

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

ATP8B1 の機能低下によりもたらされる  
ヒト単球由来マクロファージの表現型異常  
に対する機序の解析および  
その小児肝疾患診断技術としての応用

氏名 仁島 大毅

### 【背景・目的】

家族性肝内胆汁うっ滞症は、乳幼児期に発症する常染色体劣性遺伝疾患である。急速に進行し肝硬変・肝不全に至る進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)と、軽症で肝硬変には至らない良性反復性肝内胆汁うっ滞(BRIC)に大別される。両病型は原因遺伝子の違いから、さらに PFIC1～5, BRIC1,2 のサブタイプに細分化される。いずれに対しても内科的治療法は存在せず、PFIC で

は肝移植、小腸移植を含む外科治療が必要となる。一方、BRIC では症状は一過性で最終的には自然軽快するため、外科治療ではなく支持療法が望まれる。このように両病型では治療方針が大きく異なる反面、現状では発症早期の鑑別が困難で、臨床経過を通じて事後に鑑別がなされている。また、PFIC ではサブタイプにより最適な外科治療が異なるが、遺伝子変異検査では病因変異の同定に難渋するケースが散見される。従って家族性肝内胆汁うっ滞症では各症例の予後予測、ひいては治療方針の決定を発症早期に実現すべく、PFIC, BRIC の鑑別、各サブタイプを決定する診断技術の開発が切望されている。

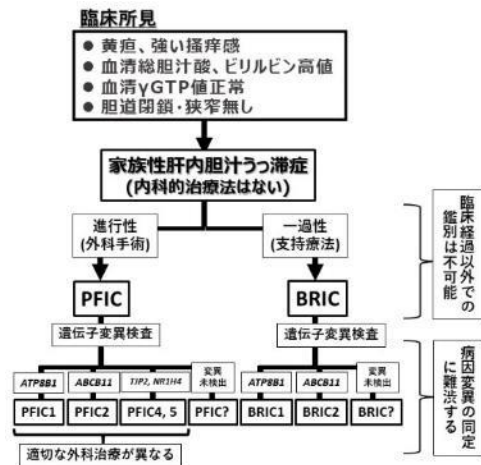


Fig.1 現行の診断方針とその問題点

細胞膜内外のリン脂質構成比の制御に働くフリッパーゼをコードする *ATP8B1* は、PFIC1、BRIC1 の原因遺伝子として知られている。当研究室では、*ATP8B1* の機能低下が、IL-10 刺激による末梢血単球由来マクロファージ(HMDM)の M2c マクロファージ(M $\phi$ )への極性を阻害し、M2c M $\phi$  マーカーの発現量低下などの表現型異常として顕在化することを見出している。HMDM は低侵襲に患者から調製が可能であることから、本研究ではこの M2c M $\phi$  の表現型異常を利用し、家族性肝内胆汁うっ滞症の臨床所見を呈する症例から、PFIC1 の選別が可能であるかを検討した。

*ATP8B1* の機能破綻により、PFIC1 の病態が生じる機構は不明である。*ATP8B1* の機能低下による M2c M $\phi$  の表現型異常の機序解析が、病態発症機構の手掛かりとなる可能性があるが、PFIC1 の希少性から現状では詳細な解析は困難である。そこで本研究では、ヒト急性単球性白血球由来細胞株である THP-1 細胞を利用し、本表現型を再現するモデル細胞株の確立を試みた。

## 【方法・結果】

### 1. HMDM の IL-10 刺激により生じる M2c M $\phi$ の表現型から PFIC1、BRIC1 の鑑別が可能である

全国の医療施設に通院する家族性肝内胆汁うっ滞症の患児、ご家族にご協力頂き、各患児の末梢血由来単球を M-CSF で分化誘導し HMDM を調製した。さらに HMDM を IL-10 刺激により M2c M $\phi$  へと極性化させ、M2c M $\phi$  マーカー(CD163, CD14)の発現、細胞形態をフローサイトメーターを用いて定量解析した。その結果、PFIC1 患児(n=4)では、他の PFIC 患児(n=4)、コントロール児 (他の肝疾患、健常児など) に比べ、CD163、CD14 の発現量低下や、SSC の増加が有意に認められた。本方法を用い、片アレルにのみ *ATP8B1* 変異を有する、臨床的 PFIC 患児 (n=4) を鑑別したところ、3 例で *ATP8B1* の機能欠損を示唆する結果が得られた。当該症例の肝組織では、*ATP8B1* 発現が欠落していた。

