

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08478

研究課題名(和文) C型肝炎に伴う血小板減少の病態における自己免疫の役割の解明

研究課題名(英文) The role of autoimmunity in the pathogenesis of thrombocytopenia associated with hepatitis C

研究代表者

佐藤 隆司 (Sato, Takashi)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：90407114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血小板減少を伴うC型慢性肝炎(CHC)における自己免疫機構は不明な点が多い。本研究は、CHC患者を対象に直接作用型抗ウイルス薬(DAA)治療前後の抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数、血漿中のサイトカイン濃度の変化を検討した。血小板減少症を伴うCHCでは、DAA治療により血小板数が有意に増加し、抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数及び血漿BAFF濃度が有意に減少した。しかし、血小板減少のないCHCでは、これらの変化は認められなかった。これらの結果は、DAA治療によるC型肝炎ウイルスの排除が血小板に対する自己免疫反応を抑制し、血小板減少の病態が改善された可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝疾患に伴った血小板減少の病態を正確に把握し、それに基づいた検査法の開発や治療法の選択が強く求められる。本研究の知見において、抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数や血漿BAFF濃度を経時的に測定することは、治療効果判定などに有効であると考えられる。また、C型肝炎は肝臓以外の臓器及び組織に多彩な病変を合併することが知られ、これらを肝外病変と総称されている。肝外病変の原因としては、HCV感染に対する免疫異常および病変部へのHCV感染の関与が考えられて、病態として自己免疫疾患も存在する。本研究は自己免疫が関与する肝疾患の病態解明にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of thrombocytopenia in chronic hepatitis C (CHC) conceivably involves autoimmunity; however, the dynamics of autoantibodies and other autoimmune mechanisms remain unclear. In this study, we examined the changes in the frequency of anti-glycoprotein (GP) IIb/IIIa antibody-producing B cells and the levels of plasma cytokines following treatment of CHC with direct-acting antiviral agents (DAA). Platelet counts increased significantly, and the frequency of anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells decreased significantly in CHC patients with thrombocytopenia at the end of treatment (EOT) than before DAA treatment (baseline). However, these changes were not observed in CHC patients without thrombocytopenia. Plasma BAFF levels in CHC patients with thrombocytopenia significantly decreased from baseline to EOT. These results suggest that DAA treatment suppresses the autoimmune response against platelets and improves thrombocytopenia.

研究分野：血液検査学

キーワード：血小板減少 自己免疫 C型肝炎 抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞 BAFF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景 慢性肝疾患における血小板減少の病態は、脾機能亢進症や血小板産生に關与するトロンボポエチン (TPO) の産生障害、さらに自己免疫の關与が考えられている (*Hepatology* 49: 1729, 2009)。自己免疫の關与として、自己抗体である抗血小板抗体が血小板上の血小板膜糖蛋白の GPIIb/IIIa などに結合し、その血小板は網内系の貪食細胞の Fc 受容体 (Fc R) を介して取り込まれ、血小板破壊が亢進すると考えられている (*Hepatology* 37: 1267, 2003)。この機序は免疫性血小板減少症 (ITP) における血小板減少の機序と類似しているため、肝疾患に伴う血小板減少は二次性 ITP に分類されている (Sato T et al, *Springer nature*, 63, 2017)。

本邦での慢性肝疾患の多くは、B 型ウイルスあるいは C 型ウイルス (HCV) 感染による肝炎の慢性化で発症する。ウイルス肝炎の中でも C 型肝炎が最も慢性化しやすく (*Ann Surg* 202: 191, 1985)、肝硬変さらには肝細胞癌へと進行し、年間約 34000 人が死亡している。肝疾患患者における消化管出血や手術時における出血傾向は致死的となることがあるが、これまで肝疾患における出血傾向はあまり注目されてはいなかった (*Hepatology* 49: 1729, 2009)。

一方、C 型慢性肝炎症例においてインターフェロンによる HCV 排除で血小板数の改善が見られている (*Eur J Haematol* 75: 417, 2005)。つまり、HCV 感染が血小板減少を誘導している可能性が考えられる。近年、HCV の複製を強力に抑制する直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) はほぼ 100% の C 型慢性肝炎症例で HCV の排除が可能となり、インターフェロンでは治療が困難であった線維化進展例や血小板減少例にも安全に治療が行われている (*J Gastroenterol* 48: 1, 2013)。この中で、DAA 治療後の C 型慢性肝炎でも血小板数上昇例が散見されているが、HCV 排除による血小板数の回復の機序は不明であり、抗血小板抗体の動態や自己免疫機序の詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

