

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590987

研究課題名(和文)自己免疫性肝炎における新規PEPCK抗体の有用性に関する研究

研究課題名(英文)Clinical significance of anti-PEPCK antibody in patients with autoimmune hepatitis

研究代表者

大平 弘正(Ohira, Hiromasa)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90274951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肝炎(AIH)における診断あるいは病態に関する疾患特異的な自己抗体の探索が重要である。本研究では、ヒト正常肝細胞から抽出した非核成分を抗原蛋白としてAIH患者血清と特異的に反応する抗原蛋白としてPEPCKを同定し、その抗体の臨床的意義について検討した。その結果、抗PEPCK抗体はAIH診断の感度50%、特異度91.5%、正診率83.1%であった。しかし、抗PEPCK抗体の有無および抗体価と臨床検査成績、肝線維化の程度、重症度に統計学的有意差は認めなかった。以上のことから、抗PEPCK抗体はAIH患者での特異度が高くAIHの疾患標識マーカーとなり得る可能性があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Identifying disease-specific autoantibodies that can be used diagnostically or are involved in the pathogenesis of AIH is important. We extracted non-nuclear component protein from normal human liver cells from which PEPCK was identified as an antigenic protein that specifically reacted with the sera from AIH patients, and we evaluated the clinical significance of anti-PEPCK antibody. The sensitivity, specificity and accuracy of anti-PEPCK antibody in diagnosing AIH were 50.0%, 91.5% and 83.1%, respectively. None of the AIH patients positive for anti-PEPCK antibody showed characteristic clinical features. Although further investigations into the clinical usefulness are necessary, anti-PEPCK may have potential as a diagnostic marker for AIH.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自己免疫性肝炎 PEPCK抗体 CpGDNA

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における自己免疫性肝炎 (AIH) はその多くが 1 型であり、抗核抗体、抗平滑筋抗体などの自己抗体が検出されるが、これら自己抗体には疾患特異性がない。AIH の診断においては、国際診断基準とわが国の診断指針を用いられているが、特異的な疾患マーカー (自己抗体) が無いため、非定型例や急性発症例においてはしばしば診断に苦慮する。また、劇症肝炎非移植例における AIH の救命率は 21% ときわめて予後不良であり、要因の一つに診断困難例の存在が挙げられる。一方、AIH の病因は、肝細胞膜に表出する抗原蛋白を標的とする自己免疫応答が主体と考えられ、自己抗体の対応抗原の同定は本症の発症機序を解明する上で重要である。これまで、病因に關与する候補自己抗体として抗 LKM-1 抗体や抗 SLA/LP 抗体が報告されているが陽性例は少なく、病態解析が難しいのが現状である。したがって、AIH においては診断あるいは病態に關与する疾患特異的な自己抗体の探索が急務である。

## 2. 研究の目的

本研究は申請者がこれまで継続して検討してきた AIH における自己抗体に関する研究において、新たに発見した抗 phospho-enolpyruvate carboxykinase (PEPCK/PCK) 抗体の疾患特異性と AIH 病態との關連について解析することを目的とする。本研究では以下の点について明らかとすることを目標とした。

(1) 抗 PEPCK 抗体の測定系の確立

(2) AIH 診断マーカーとしての有用性と臨床病態との關連性に関する検討 (多施設共同研究も含め)

(3) AIH 患者の肝臓における抗体反応部位の同定 (免疫組織学的検討)

(4) PEPCK 蛋白を抗原とする CpG DNA を用い AIH モデルマウス作成に着手する。

## 3. 研究の方法

(1) 抗体測定系の確立

抗 PEPCK 抗体の検出に安定した測定系を確立するためにリコンビナント蛋白を用いて、Western blot 法、ELISA 法による測定系の確立を行う。Inhibition assay を行いながら各種条件設定し安定した測定系を確立する。

