

## 統括研究報告書

課題番号：28-10

課題名：「尿を診る」急性肝不全の新規バイオマーカーの体外診断法の確立

主任研究者： 国立成育医療研究センター  
集中治療科 医員  
井手健太郎

### (研究成果の概要)

本研究の3年間における計画は、(1)尿中サイトカイン測定の基盤技術と臨床指標の確立、(2)PICU入室症例に対する疾患横断的に尿中サイトカインの解析、(3)病変臓器におけるサイトカイン発現解析(臨床病理)、(4)尿中サイトカインと臨床病理所見との相関機能解析を、順次および並行して進め、尿中CXCL8(77)濃度に基づく急性肝不全の重症度判定を可能とする迅速診断の確立をすることである。1年目の成果とし、尿中サイトカインの測定を確立し、PICU入室症例における尿中および血中サイトカインの測定を行っている。また、並行して急性肝不全および急性拒絶反応症例の生検で採取した肝組織の特殊染色(新規バイオマーカー)を行っている。肝臓組織の状態(急性肝不全の肝壊死および再生、移植後肝不全における急性拒絶の程度)を、高い精度で体外診断できうるかを検証する段階に入っている。今後は、実際の臨床応用が可能であるかを検証する。

### 1. 研究目的

当センターは、急性肝不全に対し血液浄化療法や肝移植等の集学的治療を積極的に取り組み世界的にも優れた治療成績を挙げている。申請者らは、更なる治療成績の改善を目指して本症の肝組織を用いた臨床病理学的解析に取り組み、その結果、本症のバイオマーカーであるCXCL8(77)を新規に同定した。今回新たに、尿検体からCXCL8(77)を含めた肝不全のバイオマーカーを検出することに成功した。本研究の目的は、尿を用いたこの体外診断技術と先行研究で確立した病理診断とを統合させ、確度の高い診断を可能とするシステムの構築である。

近年、microparticlesは新しい組織障害の生化学指標として注目されているが、本研究班では尿検体からも内皮障害由来のmicroparticlesの検出にも成功している。今後は、劇症肝不全からPICUに入室した小児炎症性疾患について、横断的に新規バイオマーカーならびにmicroparticlesを測定して、こ

れらのアッセイの臨床的意義の検証をすすめていく。

### 2. 研究組織

成育医療研究センター臓器移植センター：  
小児急性肝不全症例の臨床病理学的解析：国立成育医療研究センターの臓器移植センター長の笠原群生、同センター医員の内田孟が成育医療センターで加療される急性肝不全症例の臨床情報管理と解析を行う。

成育医療研究センター集中治療室：  
集中治療室入室症例で急性肝不全を含むいわゆる全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome)を対象として尿のCXCL8(77)を含めた炎症性サイトカインの網羅的解析とその臨床的意義の検証：小児血液研究部室長 大木健太郎、集中治療科医員 井手健太郎が尿中サイトカインの臨床的意義を検証する。

成育医療研究センター研究所+病理診断部：  
小児急性肝不全症例の病態研究：小児の急性肝不全は成人と異なり肝炎ウイルスの関与が稀でその病態の制御には多因子が関与していることが推察

される。そのため各研究分野が連携して本症の病態研究を推進するとともに、本研究課題を支援する。

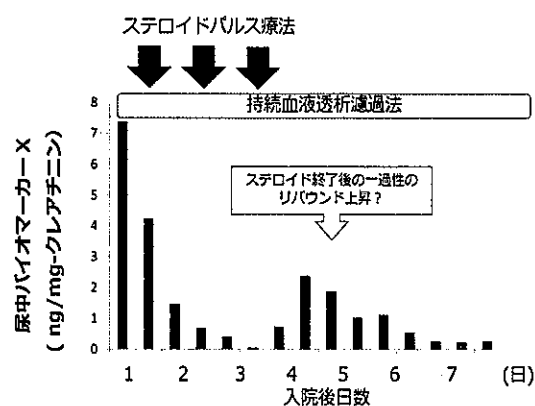
PICU を有する医療機関(成育医療研究センター外) :

尿検体を用いたバイオマーカー研究は臨床現場での課題解決型の臨床研究であり、Research question の共有が重要である。そこで、本トランスレーショナルリサーチの推進および医学教育のためにも多施設との協働研究体制を構築する。現在、東京医科歯科大学・東京都立小児医療センター・兵庫県立尼崎総合医療センターとの協働研究体制を構築している。

### 3. 研究成果

#### <井手>

- ✓ 臨床研究中核病院の研究シーズとして登録した CXCL8(77)は平成 28 年 6 月に国際特許出願(LSIP と成育医療研究センターの共同出願)を完了した。尿中からの検出系を整備し病勢との相関性が確認できており、初年度の目標は達成できた。
- ✓ 急性肝不全患者 8 名において経時的に尿検体(78 サンプル)を採取し、炎症性サイトカインを測定した。尿中クレアチンによる補正にもとづきマルチポイントで比較検討が可能な臨床指標を確立できており、尿検体に着目した体外診断システムの基礎的な整備が完了できた。
- ✓ ステロイドパルス療法と持続血液濾過透析で尿中バイオマーカー X 値は速やかに低下した。ステロイド終了後に一過性のリバウンドを認めた。尿中サイトカイン X は病勢および治療効果の判定に有用な可能性が示唆された。



