感度が得られなかった。しかし2-ピリジンメタノールで誘導体化することによって、5 μ Lの血清で十分分析可能となった。

日内変動の検討によって、マロン酸は脂肪酸合成の、またアセチルカルニチンと3-ヒドロキシ酪酸は脂肪酸 β 酸化のバイオマーカーとなり得ることが確認された。しかし、夜間睡眠時に血中アセチルカルニチン濃度は低下するものの、3-ヒドロキシ酪酸（ケトン体）濃度には明らかな低下が認められなかった。ケトン体は脳で利用できるエネルギー源であり、夜間睡眠時にも一定量のケトン体を肝臓で産生することは、脳にとって必要不可欠なのかもしれない。以上を総合すると、脂肪酸 β 酸化のバイオマーカーとしては、アセチルカルニチンのほうが優れていて、血中3-ヒドロキシ酪酸は全身の β 酸化が増加した場合には上昇するが、減少した場合には低下しにくいと言えるかもし

れない。

2) PBC 患者での脂肪酸代謝に関して：血中バイオマーカーを用いた PBC 患者の脂肪酸代謝評価では、脂肪酸合成の亢進と β 酸化の低下が認められ、高中性脂肪血症の一因になっていると考えられた。メカニズムは不明であるが、肝組織中コレステロールの増加に伴ってオキシステロールも増加していることが推測され、そのオキシステロールが核内レセプター LXR α を活性化し、脂肪酸合成を亢進させている可能性が示唆された。また、脂肪酸合成系の中間産物マロニル CoA は脂肪酸 β 酸化系を抑制することが知られており、そのことが β 酸化の低下原因かもしれない。今後さらなるメカニズムの検討が必要である。

3) 治療の影響について：ベザフィブラート治療では血中中性脂肪濃度に有意な低下が認められたが、上記3つのバイオマーカーの濃度には、有意な変化が認められなかった。すなわち、ベザフィブラートによる中性脂肪低下効果は、脂肪酸合成の抑制や β 酸化の亢進によるものではないと考えられた。リポ蛋白リパーゼ、Fatty acid transport protein や Fatty acid translocase (CD36) も PPAR α の標的遺伝子と考えられており、血中中性脂肪の分解と組織への取り込み亢進、および肝でのリン脂質への転換と胆汁中への排泄促進などが、ベザフィブラートの中性脂肪低下作用メカニズムとして重要であることが推測された。

E. 結 論

血清中の脂肪酸代謝に関するバイオマーカーの分析法を開発し、PBC 患者血清の分析を行った。その結果、PBC 患者では脂肪酸合成のマーカーであるマロン酸濃度が有意に上昇し、脂肪酸 β 酸化のマーカーであるアセチルカルニチン濃度が有意に低下していた。PBC 患者では何らかの脂肪酸代謝異常が起きており、それによって高中性脂肪血症が起きている可能性が示唆された。一方、ベザフィブラートは血中中性脂肪濃度を有意に低下させたが、脂肪酸の合成と β 酸化のマーカーには明らかな変化を認めなかった。中性脂肪の分解と組織への取り込み亢進、および肝でのリン脂質への転換と胆汁への排泄促進などのメカニズムが推測された。

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, Maeda T, Hirayama T, Saito Y, Teramoto T, Matsuzaki Y. Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A. *J. Lipid Res.* 2011; 52: 1509-1516.

2. 学会発表

本多 彰, 中牟田誠, 松崎靖司. ベザフィブラートによる原発性胆汁性肝硬変の治療効果発現メカニズムの解明. 第47回日本肝臓学会総会 (ワークショップ).

東京, 2011.

本多 彰, 池上 正, 宮崎照雄, 松崎靖司, 中牟田誠. 胆汁うっ滞時の胆汁酸合成制御に関する検討. 第19回肝病態生理研究会. 東京, 2011.

宮崎照雄, 本多 彰, 池上 正, 松崎靖司. FXR リガンドによる脂肪肝改善効果の検討. 第19回肝病態生理研究会. 東京, 2011.