(2) 診断マーカーとしての有用性と臨床病態との關連性に関する検討

上記にて確立された検出法にて AIH 患者血清中の抗 PEPCK 抗体の検出を行い、対照のウイルス性慢性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、全身性エリテマトーデス患者、健常人などとの比較を行い、その陽性頻度 (健常人の 2SD 以上の抗体価) 特異性について検討する。

臨床病態と抗 PEPCK 抗体との關連については、抗体陽性例と陰性例との間における各種臨床像との比較検討を行う。また、抗体

価と臨床検査値との關連についても併せて検討する。さらに、治療開始後の経時的な觀察例の血清についても抗体価の変化について検討する。

さらに、症例数を増やす必要がある場合には、国内の研究施設との共同研究を展開し研究を推進していく予定である。

(3) AIH 患者の肝臓における抗体反応部位の同定 (免疫組織学的検討)

抗 PEPCK 抗体を用いて、肝臓内における局在について免疫染色にて確認する。

(4) 抗原蛋白と CpG DNA を用いた AIH モデルマウスの作成

PEPCK 蛋白と CpG DNA を用いて AIH モデルマウスの作成を行う。既報 (Abe K, Ohira H, et al. Fukushima J Med Sci 2007) に準じて 8 週齡の B57BK/6NCrj マウスに CpGDNA (5' -TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3') をアジュバンドとして、抗原蛋白と共に 3 回尾根部へ皮下投与する。肝炎の誘導の確認は、マウス血清中の ALT 値ならびに組織学的な検索によって行う。

## 4. 研究成果

(1) 抗 PEPCK 抗体の測定系の確立

最適な測定法として ELISA 法を確立した。リコンビナント Human PCK2 (Abnova 社) を 0.125  $\mu\text{g}/\text{well}$  で 96well plate に固相化し、100 倍希釈血清を 2 時間、2 次抗体として 1000 倍希釈の biotin-conjugated Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG を 2 時間反応後、VECTASTAIN ABC Reagent (VECTOR Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を 30 分反応し、発色後 450nm で測定した。陽性のカットオフ値は、健常人の平均 +2SD を超える値とした。この系では、吸収試験として 5 例の抗体陽性 AIH 患者血清 5  $\mu\text{l}$  を 5  $\mu\text{l}$  のリコンビナント PCK2 (0.13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) で 2 時間反応後、遠心上製を 100 倍希釈し ELISA で測定を行ったが、すべて感度以下となり、特異性が確認された。

(2) 診断マーカーとしての有用性と臨床病態との關連

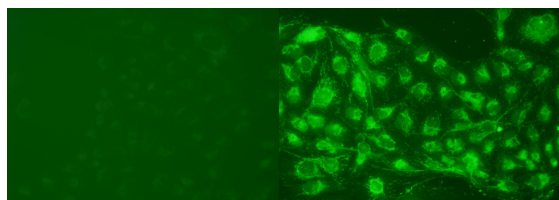
AIH 42 例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 48 例、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 41 例、C 型慢性肝炎 (CHC) 20 例、薬物性肝障害 (DILI) 10 例、SLE 16 例、健常人 30 例。リコンビナント PEPCK 蛋白を用いた ELISA 法で抗 PEPCK 抗体を測定した。AIH 症例を抗 PEPCK 抗体陽性群と陰性群それぞれの検査成績、肝組織の線維化、重症度について比較検討した。各疾患における ELISA の抗体価は AIH  $28.3 \pm 29.1\text{AU}$ 、PBC  $13.9 \pm 18.7$  ( $p=0.004$ )、NASH  $5.4 \pm 17.8$  ( $p < 0.0001$ )、CHC  $9.5 \pm 11.9$  ( $p=0.0043$ )、DILI  $7.7 \pm 6.0$  ( $p=0.0179$ )、SLE  $13.3 \pm 24.6$  ( $p=0.0064$ )、健常人  $8.3 \pm 7.3$  ( $p=0.0006$ ) と AIH で有意に高値だった。抗 PEPCK 抗体陽性は AIH 21 例 (50.0%)、PBC 7 例 (14.6%)、NASH 2 例 (4.9%)、CHC 2 例 (10.0%)、DILI 0 例 (0%)、SLE 2 例

