

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等政策研究事業)
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究
分担研究報告書

薬物性肝障害の早期診断確立に向けた前方視的検討

研究協力者 滝川康裕 岩手医科大学内科学講座消化器内科肝臓分野 教授

研究要旨：急性肝障害・肝不全に対する早期搬送システムを用いた治療介入が、脳症発症の予防・予後を改善することが明らかになった。しかし、成因別に評価した場合、薬物性肝障害における脳症の発症率は、早期治療介入前のものと比較して改善傾向にない。このことから薬物性肝障害の発症早期の病態および早期診断マーカーを明らかにすることを目的とした。ダクラタスビル・アスナプレビル治療を行った HCV 感染者のうち経過中肝酵素が上昇した群としなかった群から年齢・性別・肝疾患重症度を合わせた 8 名を選択し、HCV-RNA 消失時・肝酵素上昇時・上昇の 1 週間前の血清でサイトカイン・ケモカイン、細胞死マーカー、ミトコンドリア障害マーカーを比較検討した。IP-10、CK18 fragment、SOD2 が、HCV-RNA 消失時と比較して肝酵素上昇 1 週間前まで有意に上昇した。ダクラタスビル・アスナプレビルによる薬物性肝障害では、肝障害顕在化前に細胞アポトーシスマーカー・ミトコンドリア障害マーカーが上昇しており、早期診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

共同研究者

宮本康弘 岩手医科大学内科学講座
消化器内科肝臓分野助教
柿坂啓介 岩手医科大学内科学講座
消化器内科肝臓分野助教

A. 研究目的

急性肝障害・急性肝不全のうち高危険群への早期治療介入により肝性昏睡発現は改善している¹。しかし、早期治療介入にもかかわらず薬物性肝障害による急性肝不全では肝性昏睡発現率を改善できていない。これは従来の治療開始指標に基づいた治療介入では薬物性肝障害の病態進展を抑制できないことを示唆している¹。また、薬物性肝障害の治療は被疑薬の中止が必須であるため、早期に診断し被疑薬を中止するためにも早期診断法の確立は重要である。従って薬物性肝障害の発症早期の病態および早期診断マーカーを明らかにすることを目的とした。

本研究では、肝障害発現前の血清マーカーを探索にする目的で立案したが、原因薬物の違いによる誤差や基礎疾患、年齢など

の誤差要因を避けるために、C 型肝炎に対するダクラタスビル・アスナプレビル治療者を対象とした。

B. 研究方法

2014 年 11 月から 2015 年 11 月まで HCV 治療目的にダクラタスビル・アスナプレビル治療を受けた 110 名を対象に、肝酵素上昇を認めた 32 例と認めなかった 78 例に分け、それぞれの群から年齢、性別、疾患重症度を合致させた 8 例ずつ(それぞれ DILI 群、非 DILI 群とする)を対象に早期に変動する指標を検討した。全例 HCV genotype は 1b であった。年齢・性別を合致させた正常人を対照群とした(岩手医科大学医学部倫理委員会承認番号 H27-105)。血清サイトカイン・ケモカインおよび細胞死マーカー、ミトコンドリア障害マーカーを比較検討した。

HCV-RNA が消失した時点を Baseline、肝酵素が上昇した時点を Prominence、それよりも 1 週間前を Prominence-1W と定義し、それぞれの時点での上記マーカーを測定した。

C. 研究結果

背景因子には各群で有意差を認めなかった(表1)。対照群、DILI群、非DILI群で比較したところ(表2)対照群に比較してDILI群でIP-10が有意に高値(510.8 ± 204.1 pg/mL, 1581.8 ± 804.9 pg/mL, 1617.5 ± 525.8 pg/mL)、RANTES (18469.9 ± 832.6 pg/mL, 15760.5 ± 2891.3 pg/mL, 14545.0 ± 2300.6 pg/mL)が有意に低値であった。肝酵素上昇に伴って変化する血清因子を評価したところ(表3)、IP-10、CK18 fragment、SOD2が、Baselineと比較してProminence-1Wで有意に上昇した(1617.5 ± 525.8 pg/mL vs. 2927.9 ± 1627.4 pg/mL, 108.8 ± 95.3 U/L vs. 468.0 ± 294.2 U/L, 2960.1 ± 648.6 pg/mL vs. 3711.5 ± 573.2 pg/mL)。またIP-10、PDGF-bbおよびTNF- α はBaselineと比較してProminenceで有意に上昇した(1617.5 ± 525.8 pg/mL vs. 2650.6 ± 1082.5 pg/mL, 3075.3 ± 877.3 pg/mL vs. 4232.8 ± 1326.7 pg/mL, 31.8 ± 4.0 vs. 39.8 ± 10.8 pg/mL)。

