

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

急性肝不全における細胞死、サイトカインの血中バイオマーカーとしての有用性

研究協力者 加藤 直也 千葉大学大学院医学研究院消化器内科学 教授

研究要旨：急性肝不全の病態としては細胞死が関わることは広く知られている。ネクロプトーシスは近年新たに提唱されたプログラム細胞死であり、細胞膜の破裂を来し、炎症誘発因子を放出し周囲の炎症を励起する。ネクロプトーシスのマーカーとしてはRIPK3の有効性が報告されている。しかし急性肝不全におけるネクロプトーシスに関する報告は少なく、本研究では急性肝不全における各種サイトカイン（TNF- α 、IL-6、IL-1 β ）や肝細胞増殖因子（HGF）とともにcCK18、CK18、RIPK3などの細胞死のマーカーの有用性を検討した。

対象は2008年から2020年の急性肝障害59症例を対象とし、肝炎の重症度およびその予後について各種の血中バイオマーカーとの関連について検討した。

(1) 肝炎重症度と各種バイオマーカー：サイトカインに関して有意差は認められなかったが、HGFの値は肝炎重症度と一致して有意な上昇が認められた。アポトーシスのマーカーであるCK18に関しては急性肝炎群と比較して急性肝不全非昏睡型/急性肝不全昏睡型の群で有意に高値を示した。アポトーシスやネクローシスを含む細胞死のマーカーであるcCK18は急性肝炎と比較し急性肝不全非昏睡群で有意に高値を示したが、急性肝不全昏睡型では有意差は認められなかった。RIPK3は急性肝不全昏睡型群と比較して、急性肝炎/急性肝不全非昏睡型群で有意に低値を示した。

(2) 予後と各種バイオマーカー：HGF 7.8ng/ml以上かつRIPK3 919pg/ml以上の群では死亡率が83.3%と高率であり、その他の群では死亡者は認められなかった

今回、少数例ではあるが、cCK18、CK18、RIPK3が肝炎重症度と関連することが示唆された。特に急性肝不全非昏睡型ではアポトーシスの割合が減少し、相対的に非アポトーシスの細胞死であるネクロプトーシスの割合が増加している可能性が示唆され、急性肝不全の病態を理解する上でのマーカーとして重要であると考えられた。またHGFが高値かつRIPK3が高値である群は死亡率が高いことが示されたことから、HGFのみならず細胞死の関連マーカーは血中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。今後のさらなる症例の蓄積を行っていく。

共同研究者

近藤 孝行

千葉大学大学院消化器内科学 助教

藤原 慶一

千葉大学大学院消化器内科学 客員教授

千葉県立保健医療大学健康科学部 教授

藤原 希彩子 千葉大学大学院消化器内科学 医員

A. 研究目的

急性肝不全の病態としては短期間に大量の肝細胞が細胞死に陥り、炎症誘発性分子である damage-associated molecular patterns (DAMPs) を介して炎症性細胞やサイトカインの全身への Spill Over が起こり、全身性の炎症を引き起こすとされている[1]。ネクロプトーシスは近年新たに提唱されたプログラム細胞死であり、ネクローシスと同様に細胞膜の破裂を来し、それに伴い DAMPs を放出することにより周囲の炎症を励起することが知られている[2]。細胞死の血中のマーカーとして知られている Cytokeratin (CK) 18、アポトーシスのマーカーである cleaved CK (cCK) 18 は急性肝炎のみならず慢性肝炎の重症度や予後と関連していることが報告されている[3-7]。またネクロプトーシスの血中のマーカーとしてはネクロプトーシスの経路の中心的な役割を担っている Receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) (図 1) の有効性についての報告が腎不全や他疾患で散見される[8, 9]。しかし急性肝不全におけるネクロプトーシスに関する報告は少なく、本研究では各種サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) や肝再生因子である肝細胞増殖因子 (HGF) とともに細胞死のマーカーの急性肝不全における血中のバイオマーカーとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

2008 年から 2020 年に千葉大学病院に入院したで、入院時の血清保存が残存していた急性肝障害 59 症例 (急性肝炎 36 例、急性肝不全非昏睡型 17 例、急性肝不全昏睡型 6 例 [急性 3 例、亜急性 3 例]) を対象とした。肝炎の Etiology は自己免疫性肝炎 (AIH)、Virus、

