

審査の結果の要旨

氏名 仁島 大毅

仁島大毅は進行性家族性肝内胆汁うっ滞(PFIC)I型(PFIC1)の原因遺伝子であるATP8B1に関連する研究を行い、その成果に基づいて博士論文を執筆した。

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。

ATP8B1は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であり、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 ϕ)への極性化を阻害し、M2c M ϕ 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 ϕ 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。

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、ご家族のご協力を得て、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 ϕ へと極性化させ、M2c M ϕ マーカー(CD163, CD14)の発現および細胞形態を、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。

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、抗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 α に対するS727リン酸化(pS-STAT3 α_{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 α_{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、いくつかのキナーゼ阻害剤存在下において、IL-10 刺激による pS-STAT3 α_{upper} の減弱が確認されたことから、これらのキナーゼが関与していることが考えられる。

ATP8B1 の機能破綻により、PFIC1 の病態が生じる機序は未だ解明されていない。ATP8B1 の機能低下による M2c M ϕ 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病由来細胞株である 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。M2c M ϕ は CD14、CD163、CD16 の発現により定義される抗炎症性 M ϕ である。不死化細胞株において、これら M2c M ϕ 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 ϕ へと分化誘導し、M2c M ϕ マーカーの発現の有無を検討した。その結果、THP-1 M ϕ への分化誘導に汎用される条件(1.0x10⁶ cells/ml, PMA100ng/ml) とは異なる条件下で分化誘導した THP-1 M ϕ 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 ϕ 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 α_{upper} を抑制したキナーゼ阻害剤はいずれも、THP-1 M ϕ でも同様に、IL-10 刺激による pS-STAT3 α_{upper} を阻害し、その内、いくつかのキナーゼ阻害剤で M2c M ϕ マーカー CD14、CD163 の発現誘導抑制が見られた。

本研究では M2c M ϕ 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。

本研究は、ATP8B1 の欠損による疾患発症機序の理解ならびに、治療方法の開発に貢献するものである。今後、モデル細胞を用いることで、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。

よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。