C 型慢性肝炎に伴う血小板減少の病態における自己免疫の役割を検討するため、本研究では DAA 治療前後の C 型慢性肝炎検体を用いて、血小板数、自己抗体、サイトカインの変化を解析し、HCV 感染が血小板減少を誘導する機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 対象

本研究では、DAA で 8~12 週間治療を行い、治療後に HCV RNA が陰性となった C 型慢性肝炎患者 28 例を対象とした。また、健常成人 30 名を対照とした。DAA 治療前の C 型慢性肝炎患者を血小板減少 (10 万/μL 未満) の有無 (血小板減少群、血小板正常群) で分けて、解析を行った。

(2) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の測定 (ELISPOT 法 : Enzyme-linked immunospot)

蛋白高吸着 PVDF 膜 96 穴マイクロプレートの各ウェル上に精製ヒト GPIIb/IIIa 抗原溶液を加え固相化した。さらにブロッキング液を反応させ、ブロッキングを行なった。そこに、末梢血単核球 (PBMC) を 1 ウェルあたり 1×10^5 個/RPMI 200 μL 加え、37℃、4 時間、CO₂ インキュベータ内で培養した。培養後、細胞成分を洗浄、除去したのち、酵素標識抗ヒト IgG 抗体を加え、さらにアルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを加えた。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞が存在した部位が膜上にスポットとして検出され、それを実体顕微鏡で計測した。

(3) ELISA による血漿 BAFF、APRIL、IL-21、TPO 濃度の測定

HCV 関連疾患では HCV 感染に由来する B 細胞増殖の異常が報告されている (*Antivir Ther* 17: 1449, 2012)。そこで、B 細胞の増殖・生存・抗体産生に關与する B 細胞刺激因子 (BAFF)、増殖誘導リガンド (APRIL)、IL-21 の濃度を ELISA で測定した。また、巨核球の成熟に關与する造血因子の TPO の濃度を ELISA で測定した。

(4) 統計学的検討

全ての連続変数は中央値範囲で表示し、Mann-Whitney U test または Wilcoxon test を用いて比較した。相関分析には Spearman の相関係数を求めた。いずれにおいても有意水準 (p) が 0.05 未満を有意差ありとした。統計解析は GraphPad Prism software v.9.3.1 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) C型慢性肝炎患者の DAA 治療前後における検査所見と TPO 濃度の変化

DAA 治療前後における検査所見と TPO 濃度の変化を表 1 にまとめた。血小板減少群では、DAA 治療前から治療後にかけて血小板数の有意な改善が認められた (治

表1. DAA治療前後の臨床検査値及びトロンボポエチン濃度の変化

Laboratory findings and thrombopoietin levels	Patients with CHC with thrombocytopenia (n = 10)			Patients with CHC without thrombocytopenia (n = 18)		
	Baseline	EOT	p-value	Baseline	EOT	p-value
Platelets ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	8.45 (4.3-8.8)	9.35 (5.8-12.2)	.016	17.10 (10.2-31.3)	17.85 (9.0-31.4)	.604
White blood cells (μL)	4,200 (2,100-6,400)	4,050 (3,200-7,400)	.361	4,800 (2,200-9,700)	5,150 (3,500-9,500)	.055
Hemoglobin (g/dL)	12.7 (9.9-14.7)	11.85 (10.3-14.5)	.193	13.75 (11.2-16.2)	13.0 (11.6-15.9)	.096
Prothrombin time (%)	72 (18-103)	77 (63-100)	.113	97 (79-119)	98.5 (16-118)	.342
Serum albumin (g/dL)	3.4 (2.8-4.4)	3.5 (3.2-4.1)	.379	4.05 (2.6-4.5)	4.05 (3.0-5.5)	.914
Aspartate aminotransferase (IU/L)	47.0 (18-147)	22.0 (9-43)	.002	40.5 (12-60)	21.5 (11-49)	<.001
Alanine aminotransferase (IU/L)	35.5 (16-83)	17.5 (7-34)	.004	36.0 (11-60)	15.0 (7-44)	<.001
Total bilirubin (g/dL)	0.95 (0.4-2.0)	0.90 (0.6-1.5)	.500	0.5 (0.1-1.0)	0.65 (0.3-1.4)	.094
Thrombopoietin (pg/mL)	8.41 (4.40-27.88)	7.37 (1.56-28.55)	.770	5.37 (1.56-25.86)	1.56 (1.56-21.15)	.240

Data are expressed as median (range); CHC, chronic hepatitis C; p-values of <.05 are shown in bold.

