

タイトル：肝疾患難病「原発性胆汁性肝硬変」の新規マーカーによる予後予測

著者：中村 稔^{1,2}、相葉佳洋¹、小森敦正^{1,2}、石橋 大海^{1,2}

- 1 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター
- 2 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻肝臓病学講座

別刷り請求先：中村 稔 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター内
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科肝臓病学講座

〒856-8562 長崎県大村市久原 2-1001-1

nakamuram@nmc.hosp.go.jp

別刷り希望冊数：100部

New biomarkers for the detection of disease-progression in primary biliary cirrhosis, an intractable liver disease

Minoru Nakamura, Yoshihiro Aiba, Atsumasa Komori, Hiromi Ishibashi

Key Words: primary biliary cirrhosis(PBC), anti-mitochondrial antibody(AMA), anti-gp210 antibody, prediction of prognosis, multicenter cohort study

要旨

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, 以下 PBC と略す) は未だ根治的な治療法が確立していない肝疾患難病の一つであるが、生涯ほとんど進行しない症例や進行して肝移植が必要となる症例が存在する。PBC の診断には、本疾患に特異的に出現する抗ミトコンドリア抗体(anti-mitochondrial antibodies, 以下 AMA と略す)の測定がきわめて有用であるが、AMA は PBC の活動性や長期予後の診断には有用ではないとされ、PBC の長期予後診断に有用なバイオマーカーは知られていなかった。最近我々は、国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ(National Hospital Organization Study Group for Liver Disease in Japan:NHOSLJ)のコホート研究により、PBC の長期予後の診断には、核膜孔蛋白 (gp210 抗原) に対する自己抗体 (抗 gp210 抗体) の測定が有用であることを明らかにした。さらに、抗 gp210 抗体が黄疸を呈し肝不全へ進行するタイプ (肝不全型) の強い危険因子であるのに対して、抗セントロメア抗体が黄疸は呈さないが門脈圧亢進症へ進展するタイプ (門脈圧亢進症型) の危険因子であることも明らかにした。抗 gp210 抗体と抗セントロメア抗体の測定で予後を推定することが可能となり、より早い時期から対策 (治療計画) を立てることができるようになった。

(456 字)

キーワード: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、抗 gp210 抗体、抗セントロメア抗体、予後予測、多施設共同研究、国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ (NHOSLJ)

はじめに

現在、我が国では、いわゆる“難病（昭和 47 年の難病対策要綱によって定義）”の中から 123 疾患が難治性疾患克服研究事業対象疾患（特定疾患）に指定され、うち 45 疾患の医療費が公費負担助成の対象となっている。原発性胆汁性肝硬変（PBC）も、公費負担助成対象となっている特定疾患のひとつであり、厚生労働科学研究費補助金により調査研究班が組織され、実態調査や原因究明、治療法の確立などに関する研究が行われている（難病情報センター <http://www.nanbyou.or.jp/>）。

PBC のような稀有で慢性に経過する疾患では、その原因究明や治療法の確立のためには、長期間にわたる全国規模での共同研究が不可欠である。我々は、平成 15 年度から国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ(NHOSLJ)の中に PBC 研究班(参加 25 施設)を組織し、多施設共同研究を開始した。

PBC には、長期間経過を観察してもほとんど進行しない症例（予後良好群）から、黄疸、肝硬変、肝不全へ進行し肝移植以外に救命方法がない症例（予後不良群）までさまざまな病態ないしは重症度の症例が存在することから、まず、これらの予後良好群と不良群とを発症早期に鑑別するための血清および遺伝子バイオマーカーの同定を目指して臨床研究を開始した。

今までに、核膜孔蛋白の構成成分のひとつである gp210 に対する自己抗体（抗 gp210 抗体）が PBC の肝不全型（黄疸型）進行の強い危険因子であること、抗セントロメア抗体が門脈圧亢進症型（非黄疸型）進行の危険因子であることを見出し、自己抗体をバイオマーカーとした PBC の新しい病型分類を提唱している^{1,2)}。

本総説では、この病型分類提唱のきっかけとなった抗 gp210 抗体の臨床的意義について我々のデータを中心に紹介するとともに、PBC の進展機構に関する我々の現時点での考え方についても紹介する³⁾。

