

(別紙1)

総括研究報告書

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

主任研究者名 国立成育医療研究センター
集中治療科 医員 井手健太郎

(研究成果の要約)

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。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)を行い、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)と、尿中CXCL8(77)濃度に相関があることを確認できた。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。

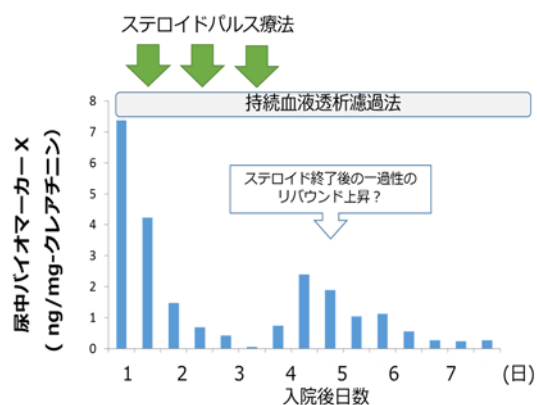
3. 研究成果

<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。

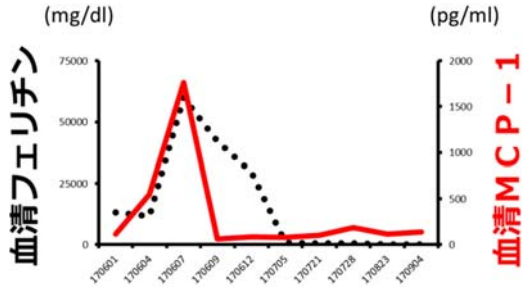
- ✓ ステロイドパルス療法と持続血液濾過透析で尿中バイオマーカーX値は速やかに低下した。ステロイド終了後に一過性のリバウンドを認めた。尿中サイトカインXは病勢および治療効果の判定に有用な可能性が示唆された



<小林>

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 β -1(TGF β 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 β 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)。



図

1 : EBV-HLH の臨床経過中に経時的にサイトカインプロファイルを取得した。血清 MCP-1 (実線) が血清フェリチン (点線) よりも鋭敏なバイオマーカーであることを見出した。

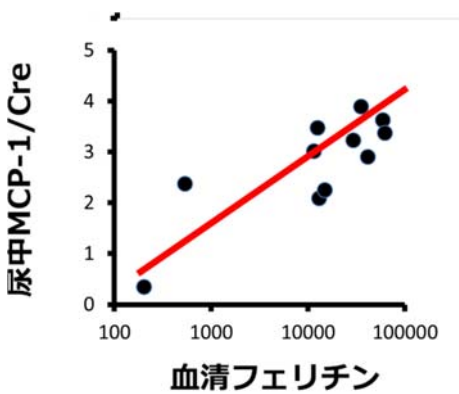


図 2 : 尿中 MCP-1 は EBV-HLH のバイオマーカーになる可能性が示された。

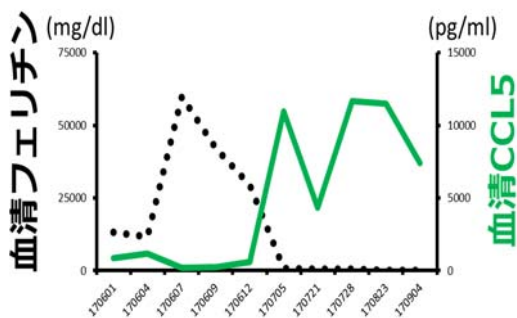
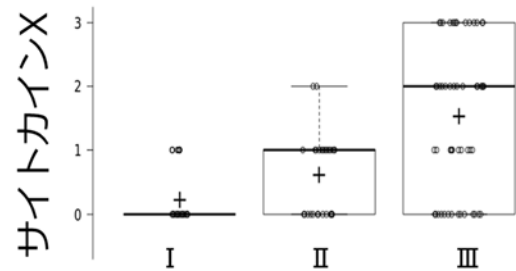


図 3 : 血清 CCL5 (実線) の動態はやフェリチン (点線) と逆相関するの動態を示す。

<阪本/内田>

肝移植後の急性拒絶反応では、重症化に伴い

中心静脈周囲炎から肝実質の細胞障害に進展する特徴的な組織像を呈する。この所見は、急性肝不全における組織像と共通する部分が多く、拒絶反応に伴うグラフト不全の病態生理には急性肝不全との共通の分子機構が関与している可能性がある。本分担研究では、急性肝不全と拒絶反応に伴うグラフト不全症例とでサイトカイン X の発現局在と発現レベルの比較検討を行った。その結果、両者の病態で中心静脈周囲炎と同部位のサイトカイン X の発現度に正の相関を認めた。以上のことから、サイトカイン X は急性肝不全の重症度のみならず肝移植後の急性拒絶反応の病勢評価にも応用出来る可能性が示唆された。



中心静脈炎の重症度

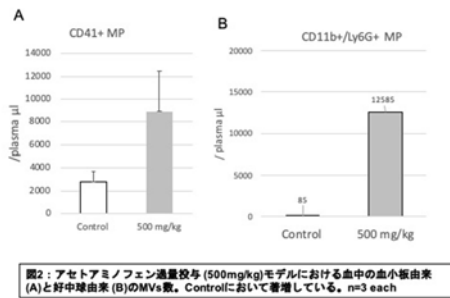
図 2: 中心静脈炎の重症度とサイトカイン X の発現度の相関

<若林>

平成 30 年度は国際共同研究者を招いた会議での議論を契機として、microparticles 測定系と実験的肝不全モデルの体制整備を更に進めることとした。具体的には体液中における microparticles の実験的急性肝障害モデルにおける測定と、ヒト検体における microparticles の測定可能種を拡充することに成功した。これらの技術と先行実験を活用して、本プロジェクトは更なる発展を目指し

た大型研究費獲得を目指している。

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。



<渡辺>

当研究チームは、急性肝不全のバイオマーカーである CXCL8(77)の新規同定に成功しこの炎症性サイトカインの濃度測定が急性肝不全の臨床検査法として有用である事を見出し、尿中、血清のサイトカイン濃度、さらに血液、肝組織のリンパ球サブセット解析と比較検討することにより、より詳細な病態解析、モニタリング、治療方針に有用になりうると考えた。本研究ではこれらの解析にフローサイトメトリー法を用いることにより、比較的簡便で迅速に解析を行う事が出来、急性肝不全の基盤技術の開発に繋がると考えられる。

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