

[別紙2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 直井 壯太郎

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 と PFIC2 は、発症から病態がある程度進行するまでの間、症状や検査値における差が認められず、臨床所見は酷似している。しかしながら、その治療に対するレスポンスは大きく異なり、早期に鑑別することは、PFIC1、PFIC2 の適切な治療方針を決定する上で重要である。PFIC1、PFIC2 は肝不全へと至る前に肝移植が検討され、現在までにその症例報告が蓄積されてきているが、PFIC2 患者は概ね予後が良好であるのに対し、PFIC1 患者は移植肝に脂肪性肝炎を発症し、肝硬変へと至ることが明らかとなってきた。そこで適切な治療方針を早期に決定できるよう、PFIC1、PFIC2 を鑑別する必要があるが、責任遺伝子である *ATP8B1*、*ABCB11 (BSEP)* の各エクソン配列の解析を行っても、両アレルに病因として明らかな変異を同定できない事例も多く、イントロンやプロモーター領域における変異による mRNA 量の減少が想定されるようなケースも見られる。そのため、遺伝子解析単独では、PFIC 型の鑑別に不十分である。そこで診断を目的に、*ATP8B1*、*BSEP* のタンパク質発現の有無を検討するために、肝生検サンプルを用いた免疫組織染色、Western blotting が行われているが、厳密なコントロールを取れないことや、発現が中程度に見られる場合には判断が困難であることが問題である。また乳児早期から肝生検を行える施設が限られていることなどから、気軽に行える検査ではない。

申請者である直井壯太郎は、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て、より採取しやすい検体を用いた PFIC1 の診断法の確立を目的として研究を行った。そこでまず、*ATP8B1* が *BSEP* と異なり、肝臓以外にも発現することに着目し、採血で得られる血球での発現プロファイルを取ったところ、ヒト単球由来マクロファージ (MDM) における発現を初めて見出した。さらに、*ATP8B1* が M2c と呼ばれる MDM のサブタイプにおいて豊富に発現し、*ATP8B1* の欠損がこのサブタイプへの極性化に影響を与え、マーカータンパク質の低下、脂肪滴蓄積の上昇というフェノタイプを明らかとした。そして、PFIC1、PFIC2 患者由来の MDM を用いた解析から、これらフェノタイプの診断マーカーとしての応用可能性を示した。

以下に研究の概略を示す。

ヒト全血から分離した各血球における発現を比較したところ、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、その評価によって診断が可能になるというスキームを立て、詳細な解析を行った。まず

siRNAにより ATP8B1 をノックダウンした MDM、また PFIC1 患者 MDM におけるタンパク質発現を Western blotting により解析したところ、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、ATP8B1 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十分なフェノタイプであると考えられた。

以上のように、申請者は、PFIC1 の責任遺伝子 *ATP8B1* の遺伝子産物である ATP8B1 のタンパク質機能の低下を、末梢血から分離・分化させることで得られる MDM を用いて評価することを可能にした。この成果により、これまで遺伝子解析だけでは鑑別できていなかった PFIC 疑いの患者を鑑別できる可能性が示された。実際に診断が困難であったケースが、MDM のフェノタイプを解析することにより、典型的な PFIC1 患者群と区別されることも示しており、診断法として有用であることが示唆された。また、ATP8B1 の欠損が抗炎症作用を持つ M2c サブタイプへの極性化に影響を与えることが明らかとなったことから、PFIC1 の病態における M2c サブタイプの関与について展望が開かれたことも当該研究の意義として大きい。本研究で得られた知見は、PFIC1 の鑑別に貢献するとともに、ヒト検体を用いた遺伝性疾患の診断の新たな手法を提示するものであり、博士 (薬科学) の学位を授与するに値するものと認めた。