

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

自己免疫性肝炎例における抗 PCK2抗体に関する研究

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: AIH においては診断あるいは病態に関与する疾患特異的な自己抗体の探索が重要である。今回、正常ヒト肝細胞から非核成分を抽出し抗原蛋白として利用し、Western-blot 法にて AIH 患者血清と特異的に反応する抗原蛋白として phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (PCK2) を同定し、その抗原蛋白に対する抗 PCK2抗体の臨床的意義について検討した。各疾患における ELISA の抗体価は AIH 28.3 ± 29.1 AU, PBC 13.9 ± 18.7 , NASH 5.4 ± 17.8 , CHC 9.5 ± 11.9 , DILI 7.7 ± 6.0 , SLE 13.3 ± 24.6 , 健常人 8.3 ± 7.3 と AIH で有意に高値だった。抗 PCK2抗体陽性は AIH 21例 (50.0%), PBC 7例 (14.6%), NASH 2例 (4.9%), CHC 2例 (10.0%), DILI 0例 (0%), SLE 2例 (12.5%), 健常人 1例 (3.3%) で AIH 診断の感度50%, 特異度91.5%, 正診率83.1%だった。AIH 例の抗 PCK2抗体の有無および抗体価と臨床検査成績, 肝線維化の程度, 重症度に統計学的有意差は認めなかった。今回の検討から, 抗 PCK2抗体は AIH 患者での特異度が高く AIH の疾患標識マーカーとなり得る可能性があると考えられた。

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
菅野有紀子 福島県立医科大学
消化器・リウマチ膠原病内科

A. 研究目的

日本における AIH はその多くが 1 型 AIH であり、抗核抗体 (ANA)、抗平滑筋抗体 (ASMA) などの自己抗体が検出されるが、これら自己抗体には疾患特異性がない。AIH の診断においては、国際診断基準とわが国の診断指針が用いられているが、特異的な疾患マーカーが無いため、非定型例や急性発症例においてはしばしば診断に苦慮する。したがって、AIH においては診断あるいは病態に関与する疾患特異的な自己抗体の探索が重要である。今回、正常ヒト肝細胞から非核成分を抽出し抗原蛋白として利用し、Western-blot 法にて AIH 患者血清と特異的に反応する抗原蛋白として phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (PCK2) を同定し、その抗原蛋白に対する抗 PCK2抗体の臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

対象は当院および関連病院で診断された AIH42例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 48例、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 41例、C 型慢性肝炎 (CHC) 20例、薬物性肝障害 (DILI) 10例、全身性エリテマトーデス (SLE) 16例、健常人30例。リコンビナント PCK2 蛋白を用いた ELISA 法で抗 PCK2抗体を測定した。AIH 症例を抗 PCK2抗体陽性群と陰性群に分け、それぞれの検査成績、肝組織の線維化、重症度について比較検討した。

C. 研究結果

各疾患における ELISA の抗体価は AIH 28.3 ± 29.1 AU, PBC 13.9 ± 18.7 ($p=0.004$), NASH 5.4 ± 17.8

($p < 0.0001$), CHC 9.5 ± 11.9 ($p=0.0043$), DILI 7.7 ± 6.0 ($p=0.0179$), SLE 13.3 ± 24.6 ($p=0.0064$), 健常人 8.3 ± 7.3 ($p=0.0006$) と AIH で有意に高値だった。抗 PCK2抗体陽性は AIH 21例 (50.0%), PBC 7例 (14.6%), NASH 2例 (4.9%), CHC 2例 (10.0%), DILI 0例 (0%), SLE 2例 (12.5%), 健常人 1例 (3.3%) で AIH 診断の感度50%, 特異度91.5%, 正診率83.1%だった。AIH 例の抗 PCK2抗体の有無および抗体価と臨床検査成績、肝線維化の程度、重症度に統計学的有意差は認めなかった。

D. 考察

本研究において、抗 PCK2抗体の AIH における疾患特異性と AIH 病態との関連について解析した。本抗体は正常ヒト肝細胞の非核成分に AIH 患者血清と特異的に反応する抗原蛋白として新規に同定したものである。今回の検討では、AIH 患者では42例中21例 (陽性頻度50.0%), AIH 以外では陽性頻度139例中12例 (8.6%) であり、特異度は91.4と高いものであった。抗体陽性例に臨床像との明らかな関連は認められなかったが、特異性が高いことから、診断マーカーの一つとして役立つ可能性がある。

PCK は生体内では肝と腎に多く存在し、ヒトでは細胞質 (PCK1/PEPCK1) およびミトコンドリア内 (PCK2/PEPCK2) に局在する肝糖新生の律速酵素の一つであり、オキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸の変換に関与する。PCK を先天的に欠損する症例では、糖新生障害に伴う低血糖や成長障害を伴うとされるが、今回の検討で抗体陽性の AIH 例に特徴的な臨床像を認めなかったことから、本抗体が酵素活性を抑制しているとは考え難い。また、蛋白の局在を考えると細胞障害性には関与はせず、他の多くの自己抗体と同様に抗体自体は標識マーカーの一つである可能性が高い。

PCK2の局在と本抗体の抗原認識部位については、今後検討する必要がある。

E. 結 論

これまで、抗 PCK2抗体と AIH との関連を示した報告はなく、AIH で特異性が高いことから新しい疾患マーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanno Y, Watanabe H, Takahashi A, Abe K, Ohira H. Anti-phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 antibody in patients with autoimmune hepatitis. Hepatol Res. 2013 (in press)

2. 学会発表

菅野有紀子, 渡辺浩志, 岡井 研, 勝嶋史子, 阿部和道, 高橋敦史, 大平弘正. 自己免疫性肝炎における PEPCK 抗体についての検討. 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013年6月

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：自己免疫性肝炎診断において複数の検査を組み合わせて用いる場合、組み合わせの感度は共分散調整後変動する場合があります。各検査間の共分散による調整が必要であることが示された。自己免疫性肝炎の国際自己免疫性肝炎グループの1999年改定スコアシステムと2008年簡易版スコアシステムの感度・特異度のメタアナリシスによる統合値と信頼区間をHierarchical bivariate summary ROCモデルを用いて解析した。改定スコアシステムでは感度0.978（95% CI 0.831 - 0.998）、特異度0.937（95% CI 0.848 - 0.976）、簡易版スコアシステムでは感度0.820（95% CI 0.698 - 0.899）、特異度0.965（95% CI 0.923 - 0.984）であり、いずれも特異度は高いが、簡易版の感度は低いことが示された。

A. 研究目的

自己免疫性肝炎（AIH）の診断では複数の検査が組み合わされて用いられる。それぞれの検査の感度がわかっていて、検査を組み合わせて診断に用いる場合、各検査が陽性の結果が得られることが互いに独立した現象であればすべての検査が陽性になる率は各検査の感度の積になる。しかしほとんどの場合検査間には何らかの相関があり、一定の割合の症例で一つの検査が陽性の場合もう一方の検査も陽性になるという関係が認められる。その疾患の共通の病態をとらえているためと考えられる。そのため複数の検査を組み合わせて診断に用いる場合にはそれぞれの検査の感度とそれぞれの検査の間の相関の程度に応じた調整が必要である。その調整に用いられるのが共分散であるが、自己免疫性肝炎の診断における感度の共分散調整に関する研究はまだ行われていない。本研究では、自己免疫性肝炎診断における複数検査の共分散調整後の感度について解析した。

複数の研究で得られた感度・特異度の値をメタアナリシスで統合することが可能である。本研究では、International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG)の1999年度改定スコアシステム¹と2008年の簡易版スコアシステム²についてメタアナリシスを行ない、感度・特異度の統合値と信頼区間を算出した。

B. 研究方法

共分散調整後の感度

1つの症例に2つの測定値がある場合、それらの間の共分散は各症例の測定値とそれぞれの測定値の平均値との差の積の合計を症例数で除した値、すなわち積の平均値である。なお共分散をそれぞれの標準偏差で除した値は相関係数に相当する。各症例の検査結果が陽性の場合1、陰性の場合0とすると、平均値は感度に相当する。従って、各症例の結果と感度の差の積の平均値を求めると感度に対する共分散が得られる。3つ以上の検査を組み合わせる場合にも共分散を算出することはできるが、組み合わせの数が多くなるためフリーの統計解析プラットフォームであるRを用いて、スクリプトを作成した。検査項目としては、従来の研

究で自己免疫性肝炎と原発性胆汁性肝硬変（PBC）の鑑別診断に有用であることが示されている、血清ALT、ALP、抗ミトコンドリア抗体を選択し解析対象とした。

ALT120以上を1、ALP正常上限の1.3倍以上を1、抗ミトコンドリア抗体（AMA）陽性を1とし、それ以外は0とした。すなわち、検査結果に応じて、表1に示す、1の場合1、2の場合0、3の場合1、4の場合0、5の場合1、6の場合0の値を与えた。

表1. 臨床検査結果の分類

ALT	ALP	AMA
1: >=120	3: >=1.3	5: 陽性
2: <120	4: <1.3	6: 陰性

共分散の計算は、図1および図2に示す式に従って行い、共分散調整後の感度は図3に示す式によって算出した³。

K tests:

$$\text{cov}_{1-K} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left[\prod_{j=1}^K (t_j^{h_i} - s_j^{h_i}) \right]$$

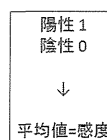


図1. K個の検査の場合の共分散の算出式

$$\text{cov}_{123} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(t_1^{h_i} - s_1^{h_i})(t_2^{h_i} - s_2^{h_i})(t_3^{h_i} - s_3^{h_i})]$$

