

**厚生労働科学研究費補助金**

**難治性疾患克服研究事業**

**難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の  
開発に関する臨床研究**

平成15年度

総括・分担研究報告書

主任研究者

石橋 大海

平成16(2004)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する臨床研究 ..... 1  
石橋大海

### II. 分担・協力研究報告

1. PBC の治療法に関する文献的考察 ..... 15  
主任研究者 石橋大海
2. 自己免疫性肝疾患の罹患率、臨床像、治療法の現状－世界各国との比較 ..... 21  
主任研究者 石橋大海  
(資料) 自己免疫性肝疾患の罹患率、臨床像、治療法に関する調査票
3. 国立病院・療養所における原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 症例データベースを用いた  
長期経過の検討 ..... 31  
研究協力者 酒井浩徳
4. 国立病院長崎医療センターにおける原発性胆汁性肝硬変の長期経過 ..... 35  
分担研究者 中村 稔
5. 国立病院における自己免疫性肝炎の治療と肝組織像の推移について ..... 38  
研究協力者 渡部幸夫
6. 生体肝移植を受けた原発性胆汁性肝硬変のprofileに関する研究 ..... 41  
分担研究者 市田隆文
7. 原発性胆汁性肝硬変に対する EBM の導入に関する研究 ..... 43  
分担研究者 西原利治
8. 原発性胆汁性肝硬変に対するフェノフィブラートの効果 ..... 45  
分担研究者 道免和文
9. PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究 ..... 49  
研究協力者 大曲勝久
10. 原発性胆汁性肝硬変の分子標的の同定と病態に基づく診断法・治療法の開発 ..... 51  
分担研究者 中村 稔
11. PBC の進展に関する遺伝子・蛋白発現の病理学的解析 ..... 53  
分担研究者 伊東正博
12. ゲノミクスに基づく難治性自己免疫性肝疾患の病態解析と診断・治療への応用に  
関する研究 ..... 55  
分担研究者 金子周一

13. 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変発生における菌体成分の関与 .....	57
分担研究者 中沼安二	
14. ヒト肝細胞 Toll-like receptor 4 (TLR4) 発現に関する研究 .....	60
分担研究者 右田清志	
15. 「PBC における Wnt シグナル伝達経路の解析およびその臨床応用」 に関する臨床研究 .....	62
分担研究者 田中 篤	
16. 原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球に関する研究 .....	63
分担研究者 市田隆文	
17. 原発性胆汁性肝硬変の病態に関与する T 細胞の機能解析 .....	67
分担研究者 下田慎治	
18. 自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析に関する研究 .....	72
分担研究者 喜多宏人	
19. Th1/Th2 バランス制御法の開発：インバリアント NKT 細胞亜分画による制御 分担研究者 松下祥 .....	74
20. 抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性 T 細胞の同定と その誘導機序・臨床応用に関する研究 .....	80
分担研究者 若月芳雄	
21. 「PBC 動物モデルの開発とそれを用いた胆道傷害機序の解析・治療法開発」 に関する研究 .....	82
分担研究者 松口徹也	
22. 肝細胞移植法の開発 .....	84
分担研究者 兼松隆之	
23. 末期肝硬変に対する遺伝子組み換え型ヒト HGF の臨床応用 .....	86
分担研究者 坪内博仁	
24. 末期肝硬変に対する遺伝子組み換え型ヒト HGF の臨床応用 .....	89
分担研究者 石川文彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	91
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	97

## I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

難治性自己免疫性肝疾患の画期的治療法の開発に関する臨床研究

主任研究者 石橋 大海 国立病院長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨： 難治性自己免疫性肝疾患である原発性胆汁性肝硬変（PBC）と自己免疫性肝炎（AIH）を根治的に治療する、あるいは進展を阻止し改善する治療法の開発が急務である。病態の解明によって、候補分子を標的とした、あるいは特異的な免疫反応を制御することができるような免疫制御療法の開発が期待される。また、PBC、AIHいずれも種々の病態を呈し、経過が良好な群と不良な群とに分けられるため、対象者に応じた治療法の開発と適切な適用指針が望まれる。

本研究の目的は、難治性自己免疫性肝疾患で PBC と AIH の予後を予測する因子や規定する因子、あるいは治療に対する反応性や病態の進行を規定する宿主因子、免疫異常の本態などを最新の手法を用いて解析して同定し、それらの因子を標的とした新しい画期的な分子標的治療法や免疫療法を開発することである。

平成 15 年度の研究成果として、

1. 既存の薬物としては、ウルソデオキシコール酸（UDCA）とベザフィブラートに加えてフェノフィブラートも有効である可能性を示す結果が得られた。

2. PBC の予後を規定するマーカーとして、血清マーカーでは血清トランスアミナーゼ値と抗 gp210 抗体価、病理学所見として interface hepatitis、lobulitis で表現される病理学的活動性が重要な因子であることが示唆された。

3. PBC 治療の分子ターゲットとしては、PPAR $\alpha$ 、Wnt 遺伝子が示唆された。

4. PBC の免疫制御療法として、PDC-E2 163-176 反応性 CD4 T 細胞や自己抗原特異的 CD8+T 細胞、NKT 細胞、あるいは iNKT 細胞を操作することによる治療法の可能性が得られた。

5. 経口からの抗原投与による肝臓における免疫寛容誘導の可能性が示された。

6. 肝硬変に進行した症例に対しては、肝細胞移植療法や肝細胞増殖因子（HGF）を用いた肝再生療法、造血幹細胞移植による再生療法の可能性が示めされた。

分担研究者

中村 稔	長崎医療センター・臨床研究 C
右田 清志	長崎医療センター・臨床研究 C
伊東 正博	長崎医療センター・臨床研究 C
兼松 隆之	長崎大学大学院・移植・消化器外科
坪内 博仁	宮崎大学医学部・第二内科
中沼 安二	金沢大学大学院・医学系研究科
松下 祥	埼玉医科大学医学部・免疫学
松口 徹也	鹿児島大学大学院・歯学総合研究科
市田 隆文	新潟大学医学生命科学医療 C
西原 利治	高知大学医学部・消化器病態学
金子 周一	金沢大学大学院・がん遺伝子治療学
若月 芳雄	京都大学大学院・医学研究科内科学
田中 篤	帝京大学医学部・内科学講座
喜多 宏人	自治医科大学・消化器内科
下田 慎治	九州大学大学院・病態修復内科学