1. 原発性胆汁性肝硬変（PBC）とは

PBC は肝内小葉間胆管の障害・破壊を呈する慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする慢性の肝疾患である。中年女性に好発し、初期には無症状のことが多いが、典型例では、進行すると全身の掻痒感、食道静脈瘤、腹水、黄疸、脳症が出現して肝不全に至り、究極的には肝臓移植以外に救命方法がない。平成 2 年からは特定疾患に指定され、医療費の公費負担対象となる症候性 PBC 患者は年間約 500 - 1000 人で、現在までに約 1 万 5 千人が登録されている。病因に関しては、AMA や抗核抗体などの自己抗体が高率に出現することや門脈域に小葉間胆管を攻撃しているように見えるリンパ球の浸潤を認めることから、小葉間胆管を標的とする自己免疫疾患と考えられているが、その発症・進展機構の詳細については未だ明らかではない。

近年、健診と診断法の普及により、肝機能異常を契機に AMA を検査されて早期診断される症例や、ウルソデオキシコール酸（ursodeoxycholic acid, 以下 UDCA と略す）投与によ

り肝機能が正常化し、長期間の経過観察でも病状の進行を認めない無症候性の症例が増加しているが、種々の治療にもかかわらず病状が進行し、肝硬変・肝不全に至る症例が約 10-20%存在すると推定されている。

2. PBC に出現する自己抗体

本症では、ミトコンドリアや核成分に対するさまざまな自己抗体が出現することが知られている（表 1）。AMA はきわめて疾患特異性が高く、PBC 患者の 90%以上に陽性となるため、その診断には不可欠の検査項目となっている。核膜孔蛋白(gp210) や核小体蛋白(sp100)に対する自己抗体も、陽性率は約 20-30%と高くはないが、PBC 患者にきわめて特異的に検出されるため、その診断に有用である。特異性は高くはないが、抗セントロメア抗体も 20-40%の症例で陽性となる。

一方、PBC の活動性の評価や予後の診断に有用な自己抗体としては、gp210 や sp100 などの核抗原に対する自己抗体の有用性を示唆する少数の報告はあったが、いずれも横断的研究からの結論であり、PBC 症例を長期間観察したコホート研究の報告はなかった。そこで我々は、AMA の主要標的抗原であるピルビン酸脱水素酵素 E2 コンポーネント (PDC-E2) と gp210 蛋白との間に EIEXDK モチーフを介する分子相同性があることを見出していたことから（図 1）⁴⁾、gp210 蛋白に対する免疫応答の出現と PBC の進展との関係に興味を持ち、抗 gp210 抗体の測定を開始した²⁾。

3. 抗 gp210 抗体測定系の確立と PBC の長期予後

gp210 は、核膜孔を構成する一回膜貫通型の 1887 アミノ酸よりなる分子量 2 万 1 千の糖蛋白で、N 末が核膜腔に、C 末が細胞質側に局在する（図 1）。膜貫通部より N 末は、約 1800 のアミノ酸より構成され糖鎖を多く含むのに対し、C 末は 60 個のアミノ酸からなるペプチドで糖鎖結合部位は存在しない。その機能については核膜孔の構成成分であること以外は未だ明らかになっていない。

gp210 に対する自己抗体が結合する抗原部位は N 末と C 末の両方に存在することが報告されていたが、我々は、C 末のペプチド (SPNALPPARKASPPSGLWSPAYASH)（図 1）を用いた ELISA が、精製あるいはリコンビナント gp210 蛋白を用いたイムノブロット法や ELISA に比べて、抗 gp210 抗体検出の感度をはるかに優れていたことから、この 25-mer の gp210-C 末のペプチドを用いた ELISA を用いて gp210 抗体の測定を開始した²⁾。このアッセイ系では、抗 gp210 抗体は PBC 患者でのみ検出され、他の疾患（自己免疫性肝炎、ウイルス肝炎、肝硬変、膠原病）では全く検出されず、PBC にきわめて特異性の高い自己抗体を検出していることが確認された（図 2）²⁾。

次に、長崎医療センターで過去 30 年間に定期的に血清が保存されていた PBC 症例の抗 gp210 抗体価を経時的に測定した（図 3）。gp210 抗体が持続陽性の 10 症例のうち 6 症例は観察期間中に肝不全死か肝移植に至っていたが(group A)、抗 gp210 抗体が UDCA 投与

により陰性化した症例は一例も肝不全や肝移植には至らず全例生存していた(group B)。国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ(NHOSLJ)での 71 症例の Kaplan-Meier 法による解析では、抗 gp210 抗体が持続陽性の症例(group A)は、経過中に陰性化した症例(group B)や診断時より抗 gp210 抗体が陰性であった症例(group C)に比べて有意に肝移植や肝不全死に至る症例の割合が多かった (図 4)。以上から、抗 gp210 抗体の測定は、PBC 患者の長期予後を予測するためのきわめて有用な血清マーカーであることが示唆された²⁾。

