

2例(17%), 腸腰筋血腫1例(8%), アスペルギルス肺炎1例(8%), カテーテル感染1例(8%)が認められた。

#### (2) B型急性肝不全：無症候性キャリア急性増悪例

対象は13例(平均年齢49±12歳, 男性9例)で5例が基礎疾患を有し(関節リウマチ2例, GIST 1例, 悪性リンパ腫1例, HIV感染症1例), 4例で免疫抑制療法もしくは化学療法が施行されていた。入院時の血液検査結果はALT 968±552 IU/l, T-Bil 12.6±8.9 mg/dl, PT 33±11%, AFP 225±272 ng/dl, HGF 6.5±9.7 ng/dl, HBV-DNA 6.4±1.7 log copy/mlであった。治療内容は免疫抑制療法に関してはステロイドの初期投与量はMPSL1000 mg 6例, 500 mg 1例, PSL60 mg 5例, 40 mg 1例で重症化の診断からステロイド投与開始までの期間は平均5.2±4.6日, ステロイド投与期間は平均53.5±53.1日で早期投与11例, 非早期投与2例であり, 核酸アナログに関してはLMV 6例, ETV 7例であった。7例(54%)が内科的治療により救命され, 5例(38%)が死亡(肝不全関連死4例, 合併症関連死1例), 1例(8%)で生体肝移植療法が施行された。治療反応性(図5-8)に関しては治療開始2週後にALTの有意な低下とPTの有意な上昇が認められ, HBV-DNAも有意に低下し平均低下量は1.7±0.9 log copy/dlであった。生存群と死亡/肝移植群の比較(表2)では入院時において死亡/肝移植群で劇症化している症例が有意に多く, 治療反応性(図9-12)に関して治療開始2週後にALTは両群で有意な低下が認められたがPTの有意な上昇が認められたのは生存群のみであった。HBV-DNAは生存群のみで治療開始2週後に有意な低下が認められ平均の低下量は2.1±0.8 log copy/dlであった。治療合併症としてニューモシスチス肺炎が2例(16%), サイトメガロ肺炎が1例(8%), MRSA腸炎(8%)が1例に認められた。

#### D. 考察

B型急性肝不全急性感染例の病早期においては抗ウイルス療法単独より, 免疫抑制療法を併用した方が早期のTransaminaseの低下およびそれに伴う肝合成能(PT)の改善を有意に得ることができる。早期に肝機能の回復を得ることで肝不全および治療に伴う合併症, 特に感染症や出血に関して対処がしやすくなり, 結果として救命率の改善につなげることができる。免疫抑制療法に関しては比較的短期間の使用ながら日和見感染の合併も認められており注意を要する。

無症候性キャリア急性増悪の治療において早期のHBV-DNA減少が予後に関連するとの報告があるが, 重症例に対する免疫抑制療法・核酸アナログ併用療法においても良好な抗ウイルス効果が得られ, 生存(回復)例においてより顕著であった。重症例は高度のウイルス増殖を伴う肝細胞壊死が持続・進展することが多いため, 核酸アナログによる抗ウイルス効果が発揮されるまでの間に炎症を制御する治療が必要であり,

免疫抑制療法の併用は合理的な治療戦略である。併用療法の合併症として, 肝機能低下および免疫抑制療法による易感染性に起因する日和見感染が認められており, 適切な重症化の定義を行ない, その診断の上に対応する必要がある。

#### E. 結論

B型急性肝不全急性感染例に対する抗ウイルス療法と免疫抑制療法の併用は, 抗ウイルス療法単独と比較して, 早期の肝炎鎮静化と肝合成能回復が得られる。結果として, 劇症化例・肝移植必要例の減少が期待できる。

HBVキャリア急性増悪重症例における免疫抑制療法・核酸アナログ併用療法は良好な抗ウイルス効果を示し, 有効な治療である。内科的治療による救命率を改善するためには適切な重症化の診断に基づき早期から高用量かつ十分な期間のステロイド投与が必要である。また, 本邦においてもB型肝炎そのものの発症を予防するuniversal vaccineについての検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) [Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O.](#) Corticosteroid for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Dec;25(12):1492.
- 2) [Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O.](#) Letter: treatment of autoimmune acute liver failure--beyond consensus guidelines. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013 Nov;38(9):1143-4.
- 3) [Fujiwara K, Ohtsuka M, Yokosuka O.](#) Radiologic and Histologic Heterogeneity in a Case of Autoimmune Acute Liver Failure. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Aug 17.
- 4) [Fujiwara K, Seza K, Fukuda Y, Nakano M, Yokosuka O.](#) A case of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis overlap showing acute presentation and transient seropositivity for immunoglobulin G and anti-nuclear antibody. *Clin J Gastroenterol* 2013; 6: 465-469.
- 5) [Kanda T, Kato K, Tsubota A, Takada N, Nishino T, Mikami S, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O.](#) Platelet count and sustained virological response in hepatitis C treatment. *World J Hepatol.* 2013 Apr 27;5(4):182-8.
- 6) [Fujiwara K, Yasui S, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O.](#) Efficacy of high-dose corticosteroid in the early stage of viral acute liver failure. *Hepatol Res.* 2013 Apr 26.

7) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, Yokosuka O. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. Int J Med Sci. 2013;10(5):567-74.

8) Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, Tsubota A, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 2 who failed previous interferon therapy. Int J Med Sci. 2013;10(1):43-9.

2. 学会発表

1) 安井伸, 藤原慶一, 中村昌人, 宮村達雄, 新井誠人, 神田達郎, 今関文夫, 横須賀収. B型急性肝不全(急性感染例)の検討. 第25回重症患者管理研究会(千葉) 2013.9.28

2) 安井伸, 藤原慶一, 横須賀収. HBVキャリア重症化の定義と核酸アナログ+ステロイド併用療法. 第39回急性肝不全学会(東京) 2013.6.5

3) 藤原慶一, 安部隆三, 織田成人, 横須賀収. 急性肝不全に対する人工肝補助の現状と high flow-volume HDF の展望. 第39回急性肝不全学会(東京) 2013.6.5

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

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

表2 生存群, 死亡/肝移植群の臨床・血液生化学的背景

生存群 vs 死亡/肝移植群			
	生存	死亡/肝移植	p
N	7	6	
年齢 (years)	45.3 ± 10.3	53.2 ± 12.6	0.25
性別 (M/F)	6/1	3/3	0.27
劇症化(入院時)	1	5	0.03
ステロイド早期投与/非早期投与	6/1	5/1	1.00
LMV/ETV	4/3	3/3	1.00
PT (%)	36 ± 11	29 ± 11	0.28
ALT (U/l)	1048 ± 628	875 ± 488	0.59
T-Bil (mg/dl)	12.7 ± 10.7	12.4 ± 7.1	0.97
AFP (ng/ml)	134 ± 234	351 ± 296	0.21
HGF (ng/ml)	1.9 ± 1.2	12.5 ± 12.3	0.13
HBV-DNA(log copies/ml)	6.7 ± 1.6	6.0 ± 1.9	0.49
HBV-DNA低下量(log copies/ml)			
Week 0-2	-2.1 ± 0.8	-1.2 ± 0.9	0.16
Week 2-4	-1.4 ± 0.8	-1.8 ± 1.8	0.72

Mean ± SD

図1 治療開始後のALTの推移(急性感染例)

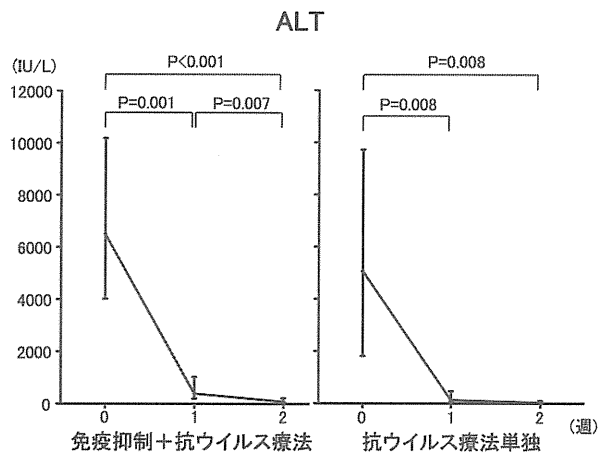


図2 治療開始後のT-Bilの推移(急性感染例)