研究協力者

八橋 弘	長崎医療センター・臨床研究 C
藤岡ひかる	長崎医療センター・臨床研究 C
道免 和文	長崎医療センター・臨床研究 C
大黒 学	長崎医療センター・臨床研究 C
小森 敦正	長崎医療センター・臨床研究 C
松本 武浩	長崎医療センター・臨床研究 C
谷口 堅	長崎医療センター・臨床研究 C
鶴殿 雅子	長崎医療センター・臨床研究 C
酒井 浩徳	九州医療センター・消化器科
渡部 幸夫	国立相模原病院・消化器科
中村 陽子	国立相模原病院・消化器科
山本 匡介	佐賀医科大学・内科
大曲 勝久	長崎大学大学院・消化器病態制御学
石川 文彦	九州大学大学院・病態修復内科学

## A. 研究目的

自己免疫肝疾患の一つである原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は慢性進行性の胆汁うっ滞性肝疾患であり、典型例では肝硬変から肝不全に至る。今までに、PBC や AIH に関する多くの研究がなされてきたが、未だその原因は明らかではなく、究極的には肝移植以外には生命を救うことができない。また、進行した段階では骨粗鬆症やそれに伴う骨折あるいは食道静脈瘤の破裂など QOL の低下も著しい。また、自己免疫性肝炎 (AIH) 患者の一部はステロイド抵抗性で肝不全へ進行する予後不良の疾患である。さらに免疫抑制薬などの治療薬による副作用も大きな問題である。このように難治性肝疾患である PBC と AIH には、新たな画期的治療法の開発が強く望まれている。また、PBC と AIH は互いに重複して発症したり、また、原発性硬化性胆管炎を合併したりと、診断困難な境界例と思われる症例も少なからず存在するため、有効な治療法を開発するうえでも従来の診断基準に加えて病態に基づいた的確な診断法の確立が必要である。特に、進行性の予後不良群と非進行性の予後良好群を区別する早期診断マーカーを同定することや両群間で異なる遺伝子発現パターンを同定し、これに基づいた新しい分子標的治療法を開発することは、難治性肝疾患の診療・研究に携わる我々に課せられた責務である。また、免疫異常の本態の解明とそれに基づいた免疫療法の開発も、自己免疫性疾患一般に共通した最も重要なテーマである。

本研究の目的は、難治性自己免疫性肝疾患である PBC と AIH の画期的治療法を開発することである。そのために、①従来の診断基準では診断困難な症例にも病態に応じた適正な診断と治療ができるように、血清や肝臓生検組織を用いた詳細な診断法を確立する。②個々の症例の予後を予測あるいは規定する因子、治療に対する反応性や病態の進行を規定する宿主因子を最新の LCM・DNA マイクロアレイ・SNPs などの分子生物学的手法を駆使して同定する。③予後不良群に特徴的に発現している分子を標的とした新しい分子標的治療法を開発する。④病因と密接に関係した自己抗原に対しては、特異的免疫療法を開発する。⑤臨床試験実施のための基盤整備、動物モデルを用いた基礎的検討を行なうとともに、臨床応用可能なものから臨床試験を

開始する。

## B. 研究方法

難病の画期的な治療法を短期間で開発することには困難が予想されるため、まず、グローバルな観点より治療法の検証と文献的考察を行なうとともに、現行の治療法の問題点を明らかにすることから着手する。同時に、現在他の疾患に使用されている治療法の中から、PBC や AIH への臨床応用が期待できる治療法に着目し、その臨床試験を検討する。一方、副作用がない画期的な治療法の開発のためには、本疾患の病態の解明が必須であり、そのための基礎的研究を、疾患早期に適応する治療法と進行期あるいは末期に適応する治療法に分けて並行して重点的に進める。具体的には、肝ネット登録症例による現行治療法の評価、臨床検体を用いた遺伝子レベルでの解析、新しい分子標的の同定、特異的免疫療法のための基礎的検討、臨床応用を目指しての動物モデルを用いた新しい治療法の解析、新たな臨床試験研究の開始と、短期的と中期的計画にわけて計画を推進する。具体的なテーマは以下の通りである。

### 1. 治療法の文献検索および考察にもとづく治療法開発戦略の決定

PBC に対して行なわれている、あるいは行なわれてきた治療法について、文献検索し、考察を行なうことにより、今後の治療法開発の方向性を見極める。

### 2. 現行治療法の検証にもとづく治療法開発戦略の決定

現在国内で行なわれている治療法の種類やその効果について検証する。

(1) 自己免疫性肝疾患の罹患率、臨床像、治療法の現状について、国内外の消化器医に調査用紙による調査を行い、世界各国の現状と比較を行なう。

(2) 国立病院肝疾患政策医療ネットワーク (L-net) への原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 登録患者、および既に国立病院・療養所共同研究で登録された PBC 患者約 450 名を対象として、臨床経過、臨床検査成績、薬剤使用歴、転帰 (肝移植あるいは死亡) データから、予後規定因子、有効な薬剤、投与量等を解析する。

(3) 国立病院長崎医療センターにおける原発性胆汁性肝硬変の長期経過を臨床検査データ、病理検査成績より解析する。

(4) 肝疾患政策医療ネットワーク(L-net)を用いて同様に自己免疫性肝炎(AIH)患者を解析する。

(5) わが国における原発性胆汁性肝硬変に対する生体肝移植症例について経過を詳しく検討することにより、移植時期、再発防止のための方法等を検討する。また、新たな治療法の開発のための標的を見出す。

### 3. 臨床試験効果判定のための薬効評価法確立のための研究

PBC、AIHとも経過が長い疾患であるため、薬剤の臨床効果の判定を行なうための指標の設定が困難である。移植、死亡が望ましいが、経過の長い疾患であるので、長期間の観察が必要となる。一方、生化学値など臨床検査データが最も安易であるが、必ずしも組織像の改善や予後の改善とは相関しない。適切な効果的指標を開発する。

### 4. 既に他の疾患に対して臨床応用が開始されている治療法や薬剤を用いた臨床試験

フェノフィブラート、白血球除去療法など、既に他の疾患に対して臨床応用が開始されている治療法や薬剤でPBC、AIHの治療に応用可能なものについて、プロトコルを検討し、倫理委員会の審査を経た後、臨床試験を開始する。