4.PBC の進行と抗核抗体

PBCの進行における抗核抗体の意義をさらに詳細に解析するために、国立病院機構政策医療肝疾患共同研究グループ(NHOSLJ)に登録された 276 症例の血清抗gp210 抗体、抗セントロメア抗体、抗sp100 抗体、抗クロマチン抗体を経時的に測定した¹⁾。これらの自己抗体の有無とPBCの予後についてのKaplan-Meier法による解析では、抗gp210 抗体陽性群は陰性群に比べて有意に肝不全死、肝移植に至った症例が多かったが、抗sp100 抗体、抗セントロメア抗体、抗クロマチン抗体の陽性群、陰性群の間には、転帰に有意差を認めなかった¹⁾。

次に、観察開始時に早期(Scheuer's stage 1, 2 であった 217 症例について、進行のエンドポイントを胃食道静脈瘤の出現 (門脈圧亢進症型進行 or 非黄疸型進行)、黄疸・肝不全の出現 (肝不全型進行 or 黄疸型進行) に分けて解析を行なったところ、抗 gp210 抗体陽性は肝不全型進行の強い危険因子であり、抗セントロメア抗体陽性は門脈圧亢進症型 (or 非黄疸型) 進行の有意な危険因子であることが明らかとなった (表 2)¹⁾。また、病理学的には、抗 gp210 抗体陽性は病理学的活動性の指標とされる限界板の破壊(interface hepatitis)あるいは肝小葉内炎症(lobular inflammation)の有意な危険因子であり、抗セントロメア抗体陽性は細胆管—小葉間胆管の増殖反応(ductular reaction) の有意な危険因子であった¹⁾。

5.PBC の病型分類と進行仮説

以上のことから、PBC は比較的急速に進行し肝不全、肝移植に至る抗 gp210 抗体陽性群と、比較的緩徐に進行し門脈圧亢進症に至る抗セントロメア抗体陽性群、および長期経過観察でもほとんど進行しない非進行群の 3 群に分類されることが示唆された^{1,3)}。また、肝生検組織における gp210 蛋白の局在を、gp210-C 末に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、免疫染色にて検討したところ、核膜の gp210 の染色性は、PBC だけでなく、自己免疫性肝炎やウイルス肝炎においても門脈域の炎症細胞に囲まれた小葉間胆管細胞において亢進しており、炎症を介した何らかの機序により gp210 の発現に変化が生じていることが推測された⁵⁾。

我々は現在、図 5 に示すような進行仮説を提唱している³⁾。①PDC-E2 に対する免疫寛容の破綻は発症早期に生じ、門脈域の炎症細胞浸潤の持続に必須であるが、それだけでは stage 3, 4 への進行には不十分である。②stage 3, 4 への進行には gp210 に対する免疫寛

容の破綻が必要であり、特に黄疸、肝不全への進行には gp210 に対する免疫寛容の破綻が不可欠である。③PDC-E2 に対する免疫寛容の破綻から gp210 に対する免疫寛容の破綻に至る過程 (intermolecular epitope spreading) で、分子擬態 (molecular mimicry) や小葉間胆管細胞における gp210 抗原の発現の変化 (aberrant expression) が重要な役割を果たしている可能性がある。④セントロメアに対する免疫寛容の破綻は PBC の発症早期に生じており、抗セントロメア抗体陽性群では発症早期に将来の stage 3, 4 への進行のリスクが規定されている。

また、最近我々は、黄疸、肝不全への進行に Multidrug resistance protein 3 (MDR3/ABCB4) の遺伝子多型 (SNPs) が関与していることも明らかにした⁶⁾。

おわりに

抗 gp210 抗体は PBC の病理学的活動性を反映する血清マーカーであり、その出現は、PBC における胆管障害、さらには肝硬変、肝不全への進展の重要な危険因子であることを明らかにした。血清抗 gp210 抗体の陽性化は、PBC の病理学的活動性とも相関しており、gp210 蛋白に対する免疫応答が PBC の胆管障害、さらには肝硬変、肝不全への進展に重要な役割を果たしていることが推定される。一方、抗セントロメア抗体の出現は、門脈圧亢進症への進行の危険因子であることが判明した。病型の違いにより異なる自己抗体が陽性となる現象は、病型により標的となる自己抗原や自己抗原の提示機構が異なることを示唆しており、PBC の病因を考える上できわめて興味深い現象と思われる。今後は、病型分類に基づく血清および遺伝子バイオマーカーの探索と同時に、これらの自己抗原に対する免疫寛容の破綻機構の解析をすすめる必要がある。