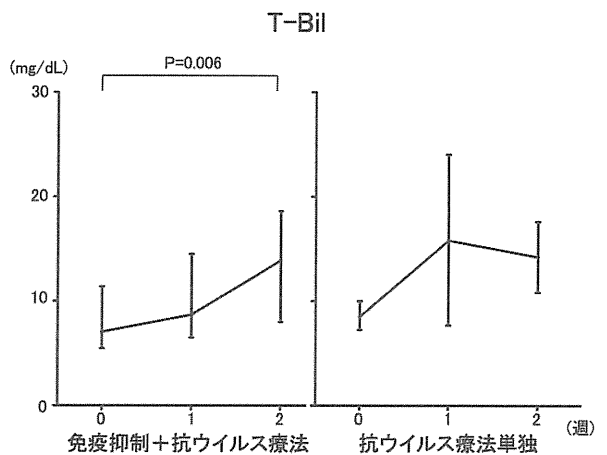


表1 CS+AVT群, AVT群の臨床・血液生化学的背景

免疫抑制療法併用群 vs 抗ウイルス療法単独群

	免疫抑制療法 + 抗ウイルス療法	抗ウイルス療法単独	P
N	12	5	
年齢, yr	54 (43-59)	22 (19-52)	0.04
男性, no. (%)	8 (67)	3 (60)	1.00
急性肝不全非昏睡型, no. (%)	3 (25)	1 (20)	1.00
急性肝不全昏睡型, no. (%)	9 (75)	4 (80)	
急性型, no. (%)	8 (67)	3 (60)	
亜急性型, no. (%)	1 (8)	1 (20)	
AST, IU/l	5759 (1742-10965)	2704 (554-13245)	0.64
ALT, IU/l	6499 (3421-6848)	5070 (1296-9730)	0.49
LDH, IU/l	2568 (721-7373)	745 (310-8395)	0.56
T-Bil, mg/dl	6.9 (5.5-11.4)	8.5 (7.3-17.8)	0.25
D-Bil, mg/dl	5.1 (3.6-6.5)	4.6 (3.2-12.7)	0.71
PT, %	13 (5-21)	9 (3-28)	0.75
PLT, /μl	84000 (53000-210000)	160000 (56000-260000)	0.56
Cre, mg/dl	1.2 (0.7-2.7)	0.6 (0.4-3.2)	0.37
AFP, ng/dl	5 (2-9)	19 (3-307)	0.32
HGF, ng/dl	2.3 (1.0-4.9)	6.5 (2.0-15.9)	0.54

Median(IQR)

図3 治療開始後の PT の推移 (急性感染例)

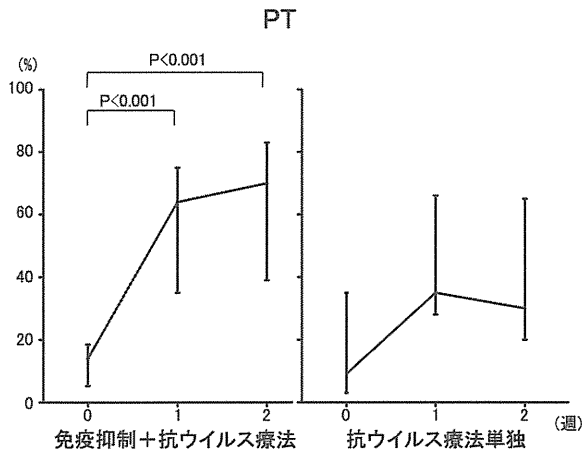


図6 治療開始後の T-Bil の推移 (急性増悪例)

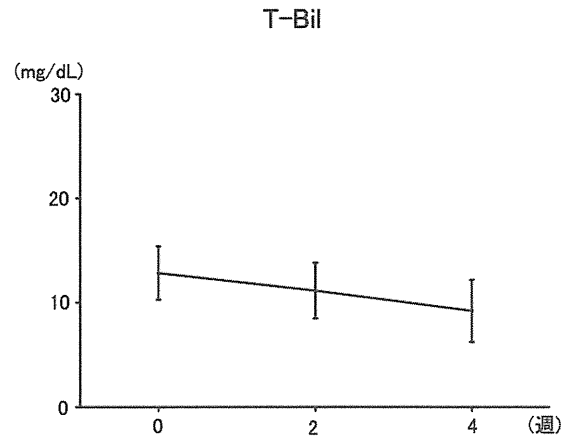


図4 治療開始後の HBV-DNA の推移 (急性感染例)

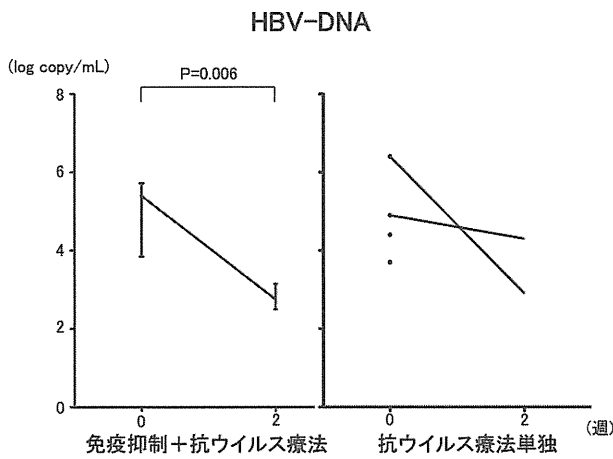


図7 治療開始後の PT の推移 (急性増悪例)

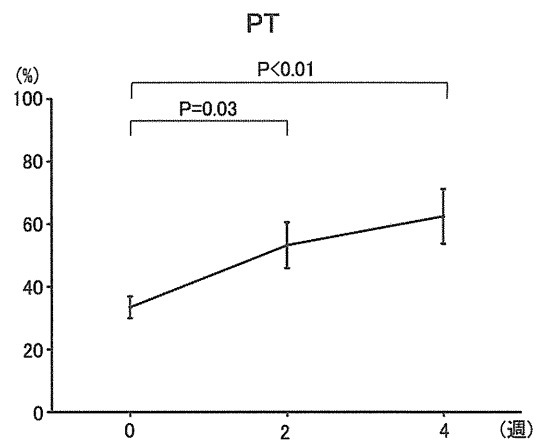


図5 治療開始後の ALT の推移 (急性増悪例)

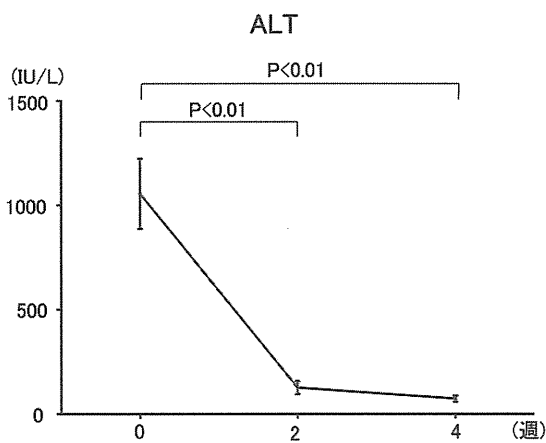


図8 治療開始後の HBV-DNA の推移 (急性感染例)

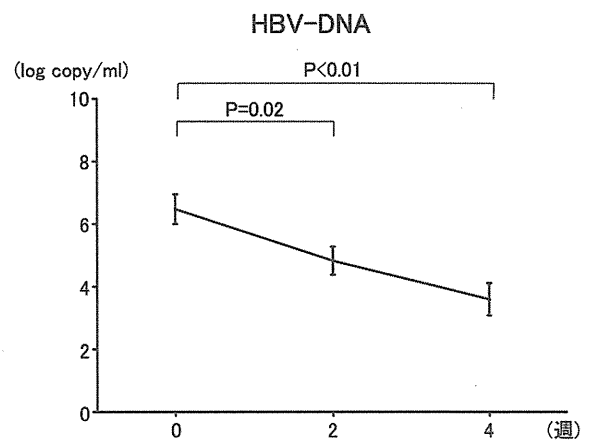


图9 治療反応性 (ALT)( 生存群 vs 死亡 / 肝移植群 )

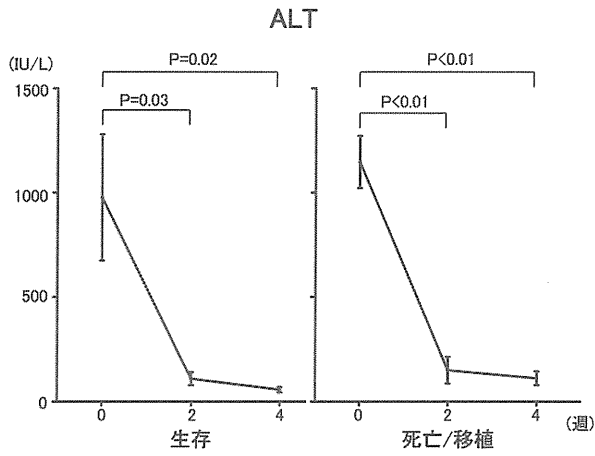


图12 治療反応性 (HBV-DNA)( 生存群 vs 死亡 / 肝移植群 )

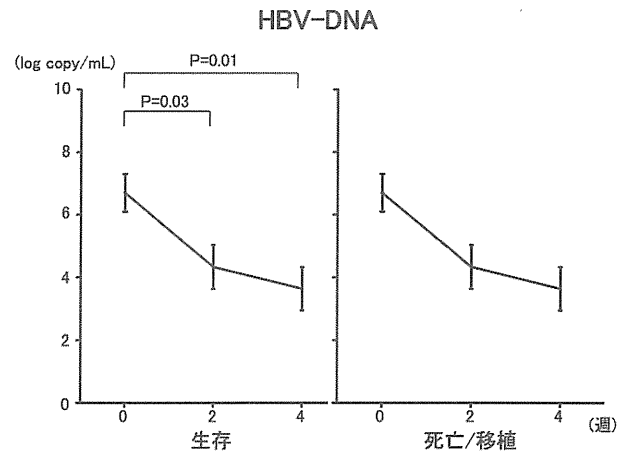


图10 治療反応性 (T-Bil)( 生存群 vs 死亡 / 肝移植群 )