### 5. 経過不良要因、現行治療法による治療抵抗性の解析にもとづく治療法開発戦略

PBCおよびAIHの経過良好群および経過不良群について、それぞれ肝臓生検組織、末梢血単核球を用いたアポトーシス関連分子、ケモカイン、サイトカインなどの既知の遺伝子発現解析を行い、両者を区別する予後規定因子を見出す。

(1) 肝組織と免疫パラメータを用いた解析

(2) PBC 特異的抗核膜抗体(gp210 抗体など)の測定系や PBC 特異的修飾 PDC-E2 抗体測定系の開発(米国カリフォルニア大学 Gershwin ME 教授との共同研究)、確定診断用 ELISA パネルの作製。

(3) 肝臓生検組織の網羅的遺伝子発現パターンによる病態に応じた診断パネルの作製。

(4) 包括的な遺伝子解析(ゲノミクス)の手法の導入により、自己免疫性肝疾患の病態診断や治療の選択に寄与する診断法を開発するための基盤研究、を行なう。

### 6. 肝細胞、胆管細胞、肝類洞上皮細胞の障

### 害機構の解析にもとづく治療法開発戦略

(1) LPS, FAS, TNF, IL-18, IFN- $\gamma$  などによる細胞障害を阻止するための分子標的の同定、(2) 原発性胆汁性肝硬変の病態形成における Wnt シグナルの関与、(3) 自己免疫性肝炎の対応抗原の分子レベルでの同定、等、肝細胞、胆管細胞、肝類洞上皮細胞の障害機構の解析にもとづいて治療法開発戦略をたてる。

### 7. 免疫担当細胞による細胞障害機構の解析にもとづく免疫制御療法の開発

PBC、AIH の発症機序にもとづく免疫応答機構を解明し、その免疫応答を制御することで治療する方法を開発する。

### 8. 治療法開発のための動物モデルの開発

新しい治療法の開発には、どうしても動物実験モデルを必要とするため、開発研究を行なう。

### 9. 肝硬変に進行した症例に対する治療法の開発

既に肝硬変、肝不全に進展した症例に対する画期的治療法を開発を行なう。

(1) 肝細胞移植法の開発

(2) 肝細胞増殖因子(HGF)のPBC・AIH肝不全治療への応用

(3) 肝細胞再生治療法の開発

\* 倫理面への配慮: 研究の遂行にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」に則り、当センターおよび各実施施設の倫理委員会で厳正な審査を経た後に準備をすすめ、患者から十分なインフォームドコンセントを得るとともに、登録においては匿名化する。症例登録は肝ネットを利用した。肝ネットは政策医療肝疾患診療・臨床研究ネットワークシステムであり、患者の登録に際しては、施設ごとにその内容を患者に説明した上で同意書を得た。登録された情報に関しては、匿名化して、個人が特定できないような仕組みとした。遺伝子解析に関しては、文部科学省、厚生労働省および科学技術省が共同して策定した「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」(2001年3月29日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守し、患者より遺伝子情報を得るための検体を得る施設においては各施設で倫理委員会に諮り許可を得た。動物実験を行なう場合は、動物愛護に配慮した。

## C. 研究成績

### 1. 治療法の文献検索および考察にもとづく治療法開発戦略の決定

#### 1) PBC の治療法に関する文献的考察 (石橋大海)

画期的治療法開発のいとぐちを掴むことを目的に、これまでに報告されたPBCに関する治療法の文献を検索し、その治療法の有効性について検討した。PBCが自己免疫性疾患と考えられることから、免疫抑制療法の有効性が考えられるが、これまで試みられてきた免疫抑制薬はいずれも非特異的な免疫抑制療法であり、いずれも毒性を上回る有効性はランダム化対照研究によって得られていない。ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は進展を抑えて死亡ないし肝移植までの期間を延長でき、しかも毒性・副作用が少ない“生理的な”薬剤として現在標準的な治療法として用いられている。肝移植後の再発も抑える可能性が示されている。最近UDCAに抵抗性の症例に対してフィブラート系の薬剤が有効とする報告が集積している。

#### 2. 現行治療法の検証にもとづく治療法開発戦略の決定

##### 1) 自己免疫性肝疾患の罹患率、臨床像、治療法の現状—世界各国との比較

同じ診断基準のもとで診断され、同期間に国内および海外の消化器医を受診したAILD症例を対象に、消化器医に対して調査票による調査を行い、我が国における罹患率、臨床像、治療法の現状を世界各国の現状と比較した。調査は同期間に同じ診断基準で行われたが、罹患率、臨床像は国間で大きく異なっていた。

治療は、国内AIH症例確診例の80%に副腎皮質ステロイド薬が使用されていたが、寛解状態が得られている約4分の1の症例に再発がみられた。また、軽症と思われる症例にUDCA単独投与がなされているが、うち20%弱に再燃がみられていることは、UDCA単独投与では完全にコントロールできないことを示している。PBCは90%の症例にUDCAが投与され、最近有効性が報告されているベザフィブラートは10%弱の症例に投与されていた。しかし、死亡例や肝移植症例が少なからず認められた。

##### 2) 国立病院・療養所における原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 症例データベースを用いた長期経過の検討 (酒井浩徳)

国立病院肝疾患政策医療ネットワーク施設を中心に国立病院・療養所を対象として構築した原発性胆汁性肝硬変症例のデータベースを用い、データ解析や新たな調査研究のシステム作りの試みを目的とし、これまでに原発性胆汁性肝硬変428症例を登録し、266症例に関しては診断時から現時点までの経過の追跡調査を完了した。その結果、多くの症例は安定した経過をたどるものと考えられた。全国的にも症例数が少なく、しかも多くの症例が安定した経過をたどる原発性胆汁性肝硬変においては、その病因、さらには自然経過の解明には、症例数の確保と長期にわたる正確な経過観察が必要である。本データベースおよび国立病院肝疾患政策医療ネットワークは原発性胆汁性肝硬変に関する調査研究に有用である。

##### 3) 国立病院長崎医療センターにおける原発性胆汁性肝硬変の長期経過 (中村 稔)

2回以上肝生検を施行した症例の中から、病理学的に進行した群と非進行群とを比較検討した結果、interface hepatitis、lobulitisで表現される病理学的活動性と血清トランスアミナーゼの上昇が、進行を規定する重要な因子として同定された。臨床経過から予後不良であった症例の解析からは、肝不全に至る有意な要因として、上記因子に加えて、初回診断時の血清総ビリルビン、ALPの値が同定された。

