

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

原発性胆汁性肝硬変の長期予後予測のためのバイオマーカーの同定

研究分担者 石橋 大海 国際医療福祉大学 教授／NHO 長崎医療センター臨床研究センター 客員研究員

研究要旨：国立病院機構肝疾患共同研究グループ（NHOSLJ）による多施設共同研究から、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の予後予測や病型分類に、自己抗体（抗 gp210抗体、抗セントロメア抗体）、免疫関連分子（HLA-DRB1, CTLA4 etc）や胆汁酸・肝線維化関連分子（MDR3, integrin $\alpha V \beta 6$, OCT1 etc）の遺伝子多型（SNPs）が有用であることを報告してきた。今年度は、①胆汁酸合成酵素である CYP7A1 に着目し、CYP7A1 及びその転写制御因子の遺伝子多型と PBC の進行の関連について、②昨年度に日本人で初めて明らかとなった PBC 疾患感受性遺伝子 *TNFSF15* の遺伝子産物である TL1A の病態形成への関与について検討した。胆汁酸合成に関連した分子（CYP7A1, HNF4A, PPARGC1A）の遺伝子多型が PBC の進行に関連していること、TL1A が PBC 病変局所で産生され PBC の病態形成・維持に関与していること、PBC 患者血中の TL1A 測定が疾患活動性のバイオマーカーになる可能性のあることなどが示された。

共同研究者

中村 稔 長崎大学大学院肝臓病学講座
小森 敦正 長崎医療センター臨床研究センター
相葉 佳洋 長崎医療センター臨床研究センター

多型は、CYP7A1 転写への影響をルシフェラーゼアッセイで検討した。

TL1A の病態形成における役割については、血中 TL1A の濃度測定、肝生検組織の TL1A 免疫染色や TL1A mRNA の定量により検討した。

A. 研究目的

我々は、国立病院機構肝疾患共同研究グループ（NHOSLJ）による多施設共同研究から、自己抗体（抗 gp210抗体、抗セントロメア抗体）や HLA-DRB1, multidrug resistance protein 3 (MDR3), organic cation transporter-1 (OCT-1) などの遺伝子多型が原発性胆汁性肝硬変（PBC）の予後予測のバイオマーカーになることを報告してきた。今年度は、①胆汁酸合成の調節に関連した18遺伝子に着目して、その遺伝子多型と PBC 進行との関連、②昨年度に“NHOSLJ (31施設)”と“難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班・PBC 分科会・抗 gp210抗体の有用性の検証ワーキング (27施設)”との共同研究で初めて明らかとなった日本人 PBC 疾患感受性遺伝子 *TNFSF15* の遺伝子産物である TL1A の PBC 病態形成における役割について検討した。

B. 研究方法

候補遺伝子法による一塩基多型（SNPs）の解析は、昨年度と同様に NHOSLJ に登録された PBC 症例の中で、1982年から2008年9月までに遺伝子解析の同意の得られた315症例（男45, 女270, 年齢 64.1+11.5歳, early stage (clinical stage 1) 228例, late stage (clinical stage 2+3) 87例を対象として行った。胆汁酸代謝関連分子（胆汁酸合成酵素：CYP7A1, 胆汁酸合成 activator: HNF4a, PPARGC1A, 胆汁酸合成 repressor: FXR, SHP, PXR, FGF19, FGFR4, Klotho $\beta 1$ ）などの SNPs は、GenBank の遺伝子多型情報を HapMap Website より入手し、Haploview 4.1を用いて Tag SNPs を各1-11ヵ所選択した後、genotype を PCR-RFLP 法, PCR-HRM 法, PCR-sequencing 法で決定した。PBC の進行と有意な関連を認めた遺伝子

C. 研究結果

- 胆汁酸合成酵素 CYP7A1 の遺伝子多型や CYP7A1 の制御に関わる HNF4A, PPARGC1A の遺伝子多型が PBC の進行と関連することが明らかとなった。
- 同定された CYP7A1 の多型や PPARGC1A のミスセンス多型は CYP7A1 の転写活性に有意な影響を与えることが *in vitro* で示された。
- 日本人の PBC 発症に関わる新規疾患感受性遺伝子 *TNFSF15* の遺伝子産物 TL1A は、PBC 患者血中で健常人コントロールに比べて有意に増加しており、非進行症例においては UDCA 治療により血中濃度が有意に低下することが示された。
- PBC 患者の肝内小型胆管は TL1A を免疫組織化学的に強く発現していることから、肝内小型胆管から分泌される TL1A が胆管周囲の Th1/Th17 環境の維持に関わり、PBC 発症になんらかの役割を果たしている可能性が示唆された。

D. 考察

今回、胆汁酸合成に関与する遺伝子多型が遺伝子発現の変化を通して PBC の進行に影響をあたえていることが明らかとなった。また、TL1A の PBC 病態への関与が世界で初めて示された。

今後は、NHOSLJ (31施設) と難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班・PBC 分科会・gp210working (27施設) で長期経過観察されている PBC 症例 (1600 症例) の combined GWAS 解析から、PBC の発症や進行に関連した遺伝子多型を同定するとともに、同定された遺伝子をてがかりとして、PBC の発症経路・分子標的の同定、病因・病態の解明、をすすめる必要

がある。また、PBCの長期予後予測のための簡便な診断法も確立する必要がある。

E. 結 論

今後も、本多施設共同研究を継続して、PBCの病型分類、長期予後予測法の確立、PBCの病因・病態解明を目指す予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Joshita S, Umemura T, Nakamura M, Katsuyama Y, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Komatsu A, Yoshizawa K, Ishibashi H, Tanaka E, Ota M. STAT4 gene polymorphisms are associated with susceptibility and ANA status in primary biliary cirrhosis. PLOS ONEP <http://pone.edmgr.com/>
2. The Intractable Hepatobiliary Disease Study Group supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Working Subgroup (English version) for Clinical Practice Guidelines for Primary BiliaryCirrhosis. Guidelines for the management of primary biliary cirrhosis. Hepatol Res 44 (Suppl. 1) , 71-90, 2014
3. Aiba Y, Nakamura M. The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. Mediators of Inflammation 2013, in press (Article ID 258164)
4. Tanaka T, Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Nakamura M, Kaneko J, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Chronologic changes of explanted liver volume and the use of ursodeoxycholic acid in patients with end-stage primary biliary cirrhosis. Hepatol Res, 2013 Dec2. [Epub ahead of print]
5. Aiba Y, Harada K, Komori A, Ito M, Shimoda S, Nakamura H, Nagaoka S, Abiru S, Migita K, Ishibashi H, Nakanuma Y, Nishida N, Kawashima M, Tokunaga K, Yatsuhashi H, Nakamura M. Systemic and local expression levels of TNF-like ligand 1A and its decoy receptor 3 are increased in primary biliary cirrhosis. Liver Int. 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]
6. Harada K, Kakuda Y, Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of serum fractalkine in primary biliary cirrhosis. Dig Dis Sci. 2013; 58:3037-43
7. Ohishi Y, Nakamuta M, Ishikawa N, Saitoh O, Nakamura H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsuhashi H, Fukushima N, Kohjima M, Yoshimoto T, Fukuzumi K, Ishibashi M, Nishino

- T, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Ishibashi H, Nakamura M; PBC Study Group of NHOSLJ. Genetic polymorphisms of OCT-1 confer susceptibility to severe progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. J Gastroenterol. 2013 Apr 24. [Epub ahead of print]
8. Migita K, Nakamura M, Abiru S, Jiuchi Y, Nagaoka S, Komori A, Hashimoto S, Bekki S, Yamasaki K, Komatsu T, Shimada M, Kouno H, Hijioka T, Kohjima M, Nakamuta M, Kato M, Yoshizawa K, Ohta H, Nakamura Y, Takezaki E, Nishimura H, Sato T, Ario K, Hirashima N, Oohara Y, Naganuma A, Muro T, Sakai H, Mita E, Sugi K, Yamashita H, Makita F, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Yasunami M. Association of STAT4 polymorphisms with susceptibility to type-1 autoimmune hepatitis in the Japanese population. PLoS One. 2013 Aug 22; 8 (8) :e71382.
9. Inamine T, Higa S, Noguchi F, Kondo S, Omagari K, Yatsuhashi H, Tsukamoto K, Nakamura M. Association of genes involved in bile acid synthesis with the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. J Gastroenterol. 2013;48:1160-70
10. 中村 稔. PBCの治療反応性と予後予測 — 厚生労働省研究班による多施設のPBC研究成果 —. たんじゅうさん 2013;12 (2) :16-17
11. 中村 稔, 西田奈央, 川嶋実苗, 相葉佳洋, 小森敦正, 八橋 弘, 徳永勝士. 国立病院機構肝ネットワークPBC研究班, 厚生労働省難治性疾患克服研究事業・難治性の肝胆膵疾患に関する調査研究班. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の疾患感受性遺伝子による病態の解明. 第20回浜名湖シンポジウム記録集 ゲノム情報の臨床応用, 2013;74-78, アークメディア
12. 中村 稔. PBCの疾患感受性遺伝子による病態の解明 日本消化器病学会雑誌2013;110:1602-1610
13. 大平弘正, 原田憲一, 下田慎治, 中村 稔. PBC最近の話題 日本消化器病学会雑誌 2013;110:29-43
14. 相葉佳洋, 小森敦正, 長岡進矢, 阿比留正剛, 右田清志, 伊東正博, 石橋大海, 八橋弘, 中村稔. 特集:自己免疫性肝胆膵疾患の病態解明の進歩. 原発性胆汁性肝硬変患者におけるTL1AとDcR3の臨床学的意義. 消化器と免疫 2013; 49 : 15-17
15. 原田憲一, 中村 稔, 下田慎治, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変における血中Fractalkineの意義. 消化器と免疫 2013; 49 : 12-14
16. 石橋大海, 小森敦正: Grand Rounds 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の診療ガイドライン, 消化器の臨床 2013; 16 (2) :117-122, 2013.4.10
17. 石橋大海, 下田慎治, 中村稔:【自己免疫性消化器疾患の病態にせまる】 原発性胆汁性肝硬変の