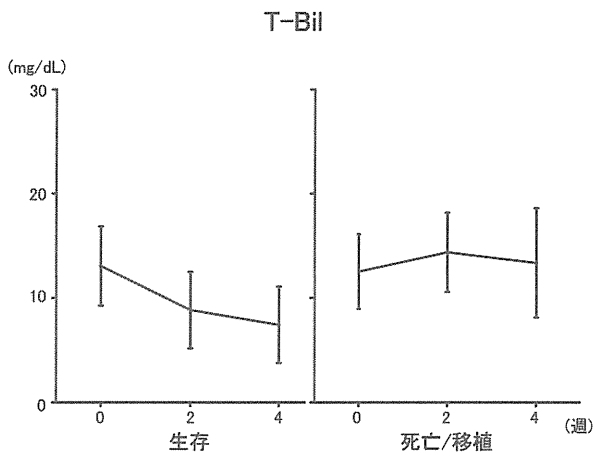
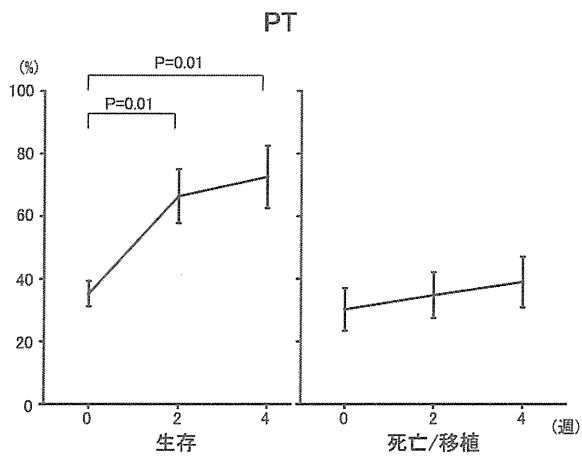


图11 治療反応性 (PT)( 生存群 vs 死亡 / 肝移植群 )



Fas 型劇症肝炎における Bcl-2ファミリー蛋白の意義

研究協力者 竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

**研究要旨:** Fas 刺激は劇症肝炎を誘発する 1 つの重要なシグナルと考えられている。Fas 刺激により肝細胞は、Bcl-2ファミリー蛋白である Bak/Bax を活性化させることで、ミトコンドリアから cytochrome c を放出する。ミトコンドリアから cytochrome c が放出されると、アポトーシスは抑制することができないため、cytochrome c の放出を制御する Bak/Bax がミトコンドリア経路では重要である。しかし、Fas 刺激時における肝細胞の Bak/Bax の重要性は明らかではない。本研究では Fas 型劇症肝炎の肝細胞アポトーシスにおける Bak/Bax の意義を検討した。Bak ノックアウト (KO) マウスや Bax KO, Bak/Bax ダブル KO マウスに対する Fas 刺激の解析より、Fas 刺激による早期の肝細胞アポトーシスは、Bak もしくは Bax が保たれていれば実行されるが、Bak/Bax 両者の欠損で完全に抑制されることを解明した。しかし、Bak/Bax の両者が欠損していても、マウスの肝不全による死亡率は軽度改善を認めるものの、弱いカスパーゼ活性を認め、遅発性の肝細胞死による肝障害、肝不全は抑制できないことも解明された。この遅発性肝細胞死には、ネクローシスの経路は関与しておらず、Bak/Bax を介ささない弱いカスパーゼの活性に依存したアポトーシスであると考えられた。以上より、Bak/Bax は肝細胞アポトーシスを迅速に実行するために必須であることを明らかにしたと同時に、肝細胞にはアポトーシス機構として Bak/Bax 非依存的なデスレセプター経路 (Extrinsic pathway) も存在しており、ミトコンドリア経路 (Intrinsic pathway) のバックアップシステムとして機能していることを明らかにした。Fas 型劇症肝炎の治療には、Bak/Bax の両者の抑制はある程度生存率を改善させる可能性があるが、大幅な生存率改善にはそれだけでは不十分であり、遅発性アポトーシスの抑制としてカスパーゼ阻害薬の併用が有用であることが示唆された。

共同研究者

疋田 隼人 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

劇症肝炎では Fas 及び Fas リガンドが発現増強していることが知られており、Fas 刺激が劇症肝炎を誘発する 1 つの重要なシグナルと考えられる。Fas 刺激により肝細胞では、BH-3 only 蛋白質が活性化し、最終的に Bcl-2ファミリー蛋白である Bak/Bax を活性化させることで、ミトコンドリアから cytochrome c を放出する。この放出された cytochrome c が caspase-9、-3/7 を順次活性化しアポトーシスが遂行される。一度ミトコンドリアから cytochrome c が放出されると、アポトーシスは抑制することができないため、この cytochrome c の放出がアポトーシスの point of no return とされており、この point of no return を司る Bak/Bax がミトコンドリア経路では重要である。しかし Fas 刺激時における肝細胞の Bak/Bax の重要性は明らかではない。そこで、本研究では Fas 型劇症肝炎の肝細胞アポトーシスにおける Bak/Bax の意義を検討した。

B. 研究方法

Bak ノックアウト (KO) マウス (*Bak*<sup>-/-</sup>), Bax KO マウス (*Bax*<sup>-/-</sup>) に Fas アゴニスト抗体 (Jo2抗体) 1.5 mg/kg を腹腔内投与することで、Fas 型劇症肝炎を惹起させ、その肝細胞アポトーシスや生存率の解析を行った。またアルブミンプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現する Alb-Cre マウスと、2つの

lox P 配列で挟まれた Bax 遺伝子を持つ Bak KO マウス (*Bak*<sup>-/-</sup> *Bax*<sup>flax/flax</sup>) との交配により、肝細胞特異的 Bak Bax ダブル KO マウス (*Alb-Cre Bak*<sup>-/-</sup> *Bax*<sup>flax/flax</sup>), Cyclophilin D 欠損マウス (*Cyp D*<sup>-/-</sup>) と交配して、Cyp D Bak Bax トリプル KO マウス (*Cyp D*<sup>-/-</sup> *Alb-Cre Bak*<sup>-/-</sup> *Bax*<sup>flax/flax</sup>) を作成し、同様に Fas アゴニスト抗体を投与した。一部のマウスには、RIP1阻害剤として necrostatin-1 2mg/kg を、カスパーゼ阻害剤として Q-VD-Oph 40 mg/kg を腹腔内投与した。

(倫理面への配慮)

組み替え遺伝子を用いた実験は、大阪大学遺伝子組み換え安全委員会の承認のもと行った。また、すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで行った。

C. 研究結果

Fas 抗体投与 3 時間後、Wild-Type (WT) マウスに比し Bak KO マウスでは TUNEL 陽性細胞が著明に減少していた。また、ALT 値も WT マウスに比し有意に Bak KO マウスで減少を認めた。しかし、投与 3 時間後の Bak KO マウスの ALT 値は 600 (IU/L) 程度と完全にアポトーシスを抑制することはせず、投与 12 時間以内にほとんどのマウスは死亡し、生存を有意に延長するに至らなかった。

一方、Bax KO マウスに Fas 抗体を投与したところ、WT マウスに比し投与 3 時間後の ALT 値や TUNEL 陽性細胞に有意な差を認めなかった。そこで Bak 欠損下での Bax の効果を検討するため、肝細胞特異的

な Bak/Bax ダブル KO マウス作成し、このマウスに Fas アゴニスト抗体を投与した。投与3時間後、Bak/Bax ダブル KO マウスでは TUNEL 陽性細胞をほとんど認めず、ALT 値も30程度と上昇を認めなかった。また、caspase-3の活性も認めず、Bak/Bax 両者の欠損で Fas 刺激による早期のアポトーシスは完全に抑制された。しかし、Bak/Bax ダブル KO マウスの生存率は、Bak KO マウスの生存率に比して有意に改善したものの、Fas 刺激8時間以降に死亡するマウスが出現し、24時間以内に約半数のマウスが死亡した(図1)。死亡原因を検討するため投与6時間後を解析したところ、Bak/Bax KO マウスでも肝臓に多数の TUNEL 陽性細胞の出現を伴って、ALT 値の上昇を認め、やはり肝不全により死亡していると確認された。アポトーシスの指標である DNA の laddering も、Bak KO マウスの Fas 刺激3時間後と同様に Bak/Bax ダブル KO マウスの Fas 刺激6時間後に認められた。また Caspase-3及び7の活性化も、Bak KO マウスの Fas 刺激3時間後と比較すれば弱いものの、Bak/Bax ダブル KO マウスの Fas 刺激6時間後には認められた。以上より、Bak/Bax ダブル KO マウスでも Fas 刺激により遅発性の細胞死による肝障害が惹起され、肝不全に陥ることが明らかとなった。

この Bak/Bax 欠損下で認められる遅発性の肝細胞死に、ネクローシス/ネクロプトーシスによる細胞死機構が関与しているかを検討するため、RIP1を阻害する necrostatin-1の投与あるいは、Cyclophilin D 欠損での肝障害の程度を検討した。Fas 刺激の2時間前に necrostatin-1 2mg/kg を Bak/Bax ダブル KO マウスの腹腔内に投与したが、Fas 刺激による遅発性肝障害は改善されなかった。また Cyclophilin D をさらに欠損させた Cyp D Bak Bax トリプル KO マウスを作成し Fas 刺激を行ったが遅発性肝障害は改善されず、ネクローシス/ネクロプトーシスの経路の関与は否定的であった。