[文献]

- 1) Nakamura M, Kondo H, Mori T, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45:118-27
- 2) Nakamura M, Shimizu-Yoshida Y, Takii Y, et al. Antibody titer to gp210-C terminal peptide as a clinical parameter for monitoring primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2005; 42:386-92
- 3) Nakamura M, Komori A, Ito M, et al. Predictive role of anti-gp210 and anti-centromere antibodies in long-term outcome of primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* 2007, 37:S412-19
- 4) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, et al. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 124:1915-25
- 5) Nakamura M, Takii Y, Ito M, et al. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmunity* 2006; 26:138-45
- 6) Ohishi Y, Nakamura M, Iio N, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis of the multidrug resistance protein 3 gene for the detection of clinical progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008, April 18, [Epub ahead of print]

図の説明

図 1 . 核膜孔蛋白 gp210 の構造

図 2 . gp210-C 末ペプチドに対する血清抗体価

図 3 .PBC 患者の抗 gp210 抗体価の経時的変化と転帰

図 4 .PBC 患者の生存率

図 5. PBC の進行仮説

表 1. 原発性胆汁性肝硬変で出現する自己抗体とその対応抗原

・抗ミトコンドリア抗体	抗原
抗 PDC 抗体	PDC-E2 (74 kD)
	PDC-E3BP (50 kD)
	PDC-E1a (41 kD)
抗 OGDC 抗体	OGDC-E2 (48 kD)
抗 BCOADC 抗体	BCOADC-E2 (52 kD)
・抗核抗体	
抗核膜抗体	gp210 (核膜孔蛋白 210 kD)
	p62 (核膜孔蛋白 62 kD)
	Lamin B Receptor (58 kD)
抗核小体抗体	sp100 (100 kD)
	PML, SUMO
抗セントロメア抗体	CENP-B (80 kD)

表 2. 原発性胆汁性肝硬変の進行に対する危険因子 (n=217)

因子	Odds ratio (95% confidence interval)		
	全	門脈圧亢進症 (非黄疸型)	肝不全 (黄疸型)
性、男	—	—	—
年齢 (one year ⁻¹)	—	1.08 (1.01 – 1.16)	—
gp210 抗体陽性	7.09 (2.65 – 20.21)	—	33.78 (5.93 – 636.75)
セントロメア抗体陽性	4.49 (1.66 – 12.78)	4.20 (1.31 – 14.76)	—
sp100 抗体陽性	—	—	—
クロマチン抗体陽性	—	—	—

(unconditional step-wise logistic regression analysis)

(文献より 改変)