##### 4) 国立病院における自己免疫性肝炎の治療と肝組織像の推移について (渡部 幸夫)

① 政策医療肝疾患ネットワーク登録症例の予後調査：1998年以後国立病院肝疾患政策医療ネットワーク参加施設で自己免疫性肝炎 (AIH) 新規症例を登録してきた。計391症例のうち2002年11月に予後調査を施行し、PSL治療とAIHの予後について解析した。肝炎ウイルス合併例を除いた259例を調査対象としたが、このうちの慢性肝炎220例中、経過中に14例(6.4%)が肝硬変に進展した。全経過中のステロイド (PSL) 剤治療の有無、初回治療の反応性、治療経過中の肝機能再燃、PSL中止の有無などいずれの要因が肝硬変進展を抑制するかについて検討した結果、PSL治療の有無のみが統計上有意であった。

② PSL治療の治療効果：PSL治療によるAIHの予後を検討するため、治療前と治療中に複数回肝生検を施行した30例について肝



組織変化を比較した。肝生検組織は2人の病理医と3人の臨床肝臓専門医の総合評価で点数化した。2回の肝生検の間でPSL治療を行なわなかった11例では、ほぼ全例で線維化(fibrosis)が悪化進展した。グ鞘炎やpiecemeal necrosis、小葉炎の炎症所見は改善する例も散見された。PSL治療で完全寛解を維持している10例では組織4項目ともすべて改善したが、炎症所見に比して繊維化の改善は遅れる傾向があり、組織改善には時間差があった。PSL治療で寛解、再燃のある13例では、各因子とも数年経ても平行線をたどるものが多かった。

#### 5) 生体肝移植を受けた原発性胆汁性肝硬変のprofileに関する研究(市田隆文)

わが国の生体肝移植レシピエントを調査し、特に自己免疫性肝疾患として原発性胆汁性肝硬変221例を中心に検索した。その結果、生体肝移植の移植成績は5年生存率75%と良好であり、原発性硬化性胆管炎や自己免疫性肝炎も同様であった。原発性胆汁性肝硬変の再発は組織学的には70例中7例(10%)であることが判明したが、特異的な自己抗体である抗糸粒体抗体(AMA)の再陽性率は70%前後であった。さらに、この頻度をドナーとレシピエント間で血縁、非血縁者間で比較検討すると、非血縁者でのAMA陽性率はHLAクラスIのB locusの一致が深く関与していることが統計学的に示唆された。

### 3. 臨床試験効果判定のための薬効評価法確立のための研究

#### 1) 原発性胆汁性肝硬変に対するEBMの導入に関する研究(西原 利治)

胆管あるいは肝細胞におけるPPAR- $\alpha$ を介するシグナルの活性化の程度を系統的に検討し、原発性胆汁性肝硬変の病態におけるPPAR- $\alpha$ の役割を明らかにすると共に、非侵襲的で客観的かつ再現性と定量性の高い薬効評価法を確立し、EBMの導入に努めることを目的に研究を行った。PBCを対象にursodeoxycholic acid(UDCA) 600mg/日の内服治療を施行し、ALP、 $\gamma$ -GTP、IgM等の血液検査成績並びに肝臓の組織学的改善度を検討する。上記指標に改善が得られない症例に対しては、bezafibrate 800mg/日の追加内服治療を施行し、ALP、 $\gamma$ -GTP、IgM等の血液検査成績並びに肝臓の組織学的改善度を検討する。その間、経時的にPPAR- $\alpha$ を介す

るシグナルの活性化の程度を系統的に検討した。結果、6例の新規PBC症例に対してUDCAの投与を開始し、3ヶ月目にPPAR- $\alpha$ を介するシグナルの活性化の程度の系統的検討を行ったが、投与前に比してPPAR- $\alpha$ を介するシグナルの活性化状態に明らかな変化は認めなかった。

#### 4. 既に他の疾患に対して臨床応用が開始されている治療法や薬剤を用いた臨床試験

##### 1) PBCに対するフェノフィブラートの効果(道免和文)

PBCの治療法としてはウルソ酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)が用いられているが、肝機能の正常化は20-30%にみられるに過ぎない。UDCA無効の非症候性PBC(asymptomatic PBC, aPBC)9例に抗高脂血症剤であるフェノフィブラートを追加投与し、その血清学的・生化学的検査を継時的に施行した。フェノフィブラートの追加投与により、有意に肝胆道系酵素の低下を認め、同時に9例中4例にAMAの低下も認められた。副作用はみられなかった。フェノフィブラートはaPBCに対し、今後の有効な治療薬のひとつとして位置づけられる。

##### 5. 経過不良要因、現行治療法による治療抵抗性の解析にもとづく治療法開発戦略の決定

##### 1) PBCの進展と治療反応性の予測におけるIgAクラス抗M2抗体の役割に関する研究(大曲勝久)

IgAクラス抗M2抗体が原発性胆汁性肝硬変(PBC)の進展予測因子となりうるかを検討した。2年以上の間隔で2回以上の肝生検を施行され、かつ生検前後の血清が保存されているPBC症例7例を対象とし、Western blot法にてIgAクラス抗M2抗体を検出した。非進行例4例のうち2例は前後とも血清中IgAクラス抗M2抗体は陰性であったが、他の2例は前後とも陽性であった。進行例3例のうち1例は初回肝生検時の血清ではIgAクラス抗M2抗体が陰性であったが、2回目の肝生検時には陽転化していた。他の2例は前後ともに陽性であった。

##### 2) PBCの分子標的の同定と病態に基づく診断法・治療法の開発(中村 稔)

PBCの発症と進展に関する作業仮説“分子相同性とepitope spreading”に基づき、核

膜孔蛋白 gp210 に着目し、gp210 に対する免疫応答と予後との相関について解析した。まず、gp210 蛋白の中で、最も抗原性が強い B 細胞エピトープを同定した後、その部位を含む抗原を用いて、ELISA による抗体の定量系を確立した。この系を用いて、過去 20 年間に当院で診療した PBC 71 症例の抗 gp210 抗体を経時的に定量した。上記仮説を支持する結果が得られるとともに、抗 gp210 抗体価が、肝不全への進展の独立した予後因子であることが明らかとなった。また、Laser capture microdissection (LCM) と PBC 肝生検凍結組織を用いた部位別遺伝子発現の解析から、PBC に特徴的な免疫関連遺伝子が同定された。ヒト初代培養胆管細胞を用いた研究から、胆管細胞は TLR4, TLR9 などの自然免疫に関与する分子を発現し、その刺激を介してさまざまな免疫応答を修飾していることが示唆された。