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

エストロゲン肝障害における肝細胞膜トランスポーターの動態

研究協力者 西原 利治 高知大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：妊娠性胆汁うっ滞症は妊娠後期に認められる難治性の皮膚掻痒と黄疸を主徴とする肝疾患であり、出産後1ヶ月程度で徐々に症状の緩解する可逆性肝疾患である。その成因としては、エストロゲン修飾物が肝細胞から放出される際に、胆汁酸やビリルビンの移送と競合するとの通説が流布している。他方、胆汁酸の産生を負に制御するFRXのSNPが本症の危険因子であるとの報告も認められるが、どのような機序により本症が発症するか詳細な研究はなされていない。今回、妊娠時には肝細胞への胆汁酸の取り込みが抑制されることが明らかになった。しかし、肝細胞内で産生された胆汁酸の胆管への排泄は抑制されていないために、エストロゲンによる胆汁酸産生抑制機構の低下を有する症例では妊娠性胆汁うっ滞をきたすものと考えられた。

A. 研究目的

妊娠性胆汁うっ滞症は妊娠後期に認められる難治性の皮膚掻痒と黄疸を主徴とする肝疾患であり、出産後1ヶ月程度で徐々に症状の緩解する可逆性肝疾患である。その成因としては、妊娠時に高値を示すエストロゲン修飾物が肝細胞から放出される際に、胆汁酸やビリルビンの移送と競合するとの通説が流布している。他方、胆汁酸の産生を負に制御するFRXのSNPが本症の危険因子であるとの報告も認められるが、どのような機序により本症が発症するか詳細な機序は依然不明のままである。

今回、エストロゲン受容体欠損マウスを対照群として、高エストロゲン血症により生じる肝細胞膜のトランスポーターおよび胆汁酸産生系に及ぼすエストロゲンの影響を網羅的に検討し、本症発症機序の背景を検討した。

B. 研究方法

10週齢雄性B6マウスおよびエストロゲン受容体 α 欠損マウスにエストロゲンを腹腔内に投与し、経時的にCO₂中にて死亡させた後に肝臓を摘出し、発現された肝細胞膜のトランスポーターおよび胆汁酸産生系酵素のmRNA量をmicroarrayにより検討した。変動の認められる遺伝子についてはreal-time PCRにより定量化を行い、その経時的変動を明らかにした。

C. 研究結果

ビリルビンを肝細胞に取り込むトランスポーターであるNTCPの遺伝子発現は、肝細胞から胆道に排泄するトランスポーターであるMRP2の遺伝子発現と共に抑制されていた。また、胆汁酸を肝細胞に取り込むトランスポーターであるOATP1bの遺伝子発現は抑制されていたが、肝細胞から胆道に排泄するトランスポーターであるBSEPの遺伝子発現には明らかな抑制を認めなかった。

他方、胆汁酸産生の律速酵素であるcyp7a1のmRNAの発現は強く抑制されており、この遺伝子の発現を負に制御するSHPの発現は著明に亢進してい

た。このような変化はエストロゲン α 受容体欠損マウスでは観察されなかった。

D. 考察

妊娠性胆汁うっ滞の危険因子としてすでに報告されているSNPを有するFXRは、SHPを正に制御する因子であり、その機能低下はcyp7a1のmRNAの発現を亢進させると考えられた。肝細胞内で胆汁酸の産生が亢進すると、正常に発現されたBSEPを介して消化管に大量の胆汁酸が放出され、腸管から再吸収された胆汁酸は肝細胞に取り込むトランスポーターの発現低下により血中に滞留し、高胆汁酸血症をきたすと考えられた。従って、エストロゲンによる胆汁うっ滞にはFXR α とSHPの遺伝子変異が重要な役割を果たすことが予想された。

このような変化はエストロゲン α 受容体欠損マウスでは観察されなかったため、このような胆汁酸動態の変化はエストロゲン受容体を介することも明らかとなった。

E. 結論

妊娠では肝細胞への胆汁酸の取り込みが抑制される。しかし、肝細胞内で産生された胆汁酸の胆管への排泄は抑制されていないために、エストロゲンによる胆汁酸産生抑制機構の低下を有する症例では妊娠性胆汁うっ滞をきたすものと考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