図2. 3つの検査の場合の共分散の算出式

$$P(T_1^1 \cap T_2^1 \cap T_3^1 | D) = s_1^1 s_2^1 s_3^1 + s_1^1 \text{cov}_{23} + s_2^1 \text{cov}_{13} + s_3^1 \text{cov}_{12} + \text{cov}_{123}$$

図3. 共分散調整後の感度の算出式

自己免疫性肝炎26例、原発性胆汁性肝硬変15例について解析を行った。

感度・特異度のメタアナリシスによる統合

診断法の診断能の指標として感度・特異度が用いられている。複数の研究から得られた感度・特異度の値をメタアナリシスで統合することが可能である。単純な方法としては感度・特異度を別々に統合する方法がある。その場合は、割合の値とその分散を求め、分散で重み付けした平均値を算出する。信頼区間は分散の逆数の合計の逆数の平方根を標準誤差として算出し、そこから求めることができる。ランダム効果モデルの場合は、平均値と各研究の値の値から分散を算出し、それを各研究の分散の値に加算することで、研究間の分散を加味した統合値と信頼区間を算出するのは他の効果指標のメタアナリシスと同様である。

しかし、感度・特異度をそれぞれ独立した変数として取り扱くと、陽性・陰性の閾値を無視していることになる。陽性・陰性の名義変数であっても、その判定の基準となる閾値は各研究によって異なる可能性があるため、閾値を含めた Bivariate model が提案された^{4,5}。さらに、上位の階層を想定したランダム効果モデルとして Rutter-Gatsonis の Hierarchical Summary ROC (Receiver Operative Characteristic) モデル (HSROC) モデルが開発された⁶。

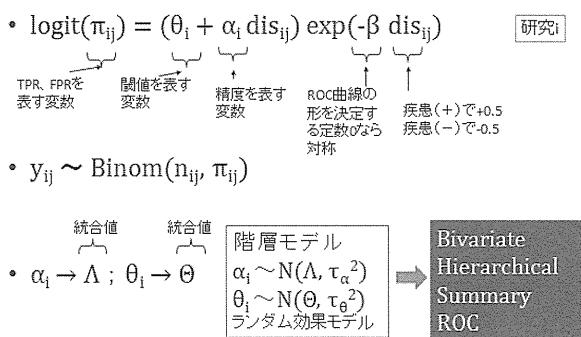


図4. Rutter-Gatsonis の Bivariate hierarchical summary receiver operating characteristic (HSROC) model

そのベジアン解析を WinBUGS で施行する方法も Dendukuri らにより報告されている⁷。本研究では、R のパッケージとして発表されている、mada を用いて⁸、ランダム効果 HSROC の解析を行い、さらに、Dendukuri⁹らの開発した、WinBUGS を用いるベジアンアプローチによる、不完全な参照基準とインデックス検査（上記の2つのスコアシステム）の間の相関を前提としたモデルを用いた解析を行った。

C. 研究結果

共分散調整後の感度

上記の臨床検査結果の組合せの自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変における感度、すなわち陽性率を算出した結果を表2に示す。

表2. 共分散調整後の3つの検査の組合せの感度

結果組合せ	共分散調整後感度		共分散未調整感度	
	AIH	PBC	AIH	PBC
1 3 5	0.01064	0.061	0.0106	0.031
1 3 6	0.10449	0.006	0.266	0.005
1 4 5	0.02807	0.073	0.0056	0.085
1 4 6	0.28012	0	0.1408	0.013
2 3 5	0.01417	0.176	0.0145	0.2
2 3 6	0.52429	0.024	0.3627	0.031
2 4 5	0	0.557	0.0077	0.551
2 4 6	0.05263	0.11	0.192	0.085

たとえば、結果組合せ246、すなわち、ALT<120, ALP<1.3正常上限、抗ミトコンドリア抗体陰性の場合には、共分散未調整の感度と共分散調整後の感度は逆転している。もし事前確率が等しいとみなした場合には、この組合せの結果が得られた際の自己免疫性肝炎の疾患確率は共分散調整後の感度を用いると $0.5 \times 0.05263 / (0.5 \times 0.5263 + 0.5 \times 0.11) = 0.323$ 、原発性胆汁性肝硬変の疾患確率は $0.5 \times 0.11 / (0.5 \times 0.5263 + 0.5 \times 0.11) = 0.676$ となる。一方で、共分散未調整の感度を用いると、それぞれ $0.5 \times 0.192 / (0.5 \times 0.192 + 0.5 \times 0.085) = 0.693$ 、原発性胆汁性肝硬変の疾患確率は $0.5 \times 0.085 / (0.5 \times 0.192 + 0.5 \times 0.085) = 0.306$ となり疾患確率は逆転する。

共分散未調整感度と共分散調整後感度の大小の関係が同じ場合もあるが、このように逆転する場合もあり、自己免疫性肝炎と原発性胆汁性肝硬変の鑑別診断で複数の検査を組み合わせる場合には、共分散による感度の調整が必要であることが示された。

感度・特異度のメタアナリシスによる統合

2008年の簡易版スコアシステムの感度・特異度についての7文献^{10, 11, 12, 13, 14, 15, 16}の感度および特異度の値と95%信頼区間をフォレストプロットとして示す（図5, 6）。

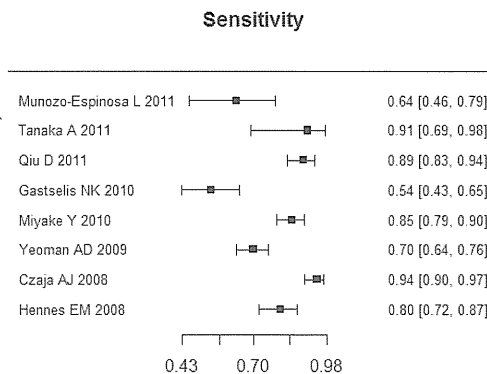


図5. 簡易版スコアシステムの感度

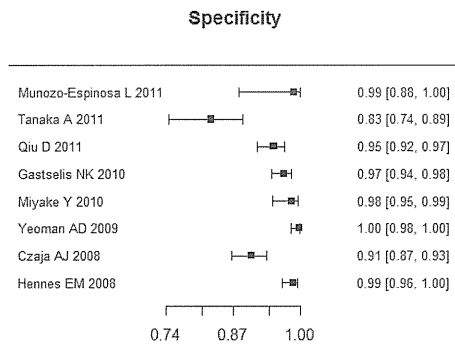


図6. 簡易版スコアシステムの特異度

HSROC 解析の結果を図7に示す。

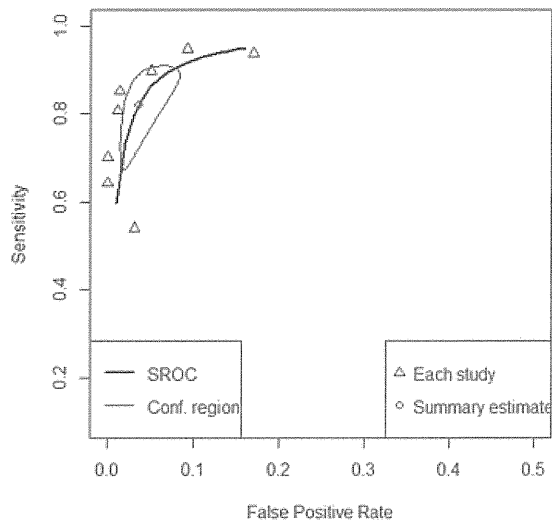


図7. 2008年簡易版スコアシステムによる感度・特異度の Bivariate model による HSROC の結果

感度0.820 (95% CI 0.698 - 0.899), 特異度0.965 (95% CI 0.923 - 0.984) であった。

さらに, Dendukuri の不完全な参照基準と参照基準とインデックス検査に相関があることを前提としたモデルによるベイジアンアプローチによる HSROC の結果を図8に示す。