## 2. ATP8B1の機能低下によるIL-10刺激を介したSTAT3 $\alpha$ のS727リン酸化の抑制

IL-10による刺激は、STAT3のチロシン(Y705)、セリン(S727)リン酸化によって伝達され、炎症性の遺伝子発現が誘導される。HMDMにおいてこのIL-10刺激応答性STAT3リン酸化を評価したところ、高分子量側に現れる特定のSTAT3 $\alpha$ に対するS727リン酸化(pS-STAT3 $\alpha_{upper}$ )が、siRNAによるATP8B1のノックダウン(KD)により阻害されることが明らかとなった。また、STAT3により直接的に正の転写制御を受ける遺伝子群(SOCS3, ZFP36, SBNO2)の誘導が抑制された。

STAT3のS727リン酸化には、細胞種、刺激により様々なキナーゼの関与が報告されている。IL-10刺激により、HMDMにおいて誘導されるpS-STAT3 $\alpha_{upper}$ を担うキナーゼを探索するため、種々のキナーゼ阻害剤の影響を評価した。その結果、いくつかの阻害剤存在下において、IL-10刺激によるpS-STAT3 $\alpha_{upper}$ の減弱を確認した。

## 3. THP-1細胞のM2c-like M $\phi$ への分化誘導条件の確立

M2c M $\phi$ はCD14、CD163、CD16の発現により定義される抗炎症性M $\phi$ である。不死化細胞株において、これらM2c M $\phi$ マーカーを同時に発現する培養条件は確立していない。そこでヒト急性単球性白血病由来細胞株であるTHP-1細胞を様々な条件下でTHP-1 M $\phi$ へと分化誘導し、M2c M $\phi$ マーカーの発現の有無を検討した。その結果、THP-1 M $\phi$ への分化誘導に汎用される条件(1.0 x 10<sup>6</sup> cells/ml, PMA 100 ng/ml)とは異なる条件下で分化誘導したTHP-1 M $\phi$ をIL-10で刺激することにより、ATP8B1に加えCD14, CD163, CD16遺伝子を発現誘導することに成功した。

ATP8B1に対するshRNAを安定的に発現するTHP-1細胞株を作成し、IL-10刺激応答性を評価した。その結果、HMDMと同様ATP8B1の発現抑制により、STAT3により直接正の転写制御を受けるSOCS3, ZFP36の発現誘導及び、M2c M $\phi$ マーカーCD14, CD163の発現上昇が抑制された。また、HMDMでIL-10刺激によるpS-STAT3 $\alpha_{upper}$ を抑制したキナーゼ阻害剤はいずれも、THP-1 M $\phi$ でも同様に、IL-10刺激によるpS-STAT3 $\alpha_{upper}$ を阻害し、その内、いくつかのキナーゼ阻害剤でM2c M $\phi$ マーカーCD14, CD163の発現誘導抑制が見られた。

### 【まとめ・考察】

本研究ではM2c M $\phi$ の表現型を用いることにより、家族性肝内胆汁うっ滞症の患児からATP8B1機能が低下している患児を鑑別し、さらには当該患児の予後を予測(PFIC1の鑑別)出来る可能性を見出した。本成果により、PFIC1を発症早期に迅速かつ正確に選別し、適切な症例に適切な時期に移植医療を行うとともに、不要な外科治療や投薬を控えることが可能となるため、本疾患患児の生命予後、生活の質が改善するものと期待される。

HMDMのIL-10刺激により生じるpS-STAT3 $\alpha_{upper}$ には特定のキナーゼが関与しており、

ATP8B1 は当該経路を介し、M2c M $\phi$  への極性化制御に働くことが示唆された。今後、THP-1 細胞由来の M2c-like M $\phi$  を利用し、詳細な解析を進めることにより、ATP8B1 による本シグナル伝達系の制御機構、ひいては ATP8B1 の機能低下が家族性肝内胆汁うっ滞症の病態を惹起する機序が明らかになるものと期待される。