

審査の結果の要旨

氏名 門 輝

本研究は、本邦を含む世界中で急増する非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)と、その肝疾患への末梢血中の免疫細胞の関与についてヒトの末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) と肝生検検体の一部を用いて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 当院消化器内科で 2015 年 4 月から 2017 年 1 月の間に、経皮的肝生検を施行し、病理学的に NAFLD と診断された 54 症例について検討を行った。NAFLD activity score (NAS) に層別化し、54 症例から PBMC を採取し、遺伝子発現について定量的 PCR で評価した。Matteoni 分類に従い、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 症例で詳細に検討したところ、CXCL9、CXCL10 以外の 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。NAS の層別化でも、上記 5 つの遺伝子が ballooning の進行に従って正に相関していたことから、5 つの遺伝子と NASH 進展との関連が示唆された。
2. 自然免疫と獲得免疫 (Th1 経路) に関与するこれら 5 つの遺伝子以外に、制御性 T 細胞 (Treg) や CD4+ T helper 2 cell (Th2) 関連のサイトカインである IL10 や、CXCL9、10、11 の共通受容体である CXCR3 が NASH 群で有意に発現が増加していた。さらに、この 2 つの遺伝子は、ballooning による層別化で、ballooning の進行に従って正に相関していた。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。肝生検の検体で CXCR3 が NASH 群で発現が有意に増加し、PBMC の CXCL11 と肝組織の CXCR3 が有意な正の相関を認めたことから、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示唆された。これらの結果から、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た。
3. 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 Receiver Operating Characteristic (ROC)

曲線、そのカットオフ及び Area Under Curve (AUC) を計算したところ、IL10 が 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 (IL10、IFN γ 、CCL2) の組み合わせで、その相対的発現量を、カットオフ値を参考に 0~2 点に層別化して、NASH 判別法を作成した。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(26 症例)を用いて validation を行ったところ、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。

4. 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。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。これも ballooning+/- の 2 群間の比較で有意差を認めたが、CCR9 の発現が肝臓の脂肪化との相関が強いことも示され、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が、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。

以上、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り、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明らかにした。本研究が、脂肪性肝疾患の病態解明及び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ると考えられ、学位の授与に値するものと判断された。