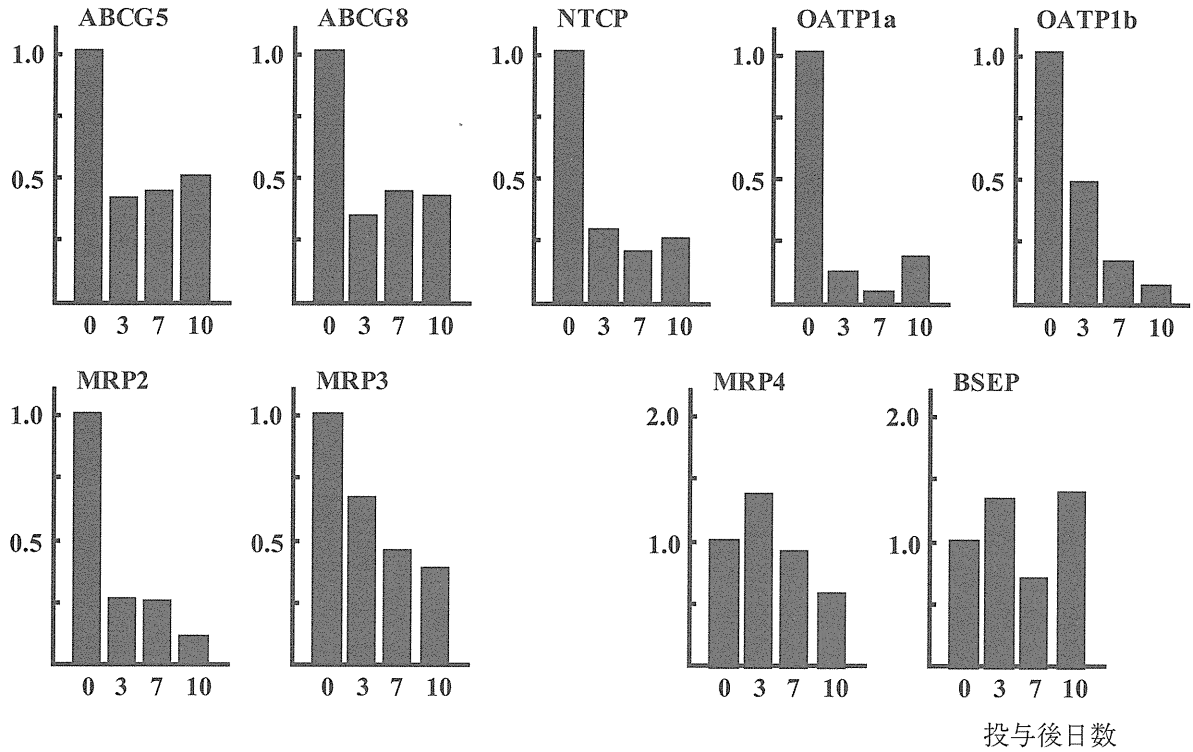
G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
特記事項なし

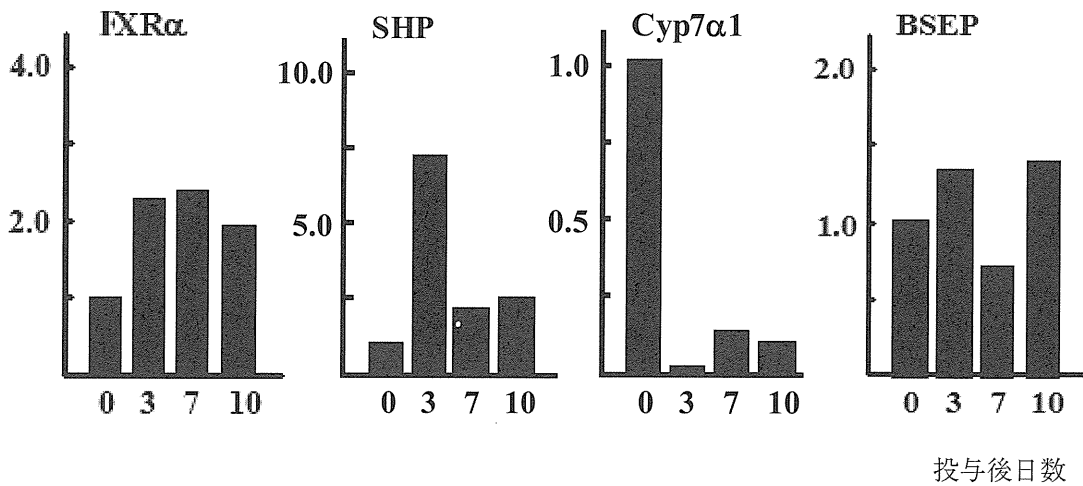
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 特記事項なし
2. 実用新案登録 特記事項なし
3. その他 特記事項なし