D. 考察

IP-10、RANTESが対照群と比較してDILI群で有意に変化していたことは、薬物性肝障害の背景因子であることが考えられた。しかし、IP-10については、C型肝炎で高く、抗ウイルス治療を行った後に低下することが報告されており²、患者背景と交絡した可能性がある。肝酵素上昇前の血清でBaselineより上昇していたことより薬物性肝障害の顕在化に関与している可能性がある。一方で、薬物性肝障害による肝不全では急性肝障害と比較してRANTESが低値になることが報告されており、RANTESの薬物性肝障害発症における詳細な役割を検討していく必要があると思われた。

ミトコンドリア障害であるSOD2、細胞アポトーシスのマーカーであるCK18 fragmentが肝酵素上昇前から上昇していたことは、薬物性肝障害顕在化より前にミトコンドリア障害や肝細胞アポトーシスが惹起されていることを示唆している。本検討では、薬物性肝障害発症を予測する良好なCut-off値は設定できなかったが、顕在化前からミトコンドリア障害があるこ

とを念頭に今後は診断マーカーの候補を検討していく。

薬物性肝障害による急性肝不全にはステロイド不応性を示す症例が存在することや早期搬送システムを用いた早期治療介入でも脳症発症率の改善が乏しいことが問題となっている。すでにGWASによる網羅的解析でHLAなどがDILIの発症リスクとして認識されている^{3,4}。しかしながら、個別に行う遺伝子解析は高価であり、それぞれの薬剤でリスク遺伝子が異なる可能性も考慮すると汎用性に乏しい可能性がある。本研究は、交絡因子をなるべく除去するためにダクラタスビル・アスナプレビルによる薬物性肝障害を対象に検討した。この結果を他の薬剤に応用し、早期診断および原因薬剤の早期中止から薬物性肝障害による肝不全が減少していくかを前向きに検討していく。

E. 結論

ダクラタスビル・アスナプレビルによる薬物性肝障害では、肝障害顕在化前に細胞アポトーシスマーカー・ミトコンドリア障害マーカーが上昇しており、早期診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Cytokine. 2016 Oct;86: 21-8.
- 2) Hepatology. 2015 Oct;62: 1047-58.
- 3) Nat Genet. 2009 Jul;41: 816-9.
- 4) Pharmacogenet Genomics. 2016 May;26: 218-24.

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Mochida S, Nakayama N, Ido A, Takikawa Y, Yokosuka O, Sakaida I, Moriwaki H, Genda T, Takikawa H.

Revised Criteria for Classification of the Etiologies of Acute Liver Failure and Late-Onset Hepatic Failure in Japan: A Report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan in 2015. Hepatol Res. 46 369-371

2016

② Kakisaka K, Kataoka K, Kuroda H, Takikawa Y. Predictive formula for acute liver failure is useful for predicting the prognosis of patients with acute-on-chronic liver failure. *Hepatol Res.* 46 459-467 2016

③ Kakisaka K, Kataoka K, Suzuki Y, Okada Y, Yoshida Y, Kuroda H, Takikawa Y. Necrotic cell death and suppression of T-cell immunity characterized acute liver failure due to drug-induced liver injury. *Cytokine.* 86 21-28 2016

④ Kakisaka K, Kuroda H, Abe T, Suzuki Y, Yoshida Y, Kataoka K, Miyamoto Y, Ishida K, Takikawa Y. Hepatic Hemodynamics and Elevation of Liver Stiffness as Possible Predictive Markers of Late-onset Hepatic Failure. *Intern Med.* 55(9): 1091-5. 2016

2. 学会発表

① Kakisaka K, Kataoka K, Suzuki Y, Endo K, Miyamoto Y, Kuroda H, Takikawa Y. A predictive formula for the prognosis of patients with acute-on-chronic liver failure. The 25th Annual Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Tokyo, Japan. Feb 20-24, 2016. Tokyo, Japan. Feb 20-24, 2016.