- 自己抗原は何か. 分子消化器病 2013; 10 (2):131-137, 2013.6.1
18. 石橋大海, 下田慎治, 中村 稔:【自己免疫疾患・アレルギー疾患(後篇)それぞれの疾患の理解】臓器特異的自己免疫疾患 原発性胆汁性肝硬変. 最新医学2013; 68 (6) 増刊号: 1326-1334, 2013.6
 19. 小森敦正, 石橋大海, 中村 稔, 八橋 弘: 原発性胆汁性肝硬変の予後. 肝胆膵 2013;66:455-461
 20. 石橋大海:【難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班公開成果報告会】原発性胆汁性肝硬変の病態解明, 東京肝臓友の会, 東京肝臓のひろば4月号, 2014.4
 21. 石橋大海:【稀少疾患】原発性胆汁性肝硬変. ケアネット CareNet <http://www.carenet.com/> 2014.1.9
 22. 石橋大海, 小森敦正: UDCA 使用中の原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者に対するベザフィブラートの併用効果. Minds トピックス. 2014
 23. 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班 PBC 診療ガイドライン WG: 患者さん・ご家族のための原発性胆汁性肝硬変 (PBC) ガイドブック. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班 (研究代表者 坪内博仁) 平成24年度 分担研究報告書 (研究代表者 坪内博仁). 54-55, 2013.4
Minds 一般向けガイドライン解説. http://minds.jcqh.or.jp/n/public_user_main.php?main_tab=1&menu_id=1#SEARCH_COND_START_POS
難病情報センター, 病気の解説 (一般利用者向け) 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) (公費対象), <http://www.nanbyou.or.jp/entry/93>
2. 学会発表
 1. Yoshihiro Aiba, Atsumasa Komori, Masahiro Ito, Kiyoshi Migita, Hiroshi Yatsunami, Minoru Nakamura. The mechanism of TL1A production in human biliary epithelial cells. 第42回日本免疫学会総会 幕張 2013.12.11-13
 2. 相葉佳洋, 小森敦正, 伊東正博, 右田清志, 八橋 弘, 中村 稔. ヒト胆管上皮細胞における TL1A 産生機構の解析 第41回日本臨床免疫学会 下関 2013.11.27-29
 3. Yoshihiro Aiba, Kenichi Harada, Atsumasa Komori, Masahiro Ito, Shinji Shimoda, Shinya Nagaoka, Seigo Abiru, Kiyoshi Migita, Hiroshi Ishibashi, Yasuni Nakanuma, Nao Nishida, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, Hiroshi Yatsunami, Minoru Nakamura. Systemic and local expression of TNF-like ligand 1A and its decoy receptor 3 are increased in primary biliary cirrhosis. AASLD THE LIVER MEETING 2013 Washington, DC 2013.11.1-5
 4. Tatsuo Inamine, Minoru Nakamura, Chi Zhu, Shinji Kondo, Kazuhiro Tsukamoto. Genetic polymorphisms in *CYP7A1* and *PPARGC1A* affects the progression of primary biliary cirrhosis via the altered expression of *CYP7A1*. AASLD THE LIVER MEETING 2013 Washington, DC 2013.11.1-5
 5. 中村 稔, 西田奈央, 徳永勝士. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の疾患感受性遺伝子による病態の解明 第17回日本肝臓学会・第55回日本消化器病学会合同大会 品川 2013.10.9-12
 6. 相葉佳洋, 原田憲一, 小森敦正, 阿比留正剛, 長岡進矢, 右田清志, 伊東正博, 中沼安二, 八橋 弘, 中村 稔. 原発性胆汁性肝硬変の肝局所における TL1A 産生機構の解明 第50回日本消化器免疫学会総会 東京 2013.8.1-2
 7. 中村 稔. 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の疾患感受性遺伝子による病態の解明 シンポジウム 4 炎症性疾患と再生のゲノム, エピゲノム解析の現状と展望 第34回日本炎症・再生医学会 京都 2013.7.2
 8. 中村 稔, 西田奈央, 徳永勝士. 原発性胆汁性肝硬変の疾患感受性遺伝子による病態の解明 シンポジウム 3 AIH, PBC の最近の進歩 第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.6.7
 9. 稲嶺達夫, 大曲勝久, 中村 稔. 原発性胆汁性肝硬変の進行に関与する胆汁酸合成系遺伝子多型の解析. 第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.6.6-7
 10. 相葉佳洋, 原田憲一, 小森敦正, 阿比留正剛, 長岡進矢, 右田清志, 石橋大海, 中沼安二, 八橋 弘, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変における TL1A の役割. 第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.6.6-7
 11. 原田憲一, 佐藤裕英, 中村 稔, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変における Fractalkine 発現と ursodeoxycholic acid による発現制御. 第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.6.6-7
 12. 小森敦正, 伊東正博, 八橋 弘. 原発性胆汁性肝硬変の疾患活動性と治療反応: 血中上皮細胞死マーカーを用いた解析. 第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.6.6-7
 13. 下田慎治, 原田憲一, 石橋大海: AIH, PBC の最近の進歩 原発性胆汁性肝硬変発症と病態維持に関わる機序の解明. 第49回日本肝臓学会総会 東京 2013.6.6-7
- 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
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

硬化性胆管炎全国調査の二次調査

研究分担者 滝川 一 帝京大学医学部内科 主任教授

研究要旨: 2012年にわれわれは、2005年以降に診断された原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis; PSC), および自己免疫性膵炎を合併していない IgG4関連硬化性胆管炎 (IgG4-related sclerosing cholangitis; IgG4-SC) を対象として、アンケートによる全国調査を行った。この結果 PSC 197例, IgG4-SC 43例が集計され、今回はこの全国調査の二次調査として若年 PSC (PSC の年齢中央値である47歳以下)・高齢 PSC (48歳以上), IgG4-SC の3群間の比較検討を行った。その結果、高齢 PSC と比較して若年 PSC は、診断時 IgA が低値, IgM が高値, 診断時病期が進行している傾向があり, IBD の合併が多かった。一方、高齢 PSC と比較して IgG4-SC は男性に多く IgG・IgG4が高値, IBD・胆道癌の合併はなく予後が良好であった。

共同研究者

田中 篤 帝京大学医学部内科

A. 研究目的

原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis; PSC) は肝内外の胆管に多発性・びまん性の狭窄が生じ、胆汁うっ滞を来す慢性肝疾患であり、病理学的には胆管壁の線維性肥厚を特徴とする。われわれは、過去1997年・2003年の2回にわたって原発性硬化性胆管炎についての全国調査を行い、本邦の PSC 症例の年齢分布は欧米とは異なり二峰性であり、高齢者において欧米にはみられないピークが存在すること、および炎症性腸疾患の合併が少なく、その反面高齢者に自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis; AIP) の合併がみられることを報告した。しかしその後、主として本邦の研究者によって、IgG4関連硬化性胆管炎 (IgG4-related sclerosing cholangitis; IgG4-SC) の疾患概念が報告・確立されるに伴い、過去2回の全国調査において PSC として報告された症例の中に IgG4-SC が混入しており、ことに AIP を合併した症例は実際には IgG4-SC である可能性が指摘された。しかし2003年当時には未だ IgG4-SC という疾患概念が広く知られておらず、診断基準も存在しなかったことから、前回の全国調査時には PSC と IgG4-SC とを鑑別することは困難であった。

その後 IgG4-SC についての報告が相次ぎ、PSC との画像診断および病理学的な差異についての知見も集積された。2012年には「IgG4 関連硬化性胆管炎臨床診断基準2012」が公表され、統一した基準によって PSC と IgG4-SC との鑑別診断が可能となった。これに伴い、われわれは2012年に、本邦における PSC, および PSC との鑑別が困難である AIP を合併していない IgG4-SC の実態、および両者の臨床像の相違を把握するため、改めて全国調査を行い、その結果を平成24年度の本研究班報告書において報告した。今回は同全国調査の二次調査として、若年・高齢 PSC 症例、および IgG4-SC 症例3群の比較を行った。

B. 研究方法

本調査の方法については平成24年度研究報告書を参照されたい。本調査で197例の PSC 症例が集積され、年齢の中央値は47.7歳であった。そこで診断時年齢47歳以下を若年 PSC, 48歳以上を高年齢 PSC とし、43例の IgG4-SC との3群間での比較検討を行った。IgG4-SC 症例は全例48歳以上であった (図1)。

統計解析には IBM® SPSS® Statistics, version 19 を用いた。PSC と IgG4-SC の間の比較では、連続量では Mann-Whitney's U test, 非連続量ではカイ二乗検定を用い、多重比較を考慮して $P < 0.01$ を有意とした。生存曲線の作成には Kaplan-Meier 法を用いた。本調査は帝京大学医学部倫理委員会の審査・承認を得た上で実施された。

