

論文の内容の要旨

論文題目 末梢血単核球の遺伝子発現に着目した

NASH の biomarker 探索

氏名 門 輝

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)は、世界中で増加し、本邦でも生活習慣の欧米化に伴い、増加傾向にある。NAFLD は、糖代謝・脂質代謝異常等のメタボリックシンドロームを招く病態であり、非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver: NAFL) と非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) の二つに区分される。NASH は、肝硬変や肝細胞癌に至り、かつ心血管系のイベントなど全身の病態への影響が多いため、早期の診断と治療が求められる。NASH への進展には、過食・運動不足などの生活習慣、インスリン抵抗性、酸化ストレス、炎症性サイトカイン、腸内細菌、Lipopolysaccharide (LPS)/エンドトキシン・胆汁酸代謝などの多くの因子の関与が示唆されているが、その病態は未だに不明な点が多い。現在、予後良好な NAFL と進行性の NASH の鑑別診断には侵襲的な肝生検が必須になっているが、患者負担の観点や、肝生検が行える施設も限られている点から、非侵襲的な診断方法の確立が必要である。さらに現在特異的な治療法がない点からも治療法の開発につながる病態の解明が求められる。NASH には血中及び肝臓内のサイトカイン・ケモカイン誘導を伴う免疫学的機序が病態進展へ関与していると考えられる。CC chemokine ligand (CCL)2 が脂肪組織の炎症・アディポカイン産生低下を引き起こし、CXC chemokine receptor (CXCR)3 が肝組織内の脂肪酸合成の亢進をもたらすなど、血中の免疫細胞と肝臓の炎症・代謝が密接に関係していることが多く報告されている。肝疾患と末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) との相関を示す報告が多数認められるが、NAFLD においては報告が少なく、NASH 進展への末梢血中の免疫細胞の関与や詳細な機序について未だ不明な点が多い。

そこで、本研究では NAFLD 患者の PBMC におけるサイトカイン関連遺伝子の発現に着目して、NAFLD との病理学的変化の関連性を検討し、非侵襲的に NASH を判定できる biomarker の探索を試みた。尚、本研究の臨床研究に関する部分は、文部科学省および厚生労働省によって公表されている疫学研究に関する倫理ガイドラインに則り施行され、東京大学医学部倫理委員会で承認されており (承認番号 3955-(3), 1302-(4))、ヘルシンキ宣言に則り、参加者からは文書同意を取得している。

当科で 2015 年 4 月から 2017 年 1 月の間に、即知の肝疾患がなく臨床的に NAFLD を疑われ経皮的肝生検を施行し、病理学的に Matteoni 分類に従って NAFLD と診断された 54 症例について検討を行った。アルコール換算で男性 30g 未満、女性 20g 未満を 1 日飲酒量の基準とした。組織

学的進行度については、the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network 基準に従って、NAFLD activity score (NAS) の構成要素である肝脂肪化 (steatosis)、小葉炎症 (lobular inflammation: LI) そして肝細胞の風船様腫大 (hepatocellular ballooning) に層別化して検討した。該当する 54 症例から PBMC を採取し、相補的 DNA を合成し、遺伝子発現について定量的 polymerase chain reaction (PCR) で評価した。Matteoni 分類では NASH と判定する病理所見が ballooning であることから、ballooning(-) の 18 症例を NAFL の群、ballooning(+) の 36 症例を NASH の群に分けた。

まず、スクリーニングとして、NAFL 群から 6 例と NASH 群から 12 例を無作為に選び、84 種のサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子の発現を real-time PCR 法で検討したところ、interferon (IFN) γ 、interleukin (IL)2、IL15、CCL2、C-X-C Chemokine Ligand (CXCL)9、CXCL10 そして CXCL11 の遺伝子が、有意差がないものの、NASH 群で発現が増加する傾向にあった。次に、これらの遺伝子発現を、全 54 症例で特異的プライマープローブを用いた real-time PCR 法にて検討した。IFN γ 、IL2、IL15、CCL2 そして CXCL11 では NASH 群において有意な発現増加が認められたが、CXCL9 と CXCL10 では有意差がないものの、発現が増加する傾向にあった。さらに NAS の 3 要素 (steatosis、LI、hepatocellular ballooning) による層別化を行った。steatosis では、7 つの遺伝子全てで相関が認められず、LI では、IL2 のみで正の相関が認められた。ballooning では、IFN- γ 、IL2、IL15、CCL2 そして CXCL11 が ballooning の進行に従って正に相関していたが、CXCL9 と CXCL10 では有意な相関はみられなかった。これらの結果から、IFN γ 、IL2、IL15、CCL2 そして CXCL11 は、ballooning の進行に従って有意に発現が増加しており、NASH の進展との関連が示唆された。

これらの遺伝子は、自然免疫と獲得免疫 (Th1 経路) に関与するサイトカイン・ケモカインであるため、他の Th1 経路のサイトカインである IL12、Th1 経路を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) や CD4+ T helper 2 cell (Th2) 関連のサイトカイン (IL4、IL6、IL10)、そして CXCL9、10、11 の共通受容体である CXCR3 に変化が見られるかを、検討してみた。IL12、4、6 は有意差がないものの NASH 群で発現が増加する傾向にあった。IL10、CXCR3 は NASH 群で有意に発現が増加していた。これら 5 つの遺伝子も、NAS の 3 要素で層別化すると、steatosis では、5 つの遺伝子全てで相関が認められなかったが、LI では、CXCR3 のみ正の相関が認められた。これは、肝臓の炎症に応じて血中の T 細胞が活性化されることを示唆しており、肝組織でも CXCR3 を測定したところ、NASH 群で発現が有意に増加しており、PBMC の CXCL11 と肝組織の CXCR3 が有意な正の相関を認めた。ballooning による層別化では、IL4、IL10、CXCR3 が ballooning の進行に従って正に相関していた。これらの結果から、IL10 や CXCR3 も、ballooning の進行に従って有意に発現が増加し、NASH の進展との関連が示唆された。さらに血中の PBMC が肝組織に何らかの影響を及ぼしていることが推測された。