Indeterminate のみとしてそれ以外のものは除外した。

肝炎の重症度およびその予後について CK18・cCK18・RIPK3・IL-6・IL-1 β ・TNF- α ・HGF の血中バイオマーカーとの関連について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」にしがたい、施設内倫理委員会による研究計画の承認が得られたものである。

C. 研究結果

対象患者の背景を肝炎の重症度別にまとめ表 1 に示した。

(1) 肝炎重症度と各種バイオマーカー

サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 に関しては肝炎重症度別に比較したところ有意差は認められなかった (図 2)。

また 10 例と少数例ではあるが、ステロイドパルス後の TNF- α および IL-6 の変化について検討を行ったところ、TNF- α は 10 例中 5 例でステロイドパルス後速やかに値が改善し、IL-6 に関しては 10 例中 8 例でステロイドパルス後に速やかな改善が得られた。HGF の値に関しては肝炎重症度と一致して有意な上昇が認められた (図 3)。

アポトーシスのマーカーである CK18 に関しては急性肝炎群と比較して急性肝不全非昏睡型/急性肝不全昏睡型の群で有意に高値を示した。またアポトーシスやネクローシスを含む細胞死のマーカーである cCK18 は急性肝炎と比較し急性肝不全非昏睡群で有意に高値を示したが、急性肝不全昏睡型では有意差は認められなかった [図 4]。

ネクロプトーシスのマーカーと考えられる RIPK3 は急性肝不全昏睡型群と比較して、急性肝炎/急性肝不全非昏睡型群で有意に低値を示した[図 5]。

(2) 予後と各種バイオマーカー

入院期間中に 5 名が死亡し、生存群と死亡群に分けて各種バイオマーカーの値を比較検討した。

サイトカインや CK18、cCK18 は予後との関連は認められなかったが、HGF ($P < 0.01$) 及び RIPK3 ($P < 0.01$) は死亡群において有意に高値を示した[表 2]。また HGF および RIPK3 を説明変数とした決定木分析では HGF が 7.8ng/ml 以上かつ RIPK3 が 919pg/ml 以上の群では死亡率が 83.3%と高率であり、その他の群では死亡者は認められなかった。

D. 考察

今回、少数例ではあるが、細胞死のマーカーである cCK18、CK18、RIPK3 が肝炎重症度と関連することが示唆された。特にアポトーシスやネクローシスを含むマーカーである CK18 が肝不全非昏睡型および昏睡型で上昇している中で、アポトーシスのマーカーである cCK18 が急性肝不全昏睡型で有意な高値を示さなかったということは、急性肝不全非昏睡型ではアポトーシス以外の細胞死の割合が増加している可能性を示しており、それを裏付ける形でネクロプトーシスのマーカーと考えられる RIPK3 が急性肝不全非昏睡型で有意な高値を示している。すなわち急性肝不全非昏睡型ではアポトーシスの割合が減少し、相対的に非アポトーシスの細胞死であるネクロプトーシスの割合が増加している可能性がある。このような報告は既報には無く、急性肝不全の病態を理解する上でのマ-

ーカーとして重要でありさらなる検証が必要であると考えられた。

欧米では 1970 年代の Randomized controlled trial (RCT) の結果から[10-11]、急性肝不全に対するステロイド投与は否定されているが、以前報告したように、我が国ではステロイドを中心とした免疫抑制療法は、炎症性サイトカインによる肝細胞死を抑制すると考えられ、70%以上の症例にステロイドが投与されている[12]。またすでにステロイドの投与後にサイトカインの低下する可能性については報告しているが[13]、今回も少数例ではあるが、ステロイド投与後のサイトカインの推移を観察し、ステロイド投与による炎症性サイトカインの早期減少の可能性を示した。しかしステロイドの適応や継続を判断する指標として用いるためには、一定期間の Trend を見ながら、さらなる症例の蓄積が必要であり、今後の検討課題のひとつと言える。

血清の HGF は劇症肝炎肝炎で上昇し、その測定により劇症肝炎の予知や予後予測に有用であることは知られており[14, 15]、本研究でも HGF は肝炎重症度およびその予後とよく関連していることが示された。そして HGF が高値であり、なおかつ RIPK3 が高値である群は 83.35%と高確率で死亡することが示された。このことは、入院時の血液検査にて今後の肝移植の導入の必要性を予測することができる可能性があり、HGF とともに RIPK3 が早期の予後不良因子としてのバイオマーカー候補となりうるかどうかについて更なる検証をする必要がある。

