論文の内容の要旨

論文題目　　PFIC1 の確定診断法の確立を指向した

ヒト単球由来マクロファージにおける ATP8B1 の機能解析

氏名　　直井　壯太朗

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型、2 型（PFIC1、2）は乳児期から肝内胆汁うっ滞を発症し、進行性で思春期までに肝不全へと至る常染色体劣性の遺伝性疾患である。PFIC1、PFIC2 は症状が酷似しており、臨床所見からの鑑別は困難であるが、治療の過程では差異が認められ、特に肝移植後の予後が大きく異なる。これまでに PFIC2 では予後が概ね良好であるのに対し、PFIC1 では脂肪性肝炎が高頻度に認められ、移植肝の機能喪失へと至ることが明らかとなってきている。そこで適切な治療方針を決定できるよう、PFIC1、PFIC2 の型を早期に鑑別する必要があるが、責任遺伝子である *ATP8B1*、*ABCB11* の各エクソン配列の解析を行っても、イントロンやプロモーター領域における変異により mRNA 量が減少していると想定されるようなケースも見られることから、両

アレルに病因として明らかな変異を同定できないことも多い。そこで本研究では、遺伝子産物であるタンパク質機能の評価が、より直接的な病因の特定につながると考え、ATP8B1 の分子機能評価をベースとした PFIC1 の診断法の確立を目的とした。ATP8B1 が BSEP と異なり、肝臓以外にも発現することに着目し、ヒト全血から分離した各血球における発現を調べたところ、単球由来マクロファージ（MDM）においてのみ発現が確認された。そこで ATP8B1 の欠損により MDM で見られるフェノタイプを探索し、その評価による診断を目指し、siRNA による ATP8B1 のノックダウン、また PFIC1 患者 MDM におけるフェノタイプを Western blot により調べたところ、MDM のサブタイプ特異的なマーカーの発現量に変動が見られた。また、ドナーの異なる MDM 間における ATP8B1 の発現量変動と M2c サブタイプマーカーCD163 の発現量の相関を見出したことから、ATP8B1 が M2c サブタイプに高発現しており、ATP8B1 が発現しない PFIC1 患者 MDM では M2c サブタイプが少ないことを明らかとした。そこで、IL-10 処理により M2c サブタイプへの極性化を誘導することで、ATP8B1 欠損のフェノタイプがより大きく見られることを期待して、ATP8B1 のノックダウン下で IL-10 処理を行い、M2c サブタイプへの極性化の程度を、M2c マーカーの発現、アポトーシス細胞のファゴサイトーシス能、細胞の形態という 3 点について FACS を用いて検討することとした。その結果、ATP8B 1

ノックダウン下において、M2c マーカーである CD163、CD14 の発現量が大きく低下したが（CD163: 75%, CD14: 53%)、一方で CD16 の発現量に影響はないこと、またアポトーシス細胞のファゴサイトーシス能は IL-10 処理により正常に誘導されていることが明らかとなった。部分的に M2c サブタイプへの極性化が起こっていると考えられる $CD16^{high}$ ポピュレーションの ATP8B1 ノックダウンによる細胞形態の変化について検討したところ、SSC 値が有意に高くなることが観察され、これは脂肪滴蓄積の増大と対応することが明らかとなった。ATP8B1 のノックダウン下での IL-10 処理により見られたこれらのフェノタイプは、PFIC1 患者 MDM においても同様に観察され、このうち、脂肪滴蓄積の評価は、測定が容易であること、PFIC1 群とその他の群間で、約 2 倍程度の差が見られること、個人間変動が小さいこと（コントロール群の CV 値: 14%)、測定値を絶対値として評価できることから、診断として用いるには十分なフェノタイプであると考えられた。