そこで、Bak/Bax ダブル KO マウスの遅発性肝障害時に認められる弱い caspase3/7活性をカスパーゼ阻害剤で抑制することで、遅発性の肝細胞死を抑制できないか検討することとした。Fas 刺激後2時間というタイミングでは、すでに caspase-8が活性化していることが確認できたため、Bak/Bax ダブル KO マウスに Fas 刺激を行い、2時間後にカスパーゼ阻害剤として Q-VD-Oph 40 mg/kg を投与した。Fas 刺激6時間後、カスパーゼ阻害剤を投与したマウスの肝臓では、TUNEL 陽性細胞数や ALT 値は Fas 刺激を行わなかったマウスと同程度にまで抑制された。また、生存率の解析でもカスパーゼ阻害剤を投与したマウスは肝不全による死亡を認めなかった(図1)。以上より、Bak/Bax ダブル KO マウスの遅発性肝細胞死は、Bak/Bax を介ささない弱いカスパーゼの活性化に依存したアポトーシスであると考えられた。

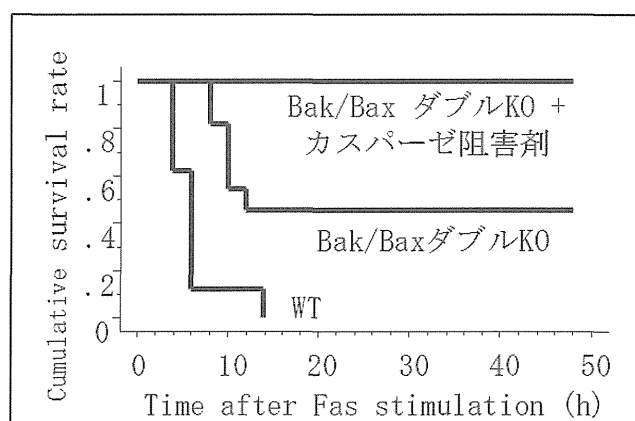


図1 Fas刺激後の累積生存率

#### D. 考察と結論

Fas 刺激による早期の肝細胞アポトーシスは、Bak もしくは Bax のいずれかが保たれていれば実行されるが、Bak/Bax 両者の欠損で完全に抑制され、Fas 型劇症肝炎による肝不全死の発生率を低下させることが明らかとなった。しかし、Bak/Bax の両者が欠損していても、遅発性の肝細胞死による肝障害は抑制できず、Fas 型劇症肝炎の肝不全死を回避にすることはできなかった。この遅発性肝細胞死は、Bak/Bax 依存的な早期のアポトーシスに比べ緩徐に起こり、弱い caspase の活性化に完全に依存したアポトーシスであることが明らかとなった。以上より、本研究では、Bak/Bax は肝細胞アポトーシスを迅速に実行するために必須であることが明らかになるとともに、肝細胞にはアポトーシス機構として Bak/Bax 非依存的なデスレセプター経路も存在しており、ミトコンドリア経路のバックアップシステムとして機能していることが解明された。これらの結果を考え合わせると、Fas 型劇症肝炎の治療には、Bak/Bax の両者の抑制はある程度生存率を改善させる可能性があるが、大幅な生存率改善にはそれだけでは不十分で、遅発性アポトーシスの抑制としてカスパーゼ阻害剤の併用が有用であることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. *J. Biol. Chem.* 288: 30009-30018, 2013.
2. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi

T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. *J Hepatol*. 59: 1239-1245, 2013.

3. Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Valine, the Branched-Chain Amino Acid, Suppresses Hepatitis C Virus RNA Replication but Promotes Infectious Particle Formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 437: 127-133, 2013.

4. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3) (+) dendritic cells are a potent producer of interferon- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 57: 1705-1715, 2013

## 2. 学会発表

The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Washington, Nov 1~ Nov 5, 2013

Oxidative stress induced by continuous hepatocyte apoptosis drives liver carcinogenesis independently of regeneration and DNA methylation status. *Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara*

A novel hepato-proliferative effect of carbamazepine during liver regeneration. *Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Wei Li, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara*.

The crosstalk between apoptosis and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara*.

## 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 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

### 障害肝の再生・修復機構の解明

研究分担者 井戸 章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学 教授

**研究要旨：**傷害組織の修復過程では、マクロファージは傷害部位周囲に集積し、サイトカインなどの産生や有害物質や壊死組織の貪食などを介して、傷害組織の修復過程において重要な役割を果たしている。傷害組織の再生・修復過程において重要な役割を果たしている創傷治癒マクロファージは炎症促進性（M1）および炎症抑制性（M2）の中間に位置する不均一な細胞集団であり、その詳細な役割は明らかになっていない。肝障害を誘導した後にマクロファージを欠損させると肝障害が遷延化し、生存率が低下した。また、マクロファージを欠損させた肝組織では炎症性サイトカインのみならず、抗炎症性サイトカインや線維化に関連した分子の発現も低下しており、障害組織の再生・修復が誘導されていないことが推測された。一方、肝障害誘導後に経時的に単離したマクロファージにおける遺伝子発現解析から、肝障害誘導後2日目から浸潤マクロファージはM1および早期の創傷治癒マクロファージから後期の創傷治癒からM2マクロファージに形質が変化することが推測された。さらにGpnmbは浸潤マクロファージの創傷治癒およびM2マクロファージへの形質転化に関与し、障害組織の再生・修復に重要な役割を果たしていることが考えられた。以上の研究成果は、予後不良の昏睡型急性肝不全において肝再生不全の分子機構の解明につながることを期待される。

#### 共同研究者

熊谷公太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
楠 一晃 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
玉井 努 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 特任助教  
森内 昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
HGF 組織修復・再生医療学講座 特任講師  
宇都 浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 講師  
桶谷 真 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 講師

#### A. 研究目的

傷害組織の修復過程では、残存した有害物質や壊死組織の除去および欠損した組織の修復といった二つのメカニズムが存在する。マクロファージは傷害部位周囲に集積し、サイトカインなどの産生や有害物質や壊死組織の貪食などを介して、傷害組織の修復過程において重要な役割を果たしている。

我々は、Gpnmb (osteoactivin or DC-HIL) という障害肝の浸潤マクロファージに発現する分子に着目して、障害肝の再生・修復過程におけるマクロファージの役割を明らかにすることに取り組み、貪食能の高いGpnmb陽性マクロファージは障害肝組織の修復過程において線維形成のみならずその吸収に重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかし、傷害組織の再生・修復過程において重要な役割を果たしている創傷治癒マクロファージは炎症促進性（M1）および炎症抑制性（M2）の中間に位置する不均一な細胞集団であり、その詳細な役割は明らかになっていない。そこで、今年度は障害肝の修復過程におけるマクロファージの役割をM1およびM2、さらに創傷治癒マ

クロファージの観点から、その全体像を明らかにすることを目的に研究を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 急性肝障害の修復過程における肝マクロファージ欠損の影響

8週齢のC57BL/6マウスに四塩化炭素1ml/kgを単回腹腔内投与し、その2日後にClodronate liposomeを投与し、下記の検討を行った。

- (1) F4/80免疫組織化学染色によるマクロファージの浸潤とその分布
- (2) 肝障害誘導4, 6日目の血清ALT値および組織学的所見
- (3) 体重変化率および生存率
- (4) 肝組織における遺伝子発現

##### 2. 急性肝障害の修復過程における浸潤マクロファージの解析

8週齢のC57BL/6マウスに四塩化炭素1ml/kgを単回腹腔内投与した後、経時的に肝マクロファージを単離し、下記の遺伝子発現をreal-time PCRを用いて解析した。

- (1) M1～早期の創傷治癒マクロファージマーカー
- (2) 後期の創傷治癒マクロファージ～M2マーカー
- (3) Gpnmb

#### C. 研究結果

##### 1. 急性肝障害モデルにおける肝マクロファージ欠損の影響

- (1) F4/80を用いた免疫染色では、Clodronate liposomeを投与したマウスでは肝障害誘導4, 6日後の肝組織において、浸潤マクロファージは検出されなかった。
- (2) 肝障害誘導4日目の血清ALTはClodronate liposome投与群で著明に上昇しており ( $p < 0.05$ ),



組織学的にも肝障害が遷延化していた。

- (3) Clodronate liposome 投与群では肝障害誘導後4、6日目の体重が有意に減少し ( $p < 0.05$ )、コントロールマウスでは全てのマウスが生存したのに対し、Clodronate liposome 投与群では50%のマウスが肝障害誘導後4日目に死亡した。
  - (4) Clodronate liposome 投与群では、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CCL2、IL-10およびGPNMBの発現が有意に低下した。また、TGF- $\beta$ 、Colla1、MMP9の発現は低下したが、VEGFの発現は増強した。
2. 急性肝障害の修復過程における浸潤マクロファージの解析
- (1) Arginase、IL-6およびIL-1 $\beta$ といったM1～早期の創傷治癒マクロファージマーカーは肝障害2日後に一過性に上昇した後、8日目に再度上昇した。
  - (2) Mrc1およびFizz1といった後期の創傷治癒マクロファージ～M2マーカーは2日目に有意に発現低下し、以後8日目まで発現は徐々に増強した。
  - (3) Gpmbは2日目から次第に発現増強し、6日目にピークとなり8日目には低下した。