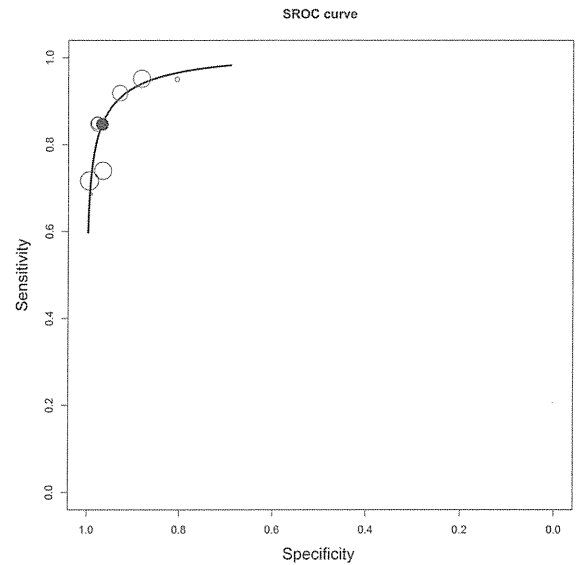


図8. 簡易版スコアシステムの感度・特異度のベイジアンアプローチによる HSROC

感度0.846 (95% CI 0.641 - 0.950), 特異度0.959 (95% CI 0.857 - 0.996) となりほぼ同じ結果となった。

次に改定スコアシステムの感度および特異度の5文献¹⁷のフォレストプロットを図9, 10に示す。

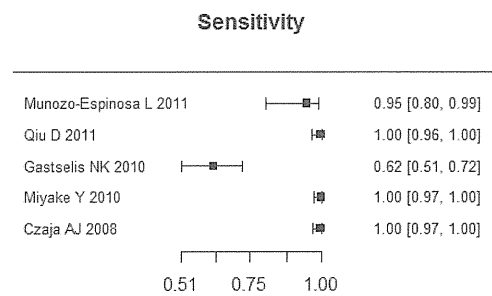


図9. 改定スコアシステムによる感度のフォレストプロット

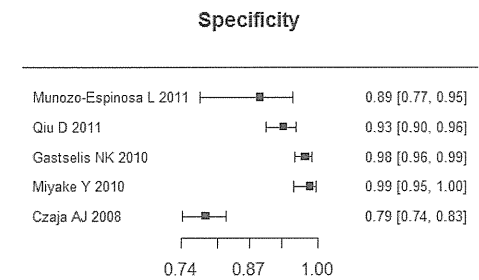


図10. 改定スコアシステムによる特異度のフォレストプロット

さらに、改定スコアシステムによる感度・特異度の HSROC の結果を図11に示す。

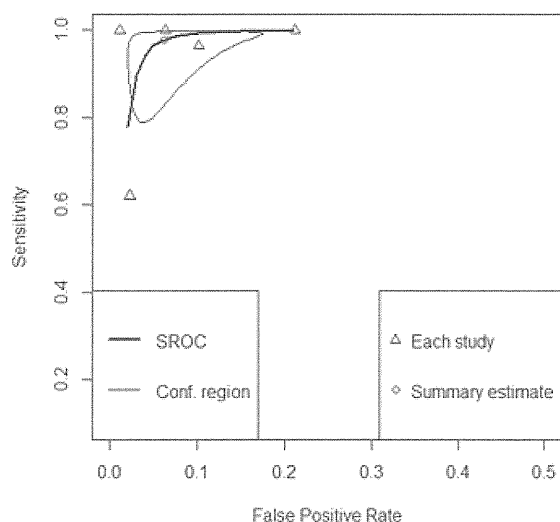


図11. 1999年改定スコアシステムによる感度・特異度の HSROC

感度0.978 (95% CI 0.831 - 0.998), 特異度0.937 (95% CI 0.848 - 0.976) となった。

簡易版スコアシステムは改定スコアシステムと比べ、感度が低かったが、特異度はいずれのスコアシステムも高かった。

D. 考 察

複数の検査を組み合わせる診断に用いる場合、それぞれの検査の感度のデータだけでなく共分散のデータが必要であることが示された。共分散の計算は、組み合わせる検査の数が多くなると、非常に複雑になるため、活用される機会は少ない。しかし、今後電子カルテの普及にとともに、多数の症例のデータをたえず取り込んで診断が確定した時点で共分散の算出に用いるITのシステムの構築が期待される。

診断精度 (Diagnostic Test Accuracy, DTA) 研究は診断法の患者中心アウトカムへの効果をランダム化比較試験などで直接解析することが困難なことから、診断法の有用性の間接的な証明として行われてきた。

DTAのメタアナリシスすなわち感度・特異度の統合は従来感度および特異度をそれぞれプールすることによって行われてきた。しかし、感度・特異度は閾値によって変動するため、閾値をモデルに取り込んだBivariate modelが提案され、さらにRutter-GatsonisのHSROCのモデルが提案され、現時点では、そのベイジアン解析を適用する方法も含めて、これらのモデルの使用が推奨されている¹⁸。

自己免疫性肝炎の診断に広く用いられている国際自

己免疫性肝炎グループの1999年改定スコアシステム、2008年の簡易版スコアシステムに適用したところ、いずれのスコアシステムも特異度は高いが、簡易版スコアシステムの感度は低いことが示された。

E. 結 論

1. 複数の診断法を組み合わせる場合には、共分散による調整が必要になる。調整後の感度は未調整の値と異なることが多い。
2. 診断法の感度・特異度をメタアナリシスで統合する場合には、Bivariate Hierarchical Summary ROC解析を行うことが望ましい。
3. IAHGの1999年改定スコアシステムと2008年簡易版スコアシステムのメタアナリシスの結果では、後者の感度が低い、いずれも特異度は高いことが示された。

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

文献

- 1 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M, et al: International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
- 2 Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW; International Autoimmune Hepatitis Group: Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169-76.
- 3 Jones G, Johnson W, Hanson T, Christensen R: Identifiability of models for multiple diagnostic testing in the absence of a gold standard. *Biometrics* 2010; 66:855-63.
- 4 Moses LE, Shapiro D, Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additional considerations. *Stat Med.* 1993;12:1293-316.
- 5 Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, Scholten RJ, Bossuyt PM, Zwinderman AH: Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J Clin Epidemiol* 2005;58:982-90.
- 6 Rutter CM, Gatsonis CA. A hierarchical regression approach to meta-analysis of diagnostic test accuracy evaluations. *Stat Med.* 2001;20:2865-84.
- 7 Dendukuri N, Schiller I, Joseph L, Pai M: Bayesian meta-analysis of the accuracy of a test for tuberculous pleuritis in the absence of a gold standard reference. *Biometrics* 2012; 68: 1285-93.
- 8 <http://cran.r-project.org/web/packages/mada/index.html>
- 9 <http://www.nandinidendukuri.com/>
- 10 Tanaka A, Harada K, Ebinuma H, Komori A, Yokokawa J, Yoshizawa K, Abe M, Miyake Y, Kikuchi K, Ohira H, Zeniya M, Yamamoto K, Ishibashi H, Onji M, Nakanuma Y, Tsubouchi H, Takikawa H: Primary biliary cirrhosis - Autoimmune hepatitis overlap syndrome: A rationale for corticosteroids use based on a nationwide retrospective study in Japan. *Hepatol Res* 2011;41:877-86.
- 11 Qiu D, Wang Q, Wang H, Xie Q, Zang G, Jiang H, Tu C, Guo J, Zhang S, Wang J, Lu Y, Han Y, Shen L, Chen X, Hu X, Wang X, Chen C, Fu Q, Ma X: Validation of the simplified criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis in Chinese patients. *J Hepatol* 2011;54:340-7.
- 12 Gatselis NK, Zachou K, Papamichalis P, Koukoulis GK, Gabeta S, Dalekos GN, Rigopoulou EI: Comparison of simplified score with the revised original score for the diagnosis of autoimmune hepatitis: a new or a complementary diagnostic score? *Dig Liver Dis* 2010;42:807-12.
- 13 Miyake Y, Iwasaki Y, Kobashi H, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Yamamoto K: Clinical features of autoimmune hepatitis diagnosed based on simplified criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Dig Liver Dis* 2010;42:210-5.
- 14 Yeoman AD, Westbrook RH, Al-Chalabi T, Carey I, Heaton ND, Portmann BC, Heneghan MA: Diagnostic value and utility of the simplified International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) criteria in acute and chronic liver disease. *Hepatology* 2009;50:538-45.
- 15 Czaja AJ: Performance parameters of the diagnostic scoring systems for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:1540-8.
- 16 Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW; International Autoimmune Hepatitis Group: Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169-76.
- 17 Muñoz-Espinosa L, Alarcon G, Mercado-Moreira A, Cordero P, Caballero E, Avalos V, Villarreal G, Senties K, Puente D, Soto J, Esqueda B, Campos G, Martínez M, Jaquez J, Ramirez A, Reyes I, Kershenobich D, Montano-Loza AJ: Performance of the international classifications criteria for autoimmune hepatitis diagnosis in Mexican patients. *Autoimmunity* 2011;44:543-8.
- 18 Macaskill P, Gatsonis C, Deeks J, Harbord R, Takwoingi Y: Cochrane handbook for systematic reviews of diagnostic test accuracy. Chapter 10 Analysing and presenting results. 2010, (version 1.0), <http://srdta.cochrane.org/handbook-dta-reviews>.

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎の病態と治療への応用

研究協力者 海老沼 浩利 慶應義塾大学医学部 消化器内科 専任講師

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）の原因や病態を解明し、治療に応用するために、我々は今まで臨床面と基礎研究面からアプローチしてきた。AIHには急性発症型を含めて様々な非典型型が存在し、多彩な病態を呈しているが、その主たる病態は免疫寛容の破綻と考えられる。そこには、Tregや自然免疫系の関与があり、その病態は複雑である。今回はCon A再投与により誘導される免疫寛容に、conventional DC細胞が関与していること、また末梢血単核球中CD14+CD16+マクロファージの比率がALT値と関連することを示した。すなわち、AIHの治療にはこれらの過剰で多彩な免疫応答を抑制する必要があると考えられた。

共同研究者

中本 伸宏	若山 遊子
谷木 信仁	村田 宏子
楮 柏松	碓井 真吾
石橋 由佳	山岸 由幸
斎藤 英胤	金井 隆典

A. 研究目的

我々は、本研究班において自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis; AIH）を臨床面からAIH症例の診断と治療成績について、及び基礎研究面からマウスを用いた自然免疫・獲得免疫の研究について行い、その病態を解明していくことにより、適切な治療方法の確立を目指してきた。

AIHはその概念は確立しているが、その診断に絶対的な項目はなく、自己抗体陽性や高IgG血症、肝生検による組織学的所見といった複数の項目により総合的に判断して診断する必要がある。このことは、AIHの病態がまだ完全に解明されていないこと、さらにはAIHの病態が多岐にわたっていることを示している。

我々は、今までAIH症例の末梢血単核球や肝組織切片を用いた研究から、AIH症例では制御性T細胞（Treg）の頻度が低下し、炎症惹起性であるTh17細胞の頻度が増加していることを報告してきた。そこで、AIHでは何らかの原因で発症した過剰な免疫応答に対して抑制が効かない、すなわち免疫寛容が誘導されないのではないかと考えてきた。同様のAIHにおけるTregの頻度・機能低下は他のグループからも報告されている（1, 2）。しかし、この末梢血Tregの低下だけでは、どうして肝臓内だけに起こるのか、あるいは急性発症型AIHといった特殊型との相違は説明つかないことから、獲得免疫のみならず自然免疫も関与しているのではないかと考えてきた。