以上から、NASH の進展に自然免疫と Th1 経路に加えて Th2 経路や Treg も活性化していることが示唆され、これらの遺伝子の定量的評価で実際に NASH を見極める biomarker や判別法が作成できるか、検討した。単一の遺伝子で non NASH と NASH を区別できるか、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線にて、そのカットオフと Area Under Curve (AUC) を計算した。AUC

としては、IL10 が一番数値として高かったため biomarker の一つの候補とした。さらに、これらの遺伝子の中で AUC が高かった 3 つの遺伝子を選択し、その相対的発現量を、カットオフ値を参考に 0~2 点に層別化した。スコア化により non NASH と NASH を区別できるか否かを検討したところ、IL10、IFN γ 、CCL2 の 3 個の遺伝子の組み合わせで両者を判別できた。NASH を判別する方法として、この 3 つの遺伝子発現量のスコア化を候補に挙げ、この判別法が実際に他の NAFLD 患者でも有用であるか、別のコホートを用いて validation を行った。2017 年 1 月以降で既知の背景肝疾患がなく、臨床的に NAFLD を疑われ、経皮的肝生検を施行した 26 症例に対して、前述の判別法の有用性を検討した。この判別法では、2 例を除いた 24 症例で基準を満たしていた。この結果から、IL10、IFN γ 、CCL2 の 3 つの遺伝子の相対的発現量によるスコア化を、本研究の『NASH 判別法』とした。

他の biomarker の候補として、CCL5、CC receptor (CCR)9 そして Fibrosis related monocyte (SatM) 関連サイトカインに注目した。CCL5 は、NAFLD の肝線維化を促進させると報告されており、ballooning+/- の 2 群間の比較で有意差を認めた。NAS の 3 つの要素の層別化では、いずれも相関関係はなかった。validation の検討では 1 例を除いた 25 症例で基準を満たしており、CCL5 も判別法の一因子となり得る可能性が示された。CCR9 は、慶応義塾大学の中本らの報告で、CCR9/CCL25 を介して CD11b+マクロファージが肝内に遊走され、急性肝障害を引き起こすとされる。ballooning+/- の 2 群間の比較で有意差を認めたが、NAS の 3 つの要素の層別化では、steatosis のみ、正の相関関係が示された。CCR9 の発現が肝臓の脂肪化との相関が強いことを意味しており、ballooning の形成に直接関わっていない可能性が考えられた。実際に validation の検討でもほとんど基準を満たしておらず、NASH 判別法としての有用性は少ないと考えた。SatM は、大阪大学の審良らのグループから、肝線維化に関連すると報告された単球であり、特にその関連サイトカインである Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (Ceacam) 1、Macrophage scavenger receptor (Msr) 1、Macrophage-1 antigen (Mac1) について今回のコホートで発現量を検討した。ballooning+/- の 2 群間の比較で、Mac1 のみ有意差が認められ、NAFLD の ballooning には SatM が介入している可能性が低いと考えられた。

今回の研究では、免疫学的な観点から NASH の biomarker について検討を行ったが、近年、慢性炎症性疾患、悪性腫瘍そして自己免疫疾患で増加する S100A9 や、上皮系細胞でのネクロシスやアポトーシスの際に放出される CK18 などが報告されている。ヒトの NAFLD 症例の血漿でもいくつかのサイトカインが borderline/not NASH と NASH 群で有意に変化していると報告されているが、いずれも NASH を判定できる biomarker となるか、疑問が残されている。

今回 NASH の進展に自然免疫と獲得免疫のサイトカインが関与していることが分かった。実際に、これらのサイトカインと NAFLD との関連の仮説について文献的考察を加えてみた。まず LPS 刺激や微生物感染の際に自然免疫の免疫細胞から CCL2 が分泌され、マクロファージが活性化される。IL15 や IFN γ も分泌され、Th1 系の活性化を引き起こすと同時に肝臓の炎症を引き起こす。一方で IL15 は肝脂肪化の抑制に働くと考えられている。自然免疫系の免疫細胞から抗原の提示を受けた CD4+ナイーブ T 細胞が、IL12 刺激にて活性化される。IL2 は、活性化した Th1 系の

CD4+T 細胞から IFN γ 、CXCL9、10、11 などと一緒に分泌されて、CD8+細胞障害性 T 細胞や B 細胞等を活性化させ、細胞性免疫を起こす。CXCL9、10、11 の分泌を受けて CXCR3 をもつ T 細胞が次々と活性化し、これらの発現増加が肝臓に脂肪化、炎症そして線維化を引き起こす。さらに、これらのサイトカインに抑制的に働く IL10 の発現増加が肝内の線維化・細胞変性を引き起こし、NASH の進展の一因となる。

本研究で得られた知見は、PBMC が発現するサイトカイン・ケモカインが NASH 病態に関与している可能性がある点、そしてそれらを調べることで非侵襲的に NASH を診断できる可能性があることを示した点にあると考えている。本研究で同定された遺伝子を標的とした NASH の治療薬の開発への一助となれるよう、今後もさらなる検討を続けていきたい。