#### D. 考 察

肝障害を誘導した後にマクロファージを欠損させると肝障害が遷延化し、生存率が低下したことから、障害肝に浸潤したマクロファージはその修復過程に重要な役割を果たしていることが推測された。すなわち、肝障害誘導後2日目以降、肝マクロファージは炎症促進性のマクロファージから創傷治癒から炎症抑制性のマクロファージに形質転換し、その再生・修復を促進しているものと考えられる。一方、マクロファージを欠損させた肝組織では炎症性サイトカインのみならず、抗炎症性サイトカインや線維化に関連した分子の発現も低下しており、障害組織の再生・修復が誘導されていないことが推測された。

肝障害誘導した後に経時的にマクロファージを単離してその遺伝子発現を検討すると、M1から早期の創傷治癒マクロファージのマーカーは肝障害誘導2日後に発現増強するものの4、6日後にはその発現は一旦減少し、その後再度発現増強する二峰性を示した。一方、後期の創傷治癒マクロファージからM2マーカーの発現は肝障害誘導前に強く発現していたが、肝障害誘導2日後に著明に現弱し、以後漸増した。以上の結果から、肝障害誘導後2日目から浸潤マクロファージはM1および早期の創傷治癒マクロファージから後期の創傷治癒からM2マクロファージに形質が変化することが推測された。また、Gpmbは、肝障害誘導2日目から漸増し6日目にピークとなり以後低下していること、また前年度までの研究でGpmbが炎症性サイトカインの発現を抑制することから、浸潤マクロファージの創傷治癒およびM2マクロファージへの形質転化に関与し、障害組織の再生・修復に重要な役割を果たしていることが考えられた。

#### E. 結 論

肝障害の極期に遅れて、障害部位周囲に浸潤するマクロファージは食能優位のマクロファージで障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしていることが推測された。

近年、人工肝補助療法の進歩によって昏睡型急性肝不全における覚醒率は著しく改善しているが、肝再生が誘導されないために救命率の改善にはつながっていない。本研究では、障害肝の再生・修復において創傷治癒マクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかになった。予後不良の昏睡型急性肝不全において肝再生不全の分子機構の解明につながることが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Ohnishi S, Tsubouchi H; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatol Res.* 2013; 43: 97-105

##### 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

ヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導

研究協力者 汐田 剛史 鳥取大学大学院 遺伝子医療学 教授

研究要旨：ヒト iPS 細胞から機能性肝細胞への分化誘導は困難であると言わざるをえない。最近、iPS 細胞の分化抵抗性や分化指向性が存在することが報告されているが、今回、28種類のヒト iPS 細胞株より、最も肝細胞分化指向性株を選択した。その分子機序として核内受容体発現に着目し、iPS 細胞より肝細胞への分化過程での核内受容体48種類の発現を検討した。

共同研究者

神吉けい太 鳥取大学大学院医学系研究科  
遺伝子医療学部門 助教  
板場 則子 鳥取大学大学院医学系研究科  
遺伝子医療学部門 助教

化マーカー発現をリアルタイム RT-PCR により行った。

C. 研究結果

A. 研究目的

iPS 細胞の臨床応用へ向けた課題として、① iPS 細胞の樹立効率の改善、② 腫瘍化の危険性のない iPS 細胞の樹立、③ 目的とする細胞系譜への効率的な分化誘導法の開発、などが挙げられる。そのうち、肝臓などの内胚葉系への分化誘導は現在のところ難しく、ある程度の分化誘導は可能でも、十分な機能を持つ肝臓細胞への分化誘導は非常に困難であると言わざるをえない。最近、iPS 細胞の分化抵抗性や分化指向性が存在することが報告されている。今回、28種類のヒト iPS 細胞株より、最も肝細胞分化指向性株を選択し、その分子機序として核内受容体発現に着目し、iPS 細胞より肝細胞への分化過程での核内受容体48種類の発現を検討した。

1. 28種類のヒト iPS 細胞株を STEP1により分化誘導し、分化マーカーとして SOX17, CXCR4, HNF3beta により行い、上位 8 細胞株を選択した。上位 8 細胞株を STEP2により分化誘導し、分化マーカーとしてアルブミン、AFP、CK18により上位 2 細胞株を選択した。上位 2 細胞株を STEP3により分化誘導し、分化マーカーとして TAT, TDO2, CYP3A4により最も肝細胞分化指向性細胞株を選定した。

2. ヒト iPS 細胞の分化指向性の分子機序として、核内受容体に着目し検討した。48種類の核内受容体の発現をリアルタイム RT-PCR により検討し、発現量から 4 パターンに分類されることが明らかとなった。分化前、STEP1終了時、STEP2終了時、STEP3終了時と徐々に増加する場合、分化前に比較しSTEP1終了時で低下するがその後STEP2終了時、STEP3終了時と増加する場合、分化前に比較しSTEP1終了時で増加するがその後STEP2終了時、STEP3終了時と低下する場合、その他の場合の合計 4 種類のパターンを示した。

B. 研究方法

1. 各機関の倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得られた方より体細胞を採取し、樹立された28iPS細胞株の供与を受けた。樹立機関は、理化学研究所バイオリソースセンター、慶応大学医学部生理学教室、東京大学医科学研究所幹細胞治療部門、岐阜大学大学院医学系研究科再生医療学独立専攻組織器官形成統御学部門である。鳥取大学医学部倫理委員会の承認のもと、本研究を開始した。
2. 各 iPS 細胞株の維持は MMC 処理した MEF 細胞をフィーダー細胞として利用した。未分化状態の維持は、20%KSR, 5ng/ml bFGF にて行った。iPS 細胞から肝細胞への分化は 3 段階により行った (STEP1, STEP2, STEP3)。STEP1は、内胚葉への分化を目標に、アクチビン A 存在下で 5 日間培養した。STEP2は、内胚葉から肝芽細胞への分化を目標に、FGF-4, BMP-2の存在下で 5 日間培養した。STEP3は、肝芽細胞から肝細胞への分化を目標に、最初の 5 日間は HGF 存在下に、後の 5 日間は OSM, デキサメサゾン存在下に培養した。STEP1, STEP2, STEP3での分化度の評価は、分

D. 考察

ヒト iPS 細胞には肝細胞分化指向性株が存在する。その詳細な機序は不明であるが、核内受容体の発現パターンが関与する可能性があり、今後の検討が必要である。

E. 結論

ヒト iPS 細胞の肝細胞分化指向性の機序として、核内受容体の関与の可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
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

### 骨髄由来および脂肪由来間葉系幹細胞の違いに関する研究

研究協力者 坂井田 功 山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学 教授

**研究要旨:**我々は肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法を開発し、さらに現在基礎研究として、肝硬変症に対して局所麻酔下で採取した少量骨髄液から培養した間葉系幹細胞 (MSC) を用いる低侵襲な肝臓再生療法の開発に取り組んでいる。MSCにはその細胞源の違いにより、骨髄由来 MSC (BMSC) と脂肪組織由来 MSC (ADSC) があるが、それらの生物学的特性の差異については不明な部分が多い。そこで今回、それぞれの MSC の生物学的な差異を解析した。その結果、脂肪組織由来 MSC は尾静脈投与を実施した場合、肺塞栓を引き起こす可能性があるため、骨髄由来 MSC 投与がより安全であることが明らかになった。

#### 共同研究者

寺井 崇二 山口大学大学院 医学系研究科  
消化器病態内科学 准教授  
高見 太郎 山口大学大学院 医学系研究科  
消化器病態内科学 講師

また、プロトロンビン時間は細胞非投与群  $6.50 \pm 1.72$  秒 vs BMSC 投与群  $6.74 \pm 0.79$  秒 vs ADSC 投与群 120 秒以上 (測定上限) であり ADSC 投与群で有意に延長し、組織学的には肺・肝の血管内に多数の血栓形成を確認した。

#### A. 研究目的

我々は、次世代の再生療法として、肝硬変症に対して局所麻酔下で採取した少量骨髄液から培養した間葉系幹細胞 (MSC) を用いる低侵襲な肝臓再生療法の開発に取り組んでいる。MSCにはその細胞源の違いにより、骨髄由来 MSC (BMSC) と脂肪組織由来 MSC (ADSC) があるが、それらの生物学的特性の差異については不明な部分が多い。そこで今回、それぞれの MSC の生物学的な差異を解析した。

#### D. 考 察

ADSCには外因系血液凝固反応の開始因子である TF が高発現しているため、その向凝固活性により血栓症を引き起こす危険性があることが確認された。

#### B. 研究方法

*in vitro* 解析として、Lonza 社のヒト BMSC 及びヒト ADSC を 10% ウシ血清含有 DMEM 培地で培養し、DNA-chip による網羅的遺伝子解析を行い、組織因子 (tissue factor, TF) の発現をリアルタイム PCR 及び Western-blot で解析評価した。次にヒト血清を用いた Clotting assay で向凝固活性を評価した。*in vivo* 解析として、マウス C57BL/6 に Cyagen Biosciences 社のマウス BMSC 及びマウス ADSC を各々  $3.0 \times 10^5$  個 / 200  $\mu$ l 末梢静脈 (尾静脈) 投与し、投与後のプロトロンビン時間測定、肺・肝の組織学的所見及び 24 時間後の生存率を比較した。