C. 研究結果・考察・結論

診断時情報: まず性別については、若年 PSC・高齢 PSC・IgG4-SC それぞれにおける男女比は、57/42, 49/49, 33/10であり、若年・高齢 PSC と比較して IgG4-SC は有意に男性に多かった (それぞれ $p=0.029$, $p=0.003$)。診断時年齢の中央値は PSC 48.1歳, IgG4-SC 69.3歳で、IgG4-SC 症例は有意に高齢であった ($p < 0.001$)。診断時症状では3群の間に有意な差異はみられず、症状がなかった症例が若年 PSC 60%, 高齢 PSC 55%, IgG4-SC 54% と最も高頻度であった。

診断時の血液生化学所見では3群間に有意差のみられる項目はなかった。一方、免疫グロブリン値には3群間で差がみられており (表1), IgA は高齢 PSC で、また IgM は若年 PSC で有意に高値であった。IgG および IgG4は他の2群に比べて IgG4-SC で高値であった (図2)。IgE は測定症例数が PSC で73例, IgG4-SC で19例と少なかったものの、IgG4-SC で高い傾向があった。自己抗体の検出率にも3群間で差はなかった。

画像・病理所見: 病変部位については、簡略化して「肝内のみ」「肝内外」「肝外のみ」の3つの選択肢から回答するという形式とした。その結果、若年・高齢 PSC では「肝内外」との回答が多かったのに対し、IgG4-SC では「肝内のみ」との回答が最も多かった。

PSC の Ludwig 分類では、I 期・II 期・III 期・IV 期それぞれ若年 PSC で11例・17例・7例・5例、高齢 PSC で14例・6例・11例・0例であり、若年 PSC で病期が有意に進行していた (p=0.015)。

合併症：PSC における炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases; IBD) の有無については、若年・高齢それぞれ56例 (57%)・12例 (12%) であり若年 PSC で有意に高率であった。大腸癌、胆管癌の合併率には差はなかった。IgG4-SC では IBD, 大腸癌, 胆管癌いずれもみられなかった。

治療内容：PSC で若年・高齢を問わずもっとも高頻度で使用されていたのはウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid; UDCA) 単独投与であり、次いで UDCA + ベザフィブラート併用で、両群間に差はなかった。IgG4-SC では薬物治療についての回答のあった36例中27例 (75%) でステロイドが投与されていた。

予後：2005年以降の診断例に限定したこともあり、今回集積された症例の平均観察期間は比較的短く、若年 PSC で2.9±2.0年、高齢 PSC で2.5±2.0年、IgG4-SC では2.3±1.8年であった。高齢 PSC, 若年 PSC, IgG4-SC の生存率に有意な差はみられなかった (図3)。

結論：高齢 PSC と比較して若年 PSC は、診断時 IgA が低値、IgM が高値、診断時病期が進行している傾向があり、IBD の合併が多かった。一方、高齢 PSC と比較して IgG4-SC は男性に多く IgG・IgG4 が高値、IBD・胆道癌の合併はなく予後が良好であった。

D. 健康危険情報 なし

E. 研究発表

1) 論文発表

田中篤, 田妻進, 岡崎和一, 坪内博仁, 乾和郎, 滝川一. 硬化性胆管炎の全国調査. 胆道, 27:2:176-187, 2013.

Tanaka, A, Takikawa H. Geoepidemiology of primary sclerosing cholangitis: A critical review. J Autoimmunity, 46:35-40, 2013.

Tanaka A, Tazuma S, Okazaki K, Tsubouchi H, Inui K, Takikawa H. Nationwide survey for primary sclerosing cholangitis and IgG4-related sclerosing cholangitis in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Sci. Jan;21(1):43-50, 2014.

2) 学会発表

田中篤, 田妻進, 岡崎和一, 坪内博仁, 乾和郎, 滝川一. 硬化性胆管炎における免疫グロブリン値. 第50回日本消化器免疫学会総会 シンポジウム1. 肝胆道疾患と免疫. 東京, 2013.8.1.

田中篤, 田妻進, 滝川一. 若年・高齢発症原発性硬化性胆管炎の比較. 第49回日本胆道学会学術集会. 千葉, 2013.9.20.

田中篤, 田妻進, 滝川一. IgG4関連硬化性胆管炎と高齢発症原発性硬化性胆管炎の比較. 第17回日本

肝臓学会大会 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. 東京, 2013.10.10.

F. 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

図1 PSC・IgG4-SC 症例の年齢分布

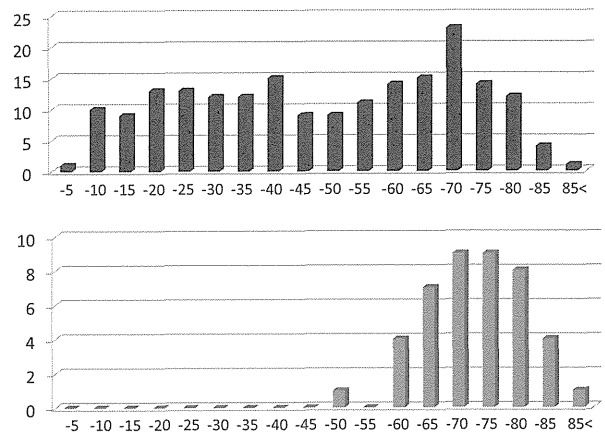


表1 診断時免疫グロブリン値

	IgA	IgM	IgG	IgG4	IgE
若年PSC	248 [43-1597]	168 [33-599]	1687 [508-3943]	43 [3-369]	145 [4-1816]
高齢PSC	324 [112-1110]	100 [24-411]	1547 [603-4456]	54 [4.4-238]	225 [15-1460]
P	<0.001	<0.001	NS	NS	NS
IgG4-SC	273 [53-963]	81 [20-247]	2303 [680-6615]	520 [22-2470]	703 [20-3550]

図2 診断時 IgG4値

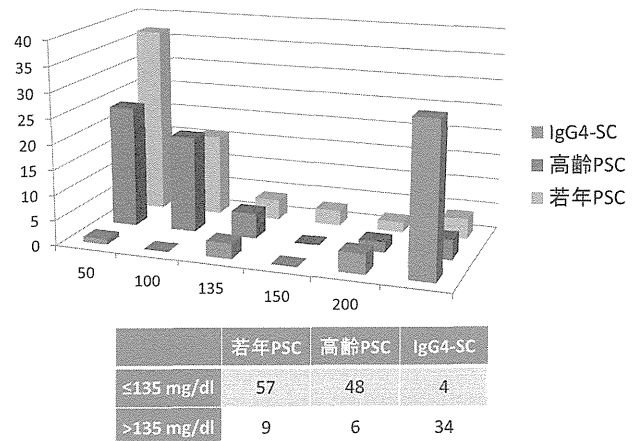
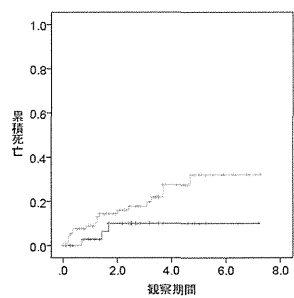
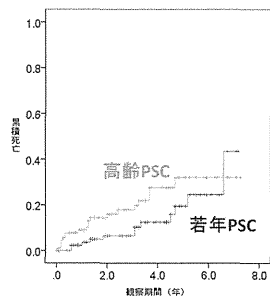


図3 生存曲線



平均観察期間
 若年PSC 2.9±2.0年
 高齢PSC 2.5±2.0年
 IgG4-SC 2.3±1.8年



死亡例
 若年PSC 12例
 高齢PSC 19例
 IgG4-SC 3例

原発性胆汁性肝硬変の障害胆管でのエネルギー代謝

研究分担者 中沼 安二 金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理 教授

研究要旨: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の障害胆管では解糖系から脂肪酸分解系へのエネルギー代謝へと誘導する PGC-1 α /ERR α の核発現を特異的に認め、脂肪酸分解系酵素 (CPT2), 酸化ストレスマーカー (8-OHdG), アポトーシス誘導分子 (Bak) も亢進していた。また、培養胆管細胞を用いた検討にて、PGC-1 α 発現を誘導した結果、脂肪酸分解系酵素、酸化ストレスマーカー、アポトーシス誘導分子の発現亢進とアポトーシス感受性の亢進が見られた。PBC の障害胆管では、解糖系から脂肪酸分解系への偏位にともなって、酸化ストレスに起因するアポトーシス感受性も亢進し、胆管消失を来す要因と考えられた。

共同研究者

原田 憲一 金沢大学形態機能病理学

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は、ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) を対応抗原とするミトコンドリア抗体 (AMA) の出現、また慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) および胆管細胞アポトーシス亢進による胆管消失を特徴とする。自己対応抗原である PDH はミトコンドリア内でピルビン酸からアセチル CoA へと変換する酵素で、解糖系エネルギー代謝の重要な酵素である。PDH 活性の制御分子である peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) /estrogen-related receptor α (ERR α) は、pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 (PDK4) の誘導により PDC-E1 α のリン酸化を介して PDH 活性を阻害し、脂肪酸分解系へのエネルギー代謝へと誘導する。我々は、PBC の CNSDC で特異的に PGC-1 α /ERR α の核発現が見られ、PDH 活性を阻害する PDK4 発現の亢進および PDH 活性の低下が見られることを報告してきた (Harada et al., J Clin Pathol, 2013)。今回、PBC の CNSDC におけるエネルギー代謝の変化および胆管消失との関連性について検討した。