E. 結論

HGF のみならず細胞死の関連マーカーは血

中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。今後のさらなる症例の蓄積を行っていく。

F. 参考文献

1. Antoniadou CG, et al. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 2008; 49:845-861.
2. Martin SJ, et al. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol Cell* 2012; 46: 387-397.
3. Zheng SJ, et al. Prognostic value of M30/65 for outcome of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2403-2411.
4. Papatheodoridis GV, et al. Serum apoptotic caspase activity as a marker of severity in chronic hepatitis C virus infection. *Ann Gastroenterol* 2008; 21: 39-44.
5. Thulin P, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int* 2014; 34: 367-378.
6. Diab DL, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1249-1254.
7. Tsutsui M, et al. Serum fragmented cytokeratin 18 levels reflect histologic activity score of nonalcoholic fatty liver disease more accurately than serum alanine aminotransferase levels. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 1.
8. Shashaty MG, et al. Plasma Levels of Receptor Interacting Protein Kinase-3 (RIP3), an Essential Mediator of Necroptosis, are Associated with Acute Kidney Injury in Critically Ill Trauma Patients. *Shock* 2016; 46: 139-143.
9. Vergara GA, et al. RIPK3 is a novel prognostic marker for lower grade glioma and further enriches IDH mutational status subgrouping. *J Neurooncol* 2020; 147: 587-594.
10. Redeker AG, et al. Randomization of corticosteroid therapy in fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1976; 294: 728-729.
11. Gregory PB, et al. Steroid therapy in severe viral hepatitis. A double-blind, randomized trial of methyl-prednisolone versus placebo. *N Engl J Med* 1976; 294: 681-687.
12. 横須賀 収. 急性発症型自己免疫性肝炎の診断、および急性肝不全に対する免疫抑制療法の妥当性に関する検討. 難治性の肝・胆道疾患に関する研究 平成28年度分担研究報告書 pp152-164.
13. Fujiwara K, et al. Corticosteroid might reduce serum levels of pro-inflammatory cytokines in fulminant hepatitis: A case series. *Hepatology Research* 2018; 48: 106-112.
14. Tsubouchi H, et al. Clinical significance of human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure.

Hepatology 1989; 9: 875-81.

15. Tsubouchi H, et al. Prediction of outcome in fulminant hepatic failure by serum human hepatocyte growth factor. Lancet 1992; 340: 307.