### 3) PBC の進展に関する遺伝子・蛋白発現の病理学的解析 (伊東正博)

PBC の進行症例においてどのような因子が PBC の病像進展に関与しているのかを分子病理学的に解析するために、国立病院長崎医療センターにおいて生検された 130 症例の組織学的再評価を行った。そのうち非進行例と進行例を対象とし免疫組織化学的にアポトーシス、MHC、HLADR、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  の発現を比較検討した。新鮮肝組織の得られた PBC 症例において LCM で肝細胞域、門脈域を選択的に採取し PPAR $\alpha$  mRNA の Real Time PCR による定量的検討を行った。結果、進行例には Stage1 $\rightarrow$ 2、1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 3、2 $\rightarrow$ 3、3 $\rightarrow$ 4 と様々の組み合わせと期間で進行がみられた。Stage1 で進行しない症例では interface hepatitis と活動性が Stage1 から進行した症例に比し有意に軽かった。PPAR $\alpha$  は正常肝では肝細胞で発現し胆管での発現は乏しいが、PBC 症例では Stage に比例して肝細胞での発現が亢進し、再生胆管で強い発現が見られた。しかし、細胞質や膜発現が主体で核内発現はほとんどみられなかった。PPAR $\alpha$  mRNA の発現は肝実質領域で高く、門脈域で低かった。これらの結果より、PBC の予後予測因子として piecemeal necrosis と活動性評価は重要な因子であることが示唆された。進行した PBC では PPAR $\alpha$  の発現は亢進しておりフィブラートが作用しやすい環境が形成されていることが示唆された。

### 4) ゲノミクスに基づく難治性自己免疫性肝疾患の病態解析と診断・治療への応用に関する研究 (金子周一)

PBC および AIH 材料を用いて、DNA チップによる病態診断や治療の選択に寄与する診断法の開発を行なう基盤研究を行った。それぞれ 15 例、12 例の材料を選択された 1,080 の遺伝子よりなるチップを用いて解析した。発現遺伝子プロファイルはそれぞれの疾患に固有であった。PBC では AIH の病期の進展に比し、初期および後期において発現している遺伝子が異なっていた。すなわち初期にはリンパ球の集族に関与する遺伝子が多く発現亢進し、後期には接着やストレス反応およびケモカイン遺伝子が上昇していた。一方、AIH では病期の進展に伴い、同様の遺伝子の発現が亢進していた。さらにレーザーキャプチャーによる組織との関連では、浸潤細胞による発現遺伝子プロファイルと、肝組織におけるプロファイルが示され、発現遺伝子からみた相互の関連が明らかになった。

### 6. 肝細胞、胆管細胞、肝類洞上皮細胞の障害機構の解析にもとづく治療法開発

1) PBC の胆管病変発生における菌体成分の関与—胆管系自然免疫におけるサイトカインネットワークおよびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  の関与について— (中沼安二)

胆管細胞と菌体成分との相互作用を検討した。ヒト胆管細胞における Toll-like receptor (TLR) 2~4 および MD-2 の発現、また IFN- $\gamma$  (Th1 型) による TLR の発現亢進と菌体成分に対する感受性亢進がみられ、PBC の胆管炎発生に TLR を介した自然免疫機構と Th1 型サイトカインへの偏位が関与していることが示唆された。また、胆管細胞は炎症性因子であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR)  $\gamma$  を発現し、IL-4 (Th2 型) 刺激にて PPAR $\gamma$  の発現亢進がみられた。さらに PBC の肝組織内では胆管における PPAR $\gamma$  の発現低下がみられ、胆管炎の増悪に関与していることが示唆された。最後に、PPAR $\gamma$  リガンド刺激にて胆管細胞における NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することができ、PPAR $\gamma$  リガンドが PBC の新たな治療薬として期待された。

## 2) ヒト肝細胞 Toll-like receptor 4 (TLR4) 発現に関する研究 (右田清志)

lipopolysaccharide (LPS) の肝細胞に対する直接作用の有無を検討する目的で、正常ヒト肝細胞における TLR4 の発現を調べた。ヒト肝細胞は、TLR4 を mRNA、蛋白レベルで発現していた。さらにヒト肝細胞を LPS で刺激すると、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化、IkappaB- $\alpha$  の分解が誘導され、急性期蛋白である SAA の産生が認められた。以上の結果より、LPS は肝細胞に対する直接作用も有していることが示唆された。

## 3) PBC における Wnt シグナル伝達経路の解析およびその臨床応用に関する臨床研究 (田中 篤)

画期的治療法の開発に資することを目的とし、PBC における Wnt シグナル伝達系の関与を検討した。移植患者から得られた PBC 肝 (n=7)、および対照として PSC (n=3)・HCV 肝 (n=4)、さらに大腸癌肝転移などから得られた正常肝 (n=5) を検体として用い、これらから RNA を抽出、cDNA に変換後、real-time PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) によって Wnt2B 遺伝子を定量し、各疾患における発現を比較した。その結果、対照肝と比較し、Wnt2B 遺伝子は PBC 肝において過剰発現しており (PBC vs normal,  $p=0.0429$ ; PBC vs HCV,  $p=0.0233$ ; PBC vs PSC,  $p=0.0147$ )、PBC の病態形成に Wnt 遺伝子が関与している可能性が改めて確認された。

## 7. 免疫担当細胞による細胞障害機構の解析にもとづく特異的免疫療法の開発

### 1) PBC の肝内リンパ球に関する研究 (市田隆文)

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別は重要であり、生体肝移植を施行した症候性 PBC7 例と、腹腔鏡下肝生検を施行した無症候性 PBC11 例を対象として標的臓器である肝臓内のリンパ球解析を行った。無症候性症例と比較して、移植例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加し免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。