図1 核膜孔蛋白gp210の構造

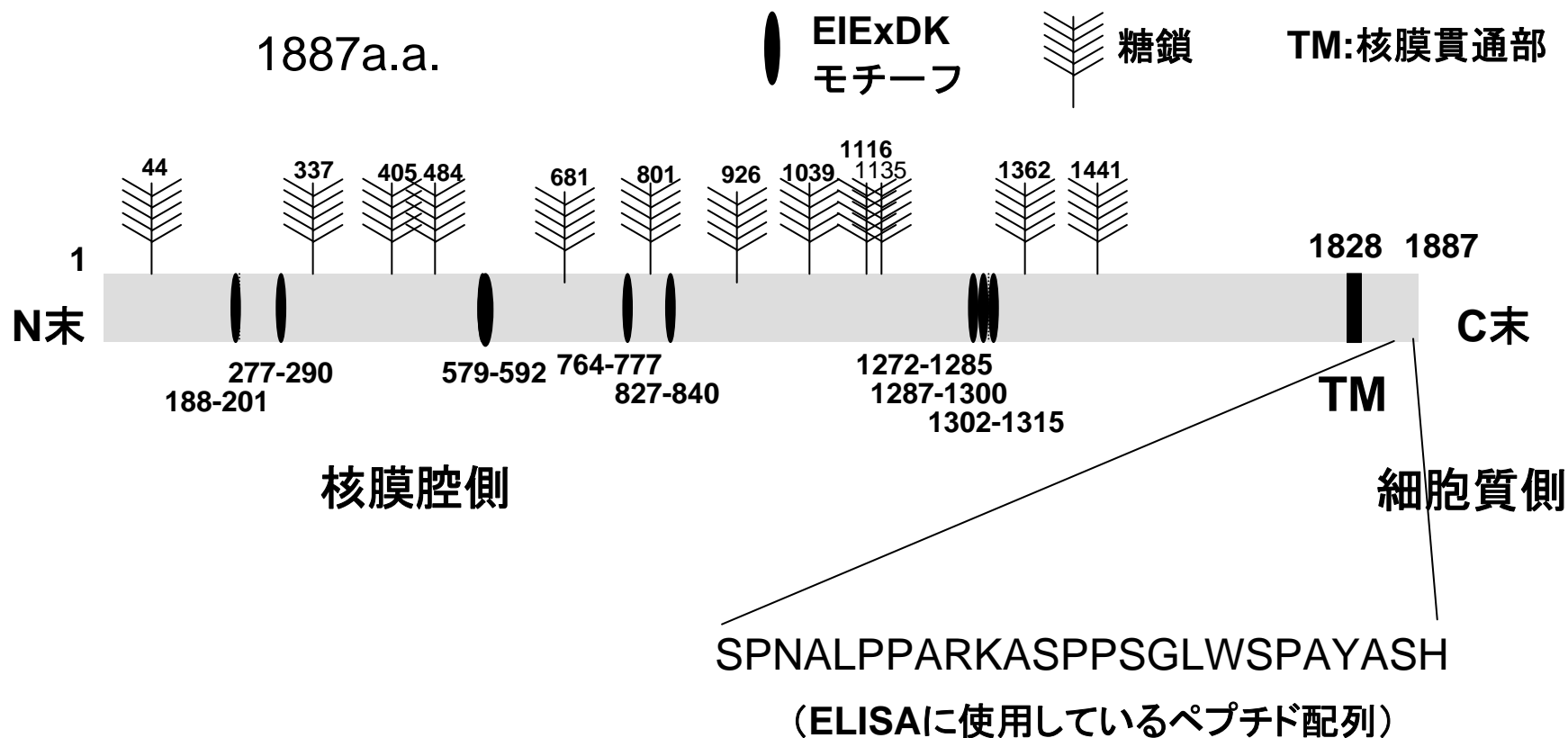
