HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	非アルコール性脂肪性肝疾患における肝マクロファージ炎症および線維化進行バイオマーカーの探索 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	坂本, 譲
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14064号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/77939
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2529
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yuzuru_Sakamoto_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　坂本　譲

学位論文題名

非アルコール性脂肪性肝疾患における肝マクロファージ炎症および線維化進行バイオマーカーの探索

(Study on biomarker of liver macrophage activation and advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease)

【背景と目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)は慢性肝疾患の15-30%を占め、肝関連合併症および死亡の原因疾患として世界的に増加傾向にある。非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)はNAFLDの進行した病態とされ、病態進行とともに肝線維化をきたし、NASH関連肝硬変および肝癌へと進行する。NAFLD患者においては、肝線維化の病理学的Stageが長期の死亡率や肝関連イベントに最も影響を及ぼす因子とされる。肝線維化Stagingのゴールドスタンダードは肝生検であるが、侵襲性、サンプルの不確実性など、臨床的な欠点をいくつか有しており、非侵襲的な肝線維化マーカーが望まれる。近年、NAFLDの病態において重要な役割をもつマクロファージに関連するマーカーがNAFLD患者の肝線維化の診断に有用であるとされてきた。

Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Siglec)は、自然免疫細胞に主に発現する膜表面タンパクである。Siglecはリガンドであるシアル酸と結合することで免疫機能を調整する。Siglec-7は、小腸や肝臓におけるNK細胞などに多く発現し、HBV/HCV慢性肝炎患者においては、NK細胞の機能的指標となり、加えて血清中に存在するsoluble form (sSiglec-7)が肝障害や肝線維化と相関するとされる。しかしながら、血清sSiglec-7の産生機序について明らかに示した報告はなく、免疫細胞の膜表面に発現するSiglec-7をウィルスがsheddingすることによると考察されているに留まる。

本研究は、NAFLD患者において血清中のsSiglec-7の意義と肝線維化診断に対する有用性を検証することを目的とした。さらに、sSiglec-7産生の機序に関しては、種々の免疫細胞へ炎症性サイトカインを添加する実験系を用いて検討した。

【対象と方法】

本研究は、臨床診断上NAFLDと診断された(肝生検によって病理組織学的線維化診断がなされた59症例を含む) NAFLD 患者93症例と、B型慢性肝炎患者33症例、C型慢性肝炎患者39症例、および健康成人19症例を対象とした。肝線維化Stage診断はBrunt基準を用いた。また、切除肝組織検体を用いた免疫細胞の解析を目的とし、NAFLD関連肝細胞癌患者に対して治療的肝切除が施行された3症例より非癌部肝組織検体を採取した。対象に対して、血清中のsSiglec-7、soluble CD163 (sCD163)、YKL-40をEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitsを用いて測定した。肝硬度エコーを施行した症例については、virtual touch tissue quantification (VTTQ)、transient elastography (TE)を測定した。非侵襲的線維化スコアであるFIB-4 index、AAR、APRI、GPR、肝予備能スコアであるALBIについては、既報論文の計算式よりそれぞれ算出した。これら諸因子の肝線維化進行に対する診断能を統計学的に検討した。肝浸潤リンパ球はコラゲナーゼ処理にて抽出し、免疫細胞の解析にはFlowcytometryを用いた。ヒト単球由来マクロファージの樹立ならびに刺激培養を行い、培養上清中のsSiglec-7をELISAで測定した。

【結果】

NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は上昇し、ALT 正常の NAFLD 患者においても同様に上昇した。また、生活改善によって体重が減少し肝障害が改善された前後においては、血清 sSiglec-7 は低下した。NAFLD 患者において、血清 sSiglec-7 は PT 値および血小板値と逆相関するが AST/ALT 値とは相関せず、非侵襲的線維化マーカーやマクロファージ関連肝線維化関連マーカーと正相関した。また、線維化進行(F stage 3, 4)、NAFLD activity score 高値、肝内炎症高度、肝細胞バルーニング高度の症例において上昇し、高度線維化診断に対する特異度(96.3)が高く、独立した寄与因子として抽出された。NAFLD 患者の線維化進行診断に対する決定木解析では、sSiglec-7、Age、YKL-40 の順で寄与因子となった。肝内マクロファージにおける Siglec-7 発現の検討では、$CCR2^{+}$マクロファージには Siglec-7 が高発現する一方で、$Tim\text{-}4^{+}$マクロファージでは部分的な発現に留まった。また、in vitro での炎症性サイトカイン添加培養実験においては、ヒト単球由来マクロファージのみが sSiglec-7 を産生し、NK 細胞や単球は産生しなかった。

【考察】

今回の検討において、血清 sSiglec-7 が NAFLD 患者において上昇し、肝線維化進行診断に対して独立した寄与因子となった。この知見は、NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 が、sCD163 や YKL-40 と同様にマクロファージ関連肝線維化バイオマーカーに成り得ることを示唆する。また、NAFLD 患者における血清 sSiglec-7 は、肝内炎症や線維化などと関連する一方で、肝逸脱酵素とは相関を認めなかった。このことは、sSiglec-7 が肝逸脱酵素よりも鋭敏に、緩徐な肝内炎症を反映する可能性を示唆する。決定木解析では、sSiglec-7 が非常に高い特異度をもって肝線維化進行の診断に対する第一寄与因子となった。このことより、血清 sSiglec-7 が臨床における肝線維化進行に対する有用なマーカーと成り得る。

肝内マクロファージの検討では、$CCR2^{+}$マクロファージには Siglec-7 が高発現する一方で、$Tim\text{-}4^{+}$のレジデントマクロファージには発現が低いことを示した。加えて NAFLD 患者では、腸管透過性の亢進や、小腸内での細菌異常増殖を含めた腸管内細菌叢変化などから、血中の LPS、TNF-α、IL-1β も上昇している。ヒト単球由来マクロファージからの sSiglec-7 産生が、LPS や TNF-α、IL-1β の刺激によって増加するという我々の知見は、NAFLD 患者における肝内マクロファージの上昇と、そこに発現する Siglec-7、さらには血清 sSiglec-7 との間にある潜在的な関連を示唆している。

NAFLD 患者において、血清中の sSiglec-7 は上昇し、そのほとんどが活性化したマクロファージから産生され、さらには肝線維化進行症例の診断における独立した寄与因子であることを示した。これらの知見から、FIB-4 index などの他の肝線維化マーカーとの併用も含め、NAFLD 患者における肝線維化進行の高リスク症例を同定する方法として、血清 sSiglec-7 の有用性を検証するさらなる研究が非常に有意義となる。

【結論】

NAFLD 患者において血清 sSiglec-7 は上昇し、肝線維化、肝内炎症、肝細胞バルーニングが進行した症例で高値を認めた。また、肝線維化進行症例に対する独立した寄与因子であり、高い特異度を有し肝線維化進行の診断における有用なバイオマーカーである。肝内の炎症性 $CCR2^{+}$マクロファージへの炎症性サイトカインの作用が、NAFLD 患者血清中の sSiglec-7 上昇の機序と成り得る。