### 2) PBC の病態に関与する T 細胞の機能解析 (下田慎治)

PBC の病態に関与する T 細胞の機能解析を行った。その結果、(1) T 細胞は HLA DR53 拘束性にリポ酸結合部位に含まれる 163-176 番を最小抗原として認識すること、(2) gp210 抗原の一部に PDC-E2 163-176 反応性 T 細胞クローンが交差反応性を示すこと、(3) PBC 患者由来の PDC-E2 反応性 T 細胞は側副刺激分子非依存性であり健常者由来の PDC-E2 反応性 T 細胞は側副刺激分子依存性であること、(4) 側副刺激分子依存性 T 細胞は anergy 状態になりやすいこと、(5) PBC 患者からは側副刺激分子非依存性の PDC-E2 反応性 T 細胞が多く同定され、健常者からは側副刺激分子依存性の PDC-E2 反応性 T 細胞が多く同定されることが判明した。これらの結果より、PBC 患者、健常者での PDC-E2 163-176 反応性 T 細胞の性質の差異が明確になったことより、PBC における PDC-E2 163-176 反応性 T 細胞の役割が明らかとなった。

### 3) 自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析に関する研究 (喜多 宏人)

PBC に対する免疫療法を開発することを目的に、PBC 患者末梢血より自己抗原特異的 T 細胞を誘導し、誘導された自己抗原特異的 T 細胞の機能を解析した。また、自己抗原がどのような過程でプロセッシングを受けるのかを解析した。さらに、PBC 患者末梢血の NK T 細胞の頻度を解析した。PBC 患者末梢から CD8 陽性で自己抗原である PDC-E2 抗原を特異的に認識する自己抗原特異的 T 細胞特異的が誘導可能であった。自己抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞は抗原特異的な細胞傷害性活性を示した。自己抗原が自己抗体と免疫複合体を形成し、特異的レセプターを介して樹状細胞に取り込まれる過程には、細胞質内のプロテアソームの作用が必要であることが証明された。PBC 患者末梢血の NK T 細胞は健常人と比較して、頻度が減少していた。

### 4) Th1/Th2 バランス制御法の開発：インバリエント NKT 細胞亜分画による制御 (松下 祥)

Th1/Th2 バランスにおける樹状細胞を介した免疫応答制御に、ヒト V $\cdot$ 24 iNKT 細胞の異なるサブセットがどのように関与しているかを、CD4<sup>+</sup> iNKT、DN iNKT 細胞に分離精製し詳細に解析した。我々のデータは、V $\cdot$ 24 TCR リガンドによって活性化された DN iNKT 細胞サブセットが Mo-DC のアロ MLR 誘導活性を抑制し、なおかつナイーブ CD4<sup>+</sup> T

細胞をTh2分化にシフトさせるDC2を誘導することを示している。したがって、iNKT細胞サブセットのバランスは、末梢におけるTh1/Th2バランスを制御する重要な要因となっている可能性がある。

5) 抗原の経口投与により肝臓で誘導される新規免疫調節性T細胞の同定とその誘導機序・臨床応用に関する研究(若月 芳雄)

肝臓の慢性炎症を成立維持する細胞機序を解明し、将来の難治性自己免疫性肝炎の治療法の開発に向けた基礎的なデータを集積する目的で、抗原の特異性が明瞭なマウスモデルを用いて肝臓の免疫調節機序の一端を明らかにした。今回は主に、経口からの抗原投与により肝臓に新たな免疫調節性CD4T細胞が誘導されることを明らかにし、その誘導機序を検討した。今回の結果を基に、免疫学的機序でおこる肝障害モデルに、免疫寛容を肝臓で誘導することにより、肝障害が阻止できるか検討した。

## 8. 治療法開発のための動物モデルの開発

1) PBC動物モデルの開発とそれを用いた胆道傷害機序の解析・治療法開発に関する研究(松口徹也)

PBC発症の病態に細菌感染の関与が提唱されている。肝内リンパ球のうちNKT細胞は特徴的に高いToll-like receptor(TLR)2の発現を示し、そのリガンドに刺激によって細胞表面FasLの発現が誘導された。またこの肝内NKTにおけるFasLの発現はマウス腹腔細菌感染モデルにおける肝障害の原因として重要なことが明らかとなった。さらに、最近作成した、Cot/Tp12キナーゼのKOマウスはTh1優位な抗原特異的免疫反応を示し、PBC動物モデルとして有望と考えられた。

## 9. 肝硬変に進行した症例に対する治療法の開発

1) 肝細胞移植法の開発(兼松隆之)

進行した原発性胆汁性肝硬変に対し、肝組織の再構築を目指し、肝細胞と肝progenitor cellを移植する治療法について検討した。まず、摘出肝から組織再生に関与するstem cell factorの存在について免疫組織学的に検討した。原発性胆汁性肝硬変と末期肝硬変には明らかな差は認められなかった。一方、末期肝硬変から分離した細胞分画中にprogenitor cellの出現と長期生存を

認めた。

2) 末期肝硬変に対する遺伝子組み換え型ヒトHGFの臨床応用(坪内 博仁)

進行した原発性胆汁性肝硬変に対する肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor; HGF)を用いた肝再生療法の確立を目的として、遺伝子組み換え型ヒトHGFの前臨床試験を行った。Dimethylnitrosamine(DMN)にて誘導した肝硬変ラットに遺伝子組み換え型ヒトHGFを静脈内投与したところ、組織学的に肝線維化が軽減し、肝重量、血清アルブミン値が増加した。肝硬変ラットにおける遺伝子組み換え型ヒトHGF静脈内投与における薬理動態を検討したところ、肝硬変ラットでは血中ヒトHGF濃度が上昇し、血中消失も遷延する傾向がみられた。一方、HGF治療を行った肝硬変ラットでは無治療の肝硬変ラットに比して血中ヒトHGF濃度は低下した。また、遺伝子組み換え型ヒトHGF静脈内投与後の組織分布を検討したところ、最大の標的臓器は肝臓であったが、その他、脾臓、副腎、腎臓にも移行し、遺伝子組み換え型ヒトHGFの投与によって尿中アルブミンが出現した。遺伝子組み換え型ヒトHGFの静脈内投与において、その腎毒性軽減にはHGFの除放化または肝選択的投与を可能とするドラッグデリバリーシステムの開発が必要と考えられた。

3) ヒト造血組織由来幹細胞の多能性、可塑性解析と肝再生の応用に関する研究(石川 文彦)