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

图 1

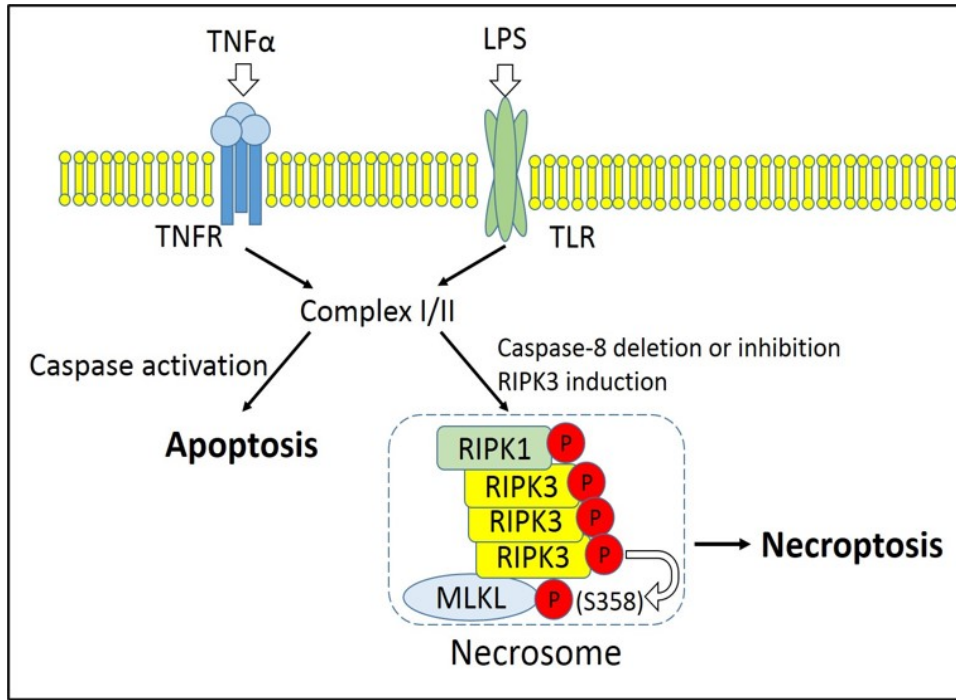


表 1

	急性肝炎 (N=36)	急性肝不全 非昏迷型 (N=17)	急性肝不全 昏迷型 (N=6)
年龄	49.4±18.7	47.3±16.6	55.7±16.1
性别 男	25 (69.4%)	7 (41.2)	2 (33.3)
Etiology (AIH/Drug/HBV/Indeterminate)	10/9/13/4	2/5/5/5	3/1/1/1
AST (U/L)	772±693	3082±3823	1672±2057
ALT (U/L)	1136±996	2900±3353	1901±2880
LDH (U/L)	481±275	1547±2271	1022±752
T-bil (mg/dL)	8.6±7.4	12.8±9.2	24.5±23.2
PT (%)	77.4±23.0	29.4±10.2	16.3±9.8