胆汁酸移送に関連する遺伝子の発現変化



胆汁酸移送に関連する遺伝子の発現変化



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肝移植後原発性肝硬変再発の機序解明

研究協力者 前原 喜彦 九州大学消化器・総合外科 教授

研究要旨：九州大学における肝移植377例のうち、原発性胆汁性肝硬変（PBC）43例を対象とし、肝移植後PBCの再発の実態を明らかにするため、病理学的な検索を行った。1. 術後肝生検20例、60回をすべて再検討した。2. 4例の再移植症例はすべて摘出肝の病理学的検索を行った。その結果、60回の肝生検のうち3回、2例はPBC再発を疑われ、再移植に至った。4例の摘出肝の診断は過小グラフト症候群、慢性拒絶、veno-occlusive disease、二次性胆汁性肝硬変であった。肝生検によるPBC再発の診断の困難性が明らかになるとともに、少量のステロイド継続が再発予防に重要な可能性がある。

A. 研究目的

肝移植後のPBC再発の実態と機序を明らかにする。

B. 研究方法

九州大学消化器・総合外科におけるPBCに対する肝移植43例を対象とし、術後肝生検60回（20例）、再移植に至った4例の摘出肝の病理学的な検索を行った。

C. 研究結果

60回の肝生検の診断の内訳は28回術後変化、急性拒絶14回、慢性拒絶6回、脂肪化4回、線維化3回、胆汁うっ滞2回、PBC再発疑い3回（2例）であった。一方、摘出肝の病理診断は過小グラフト症候群、慢性拒絶、veno-occlusive disease、二次性胆汁性肝硬変で、PBC再発はなかった。肝生検でPBC再発を疑われた2例はいずれも再移植に至ったものの、摘出肝の病理学的検索では再発の所見はなかった。

D. 考察

43例の肝移植においてPBCの明らかな再発所見を認めなかった。わが国においては京都大学の82例のPBCのうち、22%に再発を認めたとの報告がある。東京大学の74例の報告では再発率は2%であったとされ、九大、東大と京大の成績には大きな隔りがある。この顕著な差の原因としては術後ステロイドの継続、プロトコル生検が疑われる。すなわち、九大と東大では術後長期に少量のステロイドの継続がされている一方、京大では早期に離脱されている。また、プロトコル生検は九大と東大は施行せず、京大は採用している。すなわち、本来PBCは血液生化学検査は正常であっても病理学的な病勢が進行することが知られているため、生検をしなければ再発の診断は困難であるとされてきた。しかしながら、京大のプロトコル生検の採用以前の2007年の文献と採用後の2011年の文献を比較しても再発率は18%から22%有意差はなかった。

ステロイド継続については大阪大学の論文でステロイド離脱後に再発を経験したとの報告があり、今後更なる検証を要する。

肝生検にて再発を疑った症例が2例あった。生検所見ではchronic non-suppurative destructive cholangitisやepithelioid cell granulomaを認め、再発を強く示唆するものであった。しかしながら、最終的に肝不全に至り、再移植時の摘出肝には再発所見を認めなかった。このことはPBCの再発診断が極めて困難であることを示している。

E. 結論

43例のPBCに対する肝移植後の病理学的な検討では、明らかなPBC再発は認められなかった。

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

調 憲，相島慎一，間野洋平，武石一樹，戸島剛男，吉松正憲，本村貴志，武藤 純，的野る美，伊地知秀樹，原田 昇，内山秀昭，吉住朋晴，武富紹信，前原 喜彦：Primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis に対する生体肝移植の成績－特に移植後原疾患再発に注目して－

第29回肝移植研究会，仙台，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