B. 研究方法

in vitro study: 培養ヒト胆管細胞 2 株を用いて、低血清 (1%) による PGC-1 α 発現を誘導し、PGC-1 α 、脂肪酸分解系酵素 (carnitine palmitoyltransferase 2 [CPT2]), 酸化ストレス関連アポトーシス誘導分子 (BAX, BAK) の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。さらに、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の免疫染色と TRAIL (リコンビナント蛋白, 500ng/ml), Fas (CD95) 抗体 (CH-11, 100ng/ml) によるアポトーシス誘導を caspase 3-cleaved CK18 アッセイ (M30-Apoptosense) にて測定した。

in vivo study: PBC 26 例 (男 / 女 = 2 / 24, 全例 AMA 陽性) および対照群 (C 型慢性肝炎 [CH, C] 16 例, 原発性硬化性胆管炎 5 例, 自己免疫性肝炎 22 例) の肝針生検材料を用いて、PGC-1 α 、CPT2、8-OHdG、Bak に

対する免疫組織化学的染色を施行し、障害胆管を含めた小葉間胆管における発現を陰性 (-), 弱陽性 (+), 陽性 (++) の 3 段階に評価した。また、慢性胆管炎の活動度 (CA0~CA3) との関連性についても検討した。

C. 研究結果

培養ヒト胆管細胞を用いた検討にて、血清減量により PGC-1 α 発現を誘導した結果、CPT2, BAX, BAK の mRNA も発現亢進した (図 1)。8-OHdG の免疫染色では PGC-1 α 発現誘導にて核発現を示す陽性細胞が見られるようになり、酸化ストレスの誘導が示唆された。また、TRAIL, Fas 抗体によるアポトーシス誘導の亢進も見られた (図 2)。

肝組織を用いた免疫組織学的検討にて、PBC の CNSDC では活性型 PGC-1 α を示唆する強い核発現を特異的に認めたが、PBC の正常胆管や対照疾患の胆管では強い核発現を認めなかった。さらに PBC における活性型 PGC-1 α 発現は、慢性胆管炎の程度が高度になるにつれ発現亢進が見られた (図 3)。また、PBC の CNSDC を含めた障害胆管では CPT2, 8-OHdG, Bak の発現が対象疾患群に比べて亢進していた (図 4)。

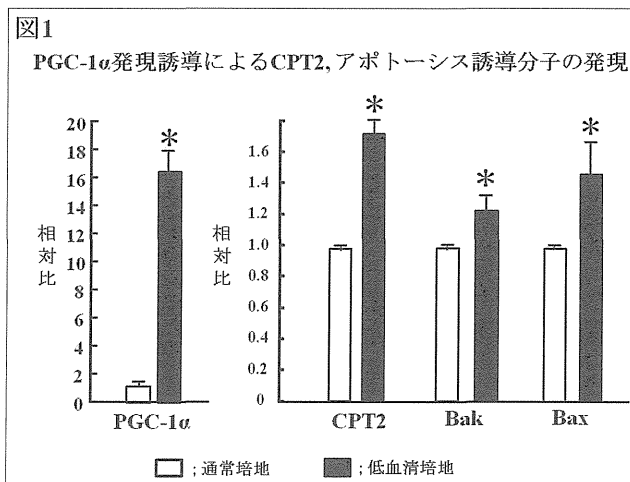


図2 PGC-1 α 発現誘導によるアポトーシス感受性亢進

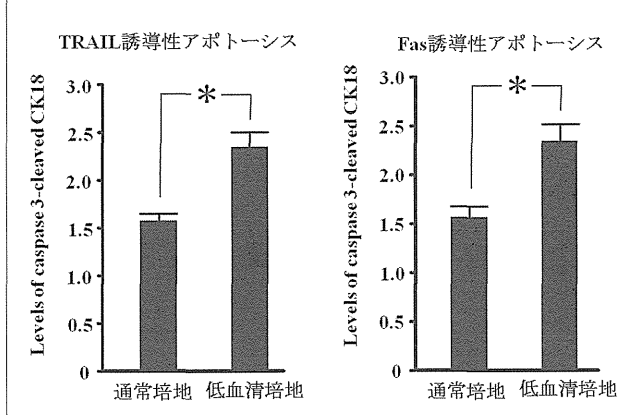


図3 胆管におけるPGC-1発現 PGC-1発現と胆管炎との関連

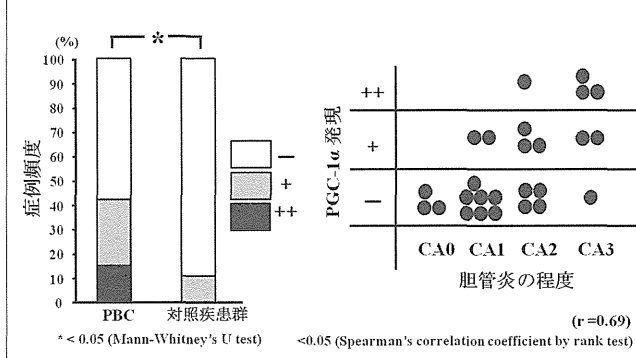
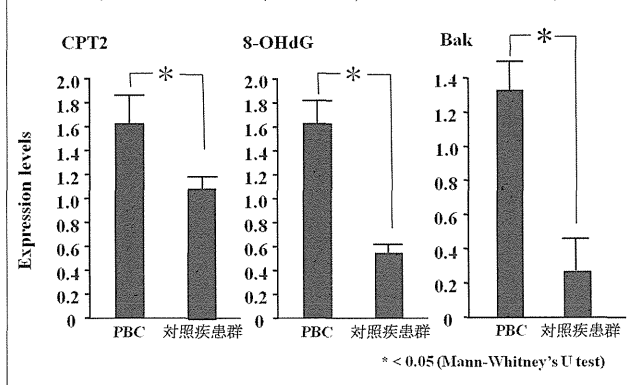


図4 胆管におけるCPT2, 8-OHdG, Bak発現の半定量解析



D. 考察

PBCの臨床病理学的特徴として、中年女性、AMA、胆管特異性の明確な3つの特徴が挙げられ、個々の特徴を解析する研究成果は多数報告されているが、3因子の相互関係のみならず2因子間の関連性を解析した研究もほとんどない。AMAの主要対応抗原であるPDHはE1, E2, E3の3つの酵素複合体(PDH complex, PDC)を形成し、ピルビン酸をアセチルCoAに変換するが、脂肪酸分解系もミトコンドリア内 β 酸化によりアセチルCoAを産生する。したがって、解糖系、脂肪酸 β 酸化ともにアセチルCoA産生を介したTCA回路でのATP産生に参与する。糖質に比べ脂肪酸からのATP産生量は多く、エネルギー産生効率は良いが、脂肪酸 β 酸化による酸化ストレ

スも発生する。酸化ストレスはDNA障害やアポトーシスに参与するが、PBCの胆管におけるエネルギー代謝からみた酸化ストレスの解析はなされていない。

我々はAMAの対応抗原であるPDHに注目し、PBC障害胆管の解析を行った結果、PBCのCNSDCでは、PGC-1 α / ERR α の核発現を特異的に認め、またPDK4発現亢進も見られたことから、PBC障害胆管ではPDH活性阻害による解糖系エネルギー代謝の抑制が示唆されることを報告してきた(Harada et al., J Clin Pathol, 2013)。PBC障害胆管における解糖系エネルギー代謝の低下が胆管障害の原因か結果かは不明であるが、いずれにせよ代償性に脂肪酸 β 酸化系の偏位がもたらされる可能性がある。

今回の検討により、培養胆管細胞の血清減量によるPGC-1 α 発現誘導により脂肪酸分解系酵素のひとつであるCPT2の発現亢進がみられ、脂肪酸代謝系への移行が確認できた。また、解糖系から脂肪酸分解系への偏位と胆管細胞傷害との関連性を検討した結果、脂肪酸代謝系への移行により、代謝関連のアポトーシス誘導分子であるBAX, BAKおよび酸化ストレスマーカーの発現亢進とアポトーシス感受性の亢進が見られた。すなわち、PBCの障害胆管では、 β 酸化における代謝ストレス(酸化ストレス)の増加に起因する胆管細胞死の感受性が亢進していることが示唆された。

E. 結論

PBCの障害胆管では通常の胆管とは異なるエネルギー代謝へ変化しており、代謝ストレスによるアポトーシス感受性亢進がPBC特異的な胆管病変の形成の発生に参与してい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

- Harada K, Hsu M, Ikeda H, Zeniya M, Nakanuma Y. Application and Validation of a New Histologic Staging and Grading System for Primary Biliary Cirrhosis. J Clin Gastroenterol 2013, 47 (2) :174-81
- Kakuda Y, Harada K, et al. Evaluation of a new histologic staging and grading system for primary biliary cirrhosis in comparison with classical systems. Hum Pathol 2013; 44 (6) : 1107-17
- Harada K, Hirohara J, Ueno Y, Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, Ichida T, Nakanuma Y. Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. Hepatology 2013 May;57 (5) :1942-9
- Nozaki Y, Harada K, et al. PPAR γ ligand attenuates portal inflammation in the MRL-lpr

mouse: a new strategy to restrain cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. Med Mol Morphol 2013.

