HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	非アルコール性脂肪性肝疾患におけるマクロファージ関連肝線維化バイオマーカーの探索［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	正司, 裕隆
Description	配架番号：2385
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13006号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70292
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hirotaka_Shoji_abstract.pdf, 論文内容の要旨

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　正司　裕隆

学 位 論 文 題 名

非アルコール性脂肪性肝疾患におけるマクロファージ関連肝線維化バイオマーカーの探索

(Study on the macrophage-related biomarkers for liver 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%を占める近年増加傾向にある疾患である。NAFLD は NASH(non-alcoholic steatohepatitis)へと病態が進行することでウイルス性肝疾患と同様に肝線維化をきたすことが報告されている。肝線維化の進行に伴い肝細胞がん発癌リスクが上昇することはすでに報告されており、早期の段階で肝線維化の Stage を正確に診断することが重要とされている。肝線維化の診断法として確立されている手法は肝生検であるが、侵襲的な検査であることや繰り返し施行することが臨床的に困難であるといった理由から侵襲度が低く、経時的にモニタリング可能なバイオマーカーの探索が求められている。近年、マクロファージを中心とした肝線維化機序が解明され、抗線維化の新たな治療標的として注目されており肝線維化におけるマクロファージの重要性が示唆されている。われわれは、マクロファージの生存、増殖、分化を促進する分子として報告されている Interleukin-34(IL-34)や Macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)、単球系細胞に発現する CD163 といったマクロファージ関連バイオマーカーに着目し、これらの因子が NAFLD 患者群において新たな肝線維化バイオマーカーになる可能性を検討した。

【対象と方法】本研究は、国立研究開発法人国立国際医療研究センターおよび関連施設において、肝生検によって病理組織学的線維化診断がなされた NAFLD194 症例と C 型慢性肝炎 38 症例、また健常者 20 症例を対象とした。肝生検施行前に採血を行い、血中の液性因子濃度を測定し肝線維化関連バイオマーカーの探索を行った。測定結果から抽出された肝線維化関連バイオマーカーに既存の線維化マーカーを加えて単変量、多変量解析を行い線維化寄与因子の探索を行った。さらに、線維化予測モデル式を重回帰分析を用いて作成した。線維化診断能を評価するため receiver-operating characteristic (ROC)解析を行った。線維化寄与因子として抽出された IL-34 の産生細胞や発現量を調べるため、肝がん細胞株、肝星細胞株、NAFLD 患者の手術標本から樹立されたヒト線維芽細胞を用いて免疫染色、Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を施行した。

【結果】NAFLD197 症例は男性 89 症例、女性 108 症例であった。肝生検による線維化の Stage は Stage0-1 が 80 症例、Stage2 が 46 症例、Stage3 が 41 症例、Stage4 が 30 症例であった。C 型慢性肝炎 38 症例の線維化の Stage は Stage0-2 が 31 症例、Stage3-4 が 7 症例であ

った。患者血中の液性因子を測定した結果、血清 IL-34, 血清 sCD163 は線維化の進行に伴い上昇した。それぞれの Stage 診断毎の線維化寄与因子を単変量解析、多変量解析で検討した結果、≥Stage 2 と≥Stage 3 では Age、Type IV collagen 7s、Stage 4 では IL-34、Type IV collagen 7s が独立した線維化寄与因子として有意差を認めた。ROC 解析で IL-34 の area under curve (AUC)値は 0.68(≧Stage 2)、0.76(≧Stage 3)、0.87(Stage 4)であった。IL-34 の Stage 4 診断能としての感度は 83.3%、特異度は 80.2%と良好であった。多変量解析の結果独立した線維化寄与因子であった IL-34, Age, Type IV collagen 7s を用いた重回帰式は IL-34 based fibrosis score【 (IL34-FS) = 0.0387*IL-34 (pg/ml) + 0.3623*type IV collagen 7s (ng/ml) + 0.0184*age (years) - 1.1850】は AUC、感度、特異度がそれぞれ 0.86、75.2%、85.0% (≥Stage 2); 0.88、81.7%、79.4% (≥Stage 3); 0.91、83.3%、85.6% (Stage 4)であった。免疫染色、PCR、ELISA の結果から IL-34 の主産生細胞は肝星細胞や線維芽細胞であること、さらに TNF-α刺激により IL-34 産生能が上昇することがわかった。C 型慢性肝炎患者群においても血清 IL-34 は高度線維化症例群において高値であった。ROC 解析の結果から≥Stage 3 において IL-34 の AUC 0.95、感度 100%、特異度 83.9%と他の線維化マーカーと比較して同等もしくは優れていた。

【考察】NAFLD の肝線維化進行には代謝疾患、酸化ストレス、インスリン抵抗性など様々な遺伝的背景や環境因子が深く関与している。これらの背景にマクロファージ、肝星細胞、線維芽細胞が関与していることが報告されており、NAFLD 線維化病態の解明やこれらの細胞を治療標的とした研究が進められている。われわれもこれらの細胞に着目し、マクロファージ関連因子が肝線維化に寄与している可能性を考えた。今回の研究で NAFLD 患者群において IL-34 は肝線維化における独立した寄与因子であり、新規肝線維化バイオマーカーとなりうること、また主として線維芽細胞より産生されることを初めて報告した。NAFLD 患者群において IL-34 が優れた線維化マーカーとなりえたことについて、IL-34 の主産生細胞が線維芽細胞であったことがあげられる。さらに炎症性サイトカインである TNF-αは脂肪細胞から分泌されることが知られており、NAFLD 患者群は健常者群と比較して血清 TNF-αが高値であった。TNF-αが線維芽細胞に作用することで IL-34 を強発現したことから、線維化の進行に伴い増殖した線維芽細胞から IL-34 が数依存的に増加し、TNF-αは線維系細胞の IL-34 産生能を助長することで線維化と IL-34 値が正相関した可能性が考えられた。今後の検討として、IL-34 が線維化バイオマーカーとしてだけでなく、抗線維化治療における新たな治療標的となる可能性の検討や NAFLD 以外の肝疾患や他臓器の線維症疾患において IL-34 が優れた線維化バイマーカーとなりうるかどうかを検討すべきと考える

【結論】本研究において NAFLD 患者群において IL-34 が新規肝線維化バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。