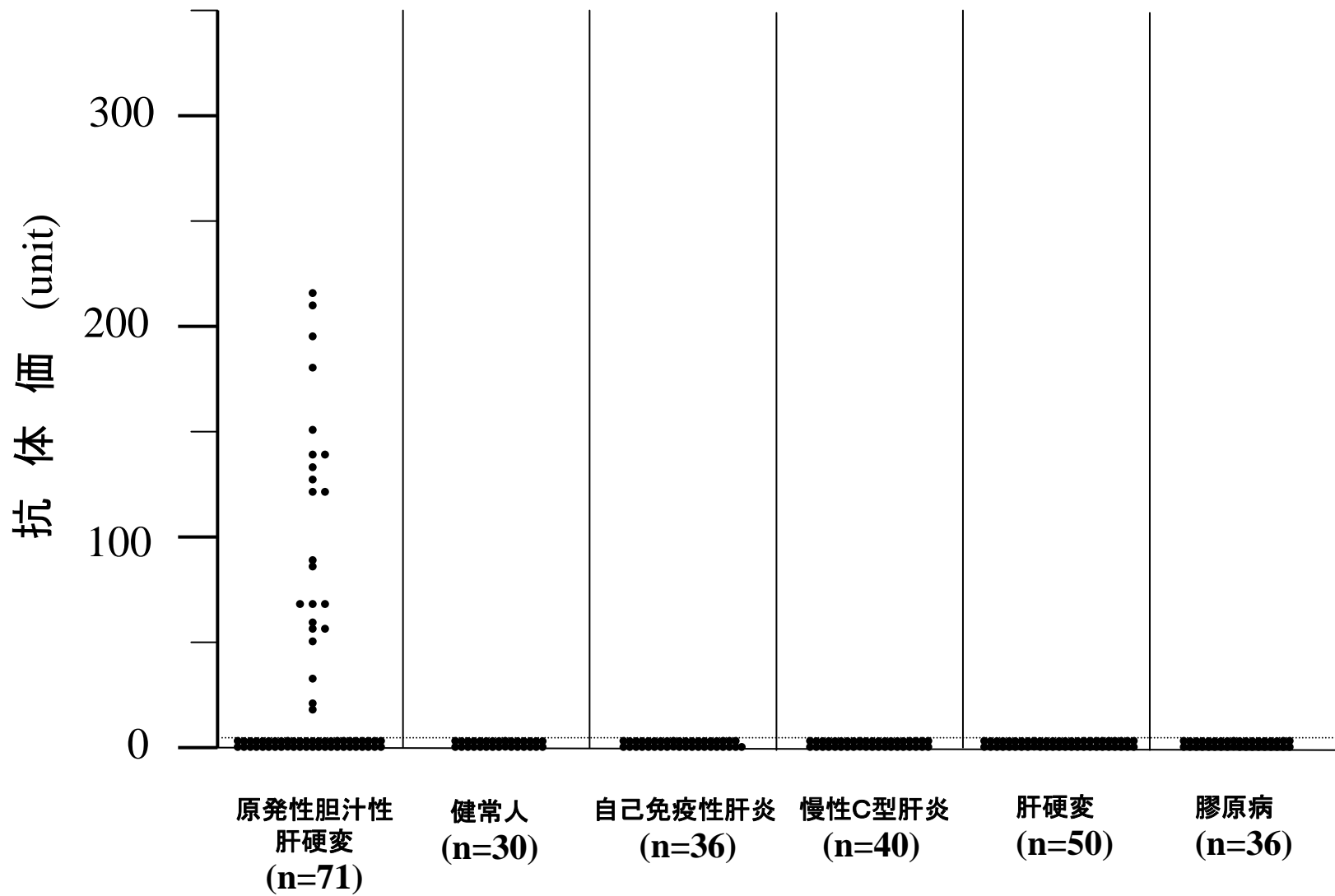
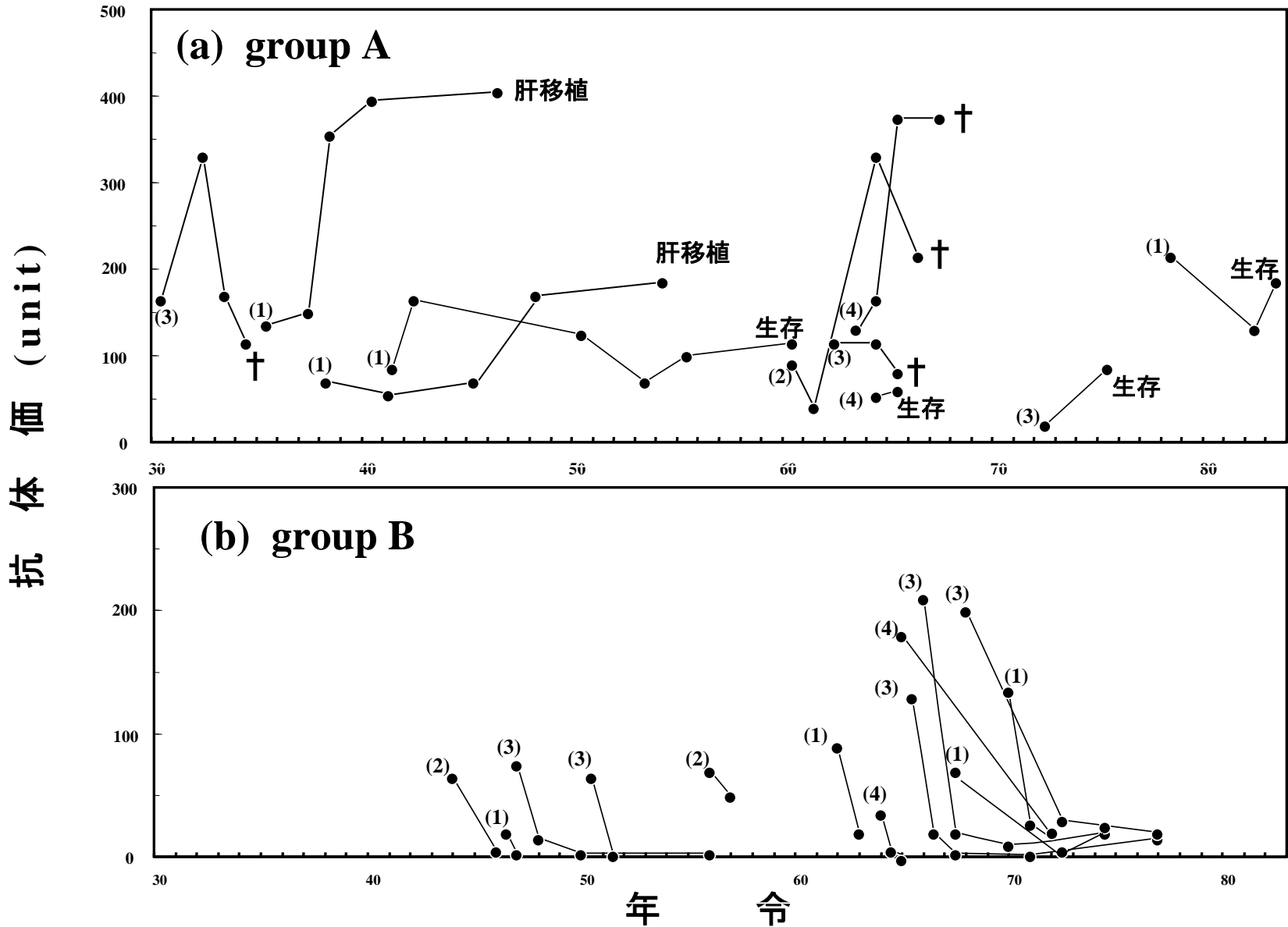