療前: $8.45 [4.3-8.8] \times 10^4/\mu\text{L}$ 、治療後: $9.35 [5.8-12.2] \times 10^4/\mu\text{L}$; $p = 0.016$)。また、血小板減少の有無にかかわらず、AST および ALT の値は、DAA 治療前から治療後にかけて有意に改善された。血小板正常群では、AST と血小板数は DAA 治療前、治療後ともに負の相関があり、また、ALT と血小板数は DAA 治療前において負の相関が認められた。一方、血小板減少群では、DAA 治療前と DAA 治療後で AST または ALT と血小板数との相関はなかった。血漿 TPO 濃度を含む他の検査データは、有意な改善を示さなかった。

(2) C型慢性肝炎患者における抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の測定

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数は健常人 ($0.3 [0-0.67]/10^5$ PBMC) と比べ治療前の C 型慢性肝炎患者 ($5.5 [0-26.5]/10^5$ PBMC) で有意に多かった ($p < 0.001$)。血小板減少群 ($6.75 [0.75-17.0]/10^5$ PBMC) 及び血小板正常群 ($4.09 [0-26.5]/10^5$ PBMC) の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数は、健常人と比べ有意に多かった ($p < 0.001$)。一方、血小板減少群と血小板正常群での比較では、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数に有意差はなかった (図 1)。

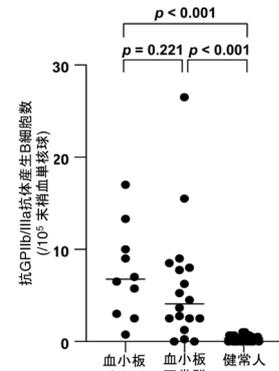


図1. 血小板減少群、血小板正常群、健常人における抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の比較

(3) DAA 治療に伴う血小板数および抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の変化

C 型慢性肝炎患者の血小板数は治療前 ($10.9 [4.3-31.3] \times 10^4/\mu\text{L}$) から治療後 ($12.4 [5.8-31.4] \times 10^4/\mu\text{L}$) で有意に増加し ($p = 0.033$) (図 2a)、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数は治療前 ($5.5 [0-26.5]/10^5$ PBMC) から治療後 ($2.6 [0.5-19.0]/10^5$ PBMC) で有意に減少した ($p = 0.005$) (図 2b)。

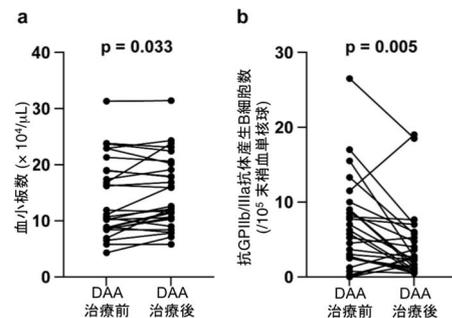


図2. DAA 治療に伴う血小板数および抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の変化

(4) 血小板減少群及び血小板正常群における DAA

治療に伴う血小板数および抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数の変化

血小板減少群の血小板数は治療前 ($8.45 [4.3-8.8] \times 10^4/\mu\text{L}$) から治療後 ($9.35 [5.8-12.2] \times 10^4/\mu\text{L}$) で有意に増加し改善が見られた ($p = 0.016$) (図 3a)。一方、血小板正常群では、治療前 ($17.1 [10.2-31.3] \times 10^4/\mu\text{L}$) から治療後 ($17.85 [9.0-31.4] \times 10^4/\mu\text{L}$) まで血小板数に変化はなかった ($p = 0.604$)。

血小板減少群の抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数は、治療前 (6.75 [0.75-17.0]/10⁵ PBMC) から治療後 (1.75 [0.5-7.0]/10⁵ PBMC) で有意に減少した (p=0.002) (図3b)。一方、血小板正常群の抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数は、治療前 (4.09 [0-26.5]/10⁵ PBMC) から治療後 (2.71 [0.5-19.0]/10⁵ PBMC) で有意な差はなかった (p=0.363)。

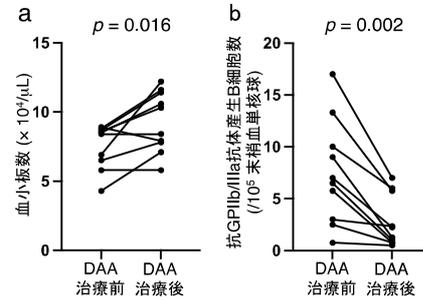


図3. 血小板減少群におけるDAA治療前後の血小板数 (a)、抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数 (b)の変化