② Suzuki Y, Katagiri H, Wang T, Kakisaka K, Kume K, Nishizuka S, Takikawa Y. Liver stem/progenitor cells in the mouse liver regeneration process with local inflammation after

a physical hepatectomy. ISSCR 2016 Annual Meeting. San Francisco, CA, USA 22-25 June 2016

③ 阿部珠美、黒田英克、滝川康裕. 非観血的肝線維化診断における Shear Wave Elastography の有用性 第200回日本消化器病学会東北支部例会 仙台 02月 2016年

④ 鈴木彰子、宮本康弘、鈴木悠地、佐藤寛毅、柿坂啓介、片岡晃二郎、滝川康裕. 脳死肝移植により救命しえた急性 Budd-Chiari 症候群の1例 第200回日本消化器病学会東北支部例会 仙台 02月 2016年

⑤ 柿坂啓介、片岡晃二郎、阿部珠美、鈴木彰子、鈴木悠地、遠藤啓、宮本康弘、黒田英克、滝川康裕. Acute on chronic liver failure の予後予測精度とその因子の検討 第102回日本消化器病学会総会 東京 04月 22日 2016年

⑥ 宮本康弘、片岡晃二郎、柿坂啓介、鈴木悠地、鈴木彰子、佐藤寛毅、遠藤啓、黒田英克、遠藤龍人、滝川康裕 急性肝不全に対する移植適応と時期に関する検討 第113回日本内科学会総会 東京 04月 16日 2016年

⑦ *森内昭博, 片岡晃二郎, +大場史記, *兼清道雄, *河野 鉄 滝川康裕, *井戸章雄, *坪内博仁 急性肝障害患者における治療介入の指標並びに治療目標としての PT 値の意義 第42回日本急性肝不全研究会 千葉 05月 18日 2016年

⑧ 宮本康弘、鈴木悠地、阿部珠美、佐藤寛毅、鈴木彰子、吉田雄一、柿坂啓介、及川隆喜、片岡晃二郎、佐原圭、黒田英克、宮坂昭生、遠藤龍人、滝川康裕. 人工肝補助療法の現状と課題第

42回日本急性肝不全研究会 千葉05月18日 2016年

⑨ 黒田英克、柿坂啓介、滝川康裕、急性肝不全の予後予測における画像診断の意義:肝硬変と肝容積の比較検討. 第52回日本肝臓学会総会 千葉 05月20日 2016年

⑩ 吉田雄一 造血幹細胞移植2年後に発症した de novo B型肝炎の一例 第38回ウイルス肝炎談話会 栃木 2016年6月18日

⑪ 黒田英克、藤原裕大、阿部珠美、三上有里子、武田智弓、滝川康裕. 急性肝不全の予後予測における VTQ の有用性: 肝硬度と肝萎縮の比較検討 第5回びまん性肝疾患の画像研究会 東京 2016年2月13日

⑫ 黒田英克、藤原裕大、阿部珠美、三上有里子、武田智弓、滝川康裕. 急性肝不全の予後予測における VTQ の有用性-肝硬度と肝萎縮の比較検討- 日本超音波医学会第51回東北会 東京 2016年3月13日

⑬ 黒田英克、藤原裕大、阿部珠美、三上有里子、武田智弓、滝川康裕. 急性肝不全の予後予測における Virtual touch quantification の有用性: 肝硬度と肝萎縮の比較検討 日本超音波医学会 第51回 東北会学術集会 仙台 2016年3月13日

⑭ 宮本康弘、柿坂啓介、滝川康裕 北東北における急性肝障害の動向 第41回日本肝臓学会東部会 東京 2016年12月8日

⑮ 柿坂啓介、鈴木悠地、滝川康裕 薬物性肝障害による急性肝障害・急性肝不全の重症度評価の特殊性について 第

41回日本肝臓学会東部会 東京 2016年12月8日

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

表 1. 对象背景

	DILI	non-DILI	cont.	p
Age (y.o.)	71.0 ± 4.9	71.4 ± 5.7	71.8 ± 5.8	n.s.
Gender (M:F)	3:5	3:5	3:5	n.s.
CH: LC	7:1	7:1		n.s.
HCV-RNA ^a	6.08 ± 0.34	6.16 ± 0.42		n.s.
number of weeks until baseline	4.6 ± 0.7	4.6 ± 0.7		n.s.
number of weeks until Prominence	8.5 ± 2.6			
ALT (IU/L)				
before treatment	30.0 ± 8.3	35.4 ± 20.8		n.s.
at baseline	16.6 ± 5.8	16.0 ± 6.0	19.6 ± 5.1	n.s.
at Prominence-1W	25.0 ± 2.2			
at Prominence	95.2 ± 77.3			

Abbreviations: Drug-induced liver injury, DILI; control, cont.; p value, p; years old, y.o.; not significant, n.s.; male to female ratio, M:F; chronic hepatitis, CH; liver cirrhosis, LC; alanine aminotransferase, ALT.