- Harada K, Kakuda Y, Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y. Clinicopathological significance of serum fractalkine in primary biliary cirrhosis. Dig Dis Sci 2013 Jun 14.
- 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の新しい病期分類・活動度分類 病理と臨床 2013;31(2):210-12

2. 学会発表

- 原田憲一, 中沼安二. パネルディスカッション: 「自己免疫性肝疾患の現状と問題点」. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管におけるエネルギー代謝の変化. 第99回日本消化器病学会総会
- 角田優子, 原田憲一, 北村星子, 池田博子, 佐藤保則, 佐々木素子, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の診断時肝生検における予後予測. 第99回日本消化器病学会総会
- 小林水緒, 角田優子, 原田憲一, 池田博子, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)にみられるインターフェース肝炎の免疫病理学的相違に関する検討. 第99回日本消化器病学会総会
- 角田優子, 原田憲一, 岡藤啓史, 池田博子, 佐藤保則, 水腰英四郎, 金子周一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)肝生検における治療反応性・予後予測の可能性. 第49回日本肝臓学会総会
- 原田憲一, 佐藤裕英, 中村稔, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変におけるFractalkine発現とursodeoxycholic acidによる発現制御. 第49回日本肝臓学会総会
- 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の障害胆管と細胞内エネルギー代謝の関連. 第49回日本肝臓学会総会
- 小林水緒, 角田優子, 原田憲一, 池田博子, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)および自己免疫性肝炎(AIH)にみられるインターフェース肝炎の免疫組織学的, 組織学的検討. 第49回日本肝臓学会総会
- 吉田真理子, 太田肇, 羽柴智美, 矢野正明, 丹尾幸樹, 丸川洋平, 川島篤弘, 角田優子, 原田憲一, 中沼安二. 各種自己抗体および新病期分類から見た原発性胆汁性肝硬変の治療反応性. 第49回日本肝臓学会総会
- 原田憲一, 中沼安二. 原発性胆汁性肝硬変の胆管におけるendocytosis関連蛋白の発現. 第102回日本病理学会総会
- 原田憲一, 中沼安二. シンポジウム: 肝胆道疾患と免疫. 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序: エネルギー代謝の変化と細胞死の関与. 第50回日本消化器免疫学会総会
- 相葉佳洋, 原田憲一, 小森敦正, 阿比留正嗣, 長岡進矢, 右田清志, 伊東正博, 中沼安二, 八橋弘,

中村稔. 原発性胆汁性肝硬変の肝局所におけるTL1A産生機構の解明 第50回日本消化器免疫学会総会

- Harada K, Kakuda Y, et al. Clinicopathological significance of serum fractalkine and its regulation by ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y. 米国肝臓学会2013
- Harada K, Nakanuma Y. Alteration of energy metabolism and subsequent oxidative stress in the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. 米国肝臓学会2013

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

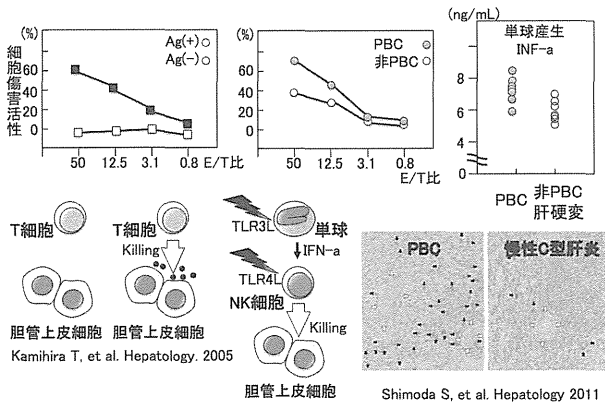
PBC における自然免疫から獲得免疫に至る胆管破壊の機序

研究協力者 下田 慎治 九州大学大学院 病態修復内科 講師

研究要旨: PBC は慢性非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) を病変の首座とする。我々はこれまでに生体移植時の摘出肝より胆管細胞, NK 細胞, 単球などを無菌的に選択し共培養する事で CNSDC の ex vivo モデルを作成してきた。このモデルを使用する事で活性化 NK 細胞が自己胆管細胞を傷害する事や, 抗ミトコンドリア抗体の対応抗原であるピルビン酸脱水素酵素 E2コンポーネント (PDC-E2) 抗原ペプチドを外的に付加した胆管細胞を PDC-E2反応性 T 細胞が傷害する事を示してきた。しかし, 自然免疫系の NK 細胞による胆管傷害が獲得免疫系の反応にどのように影響を与えるかが不明であった。今回 CNSDC に含まれる単球に着目して, NK 細胞による胆管傷害により胆管由来の PDC-E2タンパクが microparticle として細胞外に放出され, これを単球が貪食し, 抗原提示細胞として機能する事で, 自己反応性 T 細胞を活性化させることが可能である事を明らかにした。

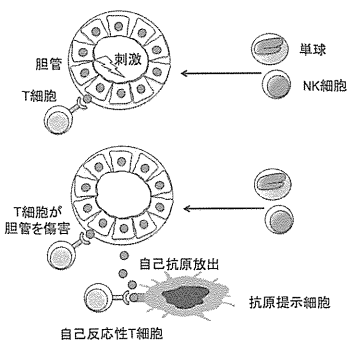
A. 研究目的

我々は PBC で標的となる胆管を中心にして下図のように, 獲得免疫系の細胞では T 細胞が (上段の左図), 自然免疫系の細胞では単球の産生する IFN- α (上段の右図) と Toll 様受容体4リガンド (TLR4L:LPS)



で活性化された NK 細胞が (上段の中央図), 自己の胆管を認識して破壊することを明らかにしてきた。

今回は, NK 細胞による胆管破壊を起点として左図のように T 細胞による胆管認識が可能となるかについて ex vivo で慢性非化膿性破壊性胆管炎を再構築して検証を行った。

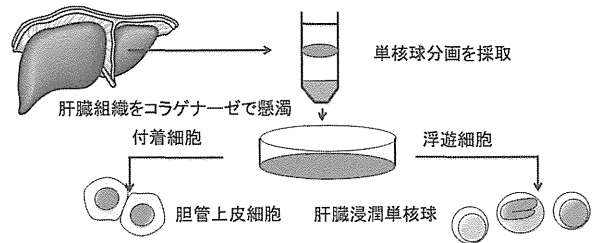


B. 研究方法

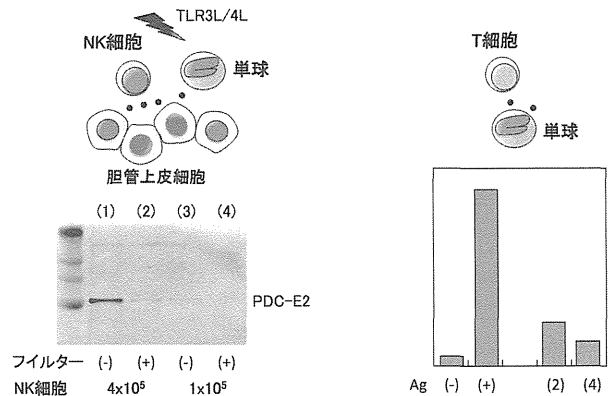
次ページの図に示すように, 生体肝移植の際の摘出肝より, マイクロビーズを用いて胆管上皮細胞, NK 細胞, 単球などを採取した。IFN- α , TLR3L:polyI:C 刺激で活性化した NK 細胞による胆管細胞破壊の系を

用いて, 胆管細胞を破壊させた場合の培養上清を採取して, 超遠心後1.2 μ m のフィルターに通す事で microparticle を得た。この particle 内に PDC-E2タンパクが含まれている事を Western Blot 法で確認した。

また, この particle を抗原として単球に貪食させたものを抗原提示細胞として, PDC-E2反応性 T 細胞クローンが反応性を示すかを3H-TdR を用いた T 細胞増殖アッセイで確認した。



C. 研究結果



活性化した NK 細胞による胆管細胞破壊の系を用いると上図左に示すように, フィルターを通さない場合 ((1), (3)) NK 細胞の細胞数に比例して破壊された胆管上皮細胞由来の PDC-E2抗原が Western Blot 法で確認できた。フィルターを通して上清から particle を取り出した場合 ((2), (4)) にも, particle 内に

PDC-E2抗原が含まれていた。

上図右に示すように、この(2)、(4)のparticleを抗原として単球に貪食させたものを抗原提示細胞とした場合も、Ag(+)で示すようにPDC-E2抗原を貪食させた場合と同様に、PDC-E2反応性T細胞クローンは増殖活性を示すことを3H-TdRの取り込みで確認する事が出来た。

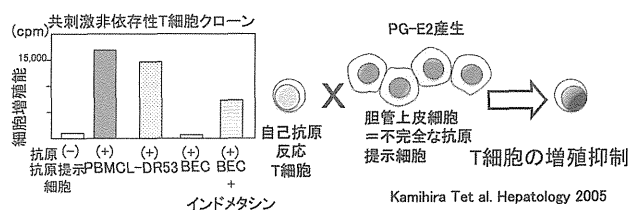
以上まとめると、胆管上皮細胞が自己のNK細胞によって傷害を受けた場合、細胞外に放出する微粒子中にはPDC-E2が含まれており、この微粒子を負荷した単球もPDC-E2反応性T細胞クローンを活性化させた。このことから単球は傷害胆管から放出された自己抗原を含む微粒子を貪食後、自己抗原を提示することで獲得免疫系を活性化させることが明らかとなった。

D. 考 察

胆管上皮細胞が自然免疫刺激で活性化され、遊走してきた単球、NK細胞により傷害を受け、胆管上皮細胞が放出する自己抗原を単球が提示して、自己反応性T細胞が活性化される一連の自然免疫から獲得免疫の異常へと移行する経路のひとつが明らかとなった。

しかし、胆管上皮細胞は下図のようにプロスタグランジンE2(PG-E2)を産生してT細胞の増殖抑制を行う事も明らかとなっている。

そこで今後は胆管上皮細胞の免疫制御機能と促進機能の両方に注目して慢性非化膿性破壊性胆管炎の病態を明らかにする事が重要であると考えられた。



E. 結 論

胆管上皮細胞はPBCにおいて慢性非化膿性破壊性胆管炎の標的細胞となる一方、抗原放出を行う事で積極的に免疫に関与している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Maruyama T, Tanabe Y, Satoh T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Efficacy of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment on the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: A prospective, multicenter study.