図2 gp210-C 末ペプチドに対する血清抗体価



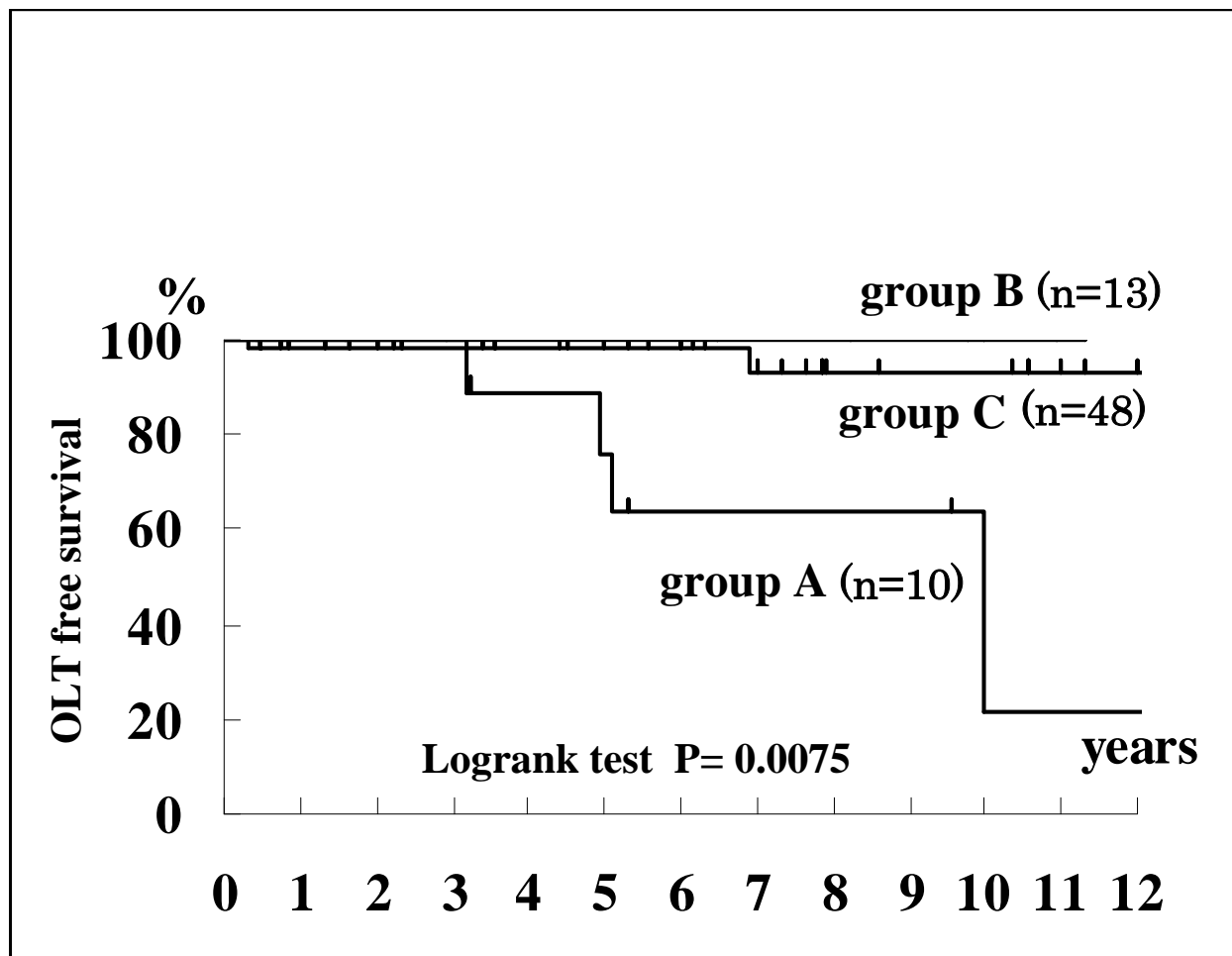
(文献2より改変)

図3 原発性胆汁性肝硬変患者の抗gp210抗体価の経時的変化と転帰



(文献2より 改変)