本年は、過去3年間の我々の研究を統括して、① Con A再投与モデルにおける免疫寛容の発症機序の解明 ②今まで得られてきたAIH患者の末梢血単核球のflowcytometryの解析 から自然免疫系の関与という点に着目して検討を進めた。

さらに、これらの研究での裏付けがAIH患者の臨

床面、特に治療に応用できればと考えている。

B. 研究方法

(a) Con A再投与モデルにおける免疫寛容の発症機序の解明

Con Aの単回投与（20mg/kg）は急性の肝障害を惹起するが、その機序にCCR9+マクロファージが関与していることはすでに報告してきた（3）。今回は、Con Aの再投与により、いつ免疫寛容が誘導できるかどうか、あるいはその機序についての検討を行った。6-8週齢C57BL/6マウスを用いて、Con Aの初回投与後1, 3, 7日後にそれぞれ2回目のCon A投与を行い、最終投与12時間後のALT値、組織像、及び再投与直前の肝臓内の免疫担当細胞につき、flowcytometryで解析した。

(b) AIH患者の末梢血単核球のflowcytometryによる免疫担当細胞の解析

インフォームドコンセントが得られた免疫抑制療法施行前のAIH患者から末梢血10mlを採取し、得られた末梢血単核球を構成する細胞群（T細胞、NK細胞、NKT細胞、マクロファージ、樹状細胞など）をflowcytometryにて解析した。

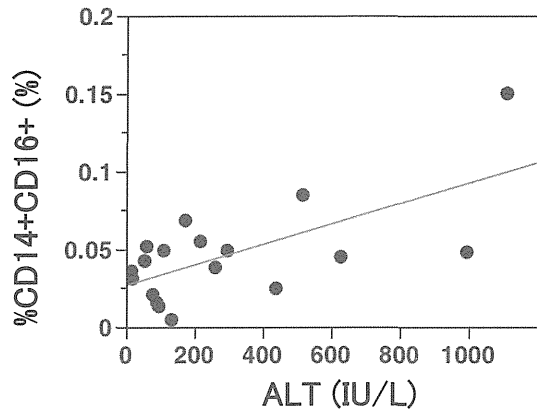
C. 研究結果

(a) Con A再投与モデルにおける免疫寛容の発症機序の解明

今までの研究から、Con Aの繰り返し投与後にCon Aを再投与すると、ALT値の上昇は初回投与と比較して有意に少なく、免疫寛容がおこっていると考えられた。そこで、Con Aの再投与の時期をかえて、いつ免疫寛容が誘導されるのかを検討したところ、初回投与後7日目の再投与で、血清学的、組織学的いずれにおいても肝障害の程度が最も軽度であった。そこで、再投与直前の肝浸潤炎症細胞をflowcytometryで解析すると、CD11c+CD11b^{dim}のconventional DC細胞が増加しており、これらはCon A投与12時間後に肝臓内に増加する炎症性マクロファージと異なり、CCR9陰性であった。

(b) AIH 患者の末梢血単核球の flowcytometry による免疫担当細胞の解析

AIH 患者の末梢血単核球を構成する免疫担当細胞を、健常人あるいはC型慢性肝炎患者と比較検討したところ、Treg の低下と CD14+CD16+ 細胞、すなわち炎症性マクロファージの分画の増加が認められた。そこで、この CD14+CD16+ 細胞の末梢血中の比率と ALT 値の相関をみたところ、CD14+CD16+ 細胞の比率が多いほど ALT 値が高い傾向にあった (図 1)。



(図 1) AIH 患者の末梢血における CD14+CD16+ 細胞の比率と ALT 値の相関

D. 考 察

AIH はその発症機序に自分の肝臓を構成する成分 (細胞や細胞成分など) に対する過剰な免疫応答が関与していると考えられている。しかし、その詳細な病態は未だ全く明確になっていないのが現状である。

我々は過去 3 年間に於いて、AIH を臨床面と基礎研究面の両者からアプローチし、その病態を解明し、治療法へ応用することを目標に研究を続けてきた。

まずは、AIH の実態を把握すること、さらには診断を確実にするために、慶應義塾大学医学部関連病院の症例データベースを作製し、オリジナルスコアリングシステム・簡易版スコアリングシステム・3 因子・7 因子における診断能を比較した (森實先生との共同研究)。ここで、判明したことは、AIH の診断は肝臓診断医が行っているにも関わらず、各診断基準にあわない症例が多数存在したことである。このことは、AIH の中に診断が困難な非典型例が多数存在すること、あるいは AIH には多彩な病型が存在していることが示唆された。

そこで、この非典型例の中でも急性発症型 AIH に着目した。当院では、肝移植登録施設であることから、とりわけ急性肝不全症例が多い。これらは肝生検による組織学的検査を行うことができないケースが多く、さらには抗核抗体陽性率が高くなく、高 IgG 血症を伴わないことも多いことから、診断に難渋するケースが多かった。それでも、その後のステロイド反応性等の経過から判断すると、亜急性の経過と肝萎縮・地図

状パターンといった CT 所見が有用であることが判明した。

そこで、この急性発症型 AIH 症例を急性ウイルス性肝炎症例と比較検討したところ、診断時の AST/ALT 値は急性発症型 AIH で低いものの、総ビリルビン値は有意に高く、アルブミン値・プロトロンビン時間 (%) は有意に低く、亜急性の経過を反映していた。さらに、診断時の血清サイトカイン・ケモカイン値を測定、比較したところ、急性発症型 AIH では急性ウイルス性肝炎と比較し、IL-17, MIP-1a, basic FGF, TNF- α など、どちらかという自然免疫に関与するサイトカイン・ケモカインが有意に高値であった。

また、AIH 症例の末梢血単核球や肝組織切片を用いた研究も行った。AIH 症例では健常人や C 型慢性肝炎症例と比較して、Treg の頻度が低下し、Th17 細胞の頻度が増加していることも報告した。これは、とりわけ急性発症型 AIH 症例で顕著であった。これらのことから、AIH では自然免疫・獲得免疫を通じた免疫抑制機能の障害すなわち免疫寛容が惹起されることがその発症ならびに進展の一因ではないかと考えた。

そこで、これらの事象を説明するために、動物モデルを用いて検証した。我々が使用している Con A 投与マウスは、AIH のモデルというには議論があるが、このモデルの詳細な病態を今までに解明してきた。すなわち、Con A 投与により発症する急性肝障害は、主に CCR9+ マクロファージにより惹起され、CCR9+ ノックアウトマウスではその肝障害は減弱することを報告した (3)。さらに、この Con A 投与マウスでは Con A の繰り返し投与では肝障害は軽減される。すなわち、前投与により免疫寛容が起こっていることが想定される。今回、どのような状況で免疫寛容が誘導されるかを検討したところ、Con A 投与後 7 日目の再投与で最も肝障害が減弱することが判明した。さらに、その再投与前の肝臓免疫担当細胞を解析したところ、有意に CD11c+CD11b^{dim} の conventional DC 細胞が増加していた。すなわち、この conventional DC 細胞の中に免疫寛容を担う細胞群が存在すると考えられ、今後の研究を進めていきたいと考えている。

最後に、これらの結果から AIH の病態に自然免疫系が重要な役割を担っていると考えたため、再び AIH 症例の末梢血単核球の解析に戻って、検索を行った。そこで、AIH 症例では CD14+CD16+ 細胞の増加が認められ、この比率と ALT 値が相関した。この CD14+CD16+ 細胞は炎症性マクロファージの分画であると考えられていることから、やはり自然免疫系の関与が、特に急性発症型 AIH では強く関与していることが考えられた。

E. 結 論

AIH には急性発症型を含めて様々な非典型例が存在し、多彩な病態を呈しているが、その主たる病態を我々は免疫寛容の破綻と考えている。そこには、Treg の比率ならびに機能低下のほか、自然免疫系の

関与があり、一旦賦活した免疫応答が抑制できない状態となっているのではないだろうか？そのため、AIHの治療には免疫寛容の誘導こそが真の治療であるが、それが出来ない以上、この過剰で多彩な免疫応答を分量のステロイドで抑制するのが妥当であると考えている。