J Hepatol. Mar;58 (3) :495-501, 2013.

- 2) Ikegami T, Shirabe K, Fukuhara T, Furusyo N, Kotoh K, Kato M, Shimoda S, Aishima S, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y.

Early extensive viremia, but not rs8099917 genotype, is the only predictor for cholestatic hepatitis C after living-donor liver transplantation.

Hepatol Res. Jun;43 (6) :621-9, 2013.

- 3) Ikegami T, Shirabe K, Yoshizumi T, Furusyo N, Kotoh K, Kato M, Shimoda S, Soejima Y, Motomura T, Fukuhara T, Maehara Y.

Impact of conversion from pegylated interferon- α 2b to interferon- α 2a for treating recurrent hepatitis C after liver transplantation.

Transplantation. Mar 27;95 (6) :e38-42, 2013.

- 4) Furusyo N, Ogawa E, Nakamuta M, Kajiwara E, Nomura H, Dohmen K, Takahashi K, Satoh T, Azuma K, Kawano A, Tanabe Y, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J.

Telaprevir can be successfully and safely used to treat older patients with genotype 1b chronic hepatitis C.

J Hepatol. Aug 59 (2) :205-212, 2013

- 5) Ogawa E, Furusyo N, Nakamuta M, Kajiwara E, Nomura H, Dohmen K, Takahashi K, Satoh T, Azuma K, Kawano A, Tanabe Y, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J Clinical milestones for the prediction of severe anemia by chronic hepatitis C patients receiving telaprevir-based triple therapy.

J Hepatol. 2013 Oct;59 (4) :667-74.

- 6) Harada K, Kakuda Y, Nakamura M, Shimoda S, Nakanuma Y.

Clinicopathological Significance of Serum Fractalkine in Primary Biliary Cirrhosis.

Dig Dis Sci. 2013 Oct;58 (10) :3037-43.

- 7) Aiba Y, Harada K, Komori A, Ito M, Shimoda S, Nakamura H, Nagaoka S, Abiru S, Migita K, Ishibashi H, Nakanuma Y, Nishida N, Kawashima M, Tokunaga K, Yatsushashi H, Nakamura M.

Systemic and local expression levels of TNF-like ligand 1A and its decoy receptor 3 are increased in primary biliary cirrhosis.

Liver Int. 2013 Aug 2. doi: 10.1111/liv.12296.

- 8) Sumida K, Shimoda S, Iwasaka S, Hisamoto S, Kawanaka H, Akahoshi T, Ikegami T, Shirabe K, Shimono N, Maehara Y, Selmi C, Gershwin ME, Akashi K.

Characteristics of Splenic CD8 $^{+}$ T Cell Exhaustion in Patients with Hepatitis C.

Clin Exp Immunol. 2013 Oct;174 (1) :172-8.

2. 学会発表

原発性胆汁性肝硬変発症と病態維持に関わる機序の

解明 第49回日本肝臓学会総会2013年6月6日（東京）

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

PBC 患者肝におけるトランスポーターの変化

研究協力者 向坂 彰太郎 福岡大学 消化器内科 教授

研究要旨：我々はこれまで、PBC 患者肝細胞の種々のトランスポーターが病状の進行につれて変化することを報告してきた。PBC 肝硬変患者では肝内 OATP1 (Gd-EOB-DTPA を取り込む) の発現が低下する事、PBC 肝硬変患者の RE 値は正常者に比べて有意に低下していることを報告した。今回、PBC 肝硬変患者の代表的 MRI 造影剤である EOB の取り込み (OATP1B) に関わるトランスポーターの発現の局在とその変化について検討を行った。結論：PBC 肝硬変患者における OATP1B3 の発現消失は、中心静脈周囲に起こっていた。

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) 患者肝細胞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に着目した。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 OATP 1 (organic anion transporter 1) (Fig.1) により肝臓内に取り込まれ、毛細胆管膜の MRP2 (multidrug resistance associated protein2) により毛細胆管内に排出される性質がある。我々は 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事を証明してきた。さらに、Gd-EOB-DTPA MRI の RE (Relative Enhancement) 法での信号強度を比較して、PBC 肝硬変患者の RE 値は正常者に比べて有意に低下していた。今回は PBC 肝硬変患者 OATP1 の発現分布について検討した。

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。PBC 肝硬変患者 (Child Pugh A) について以下の検討を行った。

1. OATP1B3 の免疫組織化学的局在の検討は、(Anti-SLCO1B3 抗体: Sigma) を用い、また胆管上皮マーカーとして CK19 抗体 (Cell Signaling) を用いて、共焦点レーザー顕微鏡 [LSM5 PASCAL; Zeiss 社]、レーザースキャン顕微鏡 [AxioImager M1; Zeiss 社] で観察した。

C. 研究結果

PBC 肝硬変患者における OATP1B3 の発現は対照肝に比し減弱し、特に中心静脈周囲の肝細胞において減弱ないし消失していた (Fig. 2, Fig. 3)。

D. 考察

OATP1B3 の発現は、胆汁酸による CAR, PXR 刺激による調節されている。PBC 肝硬変では上記作用の破綻などにより中心静脈周囲から脱落しているかもしれない (Fig. 4)。今後機序解明が必要である。

E. 結論

- ① PBC 肝硬変患者における EOB-MRI 検査は PBC の病期評価に有用である可能性がある。
- ② PBC 肝硬変患者における肝細胞の OATP1B3 の発現低下は、中心静脈周囲より起こってい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

竹山康章, 入江真, 釈迦堂敏, 早田哲郎, 向坂彰太郎「PBC 患者肝におけるトランスポーターの変化～トランスポーターの変化と臨床応用」第45回 日本臨床分子形態学会, 2013, 福岡