图 2

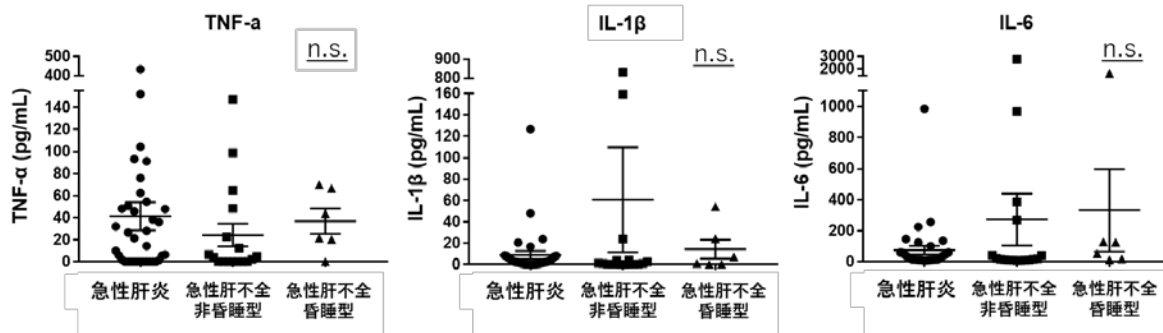


图 3

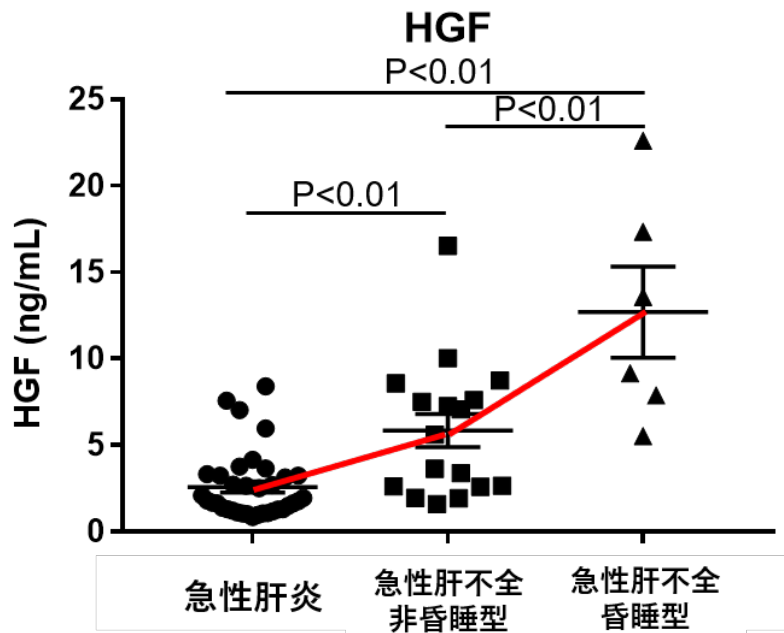


图 4

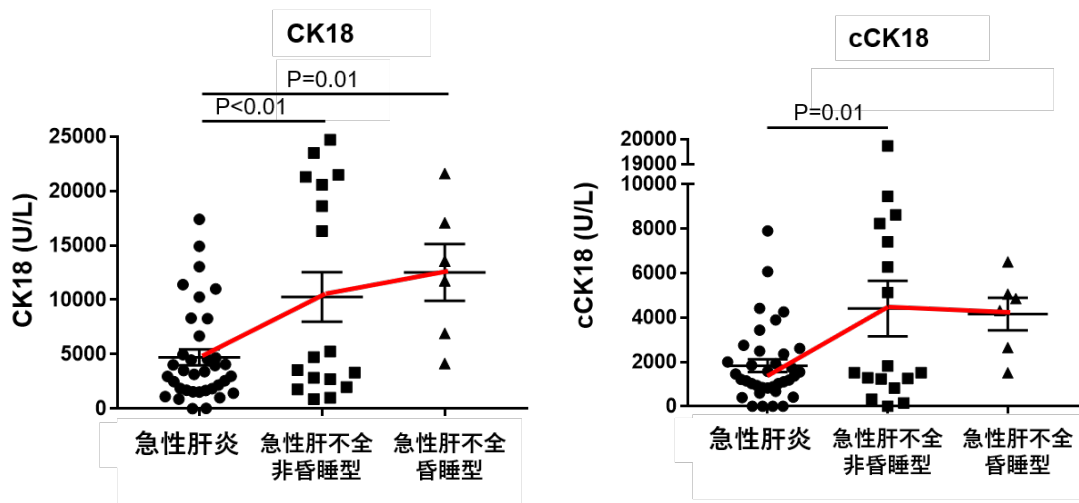


图 5

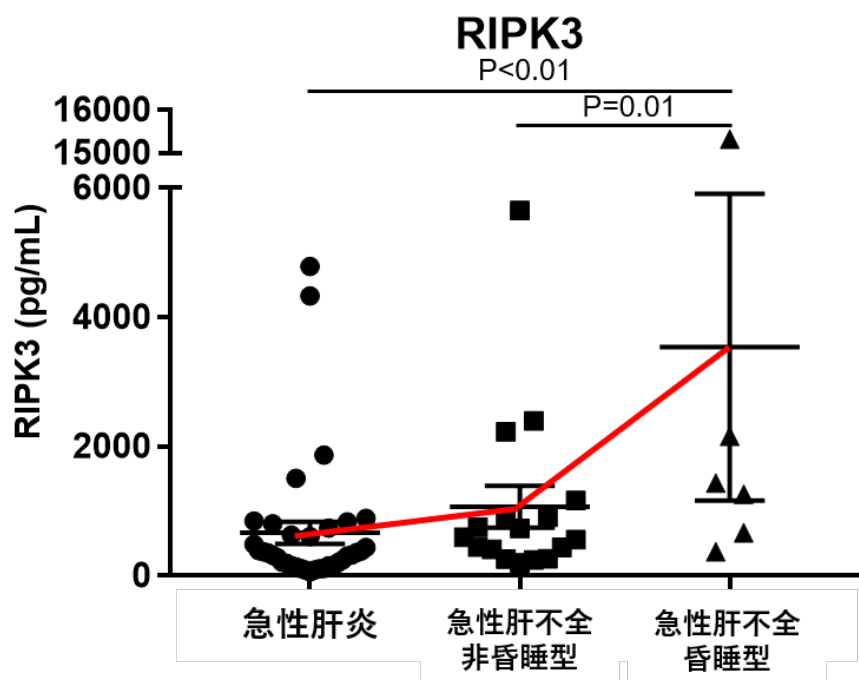


表 2

	生存 (N=54)	死亡 (N=5)	P-value
TNF- α (pg/mL)	35.6 \pm 66.8	40.0 \pm 30.0	0.89
IL-1 β (pg/mL)	25.1 \pm 115.3	17.7 \pm 22.4	0.89
IL-6 (pg/mL)	136.4 \pm 412.2	395.0 \pm 706.9	0.21
HGF (ng/mL)	3.7 \pm 3.1	14.0 \pm 6.2	<0.01
CK18 (U/L)	6950 \pm 7093	8890 \pm 6197	0.56
cCK18 (U/L)	2803 \pm 3424	2831 \pm 1735	0.99
RIPK3 (pg/mL)	784 \pm 1136	4224 \pm 6225	<0.01