図4 原発性胆汁性肝硬変患者の生存率



OLT:肝移植

group A : gp210抗体価が持続高値

group B : gp210抗体価が低下あるいは陰性化

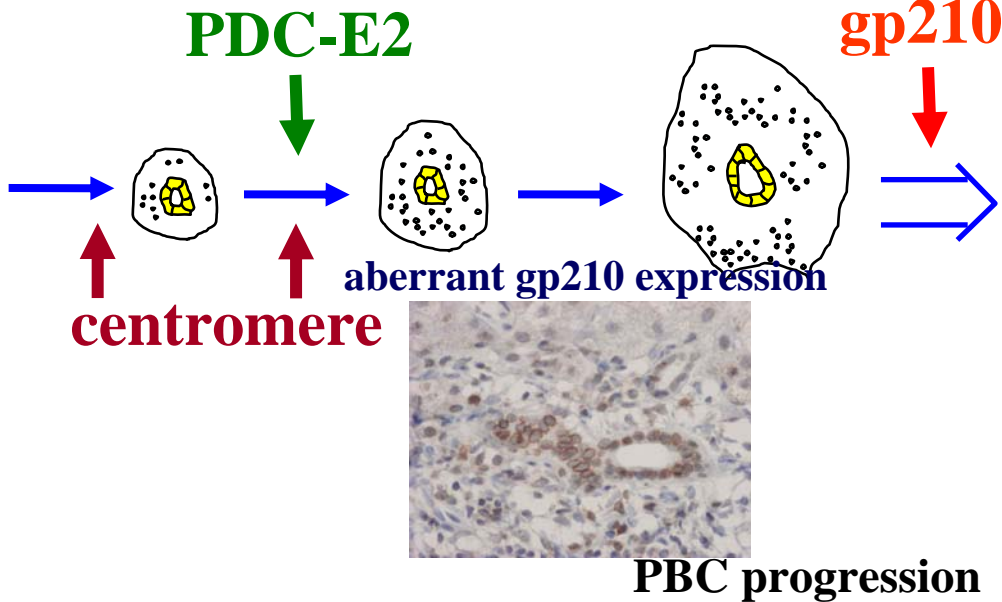
group C : gp210抗体陰性

(文献2 より 改変)

図5 原発性胆汁性肝硬変の進行仮説

PDC-E2 163-176 : GDLLA**EI**ETDKATI
 gp210 188-201 : IPPSYISE**ME**KAAK
 gp210 277-290 : PSDQY**EL**QLQNSIP

molecular mimicry

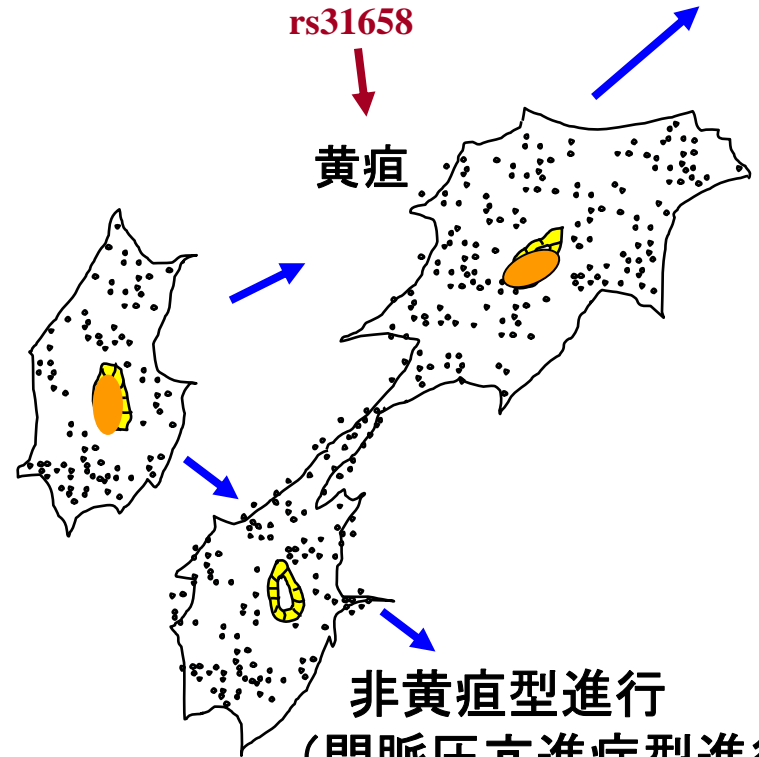


黄疸型進行
(肝不全型進行)

MDR3 SNPs

rs31658

黄疸



stage

1

2

3

4