近年明らかにされつつある、幹細胞の可塑性、多能性について、難治性肝疾患への画期的治療となりうるかについて検討を加える。幹細胞の中でも特に造血組織由来幹細胞は、十分な細胞数を得ることが比較的容易である。われわれは、CD34+CD38-のヒト造血幹細胞分画を用いて、異種となる免疫不全マウス体内で、肝細胞および胆管細胞への分化能力を検討した。その結果、4ヶ月以上の長期に亘って、ヒト造血幹細胞由来肝細胞および胆管細胞がレシピエントマウス肝内に認められた。肝細胞は少なくともアルブミン産生能を有していることがmRNAレベルとタンパクレベルにおいて確認されたため、合成能と言う点で機能的である。

#### D. 考察

PBCの治療法開発の目標は、次の4つが挙げられる。1) 発症を予防する。2) 現在既に発症しているPBCを治癒に導く。1)については、抗ミトコンドリア抗体が陽性であるが、まだ生化学データが異常を示している患者や、肝移植を行った患者でまだ再発が認められていない患者が対象となる。

また、PBCの根治的治療法はない現時点においては、当面つぎの3つが課題となるであろう。1) 病気の進行を止めるあるいは緩徐化し、生命予後の延長、ないしは肝移植までの期間を延長する。2) 病気あるいは合併症による症状を緩和し、患者のQOLを向上する。3) 肝不全に至った肝臓を移植ないしは再生医療によって再生させる。

PBCの治療法開発の問題点は、1) 原因が未解決：原因が解明されていない。そのため、ターゲットを何にするか、不明である。2) PBCの多くは無症候性、無症状である。そのため毒性の強いものは使用できない、健康食品のような副作用がない、あっても少なく、軽いものが望まれる。3) PBCの多くは予後がよい。そのためendpointの設定が困難である：薬効効果判定のendpointとしては生化学値など臨床検査データが最も安易であるが、必ずしも組織像の改善や予後の改善とは相関しない。移植、死亡が望ましいが、経過の長い疾患であるので、長期間の観察が必要となる。4) 患者数の少なさ：臨床試験を行なう上で患者数が極めて少ない疾患であることである。

PBCが自己免疫性疾患と考えられることから免疫抑制療法の有効性が考えられるが、PBCの治療法について文献的考察を行なうに、これまで試みられてきた免疫抑制薬はいずれも非特異的な免疫抑制療法であり、いずれも毒性を上回る有効性はランダム化対照研究によって得られていない。標準的治療法としては、現在、UDCAが用いられている。最近ではUDCAに抵抗性の症例に対してフィブラート系の薬剤が有効とする報告が集積している。しかし、いずれも根治的治療法ではなく、また進行例には有効でない。さらなる効果を期待できる薬剤の開発が望まれる。当面はPBCの症候や合併症、さらには肝硬変・肝不全を改善する治療法の開発も必要であるが、PBCを根治的に治療する、あるいは進展を改善する治療法の開発が急務である。病

理病態の解明によって明らかとなった候補分子を標的とした薬剤、あるいは特異的に免疫反応を抑えることができるような抗原特異的免疫療法の開発が必要である。また同時に、治療を適用する対象者を特定することが必要である。

自己免疫性肝疾患(AILD)の治療戦略を立てる目的で、同じ診断基準のもとで診断され、同期間に国内および海外の消化器医を受診したAILD症例を対象に、消化器医に対して調査票による調査を行い、我が国における罹患率、臨床像、治療法の現状を世界各国の現状と比較したが、罹患率、臨床像は国間で大きく異なっていた。我が国では、他国に比較し、症候性のAILD症例が多くを占めた。各国間における診療レベルの相違、受診する患者層の相違などの社会的な要因が大きいと思われるが、遺伝的背景とともに環境のリスクファクターの違いも反映している可能性が考えられた。

自己免疫性肝疾患の自然経過、治療の介入の効果をみるためには、症例データベースを用いた長期経過の構築が有用である。国立病院政策医療肝疾患ネットワーク施設を中心に国立病院・療養所を対象として構築した原発性胆汁性肝硬変症例のデータベースおよび国立病院肝疾患政策医療ネットワークはPBCあるいはAIHに関する調査研究に有用であると考えられた。

PBCの治療にはUDCAが広く用いられている。しかし、その作用機序はいまだ明らかになつたとは言い難く、胆道系酵素の低下など胆管障害の改善を示唆する明らかな臨床検査成績の改善が得られない場合には、治療により良好な臨床効果が得られているかの判断が困難なのが実情である。しかも、UDCAが有効性を示す作用機序についてはほとんど明らかにされていない。このため有効性を確認し得ないままの漫然とした投薬に陥り易く、EBMの遂行がはなはだしく阻害されている。原発性胆汁性肝硬変の長期予後の改善にはUDCA抵抗性症例を早期に検出し、予後の改善を計ることが最も重要である。

PBCの治療法としてはUDCAが用いられているが、肝機能の正常化は20-30%にみられるに過ぎない。近年、抗高脂血症剤がPBCに有効であることが示されており、フェノフィブラートの追加投与の効果を検討した結果、フェノフィブラートの追加投与によ

り、有意に肝胆道系酵素の低下を認め、AMAの低下も認められた。この結果よりフェノフィブラートはaPBCに対し、今後の有効な治療薬のひとつとして位置づけられると考えられた。

PBC症例は、比較的急速に進行する症例も存在するが、多くの症例は無症候性であり、長期予後もよいことが判明した。これらの症例では、QOLの低下も少ない。しかし、進行した症候性症例はQOLの低下は大きい。AIHに関しては、初期治療におけるPSL投与量やPSL中止、漸減の仕方などの治療方針は予後決定因子として重要である。また、経過を追って肝生検を施行し、肝組織所見改善の程度を十分に把握してPSL投与量などを決定すれば、再燃回数を減らすことが可能であると考えられた。

生体肝移植レシピエントは、まさに難病を背負いながら人生を歩んだ患者である。これらの症例はエンドポイントが明白であるため、経過の検証にも極めて有用である。調査の結果、PBC、AIHとも生体肝移植の移植成績は良好であった。しかし、PBCの再発は組織学的には10%にみられ、特異的な自己抗体である抗糸粒体抗体(AMA)の再陽性率は70%前後であった。今後、画期的治療法の開発のためにも生体肝移植に至った症例の背景観察を詳細に行い、病態解明に繋げる必要がある。

PBCおよびAIHとも全体で見れば比較的予後良好な疾患であり、積極的な治療法の対象は経過不良群である。これらの症例では、QOLの低下も大きい。したがって、これら経過良好群と経過不良群を分けることができる因子、ないしは予後予測因子を見出すことは、患者本人にとっても医療政策的にも重要なことである。