(5) C型慢性肝炎患者におけるDAA投与に伴う血漿BAFF、APRIL、IL-21濃度の変化

DAA治療後、抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数が低下したため、B細胞の増殖・分化・抗体産生に与するサイトカインであるBAFF、APRIL、IL-21の血漿濃度を測定した。

C型慢性肝炎患者の血漿BAFF濃度は、治療前 (1344.6 [653.6-2813.7] pg/mL) から治療後 (1229.0 [489.3-2008.1] pg/mL) で有意に減少

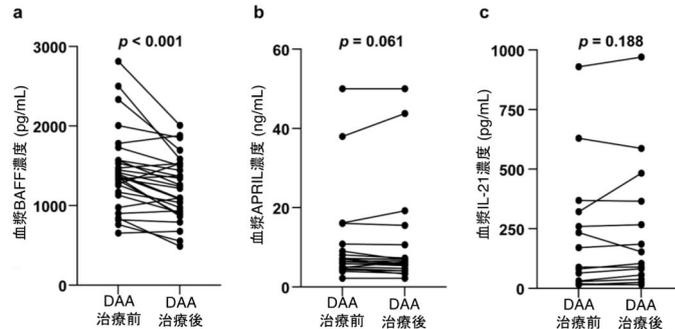


図4. C型慢性肝炎患者におけるDAA投与に伴う血漿BAFF、APRIL、IL-21濃度の変化

した (p<0.001) (図4a)。一方、DAA治療は、血漿APRIL濃度 (治療前: 6.44 [2.18-50.0] ng/mL、治療後: 6.34 [2.16-48.5] ng/mL p=0.061, 図4b) および血漿IL-21濃度 (治療前: 16.5 [15.6-929.8] pg/mL、治療後: 15.6 [15.6-970.6] pg/mL, p=0.188, 図4c) に有意な差はなかった。

また、抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数と血漿BAFF濃度の間には、治療前のC型慢性肝炎患者 (r=0.508, p=0.006)、血小板減少群 (r=0.669, p=0.039) および血小板正常群 (r=0.482, p=0.043) で有意な正の相関が認められた。

(6) 血小板減少群及び血小板正常群におけるDAA治療に伴う血漿BAFF濃度の変化

血漿BAFF濃度は、血小板減少群では治療前から治療後まで有意に減少した (治療前: 1551.3 [1130.8-2813.7] pg/mL、治療後: 1312.0 [867.0-2008.1] pg/mL, p=0.002, 図5a)。

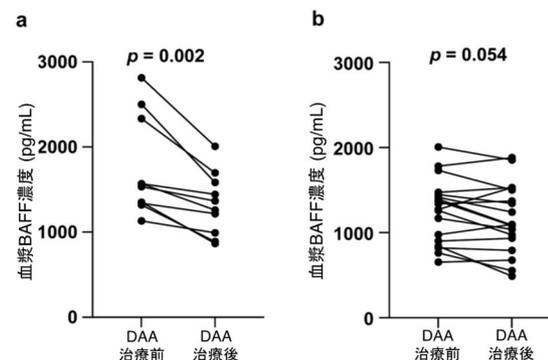


図5. 血小板減少群 (a) 及び血小板正常群 (b) におけるDAA治療前後の血漿BAFF濃度の変化

一方、血小板正常群では、治療前から治療後にかけて血漿BAFF値が低下したが、その低下は有意ではなかった (治療前: 1306.1 [653.6-2005.2] pg/mL、治療後: 1092.7 [489.3-1527.6] pg/mL, p=0.054, 図5b)。

(7) 本研究の考察及びまとめ

C型慢性肝炎では、肝臓の樹状細胞から産生されるインターフェロン (IFN)- α / β およびIFN- γ がHCV排除機構に与ることが報告されている (J Gastroenterol 51: 409, 2016)。これらの炎症性サイトカインは自然免疫細胞に作用し、BAFF産生を誘導することから (Nat Rev Immunol 2: 465, 2002, Cytokine Growth Factor Rev 64: 57, 2022)、C型慢性肝炎では、HCV感染に伴うBAFF量の増加が自己反応性B細胞の生存と抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の誘導を促進することが示唆される。さらに、DAA治療によるHCVの排除は、IFN- α / β / γ などの産生の低下によって、BAFF量は正常化し、自己反応性抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の減少につながった可能性が考えられる (図6)。