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

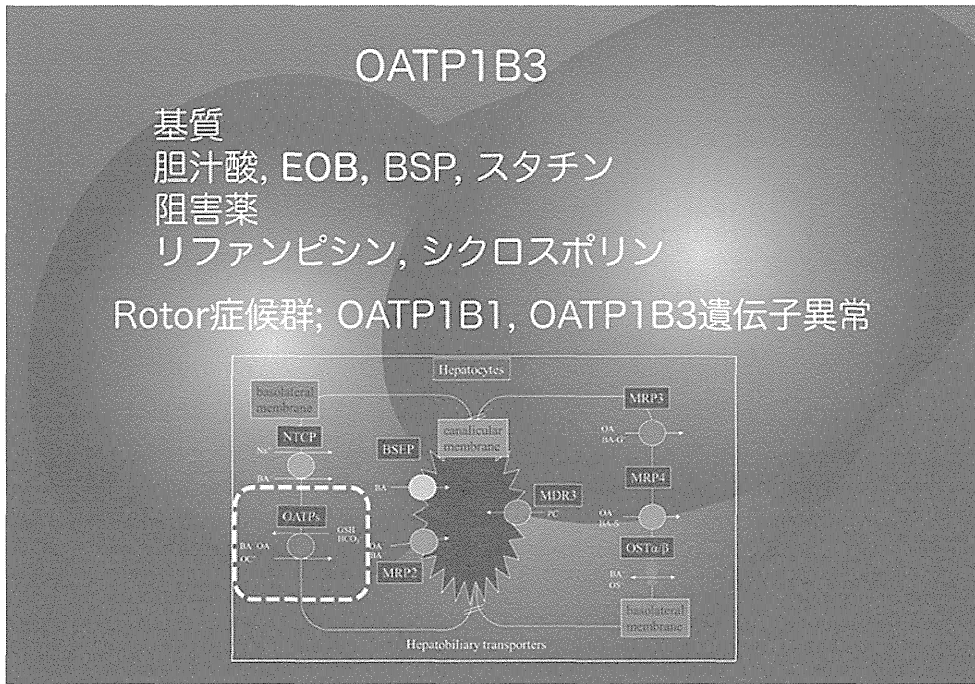


Fig.1

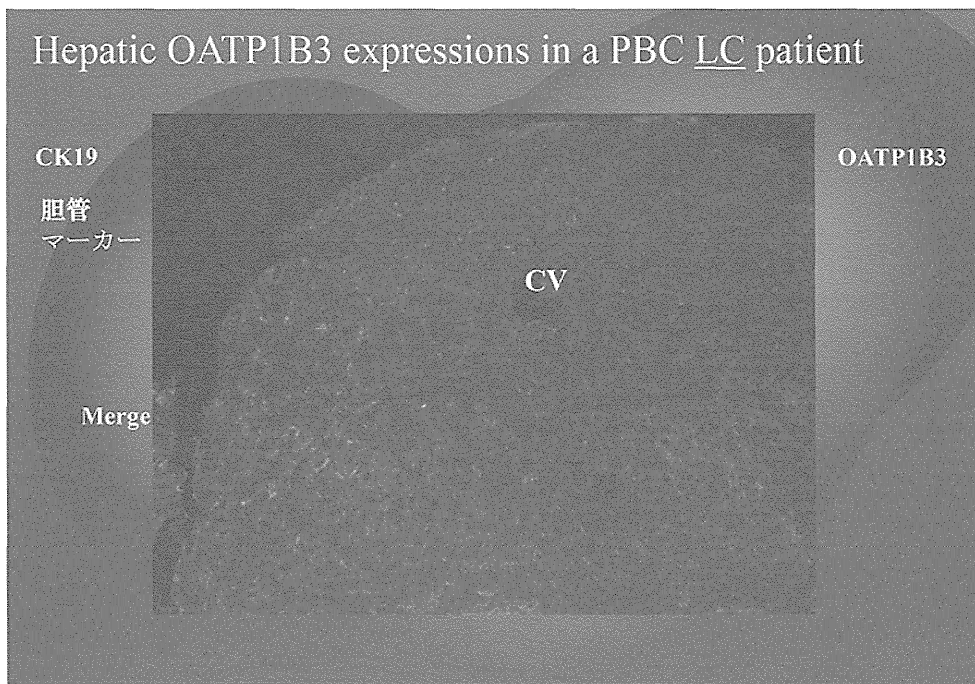


Fig.2

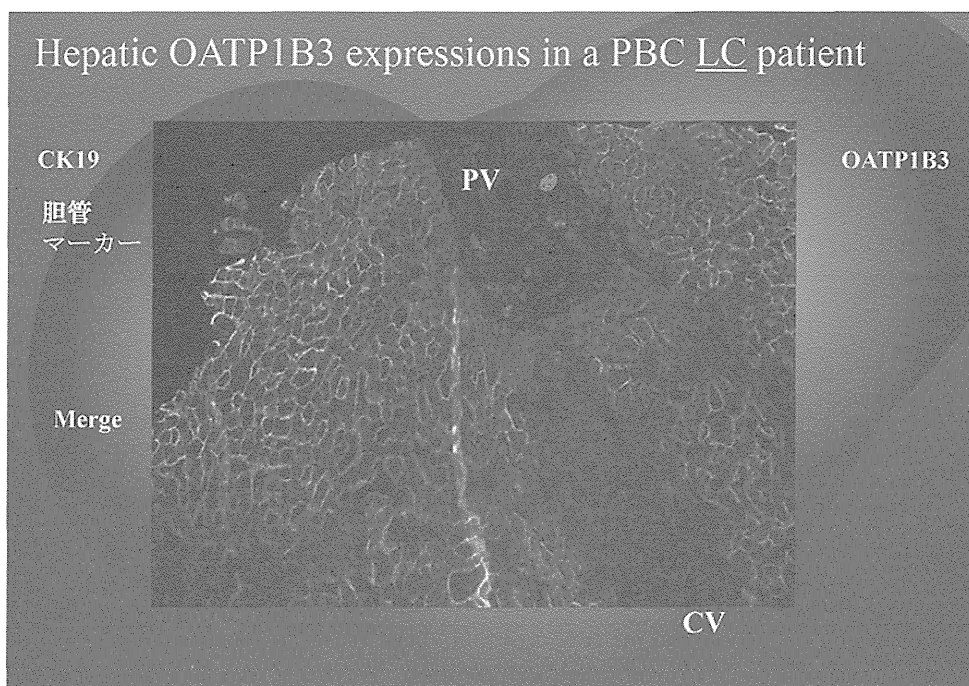


Fig.3

OATP1の発現について
PBC non LC VS PBC LC

PBC non LC	PBC LC
	中心静脈周囲から消失してゆく？
胆汁酸によるCAR, PXR 刺激	代償機構の破綻？

Fig.4

PBC 病態形成における Organic Cation Transporter 1 (OCT1) の関与

研究協力者 中牟田 誠 国立病院機構九州医療センター 消化器内科 医長

研究要旨: PBC 肝(細胞)においては、疎水性胆汁酸の親水化ならびに貯留した細胞内コレステロールを VLDL (リポ蛋白) として細胞外に分泌するために、フォスファチジルコリン (PC) が大量に消費されている。PC は各々コリンとエタノールアミンより生合成されるが、PBC 肝細胞内のコリン濃度は正常に比べて、著明に低下していた。一方、細胞外(血清)のコリン濃度は逆に PBC が高値であった。コリンは OCT1 により細胞内に取り込まれるが、我々は、その SNP が PBC の発症や進行に関与することを報告しており、今回、その SNP と OCT (rs683369, rs622342) の遺伝子ならびに蛋白発現との関連について検討を行った。OCT1 の遺伝子発現はドミナント (非進行型)、バリエントフォーム (進行型) いずれでも正常に比べて亢進していたが、一方、蛋白発現はバリエントフォームではドミナントフォームに比べて著明に低下していた。以上のことは、進行型のバリエントフォームの OCT1 をもつ場合に、OCT1 によるコリンの取り込みが不十分のために、細胞内コリン~PC の低下を来とし、さらに胆汁中の PC 低下とそれに伴う疎水性胆汁酸の親水化が低下し、疎水性胆汁酸による胆管障害が惹起・進行することが推測された。

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
- 福島 伸良 九州医療センター
- 中村 稔 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 (図 1)

PBC は自己免疫疾患として捉えられているが、実際の治療においては、ステロイドなどの免疫抑制は無効であり、ウルソ酸による胆汁の親水化が第一選択薬となっている。近年、ベザフィブレートが第二選択薬となっているが、その作用機序としては、肝細胞の毛細胆管側にある MDR3 (リン脂質排出ポンプ) を活性化させ、胆汁中へフォスファチジルコリン (PC) (リン脂質) を排出し、胆管障害を惹起する疎水性胆汁酸をミセル化することが考えられている。事実、MDR3 の発現は PBC において亢進しており、PC がより消費されていることが推測される。一方、PC はリポ蛋白 (VLDL) の膜成分であり、PBC においては胆汁排出障害に伴う細胞内コレステロールの貯留に伴い、VLDL によるコレステロールの排出が亢進しており、ここでも PC の消費がなされていることが考えられる。

PC はコリン (CDP コリン経路) とエタノールアミン (メチル化経路) より合成される。PBC では、CDP コリン経路の亢進はなく、メチル化経路の代償性の亢進が認められる。また、組織中のコリン濃度は極めて低下しており、これらのことは、PC 消費に伴う細胞内コリンの枯渇を示唆している。コリンは血中

よりそのトランスポーターである OCT1 より取り込みがなされる。PBC においては正常に比べて、大きく OCT1 の遺伝子発現は増加しているが、一方、血中コリン濃度は PBC において低下せず逆に上昇している。

OCT1 はコリン以外にもメトフォルミンなどの薬剤のトランスポーターでもあり、その SNP がその機能に関与することが数多く報告されている。我々は、その SNP の rs683369, rs2282143, rs622342 が PBC の発症や進行に関与することを報告してきた (Ohishi Y, Nakamuta M, et al. J Gastroenterol. 2013 Apr 24)。すなわち、これらのバリエントフォーム (VF) はドミナントフォーム (DF) に比べて、PBC の進行した病態に多いことが判明した。

今回、rs683369, rs622342 と実際の OCT1 の遺伝子ならびにその蛋白発現について検討を行ったので報告する。

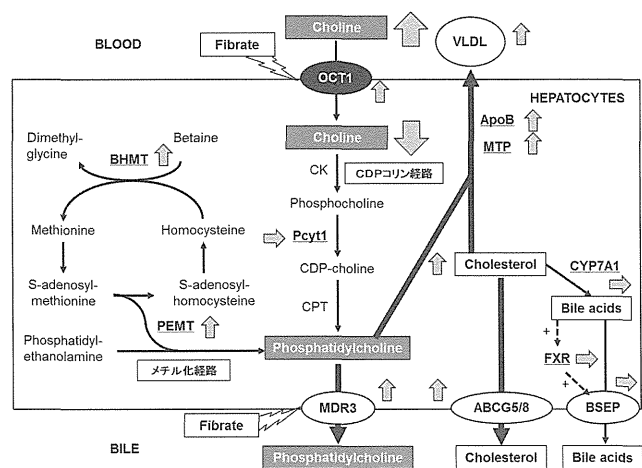


図 1

B. 研究方法

SNPs の解析は TaqMan probe method により行った。肝生検サンプルを用いて、遺伝子発現は Real-

time RT-PCRにより、蛋白レベルはWestern Blot法により解析を行った。

C. 研究結果

OCT1の遺伝子発現に関しては、PBC肝では正常肝に比べて、rs683369とrs622342のVFとDFのいずれにおいても2倍以上に有意に発現が亢進していた(図2A)。また、その遺伝子発現はVF+VF > VF(rs683369) + DF(rs622342) > DF + DFの傾向が認められた。

一方、OCT1の蛋白レベルに関しては、VF+VFでは、DF+DFに比べて著明にその発現レベルは低下していた(図2B)。また、各々のVF+DFでは、その蛋白発現レベルは、VF+VFとDF+DFの発現レベルの中間を示した。

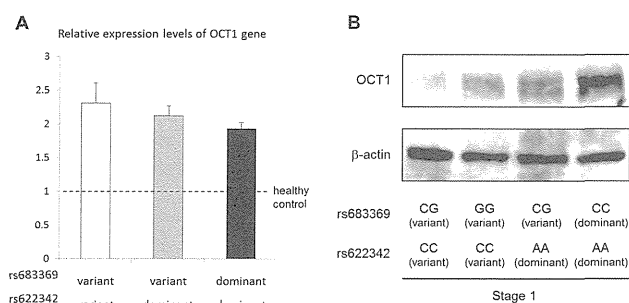


図2

D. 考察

rs683369のSNPに関しては、Phe 160 Leuのアミノ酸置換を伴い、OCT1蛋白の発現量が低下することがすでに報告されており、今回の結果に合致するものと思われた。rs622342に関しては、イントロンに存在しアミノ酸置換は伴わないが、メトホルミンの効果(取り込み)が減弱することが報告されている。今回の検討では、遺伝子発現レベルはむしろ亢進するものの、蛋白レベルでは減少しているため、rs622342は、mRNAの安定性や蛋白翻訳に影響を及ぼしているのかもしれない。従って、PBCの進行した症例に多く認められるrs683369、rs622342のVFをもつ症例では、肝細胞におけるOCT1の蛋白レベルが減少しており、コリンの取り込みが低下していることが考えられる。この低下は、細胞内コリン~PCの低下を来とし、さらには、胆汁中のPC低下とそれに伴う疎水性胆汁酸の親水化が低下し、疎水性胆汁酸による胆管障害が惹起・進行することが考えられる。