#### E. 結 論

MSCにはその細胞源の違いにより向凝固活性が異なることが明らかとなり、臨床応用には BMSC がより安全であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

学会発表

高見 太郎, 寺井 崇二, 村田 泰彦, 坂井田 功  
ヒト骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞における組織因子および IL-8 の発現の検討  
第 49 回日本肝臓学会総会 口演 (2013 年 6 月 6 日)

#### C. 研究結果

ヒト BMSC と ADSC の DNA-chip 解析にて ADSC で TF の増加を認め、リアルタイム PCR・Western-blot 解析で ADSC の TF 蛋白高発現を確認した。また Clotting assay では BMSC より ADSC の凝集時間は有意に短く、さらに細胞数に依存して短くなる傾向であった。マウス BMSC・ADSC 尾静脈投与による 24 時間生存率は、ADSC 投与群は 46% (13/28 匹) で BMSC 投与群の 95% (21/22 匹) と比較して有意に低かった。

#### 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：1986年から行ってきた血液浄化の総括とステロイドパルスの効果の検証を行った。血液浄化では、血漿交換の昏睡覚醒効果は乏しいが、凝固因子補充では効果があり、蛋白結合性毒性物質除去についてはさらなる検討が必要である。血液濾過透析は通常の方法も online 法も同等の高い昏睡覚醒効果が認められる。標準化には肝不全用透析液の開発と blood access 管理の標準化、有害事象に関する情報の集積が必要である。ステロイドパルス療法はトランスアミナーゼの低下を有意に加速するが、開始時期はトランスアミナーゼの高いうちに可及的速やかに開始すべきである。

## A. 研究目的

急性肝不全治療は症候に対する治療と原因に対する治療に分けられる。症候に対する治療のうち昏睡に陥った患者を覚醒させ、出血傾向を是正するために人工肝補助療法は必須である。今日様々な人工肝補助療法が考案されているが、本邦では血漿交換に大量の緩衝液を用いて血漿を浄化する血液濾過透析を加えた人工肝補助療法が我々より開発され、透析膜の進歩とともに大量の緩衝液で血液を浄化することが可能となってきた。近年では online HDF 法が用いられるようになり、より簡便に安価に施行することが可能となってきている。効果はすでに何度も報告してきているが、標準化に当たって安全性についての報告を行う。

急性肝不全患者を救命するためには、症候に対する治療だけでは、特に肝細胞破壊が持続する症例では不十分であり、また原因が急速に排除される場合も人工肝補助療法の期間を短縮するために肝炎を早期に鎮静化することは必須である。我々はこれまでにステロイドパルス療法とその漸減、シクロスポリン持続点滴、インターフェロン療法などを考案してきた。今回はこのうちでステロイドパルス療法はどの時期に実施すれば有効か検討する。

## B. 研究方法

対象として検討したのは昭和大学藤が丘病院に入院して加療を受けた急性肝不全306例のうち人工肝補助療法を受けた286例である。これらの症例の透析記録を詳細に調べることにより、血漿交換においては翌朝の PT 値30%の達成率とどのような症例で達成できなかったかを検討した。血液濾過透析については昏睡覚醒効果と有害事象を検討した。

ステロイドパルス療法についてはステロイドパルスを行わなかった54例と同じ時期にステロイドパルス療法を行った86例でトランスアミナーゼの低下、救命率、D/T 比を比較検討した。

さらにトランスアミナーゼのピーク値の明らかな症例で、ピーク値から70%以内でステロイドパルスを開始した症例と40%以下に低下した症例でステロイドパルス療法の効果を検討した。

## C. 研究結果

血漿交換後の翌朝の PT 値30%を目標とした場合現在まで検討した1438/1470 (97.8%)で目標を達成しえた。PT 値の目標達成困難症例は1) 劇症肝炎超急性型と2) 肝不全が長期に遷延し感染を合併した症例であることがわかった。血漿交換の役割として肝再生抑制や胆汁鬱滞を是正する効果も検討してゆく必要がある。これまで人工肝補助療法で使用される膜は PMMA 膜, CTA 膜, ポリスルフォン膜と時代とともに透水性が高く大量の置換液を用いることができる膜へと進歩してきた。それぞれの膜により昏睡覚醒効果を検討すると PMMA 膜85.7%, CTA 膜93.8%, ポリスルフォン膜93.6%であった。

また中間解析の結果であるが方法別に緩衝液の総量、透析液量、置換液量を比較すると緩衝液の総量は HDF163.8 (32.0-457.5) リットル, online HDF (pre dilution) 252 (70-399) リットル, online HDF (post dilution) 241.5 (105.0-483.0) リットルであった。

人工肝補助療法中の死亡に関連する accident は不整脈死2例, 大動脈瘤破裂1例, 肺梗塞1例, 消化管出血1例であった。直接死亡に繋がらないものの、現在用いるすべての透析膜で高度の溶血を起こし、血液浄化を施行し得なかった症例を1例経験した。

有害事象については Blood access と血圧に関する有害事象はいずれの方法でも血圧上昇が2-5%みられまた血圧低下が10-15%に認められたが、血液浄化の中止に至る血圧変動は1%以下である。Blood access の問題では QB の不良がいずれの方法でも15%前後認められ、カテ交換に至ったケースが2-3%に認められた。

ステロイドパルス療法については、パルスを施行した86例とパルスを施行しなかった54例で AST の低下を検討したところ、パルス施行例で AST の値が day2, day3, day7, day10で有意に低下した。

パルスの施行をトランスアミナーゼのピーク値から70%以上で施行した場合と40%以下で施行した場合を比較すると、トランスアミナーゼの低下はピーク値から70%以上で施行した場合に、AST は day1-10で有意に低下した。

## D. 考 察

PEは昏睡覚醒効果が乏しい治療であることは明らかであるが、凝固因子の補充の点では、ほぼ目的を達しうる。血液浄化の面では今後肝再生抑制因子の除去や胆汁鬱滞因子の除去にどれだけ有効か検討が必要である。HDFは現在透水性の高い膜が開発されており大量の緩衝液を用いた血液濾過透析が可能となっている。我々の検討では通常のHDFでもonline HDFでも大量の緩衝液を用いて血液を浄化すれば高い昏睡覚醒が得られる。この治療を標準化するためには、以前から主張しているように肝不全用の透析液の開発が不可欠であるが、それに加えてblood accessの管理も標準化することが望まれる。現実にはHDF関連の致命的合併症も経験されるので、合併症についても全国調査が必要である。

ステロイドパルス療法はトランスアミナーゼの低下を加速するが、開始時期が大いに問題であり、臨床的にはトランスアミナーゼの高い時期に可及的速やかに治療を開始すべきである。

## E. 結 論

血液浄化法は通常のHDF、online HDFのいずれでも同様の昏睡覚醒効果が認められるが、標準化にあたり、専用透析液の開発と安全性情報の集積が必要である。

ステロイドパルス療法はトランスアミナーゼの高い時期に可及的速やかに施行すれば肝炎鎮静化に有用である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 井上和明. ウイルス性急性肝炎, 劇症肝炎の治療. *Modern Physician*. 2013;33(4):470-473.
2. 井上和明. 急性肝不全へ移行する可能性のある症例の見分け方とその治療. *成人病と生活習慣病*. 2013;43(11):1342-1346.
3. 井上和明, 与芝真彰. HCV core 蛋白 BASIC AMINO ACID REGION 1の持続感染成立における役割. *肝臓*. 2013;54(Suppl.1):A234.
4. 井上和明, 小原道法. 急性肝不全, 劇症肝炎の近年の傾向と今後の治療対策. *肝臓*. 2013; 54(Suppl.1):A249.
5. 井上和明, 与芝真彰. 人工肝補助療法と原病治療からみた急性肝不全の病態理解. *肝臓*. 2013; 54(Suppl.2):A514.
6. Inoue K. The intensive artificial liver support systems improves survival rate of FHF and makes perioperative management more appropriate. *J Hepatol*. 2013;58(Suppl.1): S412.
7. Inoue K, Kohara M. Hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1 is responsible

for the impairment of IRF-3 activation. *J Hepatol*. 2013;58(Suppl.1): S471.