^alog copies/mL

表 2. Baseline における薬物性肝障害群、非肝障害群、コントロール群の血清サイトカイン・ケモカイン・マーカーの比較

	normal range		DILI		non-DILI		cont.	p
PDGF-B	12794-314	pg/mL	3075.3	± 877.3	3334.1	± 1163.	5984.9 ± 923.	n.s
IL-1β	0-6	pg/mL	28.1	± 6.2	27.5	± 7.3	29.7 ± 4.5	n.s
IL-1RA	136-323	pg/mL	31.4	± 6.9	31.7	± 8.0	34.6 ± 5.5	n.s
IL-2	0-3	pg/mL	43.9	± 14.0	40.4	± 8.7	43.4 ± 5.5	n.s
IL-4	13-51	pg/mL	95.2	± 30.4	98.3	± 39.8	120.6 ± 26.6	n.s
IL-5	0-6	pg/mL	17.8	± 2.6	18.5	± 4.6	19.5 ± 3.7	n.s
IL-6	8-20	pg/mL	53.5	± 17.4	45.9	± 11.7	46.0 ± 7.6	n.s
IL-7	14-52	pg/mL	30.9	± 7.0	29.6	± 6.6	29.8 ± 3.6	n.s
IL-8	15-48	pg/mL	122.6	± 127.6	75.9	± 47.1	57.8 ± 7.0	n.s
IL-9	34-86	pg/mL	113.9	± 42.0	93.4	± 20.6	105.3 ± 19.9	n.s
IL-10	0-2	pg/mL	62.6	± 10.6	63.1	± 13.3	61.0 ± 12.9	n.s
IL-12	13-55	pg/mL	85.1	± 31.4	79.1	± 21.4	103.8 ± 30.2	n.s
IL-13	0-17	pg/mL	70.6	± 52.2	44.3	± 10.0	43.1 ± 10.7	n.s
IL-17	91-228	pg/mL	158.6	± 49.9	150.3	± 44.4	191.9 ± 33.0	n.s
Eotaxin	105-342	pg/mL	151.2	± 89.0	133.0	± 47.7	119.3 ± 45.4	n.s
FGF-b	4-62	pg/mL	61.3	± 12.0	56.6	± 11.4	70.3 ± 10.6	n.s
GCSF	19-126	pg/mL	54.7	± 14.0	54.0	± 11.4	58.8 ± 10.2	n.s
GMCSF	0-0	pg/mL	121.3	± 39.8	103.1	± 50.3	96.7 ± 21.6	n.s
IFN-γ	136-822	pg/mL	31.0	± 8.8	29.4	± 7.2	33.1 ± 7.1	n.s
IP-10	1098-2616	pg/mL	1617.5	± 525.8	1581.8	± 804.9	510.8 ± 204.	**
MCP-1	22-67	pg/mL	127.3	± 62.1	121.7	± 39.0	128.8 ± 48.4	n.s
MIP-1a	0-15	pg/mL	48.3	± 18.6	54.8	± 35.7	50.8 ± 15.9	n.s
MIP-1b	112-194	pg/mL	681.4	± 390.8	560.2	± 328.3	514.1 ± 271.	n.s
RANTE	5734-1412	pg/mL	14545.	± 2300.	15760.	± 2891.	18469. ± 832.	**
TNF-α	0-16	pg/mL	31.8	± 4.0	31.8	± 6.5	35.5 ± 5.8	n.s
VEGF	94-322	pg/mL	201.0	± 104.8	184.2	± 60.2	236.9 ± 94.6	n.s
SOD2	2083-3081	pg/mL	2811.0	± 626.8	3033.0	± 595.2	3551.0 ± 649.	n.s
CK-18F	126-190	U/L	105.1	± 98.1	93.4	± 63.3	186.9 ± 126.	n.s

** : p<0.05, DILI vs. cont.

Abbreviations: Drug-induced liver injury, DILI; control, cont.; platelet-derived growth factor, PDGF; interleukin, IL, fibroblast growth factor, FGF; granulocyte-colony stimulating factor, GCSF; granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GMCSF; interferon, IFN; interferon-inducible protein, IP; monocyte chemoattractant protein, MCP; macrophage inflammatory protein, MIP; regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES; tumor necrosis factor, TNF; vascular endothelial growth factor, VEGF; superoxide dismutase-2, SOD2; cytokeratin-18 fragment, CK-18F.