参考文献

- 1) Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, et al. Impairment of CD4(+)/CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 31-37
 - 2) Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory-T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176: 4484-91
 - 3) Nakamoto N, Ebinuma H, Kanai T, Chu PS, Ono Y, Mikami Y, Ojio K, Lipp M, Love PE, Saito H, Hibi T. CCR9+ Macrophages are Required for Acute Liver Inflammation in Mouse Models of Hepatitis. *Gastroenterology* 2012; 142: 366-376
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Usui S, Saeki K, Matsumoto A, Mikami Y, Sugiyama K, Tomita K, Kanai T, Saito H, Hibi T. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2013; 58: 337-50
 - 2) Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y, Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Saito H, Sato T, Yagita H, Hibi T. IL-22-producing ROR γ t-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis. *PLoS One* 2013; 8 (4) : e62853
 - 3) Mizuno S, Yamagishi Y, Ebinuma H, Nakamoto N, Katahira M, Sasaki A, Sakamoto M, Suzuki H, Kanai T, Hibi T. Progressive liver failure induced by everolimus for renal cell carcinoma in a 58-year-old male hepatitis B virus carrier. *Clin J Gastroenterol* 2013; 6 (2) : 188-192
 2. 学会発表
 - 1) Nakamoto N, Ebinuma H, Kanai T, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Mikami Y, Cho PS, Sugiyama K, Saito H, Hibi T. A unique subset of CD11c-positive dendritic cells mediate immunological tolerance via TLR9 in Concanavalin A-induced liver injury in mice. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases November 2013, Washington DC
 - 2) Cho PS, Ebinuma H, Nakamoto N, Sugiyama K, Kanai T, Saito H. Serotype-associated differential NKG2D expression on CD56+CD3+ natural killer T cells predicts treatment response to interferon-based therapy in persistent hepatitis C virus infection. 64nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases November 2013, Washington DC
 - 3) 免疫学的末梢血解析からみた自己免疫性肝炎の病態. 海老沼浩利, 齋藤英胤, 日比紀文. パネルディスカッション8「自己免疫性肝疾患の現状と問題点」第99回日本消化器病学会総会 2013年3月, 鹿児島
 - 4) inflammatory bowel disease (IBD) 合併 primary sclerosing cholangitis (PSC) 症例の実態とその治療による予後の改善. 若山遊子, 海老沼浩利, 日比紀文. ワークショップ11「硬化性胆管疾患の現状と問題点」第99回日本消化器病学会総会 2013年3月, 鹿児島
 - 5) マウス Con A 急性肝不全モデルでの病理性 CCR9+ マクロファージの発見からヒト急性肝不全へのトランスレーション. 中本伸宏, 海老沼浩利, 金井隆典, 楮柏松, 碓井真吾, 若山遊子, 三上洋平, 齋藤英胤, 日比紀文. 第99回日本消化器病学会総会 2013年3月, 鹿児島
 - 6) 新たな診断基準による症例も含めた当科における HBV 急性肝不全患者の実態. 山岸由幸, 海老沼浩利, 中本伸宏, 齋藤英胤, 日比紀文. シンポジウム1「B型劇症肝炎と acute-on-chronic : 実態, 病態と治療」第39回日本急性肝不全研究会. 東京
 - 7) HMGB1に着目した急性肝不全の病態理解と治療法の開発. 篠田昌宏, 田中真之, 西山亮, 大島剛, 高野公德, 海老沼浩利, 高柳淳, 山田晋吾, 宮庄拓, 須田康一, 林田哲, 八木洋, 阿部雄太, 日比泰造, 北郷実, 尾原秀明, 竹内裕也, 板野理, 丸山征郎, 田邊稔, 北川雄光. シンポジウム2「人工肝補助: 現状と on-line HDF の展望」第39回日本急性肝不全研究会. 東京
 - 8) エベロリムスにて腎細胞癌加療中に再活性化による肝不全を来した HBV キャリアの一例. 山岸由幸, 水野慎大, 海老沼浩利, 片平舞, 中本伸宏, 佐々木文, 齋藤英胤, 坂元亨宇, 日比紀文. 第39回日本急性肝不全研究会. 東京
 - 9) ケモカイン・ケモカイン受容体 CCL25/CCR9 を介する肝線維化促進機序: マウス肝線維化モデルでの検討. 楮柏松, 中本伸宏, 海老沼浩利, 杉山和夫, 碓井真吾, 冨田謙吾, 金井隆典, 齋藤英胤. 第50回日本消化器免疫学会総会. 2013年8月, 東京
 - 10) 最終転帰からみた急性発症型自己免疫性肝炎の診断と治療. ワークショップ9「自己免疫性肝胆疾患の非定型例に対する対応と課題」. 海老沼浩利, 金井隆典, 齋藤英胤. 第17回日本肝臓学会大

会 (JDDW 2013). 2013年10月, 東京

- 11) C型慢性肝炎に対する Peg IFN, リバビリン併用療法中の末梢血中 HCV 特異的 CD8 T細胞のエフェクター機能修飾の検討. 中本伸宏, 海老沼浩利, 楢柏松, 碓井真吾, 石橋由佳, 若山遊子, 谷木信仁, 金井隆典, 齋藤英胤, 日比紀文. 第17回日本肝臓学会大会 (JDDW 2013). 2013年10月, 東京
- 12) 炎症性腸疾患患者に対する免疫抑制治療施行例, 特に TNF- α 阻害薬投与例における HBV 感染の現状. 碓井真吾, 海老沼浩利, 齋藤英胤. シンポジウム1「B型肝炎ウイルス再活性化の予防・治療の現状と課題」. 第17回日本肝臓学会大会 (JDDW 2013). 2013年10月, 東京
- 13) 急性肝不全の新診断基準による早期治療介入と予後改善の可能性. ワークショップ2「急性肝不全の予後改善に向けた病態理解と治療の進歩」. 山岸由幸, 海老沼浩利, 日比紀文. 第17回日本肝臓学会大会 (JDDW 2013). 2013年10月, 東京 (肝臓2013; 54 (Suppl.2): A514)

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

肝細胞での MHC クラス II 分子発現と肝傷害

研究協力者 青柳 豊 新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎 (AIH) における抗 HLA 抗体に着目したこれまでの研究により、AIH 発症時の血清中には健常人や原発性胆汁性肝硬変例、急性肝不全例よりも抗 HLA class II 抗体が有意に高率に検出されることなどを明らかにした。本年度は肝傷害時における抗 HLA 抗体の影響を検討することを目的とし、Concanavalin A (ConA) 肝傷害モデルを用いて抗 HLA class II 抗体投与の効果を検討した。抗 HLA class II 抗体を ConA 投与 6 時間前に投与した場合、肝傷害は有意に抑制され、抗 HLA class II 抗体の肝傷害抑制的な作用が確認された。一方、ConA 投与 4 時間後に抗 HLA class II 抗体を投与した場合も、血清中 transaminase 値の低下など同様に肝傷害抑制的な作用が示唆された。以上より、AIH における抗 HLA class II 抗体も肝炎抑制的な作用を持つ可能性があり、AIH の病態を考える上で興味深い所見と考えられた。

共同研究者

山際 訓 新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器内科学分野 助教

A. 研究目的

臓器移植分野での検討が進められている HLA (human leukocyte antigen) に対する抗体 (抗 HLA 抗体) に着目したこれまでの研究により、自己免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis; AIH) の発症時には抗 HLA class II 抗体が健常人、原発性胆汁性肝硬変例、急性肝不全例と比較して有意に高率に検出されることを報告した。また、AIH における抗 HLA class II 抗体陽性例のうち、DNA typing により自己 HLA に対する抗体の検出される症例は重症例が多いことを見出している。今年度は、肝傷害時における抗 MHC class II 抗体の影響を明らかにすることを研究目的とした。

B. 研究方法

6-8 週齢の C57BL/6 マウス (各群 5 匹) に ConA (15mg/kg BW) を尾静脈から投与する肝傷害モデルを用い、ConA 投与 6 時間前と投与 4 時間後に抗 MHC class II 抗体と Isotype control 抗体を尾静脈から投与した。経時的に、①血清 AST, ALT をトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) にて測定、②血清中 IFN- γ , TNF- α , IL-6 などのサイトカイン濃度を Cytometric Bead Array (CBA) システム (BD Biosciences) により測定、③肝の病理組織学的検討、④肝組織中の MHC class II (I-A^b) と IFN- γ , TNF- α などのサイトカイン mRNA を real-time PCR 法により定量した。

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から各法令に基づき、当機関の動物実験倫理委員会の審査と承認を得て研究を実施した。

C. 研究結果

ConA 投与前に抗 MHC class II 抗体を投与した場合、ConA 投与 12 時間後の血清中 AST, ALT 値は有

意に低下し ($P < 0.01$) (図 1), 肝病理組織学的にも抗 MHC class II 抗体投与群では壊死・炎症領域は spotty に認められるのみであり肝傷害の抑制が確認された。血清中の TNF α 濃度も低下し、肝組織中の TNF α mRNA 発現も低下傾向にあり、IFN γ などで誘導される MHC class II (I-A^b) mRNA 発現は有意に低下していた ($P < 0.05$) (図 2)。

ConA 投与 4 時間後に抗 MHC class II 抗体を投与した場合も血清中 AST, ALT 値は control 群よりも低下傾向にあり (図 3), 肝組織中の IFN γ mRNA 発現と血清中 TNF α 濃度も低下しており、肝病理組織学的にも壊死・炎症領域の減少が認められた。

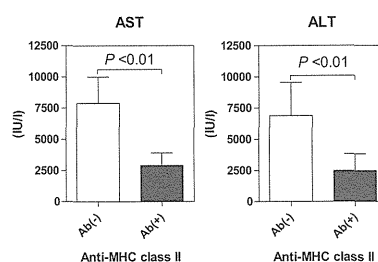


図 1. 抗 MHC class II 抗体の肝傷害発症前投与による血清中 AST, ALT 値の変化

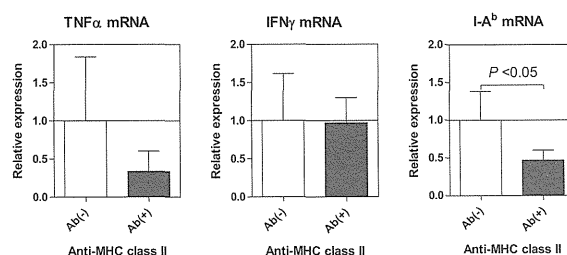


図 2. 抗 MHC class II 抗体の肝傷害発症前投与による肝組織中 mRNA 発現の変化

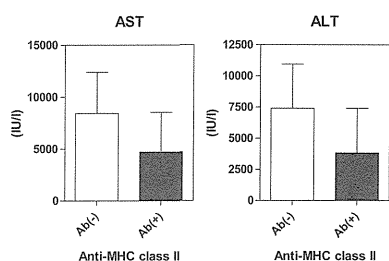


図3. 抗MHC class II抗体の肝傷害発症後投与による血清中AST, ALT値の変化

D. 考 察

今回の検討により, ConA投与前に抗MHC class II抗体を投与した場合, 肝傷害が有意に抑制されることが明らかとなり, ConA投与後に抗体を投与した場合にも肝傷害抑制的に作用する可能性が示唆された。抗MHC class II抗体は, 肝傷害発症前の投与ではMHC class II分子を発現する抗原提示細胞によるT細胞への抗原提示を阻害して肝傷害を抑制するという機序が考えられるが, 抗原提示細胞によりT細胞が活性化して肝傷害が発症した後における抗MHC class II抗体の作用機序は現時点では不明である。昨年度に報告したように, 肝傷害が発症しIFN- γ などの産生が亢進した場合, 肝細胞においてもMHC class II分子が発現するため, 発症後に抗MHC class II抗体を投与した場合には肝細胞上のMHC class IIに対するT細胞応答を阻害する可能性もあり, AIHの発症機序を明らかにする上で興味深い所見と考えられた。