8. Inoue K. Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1. *Hepatol Int*. 2013; 7(Suppl.1):S35.
2. 学会発表
  1. 井上和明, 与芝真彰. HCV core 蛋白 BASIC AMINO ACID REGION 1の持続感染成立における役割. 第49回日本肝臓学会総会 *肝臓*. 2013; 54 (Suppl.1):A234.
  2. 井上和明, 小原道法. 急性肝不全, 劇症肝炎の近年の傾向と今後の治療対策. 第49回日本肝臓学会総会. *肝臓*. 2013; 54(Suppl.1):A249.
  3. 井上和明, 与芝真彰. 人工肝補助療法と原病治療からみた急性肝不全の病態理解. 第17回日本肝臓学会大会. *肝臓*. 2013; 54(Suppl.2): A514.
  4. 井上和明, 与芝真彰. 臓器移植法改正後の劇症肝炎治療の実態と問題点. 第31回日本肝移植研究会. 抄録集. p.112.
  5. 井上和明, 与芝真彰. 当院における血液浄化療法の変遷と今後の展望 Online-HDFを巡って. 第39回日本肝不全研究会. 抄録. 2013; p.34.
  6. Inoue K. The intensive artificial liver support systems improves survival rate of FHF and makes perioperative management more appropriate. 48th Annual Meeting of the Europeans Association for the Study of the Liver EASL 2013. *J Hepatol*. 2013; 58 (Suppl. 1):S412.
  7. Inoue K, Kohara M. Hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1 is responsible for the impairment of IRF-3 activation. 48th Annual Meeting of the Europeans Association for the Study of the Liver EASL 2013. *J Hepatol*. 2013;58 (Suppl. 1):S471.
  8. Inoue K. Impairment of interferon regulatory factor-3 activation by hepatitis C virus core protein basic amino acid region 1. APASL 2013. Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. *Hepatol Int*. 2013; 7(Suppl.1):S35.
  9. Inoue K. Intensive medical care for fulminant hepatic failure in Japan. The 7th National Conference of the CNSLD. 2013. Abstract Book. 53-54.
- 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

### HBV 感染妊婦の肝不全に対する on-line HDF の有用性と遺伝子変異について

研究協力者 荒田 慎寿 横浜市立大学 特任准教授

研究要旨：妊娠中に肝不全に至った HBV キャリアに対し、核酸アナログ製剤投与と On-line hemodiafiltration (HDF) を用いた人工肝補助療法 (ALS) を導入した。7 回の on-line HDF 後に人工肝補助療法から離脱し、後遺症なく軽快した。HBV の遺伝子解析では、Genotype は C で、direct full sequence では既知の特異的な配列変異を認めないことを証明し、妊娠による免疫応答の変化が HBV 慢性感染の急性増悪と関連する可能性があることが示唆された。

#### A. 研究目的

On-line HDF の有用性検証、妊娠中の HBV キャリアの急性増悪の発症機序についての検討。

#### B. 研究方法

症例報告

#### C. 研究結果

安定した肝機能を示していた HBV キャリアの 23 歳女性が、妊娠 26 週で肝炎を発症した。HBV-DNA 定量  $>9.0$  Log コピー / mL (real-time PCR) で、IgM-HBc 抗体は陰性で、HBV 感染の活性化と考えられた。妊娠 35 週 5 日に緊急入院となった。AST 613 IU/L, ALT 364 IU/L, T-Bil 11.4 mg/dL, D-Bil 8.4 mg/dL, Plt 5.5 万 /  $\mu$  L, PT 39%。ラミブジン 100 mg/day の投与を開始した。第 2 病日に肝性脳症 stage 2 となり、緊急帝王切開を施行。第 4 病日の推定肝容積は 722.7 mL で、同日から On-line HDF と plasma exchange から成る ALS を開始した。4 回目の on-line HDF 後から意識は改善し、6 回目の on-line HDF 後に意識清明となった。7 回の on-line HDF 後に ALS から離脱した。第 20 病日の推定肝容積は 920.0 mL であった。第 33 病日に後遺症なく退院した。HBV の遺伝子解析から Genotype は C で、direct full sequence による解析では特異的な配列変異を認めないことが判明した。

#### D. 考察

妊娠中の高い adrenal corticosteroids は、ウイルス増殖を促し、妊娠中のウイルス量の増加、肝炎活性化と関連するかも知れない。妊娠後期の急性肝不全症例も報告されており、HBV キャリア妊婦に対するモニタリングが重要である。慢性 HBV 感染の急性増悪において Genotype B および、basal core promoter/precore mutation に急性増悪との関連が示唆されているが、本症例の HBV の遺伝子解析では、既知の特異的な配列変異を認めなかった。On-line HDF は、plasma exchange との併用で、肝機能を確実に代償できる。

#### E. 結論

妊娠による免疫応答の変化が HBV 慢性感染の急性増悪と関連する可能性がある。On-line HDF は肝再生までのブリッジユーズとして有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shinju Arata, Akito, Nozaki, Kenichi Takizawa, Masaaki Kondo, Manabu Morimoto, Kazushi Numata, Sanae Hayashi, Tsunamasa Watanabe, Yasuhito Tanaka, Katsuaki Tanaka: Hepatic failure in pregnancy successfully treated by online hemodiafiltration: Chronic hepatitis B virus infection without viral genome mutation. Hepatol Res. in press.

##### 2. 学会発表

- ①荒田慎寿, 田中克明, 青柳和夫: 急性肝不全に対する on-line HDF の治療成績と課題. 第 99 回日本消化器病学会 鹿児島 2013.
- ②荒田慎寿, 滝澤憲一, 野崎昭人, 近藤正晃, 森本学, 沼田和司, 今成秀則, 田中克明: 急性肝不全に対する on-line HDF の課題と展望. 第 39 回日本急性肝不全研究会 東京 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

急性肝不全における肝内および血中 ADAMTS13の動態

研究協力者 福井 博 奈良県立医科大学第三内科 教授

**研究要旨：**急性肝不全における肝内および血中 ADAMTS13の動態をガラクトサミン +LPS 急性肝不全モデルにおいて検討した。肝不全の進行とともに血中 ADAMTS13は低下するが肝内 ADAMTS13-mRNA は増加し肝内および血中 ADAMTS13抗原は保持されていることを明らかにした。血中 ADAMTS13活性の低下は血小板血栓と微小循環障害を惹起し、肝障害の進展を助長する可能性があり、血中 ADAMTS13活性の低下は血中内の何らかの阻害因子が関わっている可能性がある。

共同研究者

高谷 広章 奈良県立医科大学第三内科  
瓦谷 英人 奈良県立医科大学第三内科  
石川 昌利 奈良県立医科大学第三内科  
森岡 千恵 奈良県立医科大学第三内科  
藤本 正男 奈良県立医科大学第三内科講師

A. 研究目的

劇症肝炎の予後予測因子として血小板数の意義が注目されているが、血小板の過凝集は臓器、組織の微小循環障害の原因となる。ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloproteinase domain, with Thrombospondin type-1 motif 13) は、血管内皮細胞から放出される超高分子量 VWF multimer (UL-VWFM) を切断する亜鉛含有酵素であり、我々のこれまでの検討で主に肝星細胞で産生されることが明らかになっている。ADAMTS13の低下は血小板血栓を惹起するが、我々はこれまでに肝硬変、重症型アルコール性肝炎、非代償性肝硬変、重症急性膵炎、門脈血栓、肝移植後早期のグラフト機能不全など微小循環障害や多臓器不全をもたらす多くの病態形成に関わっている可能性を指摘している。本研究では実験的ラット急性肝不全モデルにおいて血中 ADAMTS13活性、肝内 ADAMTS13-mRNA、肝内および血中 ADAMTS13抗原量を測定する。

B. 研究方法

体重200gのSprague-Dawley 雄性ラットにD-ガラクトサミン (GalN: 700mg/kg 体重) および E. coli O55:B5 LPS (50  $\mu$ g/kg 体重) を同時に腹腔内投与して致死的な急性肝不全モデルを作成し経時的 (投与前, 3時間, 6時間, 9時間, 12時間, 15時間, 18時間, 24時間) に犠死させ、血中 ADAMTS13活性をELISAで測定した。また肝 ADAMTS13-mRNA はreal-time PCRで測定し肝内および血中 ADAMTS13抗原量はWestern Blottingで測定した。

C. 研究結果

GalN+LPS投与ラットは12~24時間に急性肝不全に至り、肝は出血凝固壊死の像を呈した。GalN+LPS投与後、経時的につまり肝不全の進行とともに血中

AST, ALT, LDH, BUN, Cr 値は上昇し、血小板数は減少した。血中 ADAMTS13活性は投与12時間後には約40%, 24時間後には0.5%未満と検出感度以下に低下した。血中 ADAMTS13活性はALT, LDH, BUN, Cr 値と負の相関関係にあり、血小板数と正の相関関係を示した。肝内 ADAMTS13-mRNA は肝不全が進行するにつれ増加し、血中 ADAMTS13活性、血小板数と負の相関関係、ALT, LDH, BUN, Cr と正の相関関係を示した。肝内 ADAMTS13抗原量および血中 ADAMTS13抗原量は血中 ADAMTS13活性が0.5%未満に著減する24時間後でも投与前と同程度に認められた。

D. 考察・結論

急性肝不全における凝固線溶系の異常については今までの多くの研究がなされてきた。Rakeらは急性肝不全の肝類洞内にfibrin血栓の存在を指摘し、Wilkisonらは、急性肝不全に合併する腎、肺、消化管組織中にfibrin血栓の存在を指摘した。また、藤原らは急性肝不全モデルにおいて類洞内凝固を証明し、これが肝不全の増悪・進展に関与する可能性を指摘した。我々はこれまでの研究において急性肝不全症例において血中VWF抗原が著増すること、急性肝不全モデルにおいて組織学的に肝細胞壊死後に生じる線維化・癒痕部に一致してVWF抗原が強く表出することを見いだした。さらに、ADAMTS13は主として肝星細胞で産生されることを明らかにしたが、ADAMTS13の基質であるVWF抗原は障害肝の類洞内皮細胞において過剰に産生され、酵素と基質の不均衡が障害肝における類洞内微小循環を引き起こしている可能性を考えてきた。