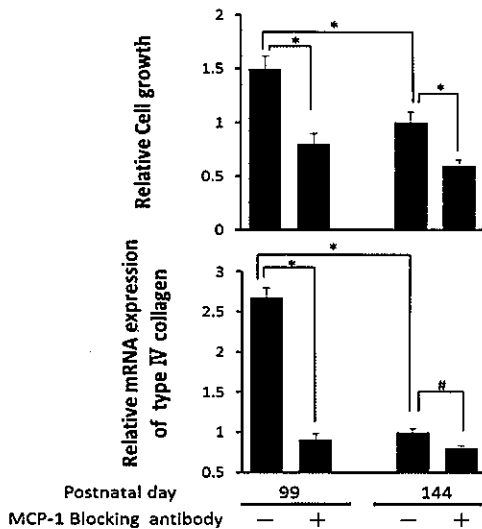
#### <小林>

急性肝不全では肝細胞障害と間質組織の線維化が同時進行する。肝細胞障害は既存の血清生化学検査で評価ができるが、線維化には適切なバイオマーカーがない。Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)は肝類洞の星細胞、門脈の結合組織、血管平滑筋等の間質組織が産生する炎症性サイトカインである。2016年度は、尿中 MCP-1 がダウン症候群の類白血病に合併する肝線維症の新規バイオマーカーであることを見出した(Kobayashi et al J Pediatr Hematol Oncol. 2017)。2017年度は MCP-1 が Tumor growth factor  $\beta$ -1(TGF  $\beta$  1)の下流分子で、繊維芽細胞の増殖と type IV collagen の産生能を活性化することも明らかにした。さらに、このサイトカインを標的とした分子標的治療 (anti-cytokine therapy) が本症に対する新しい治療になる可能性を示した興味深いことに、既存の漢方薬(茵陳蒿湯)が TGF $\beta$ 1 シグナルの抑制効果を示すことから、この薬剤のリポジショニングが肝硬変に対する新規治療になることの理論的根拠を示した (Kobayashi et al Hepatology communication. 2018)。

サイトカインプロフィールと肝線維症マーカーとの相関解析

	Type IV collagen		Hyaluronic acid	
	r	p	r	p
CXCL8	0.805	0.078	0.954	0.005*
CCL5	0.456	0.425	0.502	0.371
CXCL9	-0.876	0.035*	-0.679	0.040*
MCP-1	0.851	0.039*	0.751	0.033*
CXCL10	-0.137	0.822	0.345	0.559

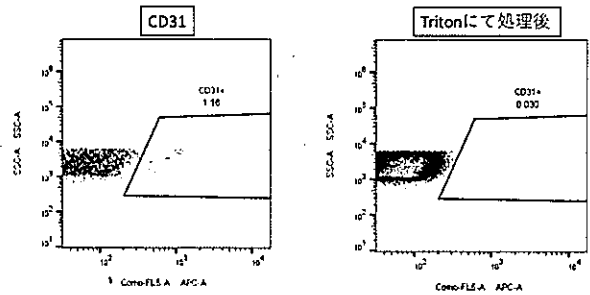
MCP-1に正の相関・CXCL9に負の相関を認めた(ピアソンの順位相関)



<若林>

- ✓ ヒト白血球を刺激して得られる microparticles を用いて、保存条件による検出能に対する影響の調査を行い、安定性を確認した。
- ✓ マウスの尿中 microparticles 検出に成功し(図)、この技術を応用して健康人の尿中 microparticles 検出についても pilot data を得られた。測定条件の調整後に、国立成育医療研究センターで既に採取・凍結保存されている急性肝不全患者の尿検体を用いた解析を年度内に施行する予定。
- ✓ 平成 29 年度はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた microparticles の生物活性測定技術を確認した。加えて信頼度の高い臨床検体測定に向けて、ヒト白血球を刺激して得られる microparticles を用いて、保存条件による量的・質的安定性

を確立した。平成 30 年度はこれらの技術を活用して臨床上の意義に関して動物実験・臨床検体測定を行う予定である。



図：FACS によるマウス尿中 microparticles の検出。FSC を用いて 1µm 以下の粒子を gating し、内皮細胞由来 (CD31+ CD41-) の microparticles を検出 (左)。検出された粒子は界面活性剤の使用にて消失することで (右)、脂質膜に囲まれた物質であることを確認し、その他の微小 debris と鑑別している。

<阪本/内田>

- ✓ 肝移植術後の大きな問題である急性拒絶反応 (広義の肝機能不全) 体の外診断目的に、臨床検査としてリンパ球活性を測定している (高度先進医療研究室)。病理診断部の協力の下、肝生検組織の CXCL8(77) 染色と尿中 CXCL8(77) の関連を検討していく予定である。

<渡辺>

- ✓ 尿中サイトカインの簡便な純化濃縮方法を確認した。
- ✓ サンプル保存条件のプロトコル作成 (安定試験) を行っている。
- ✓ 平成 29 年度合計 100 サンプルの尿、血清検体のサイトカイン測定を行い、これまでに合計 208 検体のサイトカイン測定を行った。
- ✓ 28 年度の報告と同様に、IP-10 と MCP-1 の臨床症状との相関関係、MIG と RANTES と IL-8 においては、血清のサイトカインが下がった後に尿で上昇する同様な結果を 29 年度も得る事が出来た。

- ✓ リンパ球サブセット解析においては、Th1、Th2、Th17 といったヘルパーT細胞、活性化マーカーである HLA-DR と併せた詳細解析を行った。それにより、ステロイドなどの治療前と治療後の効果や病勢動態をより詳細に把握する事が出来た。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は臨床研究の倫理指針と個人情報保護法を遵守し研究を実施する。すでに成育医療研究センターで「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・保存：受付番号 385」の倫理承認済みである。新規バイオマーカーの臨床研究に際しては、非介入および非侵襲の臨床研究として別途倫理申請を行い対応する予定である。

検査キット化のために他施設への残存検体の分与および残存検体の廃棄にあたっては、日本臨床検査医学会の見解（臨床検査を終了した検体の業務、教育、研究のための使用について、資料別添）と新臨床研究指針の倫理指針を遵守する。