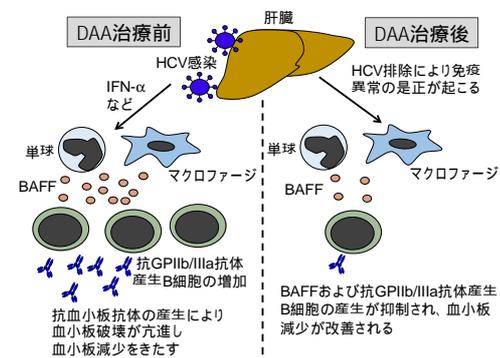


図6. HCV排除による血小板に対する自己免疫応答の変化

本研究は、血小板減少を伴うC型慢性肝炎患者において、DAA治療により抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数及び血漿BAFF濃度が減少することを見出した。

DAA治療により、血小板減少群では血小板数が増加したが、血小板数正常群では増加しなかったことから、血小板減少の根本原因はHCVであり、HCV排除により血小板減少が改善することが示唆された。DAA治療によりAST、ALTは改善したが、血漿TPO濃度は改善しなかった。また、血小板減少群では、ASTやALTと血小板数の間に相関は認められなかった。これらの結果は、血小板減少が肝機能障害以外の要因に関連していることを示唆していた。

C型慢性肝炎の血小板減少症の病態にB細胞が大きく関与していることを考えると、血小板減少を伴うC型慢性肝炎患者において、DAA治療により抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の変化が認められたことは、重要な新規発見といえる。これらの知見は、抗血小板抗体を介したHCV関連免疫性血小板減少症のメカニズムの解明に貢献するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoh Takashi, Uojima Haruki, Wada Naohisa, Takiguchi Hayato, Kaneko Mei, Nakamura Marina, Gonda Natsuki, Homma Michika, Hidaka Hisashi, Kusano Chika, Horie Ryouichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Introduction of direct-acting antiviral agents alters frequencies of anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells in chronic hepatitis C patients with thrombocytopenia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Platelets	6. 最初と最後の頁 2161498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09537104.2022.2161498	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Satoh Takashi, Takiguchi Hayato, Uojima Haruki, Kubo Makoto, Tanaka Chisato, Yokoyama Fumiko, Wada Naohisa, Miyazaki Koji, Hidaka Hisashi, Kusano Chika, Kuwana Masataka, Horie Ryouichi	4. 巻 101
2. 論文標題 B cell-activating factor is involved in thrombocytopenia in patients with liver cirrhosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2433 ~ 2444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-022-04973-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Naohisa, Uojima Haruki, Satoh Takashi, Okina Sosei, Iwasaki Shuichiro, Shao Xue, Takiguchi Hayato, Arase Yoshitaka, Itokawa Norio, Atsukawa Masanori, Miyazaki Koji, Hidaka Hisashi, Kako Makoto, Kagawa Tatehiro, Iwakiri Katsuhiko, Horie Ryouichi, Suzuki Takahiro, Koizumi Wasaburo	4. 巻 39
2. 論文標題 Impact of Anti-GPIIb/IIIa Antibody-Producing B Cells as a Predictor of the Response to Lusutrombopag in Thrombocytopenic Patients with Liver Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases	6. 最初と最後の頁 234 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000510692	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤隆司、魚嶋晴紀、和田尚久、日高央、堀江良一
2. 発表標題 C型肝炎における抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞数およびBAFF濃度の解析
3. 学会等名 第22回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田尚久、魚嶋晴紀、岩崎秀一郎、窪田幸介、日高央、中澤貴秀、渋谷明隆、佐藤隆司、小泉和二郎
2. 発表標題 C型肝炎に対する直接作用型抗ウイルス薬での治療後48週における抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の変化に関する検討
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 (JDDW2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato T, Takiguchi H, Uojima H, Kubo M, Hidaka H, Miyazaki K, Horie R
2. 発表標題 Involvement of BAFF and APRIL in thrombocytopenia in patients with Liver cirrhosis
3. 学会等名 12th International congress on Autoimmunity (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤隆司、魚嶋晴紀、瀧口隼人、日高央、堀江良一
2. 発表標題 慢性肝疾患に伴う血小板減少症に対するトロンボポエチン受容体作動薬の治療効果予測因子の探索
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤隆司、瀧口隼人、魚嶋晴紀、日高央、久保誠、宮崎浩二、堀江 良一
2. 発表標題 肝疾患に伴う二次性免疫性血小板減少症における病態形成機序の解析
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース (C型肝炎ウイルスの排除は自己免疫による血小板減少の病態を改善する)
<https://www.kitasato.ac.jp/jp/news/20230125-04.html>

北里大学医療衛生学部血液学研究室ホームページ
<https://www.kitasato-u.ac.jp/ahs/renkei/labo/hematology.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	魚嶋 晴紀 (Uojima Haruki)		
研究協力者	和田 尚久 (Wada Naohisa)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------