しかし、これまで急性肝不全における肝内ADAMTS13の動態は不明であり、今回はそれを探る目的で、肝内ADAMTS13-mRNA、肝内ADAMTS13抗原を経時的に測定し、肝障害進展との関連性を検討した。その結果、肝障害が進展し血中ADAMTS13活性が著減した時期においても肝内でADAMTS13-mRNA およびADAMTS13抗原の産生は行われており、同時期に血中ADAMTS13抗原も保たれていたことから、ADAMTS13の血中への放出が行われており、何らかの血中阻害物質がADAMTS13活性を阻害して



いる可能性が考えられた。

我々はこれまでの研究においてアルコール性肝炎、重症型アルコール性肝炎では ADAMTS13 活性に逆相関してエンドトキシンやサイトカインが著増しており、これらが ADAMTS13 活性に影響を及ぼし得ると考えてきたが、今回の一連の研究において急性肝不全でもエンドトキシンやサイトカインが著増していることから、これらが ADAMTS13 活性に影響を与える可能性があるかと推測している。今後、*in vitro* の実験系などでこの点を確かめたい。

## E. 文 献

1. Rake MO, Flute PT, Pannell G, Williams R. Intravascular coagulation in acute hepatic necrosis. *Lancet* 1970, 14:533-537.
2. Wilkinson, S.P. Arroyo, V. Gazzard, et al. Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1974, 1:521-524.
3. Fujiwara K, Ogata I, Ohta Y, et al. Intravascular coagulation in acute liver failure in rats and its treatment with antithrombin III. *Gut* 1988, 29:1103-1108.
4. Uemura Masahito, Tatsumi Kouko, Matsumoto Masanori, Fujimoto Masao, Matsuyama Tomomi, Ishikawa Masatoshi, Iwamoto taka-aki, Mori Toshio, Wanaka Akio, Fukui Hiroshi, Fujimura Yoshihiro. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*. 2005 Aug 1;106 (3) :922-4. Epub 2005 Apr 26.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(英文)

1. Uemura Masahito, Fujimura Yoshihiro, Matsuyama Tomomi, Matsumoto Masahiro, Takaya Hiroaki, Morioka Chie, Fukui Hiroshi. Crucial role of ADMTS13 related to endotoxemia and subsequent cytokinemia in the progression of alcoholic hepatitis. In Trends in alcoholic liver disease research-clinical and scientific aspects, editor Ichiro Shimizu, In Tech, 2011, p179-204.
2. Ishikawa Masatoshi, Uemura Masahito, Matsuyama Tomomi, Matsumoto Masanori, Ishizashi Hiromichi, Kato Seiji, Morioka Chie, Fujimoto Masao, Kojima Hideyuki, Yoshiji Hitoshi, Tsujimoto Tatsuhiro, Takimura Chikara, Fujimura Yoshihiro, Fukui Hiroshi. Potential role of enhanced cytokinemia and plasma inhibitor on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with alcoholic hepatitis: relationship to endotoxemia.

*Alcohol Clin Exp Res*. 2010 Feb;34 Suppl 1:S25-33. Epub 2009 Dec 16

3. Morioka Chie, Uemura Masahito, Matsuyama Tomomi, Matsumoto Masanori, Kato Seiji, Ishikawa Masatoshi, Ishizashi Hiromichi, Fujimoto Masao, Sawai Masayoshi, Yoshida Motoyuki, Mitoro Akira, Yamao Junichi, Tsujimoto Tatsuhiro, Yoshiji Hitoshi, Urizono Yasuyuki, Hata Michiaki, Nishino Kenji, Okuchi Kazuo, Fujimura Yoshihiro, Fukui Hiroshi. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43 (11) :1387-1396.

(邦文)

1. 高谷広章, 植村正人, 藤本正男, 松山友美, 森岡千恵, 石川昌利, 辻本達寛, 瓦谷英人, 北澤利幸, 早川正樹, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 急性肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態: 新規治療法の可能性を含めて. 日本エンドトキシン研究会編, 2013, P16-19.
  2. 高谷広章, 植村正人, 松山友美, 石川昌利, 藤本正男, 森岡千恵, 辻本達寛, 瓦谷英人, 福井博, 松本雅則, 藤村吉博. アルコール性肝炎における ADAMTS13 活性の動態. アルコールと生物医学, 東洋出版, 東京, 2012, P57-65.
  3. 高谷広章, 植村正人, 藤本正男, 松山友美, 森岡千恵, 石川昌利, 辻本達寛, 瓦谷英人, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 肝不全における血漿エンドトキシン濃度と ADAMTS13 活性の動態. 日本エンドトキシン研究会編, 医学図書出版, 東京, 2011, P61-65.
  4. 森岡千恵, 植村正人, 高谷広章, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 重症急性肝炎における ADAMTS13 活性の動態とその臨床的意義. *消化器内科*, 2011, 52:P200-208.
- ### 2. 学会発表
- (国内学会)
1. 高谷広章, 植村正人, 瓦谷英人, 森岡千恵, 藤本正男, 早川正樹, 松本雅則, 藤村義博, 福井博. 急性・慢性肝不全における血漿 ADAMTS13 測定の意味. 第17回 日本肝臓学会大会 2013.10.9
  2. 高谷広章, 植村正人, 瓦谷英人, 藤本正男, 浪崎正, 森岡千恵, 辻本達寛, 早川正樹, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. ラット急性肝不全モデルにおける ADAMTS13 の動態. 第49回日本肝臓学会総会 2013.6.7
  3. 高谷広章, 植村正人, 佐藤慎哉, 森岡千恵, 藤本正男, 瓦谷英人, 山尾純一, 豊原真久, 西村典久, 西尾福真理子, 沢井正佳, 早川正樹, 松本雅則, 藤村義博, 福井博. エンテカビル不応で, 各種核酸製剤により重篤な副作用を呈した obliterative vasculopathy を伴う B 型急性肝不全の 1 例. 第3回東京・神奈川劇症肝炎研究会 2013.4.6

4. 高谷広章, 植村正人, 福井博. 急性肝不全における臓器微小循環障害の新たな展開 - ADAMTS13の動態面からの検討 -. 第16回 日本肝臓学会大会. 2012.10.11
5. 高谷広章, 植村正人, 石川昌利, 松山友美, 瓦谷英人, 森岡千恵, 藤本正男, 浪崎 正, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 肝不全における血小板過凝集状態と ADAMTS13動態解析 - 臓器微小循環障害からみた検討 - 第16回 日本肝臓学会大会 2012.10.10 (国際学会)
1. Hiroaki Takaya, Masahito Uemura, Tomomi Matsuyama, Yoshihiro Fujimura, Hiroshi Fukui. Endotoxin, innate immunity and platelet aggregation in acute liver failure: new therapeutic approach by TLR4 regulation IEIIS Tokyo. 2012.10.23
2. Hiroaki Takaya, Masahito Uemura, Masao Fujimoto, Tomomi Matsuyama, Chie Morioka, Masatoshi Ishikawa, Shinya Takeyama, Tatsuhiro Tsujimoto, Hideto Kawaratani, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Hiroshi Fukui. Potential role of endotoxemia on the decreased activity of plasma ADAMTS13 in patients with chronic and acute hepatic failure. IEIIS Tokyo. 2012.10.26

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

## Ⅲ-4. 肝内結石症分科会

### 【ワーキンググループ研究報告】

1. 疫学・予後調査ワーキング グループ 肝内結石症全国調査－新規横断調査－  
杏林大学医学部 消化器・一般外科学 森 俊幸
2. 診断治療ワーキング  
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
3. 発癌ワーキング 肝内結石症からの発癌－遺伝子異常の検討－  
金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 中沼 安二
4. 発癌予知（画像）ワーキング－肝内結石症に合併する肝内胆管癌の診断－  
自治医科大学 消化器一般外科 佐田 尚宏

### 【分担研究報告】

1. 肝内結石症に対する腹腔鏡下肝切除術の有効性  
大阪医科大学 一般・消化器外科 内山 和久
2. 胆道再建の手術既往を有する肝内結石症の検討  
名古屋大学大学院医学研究科 腫瘍外科学 柳野 正人
3. 上五島地区における肝内結石症例の発症率の変化について  
長崎県上五島病院 外科 八坂 貴宏
4. 肝内胆管癌偽陽性症例の調査研究  
杏林大学医学部 消化器・一般外科学 森 俊幸
5. 胆道再建術後肝内結石症に対する内視鏡的治療  
千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 露口 利夫
6. 胆道癌の発癌・進展とオートファジーに関する分子病理学的検討  
金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 中沼 安二
7. 胆汁中リゾリン脂質の胆管上皮細胞に対する細胞障害と発癌に関する検討  
広島大学病院 総合内科・総合診療科 田妻 進
8. 胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発と簡易測定キットによる測定  
筑波大学医学医療系 医療科学 正田 純一
9. 胆汁中の遺伝子発現解析と胆道系悪性腫瘍における発現プロファイルの検討  
金沢大学大学院 病態検査学講座 本多 政夫

10. 胆汁酸刺激と細胞保護～細胞内グルタチオン動態の解析

東北大学大学院医学系研究科 消化器外科学 海野 倫明