PBCの病態形成をコリン~PCのAxisより考えると、生理的な状況においては、疎水性胆汁酸による胆管障害をMDR3を介したPCの排出によりミセル化して防御しているものと思われる。そこに何らかの原因(細菌性胆管炎、LPS、年齢、化学物質など)で胆管障害が加わった場合に、よりPCを分泌して代償しているものと思われるが、OCT1によるコリンの取り込みが不十分な遺伝的背景をもつ場合には、コリンと

PCが枯渇し、ついには、胆管障害に対応できないことが想像される。胆管障害はOCT1そのものの発現を低下させることが報告されているので、いったんそのような状況に陥ると悪循環に入ってしまう、さらなるコリン~PC不足が生じて胆管障害が悪化する可能性がある。このような胆管障害はひいては胆管上皮の変性を生じて、最終的に免疫応答(慢性非可能性破壊性胆管炎:CNSDC)や胆管上皮のアポトーシスを惹起しているのかもしれない(図3)。胆道系酵素上昇がありAMA陽性であるが、組織学的に明らかなCNSDCがまだ出現していない症例において、SNSCDのある症例と同様にMDR3の発現がすでに亢進していることは興味をもたれる点である。

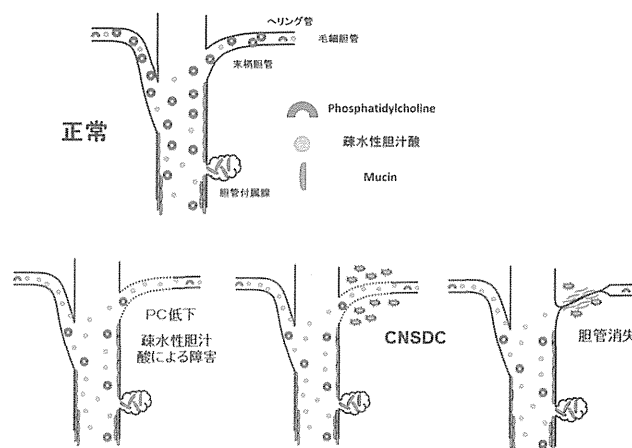


図3

PBCの治療においては、先述のように、胆汁の親水化を目指した治療である、ウルソ酸が第一選択であり、効果不十分の場合に、フィブレートが併用される。治療をOCT1~コリン~PC~MDR3の経路の観点から考えた場合に、セカンドラインであるベザフィブレートはMDR3のみならずOCT1の発現も増加させることが報告されており、PBCにおいてはMDR3はすでに代償性に発現が亢進しており、ベザフィブレートはむしろOCT1に強く作用している可能性がある。事実、ベザフィブレートの投与によりPBC症例の血清コリン値は有意に低下する。OCT1はPPAR γ により正に制御されているので、ピオグリタゾンも効果があるのかもしれない。PBCにおいては、コレステロールをVLDLとして排出するためにPCが消費されているので、細胞内コレステロールを減少をさせるスタチンやエゼチミブも効果が期待される。最後に脂肪肝の治療薬でPCそのものであるEPLの投与もよいのかもしれない。多くの症例は、ウルソ酸またはウルソ酸+ベザフィブレートの投与により胆道系酵素の上昇は正常化されるが、治療抵抗性の症例に関しては、今後、これらの薬剤の効果が期待される。

E. 結論

PBCの発症とその病態進行にOCT1のSNPsが関与することが報告されているが、その機序のひとつと

しては、蛋白発現が減少することが関与しているものと思われた。OCT1の蛋白発現低下は、コリンの取り込みの低下、ひいてはPCの合成低下をもたらし、疎水性胆汁酸による胆管障害を惹起・促進することが示唆された。従って、PBCの病態形成にコリン～PC代謝が重要であることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohishi Y, Nakamuta M, Ishikawa N, Saitoh O, Nakamura H, Aiba Y, Komori A, Migita K, Yatsunami H, Fukushima N, Kohjima M, Yoshimoto T, Fukuizumi K, Ishibashi M, Nishino T, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Ishibashi H, Nakamura M; PBC Study Group of NHOSLJ.

Genetic polymorphisms of OCT-1 confer susceptibility to severe progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients.

J Gastroenterol. 2013 Apr 24. PMID:23612856

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

PBC における脂質代謝の検討 (7): UDCA 投与時のコレステロール・胆汁酸代謝

研究協力者 松崎 靖司 東京医科大学茨城医療センター 病院長 消化器内科教授

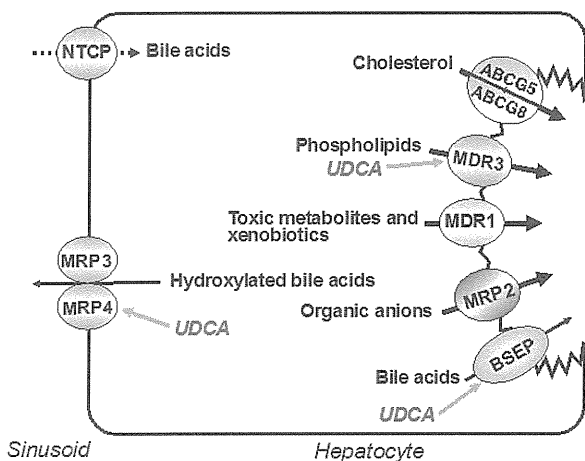
研究要旨: PBC に対する UDCA の作用機序はいまだ完全には解明されていない。そのメカニズム解明を目的として、PBC 患者における UDCA 治療前後の血清バイオマーカー分析と肝組織の遺伝子発現解析を行った。その結果、実験動物や培養肝細胞でみられるような UDCA の肝排泄トランスポーター促進作用は PBC 患者では認められなかった。UDCA による抗胆汁うっ滞、抗炎症作用の機序としては、細胞傷害性の強い通常の胆汁酸に対する replacement 作用が中心であると推測された。

共同研究者

本多 彰 東京医科大学茨城医療センター
宮崎 照雄 東京医科大学茨城医療センター
中牟田 誠 九州医療センター
国府島庸之 九州医療センター

A. 研究目的

実験動物や培養肝細胞において、UDCA は胆汁酸排泄を行う毛細胆管側の BSEP と類洞側の MRP4、およびリン脂質排泄を行う毛細胆管側の MDR3 の活性を亢進するといわれている。しかし、未治療の PBC 患者のこれらトランスポーターは既に活性化されていると報告されており、UDCA の治療効果がトランスポーター活性のさらなる上昇によるものか否か不明である。本研究は、UDCA による抗胆汁うっ滞、抗炎症作用のメカニズム解明を目的として、UDCA 治療前後の血清バイオマーカー分析と肝組織の遺伝子発現解析を行った。



B. 研究方法

実験1: 血清マーカー分析

未治療の PBC 患者 (Stage1 or 2) 31 例に対して UDCA 治療 (600mg/day) を開始し、開始前と 3 ヶ月後の血清を分析して比較した。肝・胆道系酵素、IgM、血清脂質の他に、胆汁酸分画、コレステロール合成・吸収マーカー、胆汁酸合成マーカー、酸化ステ

ロールは LC-MS/MS 法にて定量し、胆汁酸分泌マーカーである Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) は ELISA 法にて定量した。

実験2: 肝組織 mRNA 発現定量

未治療の PBC 患者 3 例に対して UDCA 治療 (600-900mg/day) を開始し、開始前と胆道系酵素正常化後に行った肝生検組織の一部から RNA を抽出した。cDNA を調製後、real-time PCR 法にて肝トランスポーター系、および胆汁酸合成酵素系の mRNA 発現定量を行った。

C. 研究結果

実験1: 血清マーカー分析

PBC 患者への UDCA (600mg/day) 3 ヶ月間の投与によって、末梢血 UDCA の比率は平均で約 75% に上昇し、AST, ALT, γ GTP, ALP, IgM はいずれも有意に低下した。血清総コレステロール、中性脂肪、コレステロール合成マーカー (lathosterol)、胆汁酸合成マーカー (C4)、胆汁酸分泌マーカー (FGF19)、酸化ステロールには有意な変化を認めなかったが、コレステロール吸収マーカーの sitosterol と campesterol が有意に増加した。

実験2: 肝組織 mRNA 発現定量

UDCA 治療前後で肝のトランスポーター発現を比較したところ、毛細胆管側の BSEP (胆汁酸排泄)、MDR3 (リン脂質排泄)、ABCG5/ABCG8 (コレステロール排泄)、MRP2 (ビリルビン排泄)、MDR1 (薬物排泄)、および類洞側の MRP3/MRP4 (胆汁酸排泄)、NTCP (胆汁酸取り込み) には、いずれも有意な変化を認めなかった。一方、胆汁酸合成系についても、胆汁酸合成のフィードバック因子である核内レセプター SHP のほか、Classic pathway の CYP7A1 と CYP8B1、Alternative pathway の CYP27A1 と CYP7B1 には、いずれも有意な変化を認めなかった。

D. 考察

実験動物や培養細胞を用いた実験では、UDCA は胆汁酸およびリン脂質排泄のトランスポーター発現を亢進することが示されており、PBC に対する効果もこれらのトランスポーターの活性化で説明されている。しかし PBC 患者では、胆汁うっ滞に対する生体