(12.5%) 健常人 1 例 (3.3%) で AIH 診断の感度 50%、特異度 91.5%、正診率 83.1% だった。AIH 例の抗 PEPCK 抗体の有無および抗体価と臨床検査成績、肝線維化の程度、重症度に統計学的有意差は認めなかった。

	抗体 (+) (n=21)	抗体 (-) (n=21)	P value
Male/Female	2/21	2/21	1
Age(years)	52.6 ± 11.6	50.1 ± 16.6	0.58
Acute presentation	10	11	1
Liver cirrhosis	7	4	0.48
Diabetes mellitus	5	5	1
ALT (IU/L)	492.2 ± 579.5	489.2 ± 526	0.92
IgG (mg/dl)	2910.2 ± 836.9	2783.4 ± 948.5	0.56
AIH score	14.4 ± 2.2	13.9 ± 3.0	0.66
ANA (median)	160	640	0.38
ASMA (median)	20	20	0.64

### (3) AIH 患者の肝臓における抗体反応部位の同定

本研究では、研究期間中に AIH 症例の免疫染色が実施できず、培養細胞における免疫染色を行った。1 次抗体として 200 倍希釈の抗 PCK2 抗体、2 次抗体として 500 倍希釈の FITC 標識抗ヒト IgG 抗体で染色を行うと細胞質全体に陽性所見が観察された。



コントロール                      抗 PEPCK 抗体

### (4) 抗原蛋白と CpG DNA を用いた AIH モデルマウスの作成

PEPCK 蛋白と CpG DNA を用いて AIH モデルマウスの作成を行った。8 週齢の B67BK/6NCrj マウスに CpG DNA または LPS をアジュバンドとして、抗原蛋白と共に 3 回尾根部へ皮下投与した。その後、採血、肝臓を摘出し、ALT 値測定や肝組織を確認した。ALT 値は、CpG DNA (10 µg/mouse) 単独または LPS (40 µg/mouse) 単独では有意な上昇は認めなかったが、CpG DNA (10 µg/mouse)/LPS (40 µg/mouse)/PEPCK 蛋白 (10 µg/mouse) を同時に投与することにより、control 群と比較して有意に上昇を認めた (26.2 ± 2.4 vs. 43.0 ± 16.5 U/L, each 4 mice, p < 0.05)。組織平面では zone 3 領域での髓外造血、小葉内に軽度の炎症細胞浸潤を認めた。血清中には抗 PEPCK 抗体が PEPCK 蛋白と CpG DNA 投与マウスでは確認された。これら結果から、PEPCK が肝障害機序に関与することが示唆されたが、炎症程度は弱く単一の自己抗体のみでヒトに類似する肝炎モデル作

成には限界があることも明らかとなった。

以上のことから、本研究から抗 PEPCK 抗体は AIH 患者での特異度が高く AIH の疾患標識マーカーとなり得る可能性があることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kanno Y, Watanabe H, Takahashi A, Abe K, Ohira H. Anti-phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 antibody in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology Research* 44:1019-1025, 2014

[学会発表](計 1 件)

菅野有紀子、渡辺浩志、岡井研、阿部和道、勝嶋史子、高橋敦史、大平弘正。自己免疫性肝炎における抗 PEPCK 抗体についての検討。日本消化器病学会総会、東京、2013 年 6 月

[図書](計 1 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：  
  
[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大平弘正 (OHIRA HIOMASA)  
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原病内科・教授  
研究者番号：90274951

### (2) 研究代表者

阿部和道 (ABE KAZUMICHI)

福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原  
病内科・助教  
研究者番号：30468128

渡辺浩志 (WATANABE HIROSHI)  
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原  
病内科・教授  
研究者番号：40336467

高橋敦史 (TAKAHASHI ATSUSHI)  
福島県立医科大学・消化器・リウマチ膠原  
病内科・助教  
研究者番号：40404868

(3)連携研究者

( )

研究者番号：