E. 結 論

ConA肝傷害モデルに対し抗MHC class II抗体は肝傷害抑制的に作用することから, AIHで検出される自己HLA class IIに対する抗体も肝炎抑制的に作用する可能性が示唆されたが, 肝細胞におけるHLA class II分子発現との関連を含めて更に検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamimura K, Imai M, Sakamaki A, Mori S, Kobayashi M, Mizuno KI, Takeuchi M, Suda T, Nomoto M, Aoyagi Y. Granulocytapheresis for the Treatment of Severe Alcoholic Hepatitis: A Case Series and Literature Review. *Dig Dis Sci*. 2013 (in press)
- 2) Domori K, Nishikura K, Ajioka Y, Aoyagi Y. Mucin phenotype expression of gastric neuroendocrine neoplasms: analysis of histopathology and carcinogenesis. *Gastric*

Cancer. 2013 (in press)

- 3) Osaki A, Suda T, Kamimura K, Tsuchiya A, Tamura Y, Takamura M, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Aoyagi Y. A safe and effective dose of cisplatin in hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Med*. 2013; 2(1): 86-98.
- 4) Kamimura K, Suda T, Zhang G, Aoyagi Y, Liu D. Parameters affecting image-guided, hydrodynamic gene delivery to swine liver. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013; 2: e128.
- 5) Takeuchi M, Kobayashi M, Hashimoto S, Mizuno K, Kawaguchi G, Sasamoto R, Aoyama H, Aoyagi Y. Salvage endoscopic submucosal dissection in patients with local failure after chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Scand J Gastroenterol*. 2013; 48(9): 1095-101.
- 6) Kobayashi Y, Kamimura K, Nomoto M, Sugitani S, Aoyagi Y. Immunohistochemical character of hepatic angiomyolipoma: for its management. *Case Rep Med*. 2013; 2013: 298143.
- 7) Suda T, Nagashima A, Takahashi S, Kanefuji T, Kamimura K, Tamura Y, Takamura M, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Active treatments are a rational approach for hepatocellular carcinoma in elderly patients. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(24): 3831-40.
- 8) Yamada K, Suda T, Komoro YS, Kanefuji T, Kubota T, Murayama T, Nakayama H, Aoyagi Y. Low fat intake is associated with pathological manifestations and poor recovery in patients with hepatocellular carcinoma. *Nutr J*. 2013; 12: 79.
- 9) Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y, Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Genda T, Ichida T. Clinical significance of cell cycle inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2013; 46(4): 185-92.
- 10) Tamura Y, Suda T, Ariei S, Sata M, Moriyasu F, Imamura H, Kawasaki S, Izumi N, Takayama T, Kokudo N, Yamamoto M, Iijima H, Aoyagi Y. Value of highly sensitive fucosylated fraction of alpha-fetoprotein for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment. *Dig Dis Sci*. 2013; 58(8): 2406-12.
- 11) Yano M, Ohkoshi S, Aoki YH, Takahashi H, Kurita S, Yamazaki K, Suzuki K, Yamagiwa S, Sanpei A, Fujimaki S, Wakai T, Kudo SE, Matsuda Y, Aoyagi Y. Hepatitis B virus X induces cell proliferation in the hepatocarcinogenesis via up-regulation of cytoplasmic p21 expression. *Liver Int*. 2013; 33(8): 1218-29.
- 12) Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M,

- Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y, Sanpei A, Fujimaki S. DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. *Scientific World Journal*. 2013; 2013: 597095.
- 13) Sato M, Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y. P21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor- β -induced hepatoma cell migration. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013; 28(6): 1047-55.
- 14) Kobayashi M, Hashimoto S, Nishikura K, Mizuno K, Takeuchi M, Sato Y, Ajioka Y, Aoyagi Y. Magnifying narrow-band imaging of surface maturation in early differentiated-type gastric cancers after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol*. 2013; 48(12): 1332-42.
- 15) Sakamaki A, Kamimura K, Shioji K, Sakurada J, Nakatsue T, Wada Y, Imai M, Mizuno K, Yamamoto T, Takeuchi M, Sato Y, Kobayashi M, Naito M, Narita I, Aoyagi Y. Immunoglobulin G4-related disease with several inflammatory foci. *Intern Med*. 2013; 52(4): 457-62.
- 16) Yokoo T, Kamimura K, Suda T, Kanefuji T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Ther*. 2013; 20(8): 816-23.
- 17) Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Aoyagi Y. Involvement of liver-intestine cadherin in cancer progression. *Med Mol Morphol*. 2013; 46(1): 1-7.
- 18) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4⁺ T cells. *Virus Genes*. 2013; 46(1): 39-46.
- 19) Hara Y, Sato Y, Yamamoto S, Oya H, Igarashi M, Abe S, Kokai H, Miura K, Suda T, Nomoto M, Aoyagi Y, Hatakeyama K. Successful laparoscopic division of a patent ductus venosus: report of a case. *Surg Today*. 2013; 43(4): 434-8.
- 20) Ikarashi S, Nishikura K, Ajioka Y, Aoyagi Y. Re-evaluation of phenotypic expression in undifferentiated-type early gastric adenocarcinomas using mucin core protein and CDX2. *Gastric Cancer*. 2013; 16(2): 208-19.
- 21) Sato H, Inoue H, Kobayashi Y, Maselli R, Santi EG, Hayee B, Igarashi K, Yoshida A, Ikeda H, Onimaru M, Aoyagi Y, Kudo SE. Control of severe strictures after circumferential endoscopic submucosal dissection for esophageal carcinoma: oral steroid therapy with balloon dilation or balloon dilation alone. *Gastrointest Endosc*. 2013; 78(2): 250-7.
- 22) Sato Y, Takeuchi M, Hashimoto S, Mizuno K, Kobayashi M, Iwafuchi M, Narisawa R, Aoyagi Y. Usefulness of endoscopic submucosal dissection for type I gastric carcinoid tumors compared with endoscopic mucosal resection. *Hepatogastroenterology*. 2013; 60(126): 1524-9.
2. 学会発表
- 1) 上村博輝, 山際 訓, 青柳 豊. 自己免疫性肝炎の肝細胞傷害における MHC class II 分子の関与. 第17回日本肝臓学会大会パネルディスカッション4 東京 2013年10月
- 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

自己免疫性肝炎の診断における抗 PD-1抗体の有用性

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) 71例と薬物性肝障害 (DILI) 37例の治療前血清を用いて、血清中抗 PD-1抗体値を測定した。血清中抗 PD-1抗体値は、AIH 例で有意に高値であった。既報に従って陽性率を評価した場合、血清中抗 PD-1抗体陽性率は、AIH で38%、DILI で8%と AIH で高率であった。AIH 例では、血清中抗 PD-1抗体値とプロトンビリン活性の間に有意な負の相関を認めた。また、抗 PD-1抗体陽性 AIH では、陰性例に比べて副腎皮質ステロイド治療開始後のトランスアミナーゼ正常化が遅く、経過中の再燃率も有意に高率であった。以上より、血清中抗 PD-1抗体は、AIH の診断や重症度判定、治療反応性の予測に有用であることが示された。

A. 研究目的

近年、活性化リンパ球表面に発現する抑制性補助刺激分子である programmed cell death-1 (PD-1) の機能異常と自己免疫性肝炎 (AIH) の病態との関連が報告されている。また、我々は、血清中抗 PD-1抗体が、AIH と薬物性肝障害 (DILI) の鑑別に有用であることや、AIH の臨床像と関連していることを報告している (Matsumoto K, et al. J Gastroenterol Hepatol in press)。

今回、既報で得られた知見を検証する目的で、本研究班の協力のもとに多施設共同検証試験を行った。

B. 研究方法

本研究は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得た後に行われた。また、収集された血清と臨床情報には連結可能匿名化を行うことにより、個人情報への漏洩に注意した。

8施設より登録された成人の AIH 71例と DILI 37例において、副腎皮質ステロイド治療開始前の血清中抗 PD-1抗体値を indirect ELISA 法により測定した。なお、測定時には positive control 血清を使用して、既報の測定結果と比較検証が出来るようにした。血清中抗 PD-1抗体値のカットオフ値は、既報に従い0.086 OD_{630nm} とした。

C. 研究結果

血清中抗 PD-1抗体値 (中央値) は、AIH 例で0.071 OD_{630nm}、DILI 例で0.023 OD_{630nm} であり、AIH 例で有意に高値であった。また、陽性率も、AIH 例で38%、DILI 例で8%と AIH 例で高頻度であった。