表 3.薬物性肝障害群の経時的血清サイトカイン・ケモカイン・マーカーの推移

	normal range		baseline		Prominence-1W		Prominence		p
PDGF-B	12794-314	pg/m	3075.3	± 877.3	3853.4	± 712.7	4232.8	± 1326.	**
IL-1β	0-6	pg/m	28.1	± 6.2	31.2	± 11.5	38.6	± 22.2	n.s.
IL-1RA	136-323	pg/m	31.4	± 6.9	32.5	± 9.8	36.3	± 8.6	n.s.
IL-2	0-3	pg/m	43.9	± 14.0	44.4	± 12.1	53.1	± 15.7	n.s.
IL-4	13-51	pg/m	95.2	± 30.4	95.3	± 33.6	106.6	± 36.1	n.s.
IL-5	0-6	pg/m	17.8	± 2.6	19.8	± 5.7	20.1	± 4.6	n.s.
IL-6	8-20	pg/m	53.5	± 17.4	65.1	± 31.7	76.3	± 61.0	n.s.
IL-7	14-52	pg/m	30.9	± 7.0	31.6	± 8.7	34.4	± 6.5	n.s.
IL-8	15-48	pg/m	122.6	± 127.6	138.0	± 110.0	151.3	± 203.5	n.s.
IL-9	34-86	pg/m	113.9	± 42.0	115.2	± 40.7	124.7	± 49.6	n.s.
IL-10	0-2	pg/m	62.6	± 10.6	70.3	± 16.5	73.3	± 15.5	n.s.
IL-12	13-55	pg/m	85.1	± 31.4	94.9	± 44.8	102.8	± 48.4	n.s.
IL-13	0-17	pg/m	70.6	± 52.2	47.1	± 16.0	53.1	± 18.7	n.s.
IL-17	91-228	pg/m	158.6	± 49.9	160.1	± 42.0	189.1	± 48.8	n.s.
Eotaxin	105-342	pg/m	151.2	± 89.0	141.8	± 66.6	148.0	± 67.6	n.s.
FGF-b	4-62	pg/m	61.3	± 12.0	63.4	± 14.3	72.9	± 14.7	n.s.
GCSF	19-126	pg/m	54.7	± 14.0	52.6	± 12.2	59.1	± 11.7	n.s.
GMCSF	0-0	pg/m	121.3	± 39.8	133.6	± 49.5	157.0	± 55.8	n.s.
IFN-γ	136-822	pg/m	31.0	± 8.8	31.8	± 9.9	36.3	± 9.6	n.s.
IP-10	1098-2616	pg/m	1617.5	± 525.8	2927.9	± 1627.	2650.6	± 1082.	*,
MCP-1	22-67	pg/m	127.3	± 62.1	124.8	± 28.3	143.5	± 50.4	n.s.
MIP-1a	0-15	pg/m	48.3	± 18.6	136.5	± 253.9	354.4	± 831.2	n.s.
MIP-1b	112-194	pg/m	681.4	± 390.8	1114.3	± 920.3	1405.8	± 1590.	n.s.
RANTE	5734-1412	pg/m	14545.	± 2300.	14260.	± 3445.	15680.	± 2444.	n.s.
TNF-α	0-16	pg/m	31.8	± 4.0	34.1	± 9.1	39.8	± 10.8	**
VEGF	94-322	pg/m	201.0	± 104.8	239.9	± 148.3	263.5	± 161.7	n.s.
SOD2	2083-3081	pg/m	2960.1	± 648.6	3711.5	± 573.2	3951.5	± 465.6	*,
CK-18F	126-190	U/L	108.8	± 95.3	468.0	± 294.2	442.2	± 233.6	*,

*: p<0.05, baseline vs. Prominence-1W; **: p<0.05, baseline vs. Prominence

Abbreviations: Drug-induced liver injury, DILI; platelet-derived growth factor, PDGF; interleukin, IL; fibroblast growth factor, FGF; granulocyte-colony stimulating factor, GCSF; granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GMCSF; interferon, IFN; interferon-inducible protein, IP; monocyte chemoattractant protein, MCP; macrophage inflammatory protein, MIP; regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES; tumor necrosis factor, TNF; vascular endothelial growth factor, VEGF; superoxide dismutase-2, SOD2; cytokeratin-18 fragment, CK-18F.