AIH における検討では、血清中抗 PD-1抗体値はプロトンビリン活性と有意な負の相関を示した ($r = -0.31, P = 0.008$)。また、ビリルビンとの間にも正の相関を認める傾向があった ($r = 0.23, P = 0.051$)。

副腎皮質ステロイド治療開始後の経過が追跡できた64例について、血清中抗 PD-1抗体と治療反応性の関連を検討した。血清中抗 PD-1抗体陽性例では、陰性例に比べて血清トランスアミナーゼの正常化が明らかに遅れていた。Cox 比例ハザードモデルによる多変量

解析でも、血清中抗 PD-1抗体陽性であることが血清トランスアミナーゼの正常化が遅れることに関連していることが示された (ハザード比1.79, $P = 0.038$)。また、血清トランスアミナーゼの正常化が得られた59例について、再燃との関連を検討した。血清中抗 PD-1抗体陽性例では、陰性例に比べて再燃率が高かった (36% versus 11%, $P = 0.018$)。

D. 考察

今回の検討により、血清中抗 PD-1抗体値が、① AIH と DILI の鑑別診断に補助的に有用であること、② AIH の重症度や副腎皮質ステロイド治療反応性と関連していることが示された。これらの結果は、我々が既報 (Matsumoto K, et al. J Gastroenterol Hepatol in press) で示した結果と一致している。よって、今回の多施設共同検証試験により、AIH における血清中抗 PD-1抗体値測定の有用性が確認された。

一方、血清中に存在する抗 PD-1抗体が生体内のリンパ球に対して何らかの作用を及ぼしているのかについては検討されていない。抗 PD-1抗体を抗悪性腫瘍剤としてヒトに投与した場合には、少数ながら副腎皮質ステロイドが奏効する肝障害が副作用として認められると報告されている。また、抗 PD-1抗体をリンパ球に反応させた場合、CD8陽性 T 細胞の活性化と制御性 T 細胞の不活性化がみられることが報告されている。よって、ヒト血清中に存在する抗 PD-1抗体が自己のリンパ球に対して何らかの作用を及ぼしている可能性は推測できる。今後の検討が必要である。

E. 結論

血清中抗 PD-1抗体は、AIH の診断のみならず、重症度判定や治療反応性の予測にも有用であることが検証された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto K, Miyake Y, Umeda Y, Matsushita H, Matsuda H, Takaki A, Sadamori H, Nouse K, Yagi T, Fujiwara T, Yamamoto K. Serial changes of serum growth factor levels and liver regeneration after partial hepatectomy in healthy humans. *Int J Mol Sci* 2013;14:20877-89.
 2. Yamamoto K, Miyake Y, Ohira H, Suzuki Y, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H; Intractable Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan. Prognosis of autoimmune hepatitis showing acute presentation. *Hepato Res* 2013;43:630-8.
 3. 三宅 康広, 松本 和幸, 大西 敦之, 松下 浩志, 高木 章乃夫, 山本 和秀. 自己免疫性肝胆膵疾患の病態解明の進歩 自己免疫性肝炎における新規自己抗体. *消化器と免疫* 2013;49:3-6.
 4. Miyake Y, Yamamoto K. Role of gut microbiota in liver diseases. *Hepato Res* 2013;43:139-46.
2. 学会発表
1. 三宅 康広, 山本 和秀, 恩地 森一. 自己免疫性肝炎における適切な副腎皮質ステロイド投与方法. *JDDW2013*, 東京, 2013, 肝臓54巻 Suppl.2 PageA488
 2. 関 博之, 池田 房雄, 竹内 康人, 森藤 由記, 難波 真太郎, 安中 哲也, 三宅 康広, 高木 章乃夫, 岩崎 良章, 山本 和秀. 肝細胞におけるCK7の発現はPBCの予後予測に有用である. *JDDW2013*, 東京, 2013, 肝臓54巻 Suppl.2 PageA646
 3. 安中 哲也, 池田 房雄, 山本 和秀. 腹腔鏡下肝生検が診断に有用であった自己免疫性肝炎の一例. *JDDW2013*, 東京, 2013, 肝臓54巻 Suppl.2 PageA427
 4. 高木 章乃夫, 保田 裕子, 八木 孝仁, 安中 哲也, 貞森 裕, 篠浦 先, 楳田 祐三, 白羽 英, 能祖 一裕, 藤原 俊義, 山本 和秀. 法改正後の肝移植紹介患者の経過より分かる現状の生体と脳死の選択. 第20回日本門脈圧亢進症学会総会, 名古屋, 2013, 日本門脈圧亢進症学会雑誌19巻3号 Page184
 5. 三宅 康広, 山本 和秀, 中沼 安二. IgG4関連疾患の肝病変 原発性胆汁性肝硬変とIgG4関連硬化性胆管炎のオーバーラップ症候群. 第49回日本肝臓学会総会, 東京, 2013, 肝臓54巻 Suppl.1 PageA95
 6. 松下 浩志, 三宅 康広, 山本 和秀, 池田 房雄, 小池 和子, 白羽 英則, 高木 章乃夫, 能祖 一裕. 原発性硬化性胆管炎の病態における自然免疫の関与. 第99回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013, 日本消化器病学会雑誌110巻臨増総会 PageA339
 7. 三宅 康広, 松下 浩志, 山本 和秀. 自己免疫性肝炎非典型例の診断における血清中抗PD-1抗体の有用性. 第99回日本消化器病学会総会, 鹿児島, 2013, 日本消化器病学会雑誌110巻臨増総会 Page

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：自己免疫性肝炎の病態を解析するため転写抑制因子 Id2に着目し遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。Id2 KO マウスは Concanavalin A (Con A) 誘導肝炎モデルに対して抵抗性を示した。Id2 KO マウスでは Con A 投与により IL-4および IL-6に比べ IFN- γ および TNF- α の肝組織での mRNA 発現が低下し、血清 IFN- γ および TNF- α 濃度の上昇も抑制されていた。さらに、抗炎症性サイトカインの IL-13は Con A 投与により野生型では認めない上昇を認めた。これらのことは肝炎発症抑制に関与していると考えられた。Id2の機能解析は自己免疫性肝炎の発症機序を解明する上で重要と考えられ、新規治療法の開発につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝臓における自然免疫は自己免疫性肝炎の発症と進展に重要な役割を演じていることが認識されつつある。抗原非特異的なエフェクター機構を介する NKT 細胞や NK 細胞活性化によって抗原特異的リンパ球の活性化が引き起こされることより、NKT 細胞および NK 細胞は自己免疫性肝炎の発症や進展に必要と考えられている。分化および増殖に働く inhibitor of DNA binding 2 (Id2) は NKT 細胞および NK 細胞の分化や維持に重要な転写抑制因子であることが示されている。自己免疫性肝炎の病態を解析するため Id2に着目し遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いて自己免疫性肝炎の発症機序を解明し、新規治療法の開発を目指して解析を行った。

B. 研究方法

野生型および Id2 KO マウスに Concanavalin A (Con A) 15 μ g/g 体重を尾静脈より投与し、3, 12時間後 sacrifice し、肝におけるサイトカイン遺伝子の発現量を定量 PCR で検討した。同様に経時的に sacrifice し、21種類の血清サイトカインおよびケモカイン量を Procarta multiplex immuneassay で検討した。
(倫理面での配慮)

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から各法令に基づき当該研究を実施した。また、実施機関の実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

C. 研究結果

- 1) 野生型マウスでは Con A 投与3時間後、6時間後の肝における IFN- γ mRNA 発現量はそれぞれ、前値に比し99.5倍、115.4倍増加したが、Id2 KO マウスでは23.37倍、9.6倍と軽度の上昇に抑制された。TNF- α mRNA も同様であった。一方、IL-6, IL-4 mRNA は野生型マウスと Id2 KO マウスで差を認めなかった。
- 2) Con A 投与後の血清サイトカイン値の推移では、IFN- γ は野生型で12時間後に13.4 ng/ml とピークを示したが、Id2 KO マウスでは3.3 ng/ml と有意に低下した ($p<0.05$)。TNF- α は野生型マウスで3

時間後415 pg/ml とピークを認め、Id2KO マウスでは197 pg/ml と有意に低下した ($p<0.05$)、IL-6は差がなく、IL-4は野生型マウスに比べ Id2 KO マウスで3時間値が有意に増加していた ($p<0.05$)。

- 3) 測定したサイトカイン・ケモカイン中、血清 IL-13は Con A 投与後の時間経過で野生型マウスでは増加を認めなかったが、Id2 KO マウスでは有意に増加した ($p<0.01$)。

D. 考察

Con A 誘導肝炎モデルにおいて Id2 KO マウスは Con A 抵抗性を示しており、Id2 KO マウスで肝臓内の NK 細胞が少なく、NKT 細胞の肝臓での集積が低下していることが関与している可能性が考えられた。今回、Con A 投与によるサイトカインの mRNA レベルおよびタンパクレベルでの解析では、Id2 KO マウスでは Th1 サイトカインの反応性が低下し、Th2 サイトカインが優位であった。抗炎症性サイトカインである IL-13が Id2 KO マウスで有意に増加しており、肝炎発症に抑制的に働いていることが示唆された。

E. 結論

転写抑制因子 Id2は肝臓における NKT 細胞および NK 細胞の発生や維持に関与しており、自己免疫性肝炎の発症機序を解明する上で重要な分子と考えられた。Con A 誘導肝炎モデルでの Id2 KO マウスの肝炎抵抗性、Th2 サイトカイン優位のプロファイルおよび抗炎症性サイトカインである IL-13の増加は新規治療法の開発につなが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) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S:

Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57: 1484-1497, 2013.

2) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase in CD14+HLA-DR -/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 62: 1421-1430, 2013.

2. 学会発表

1) 尾崎嘉彦, 根本朋幸, 赤澤悠, 濱本愛子, 野阪拓人, 高橋和人, 松田秀岳, 大谷昌弘, 平松活志, 須藤弘之, 中本安成: 当院における非 B 非 C 型肝細胞癌の臨床的特徴の検討. 第40回日本肝臓学会西部会: 肝臓 54 (Suppl.3) O-5 A726; 一般; 口演: 2013年12月6日 岐阜

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 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

新たに確立した動物モデルを用いた自己免疫性肝炎の病態解明と新規治療法の開発

研究協力者 渡部 則彦 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 非常勤講師

研究要旨：新生仔期胸腺摘除を施行したPD-1遺伝子欠損マウスは、私たちが新規開発した自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）疾患モデルであり、高ガンマグロブリン血症と抗核抗体の産生を伴い、ヒトAIHでみられる慢性肝炎から劇症肝炎までの多彩な病態が再現可能である。このモデルを用いて、AIHの発症機序の解明とステロイド治療の有効性とその限界が生じる原因の究明を行ってきたが、今回さらに、新規治療の開発を目指して解析を行った。その結果、ヒトAIHでみられるB-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF)の血中濃度上昇は、マウスモデルでも認められるが、中和抗体投与を行っても病態の改善はみられず、BAFFは、AIHの肝での炎症誘導には重要ではないと考えられた。一方、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）は、劇症肝炎を呈するAIHマウスモデルにリコンビナント蛋白投与を行うと、肝炎が改善することが明らかとなり、HGFの投与が、AIHの新規治療となりうることが示唆された。

A. 研究背景・研究目的

自己反応性T細胞により肝障害が発症すると考えられる自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis: AIH）は、B細胞活性化に基づく高ガンマグロブリン血症と抗核抗体などの血中自己抗体の出現を伴うことを特徴とする。また一方で、AIHは、慢性肝炎から劇症肝炎まで多彩な経過をとり、治療にはステロイドが有効であることが多いが、中止によりしばしば再燃し、ステロイド離脱が困難であることが多い。

私たちは、このような特異な病態を呈するAIHの発症と病態形成の機序解明が可能な自然発症型疾患モデル動物を開発した。抑制性共刺激分子PD-1を欠損したBALB/c系統のマウス（BALB/c-PD-1^{-/-}マウス）に、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の除去目的に新生仔期胸腺摘除（neonatal thymectomy: NTx）を施行することで、ヒトAIHと同様に高ガンマグロブリン血症と抗核抗体産生を伴い、2週齢で肝炎を発症し、T細胞を中心とする炎症細胞浸潤から約4週齢までに死に至る劇症肝炎が生じる（Gastroenterology 2008;135:1333-1343）。

このマウスモデルでの解析から、CD4⁺T細胞がAIHの発症惹起に必須であり、その活性化誘導が脾臓で生じることが明らかとなっている。肝炎誘導性脾臓CD4⁺T細胞は、胚中心形成濾胞内に局在し、濾胞ヘルパーT細胞（T follicular helper cell; TFH細胞）としての形質を持ち、CCL20-CCR6のケモカイン-ケモカイン受容体系の関与によって脾臓から肝臓へ移行し肝炎を惹起する（Gastroenterology 2011;140:1322-1333）。

ヒトAIHではMHCクラスIIに疾患の重症度が依存するが、BALB/c系統とは発現するMHCクラスIIが異なるC57BL/6系統に戻し交配したPD-1^{-/-}マウスにNTxを施行すると、高ガンマグロブリン血症と抗核抗体産生を伴い、ヒトAIHで多く見られる慢性肝炎タイプのAIHが発症する。脾臓においては劇症肝炎AIHモデルと同様に、T_{FH}細胞が増加しており、

この脾臓CD4⁺T細胞が、肝炎発症に必須であることから、系統に関わらず同様の機序により異なる病態のAIHが発症すると考えられる。また、ステロイド治療はいずれのマウスモデルでも、肝炎抑制に有効であるが、脾臓でのT_{FH}細胞分化抑制には十分ではなく、ステロイド治療中止にてT_{FH}細胞に起因して肝炎が再燃する。そして、発症誘導臓器である脾臓を摘出する脾摘がAIHの根治療法となりうるということが明らかとなっている（Gastroenterology 2013;145:209-220）。

研究目的：

今回私たちは、NTx-PD-1^{-/-}マウスを用いて、ヒトAIHで見られる病態の、発症への関与の解明と、新規治療の開発を目的として解析を行った。

B. 研究方法

C57BL/6系統とBALB/c系統のNTx-PD-1^{-/-}マウスを用いて、AIH発症前後の血清中のBAFF濃度をELISAを用いて測定した。そして、劇症肝炎型のAIHを呈するBALB/c-NTx-PD-1^{-/-}マウスを用いて、肝臓・脾臓の免疫担当細胞を精製し、発現分子のmRNAレベルでの定量的RT-PCR解析を行った。また、抗BAFF中和抗体をNTx後に継続的に*in vivo*に投与し、4週齢で、肝炎発症の抑制効果を免疫・組織学的に解析した。一方で、リコンビナントヒトHGF蛋白（鹿児島大学坪内先生から御供与）の*in vivo*投与実験を、ステロイド治療と併用または単独で行い、肝炎の治療効果を免疫・組織学的に検証した。（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学動物実験委員会で承認済みである。

C. 研究結果

慢性肝炎、劇症肝炎それぞれの病態を呈する異なる系統のNTx-PD-1^{-/-}マウスから経時的に血清を採取し、ELISAにてBAFFの血中濃度を測定するといずれにおいてもコントロールのPD-1^{-/-}マウスと比較し

て有意な上昇が認められ、ヒト AIH と同様であることが確認された。そして、劇症肝炎を呈する AIH モデルでは、病態の進行とともに増加していることが確認でき、病態の進行との関連性が示唆された。次に、BAFF の発現細胞を同定するために、炎症が生じる肝臓と発症誘導臓器である脾臓の免疫担当細胞をそれぞれ単離し、RNA を抽出し、mRNA 発現を定量的 RT-PCR で測定した。肝臓、脾臓いずれにおいてもマクロファージにおいて、BAFF の発現が亢進していることが明らかとなり、マクロファージがその主な産生細胞と考えられた。さらに、血中で増加している BAFF の肝炎発症と病態進行での役割を検証するために、抗マウス BAFF 中和抗体を NTx 後から継続的に *in vivo* に投与した。劇症肝炎ではほぼ全例が致死的となる生存率の低下は、BAFF 中和抗体で改善せず、肝の免疫・組織学的解析でも炎症細胞浸潤の軽減は認めなかった。

一方、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は、劇症肝炎を含む難治性疾患でリコンビナント蛋白投与の治験がすすめられており、肝細胞のアポトーシス抑制のみならず、免疫調整作用も有することが報告されており、ヒトリコンビナント蛋白がマウスでも作用する。そこで、劇症肝炎の病態を呈する NTx-PD-1^{-/-}マウスにステロイド治療に併用して有害事象がないことを確認した0.5mg/kg/回の容量で、肝炎発症後、HGF の単回、または隔日での継続的腹腔内投与を行った。劇症肝炎を呈する AIH モデルで、ほぼ全例が致死的となる生存率の低下は、HGF の単回、または隔日での継続投与いずれにおいても改善した。肝逸脱酵素 AST/ALT の測定を行うと、単回、または隔日での継続投与いずれにおいても低下を認めた。そして、4週齢での肝の免疫・組織学的解析では、炎症細胞浸潤が減少していることが明らかとなった。しかし、脾臓においては、胚中心形成濾胞が遺残しており、リコンビナント HGF 蛋白投与は肝炎抑制に有効であるが、脾臓での T_{FH} 細胞分化抑制には十分ではないことが示唆された。

D. 考 察

今回の研究で、ヒト AIH でみられる BAFF の血中濃度上昇は、AIH 自然発症疾患モデルでも認められるが、BAFF 中和抗体投与を行っても病態の改善はみられず、BAFF は、AIH の肝での炎症誘導には重要ではないと考えられた。一方、HGF は、劇症肝炎を呈する AIH マウスモデルにおいて、リコンビナント蛋白投与を行うと、肝炎が改善することが明らかとなり、HGF の投与が、ステロイドに代わる AIH の新規治療となりうるということが示唆された。

E. 結 論

疾患モデルマウスでの解析から、BAFF の AIH 病態での意義と HGF 投与による AIH 治療の可能性が明らかとなった。HGF 投与はヒト AIH の新規治療となりうるということが示唆された。

謝辞：今回の研究は、鹿児島大学 坪内先生、井戸先生との共同研究による成果であり、ここに深く感謝の意を表します。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Maruoka R, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Ikeda A, Chiba T, Watanabe N. Splenectomy prolongs the effects of corticosteroids in mouse models of autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 145 ; 209-220, 2013

2. 学会発表

1) 渡部則彦 池田亜希 丸岡隆太郎 西浦尚代 岩本諭 青木信裕 木戸正博 千葉勉 渡部則彦 慢性から劇症まで多様な病態を呈する自己免疫性肝炎モデルを用いた AIH 病態形成機構の解明 第50回日本消化器免疫学会総会 2013.8.1. ホテルグランドヒル市ヶ谷 東京.

2) 渡部則彦, 丸岡隆太郎, 池田亜希 慢性から劇症まで多様な病態を呈する自己免疫性肝炎 (AIH) モデルでの病態解析 第21回日本消化器関連学会週間 グランドプリンスホテル新高輪 2013.10.9. 東京.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (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