IgAクラス抗M2抗体がPBCの進展予測因子となりうるかを検討した結果、IgAクラス抗M2抗体はPBCの病態に深い関わりがあると推測され、PBCの進展予測因子となりうる可能性が示唆された。さらに症例を増やして、統計的に実証できるよう検討を続けていきたい。

PBCでは、AMAとともに核膜孔蛋白gp210に対する抗体が陽性化することが特徴的である。このgp210に着目し、過去20年間に国立病院長崎医療センターで診療したPBC71症例を用いてgp210に対する免疫応答と

予後との相関についての検討した結果、抗gp210抗体価が、肝不全への進展の独立した予後因子であることが明らかとなった。また、Laser capture microdissection(LCM)とPBC肝生検凍結組織を用いた部位別遺伝子発現の解析から、PBCに特徴的な免疫関連遺伝子が同定され、さらに、ヒト初代培養胆管細胞を用いた研究から、胆管細胞はTLR4、TLR9などの自然免疫に関与する分子を発現し、その刺激を介してさまざまな免疫応答を修飾していることが示唆された。

PBCの進行症例においてPBCの病像進展に関与している因子を、非進行例と進行例に分けて分子病理学的に解析した結果では、PBCの予後予測因子としてpiecemeal necrosisと活動性評価は重要な因子であることが示唆され、進行したPBCではPPAR $\alpha$ の発現は亢進しておりフィブラートが作用しやすい環境が形成されていることが示唆された。今後、研究計画に沿って症例を集積し、PBCの進行症例においてどのような因子がPBCの病像進展に関与しているのか一定の見解を引き出したい。

PBCおよびAIH材料を用いて、DNAチップによる病態診断や治療の選択に寄与する診断法の開発を行なう基盤研究を行った結果、発現遺伝子プロファイルはそれぞれの疾患に固有であり、PBCではAIHの病期の進展に比し、初期および後期において発現している遺伝子が異なっていた。この結果は、発病にかかわる分子機序がそれぞれ固有であり、PBCでは初期の病態が後期と異なることを示しており、これらの分子に対する診断や治療法の開発の重要性を示すものであった。

PBCの病因または病態形成に菌体成分の関与が示唆されている。PBCの胆管病変発生における菌体成分の関与を胆管系自然免疫におけるサイトカインネットワークおよびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ の関与から検討した結果、ヒト胆管細胞におけるToll-like receptor (TLR)2~4およびMD-2の発現、またIFN- $\gamma$  (Th1型)によるTLRの発現亢進と菌体成分に対する感受性亢進がみられ、PBCの胆管炎発生にTLRを介した自然免疫機構とTh1型サイトカインへの偏位への関与が示唆された。PPAR $\gamma$ リガンド刺激にて胆管細胞におけるNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することができ、PPAR $\gamma$ リガンドがPBCの新たな治療薬として期待された。

TLR4はヒト肝細胞にも mRNA および蛋白レベルで発現していることが確認された。また、LPS は肝細胞に対する直接作用も有していることが示唆された。

PBCにおけるWntシグナル伝達系の関与を検討した結果、Wnt2B遺伝子は対照肝と比較し、PBC肝において過剰発現しており、PBCの病態形成にWnt遺伝子が関与している可能性が確認された。

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別は重要である。生体肝移植を施行した症例を対象に、標的臓器である肝臓内のリンパ球解析を行った結果、無症候性症例と比較して、移植例ではCTLA-4及びFasLを発現した活性化CD56陽性NKT細胞が有意に増加していること確認した。PBCの進行にはNKT細胞によるFas-FasL系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害が関与している可能性があり、その制御が新たな治療法となりうるか今後の検討課題である。

PBCの病態形成にはT細胞の関与が大きいと考えられているが、詳細な解析はみられない。検討の結果、PBC患者、健常者でのPDC-E2 163-176反応性T細胞の性質の差異が明確になり、PBCにおけるPDC-E2 163-176反応性T細胞の役割が明らかとなった。

PBCに対する特異的な免疫療法を開発は本研究班におけるメインプロジェクトの一つである。PBCの発症に自己抗原特異的CD8T細胞やNK細胞等の細胞性免疫応答が密接に関連していることが明らかになり、今後これらの細胞とPBCの病態との関連を更に明らかにして行くとともに、自己抗原特異的T細胞やNK細胞を操作することによる治療法の開発に向けて研究を進めてゆく必要がある。

Th1/Th2バランスは臓器特異的な自己免疫疾患の病態や治療を考える上で重要であり、樹状細胞(DC)はTh1/Th2分化に重要な影響を与える細胞の一つである。一方、種々の免疫疾患において、特定のインバリアントNKT(iNKT)サブセットの減少が認められ、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。しかし、ヒトにおいてiNKTサブセットのバランスが、Th1/Th2バランスを支配する詳細な機序については明らかにされていない。本研究では、iNKT細胞サブセットのバランスが、末梢における

Th1/Th2応答バランスを制御する重要な要因となり得ることを明らかにした。

PBCの初期は無症候性で経過も長い。免疫寛容を肝臓で誘導することが可能であれば、抗原特異的で副作用のない治療法を開発することができ、無症候性のPBCにも適応できる。若月は経口からの抗原投与により肝臓に新たな免疫調節性CD4T細胞が誘導されることを明らかにし、その誘導機序を検討した。今回の結果を基に、免疫学的機序でおこる肝障害モデルに、免疫寛容を肝臓で誘導できる可能性が示された。

肝硬変に進行した症例に対しては、初期のPBCに対する考え方と同じには行かない。特異的免疫療法というよりも、既に免疫応答による炎症が終焉し、肝硬変まで進んでいるため、予備力の改善を促す治療法が必要となる。兼松は、進行した原発性胆汁性肝硬変に対し、肝組織の再構築を目指し、肝細胞と肝progenitor cellを移植する治療法について検討した。末期肝硬変から分離した細胞分画中にはprogenitor cellの出現と長期生存を認めた。PBC肝にも同様のことが期待され、外因的なprogenitorあるいは肝細胞の投与がこの環境を改善させる可能性が示唆された。

坪内は、進行したPBC肝に対する肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor; HGF)を用いた肝再生療法の確立を目的として、遺伝子組み換え型ヒトHGFを用いた前臨床試験を行った。その結果、肝線維化が軽減効果や肝重量、血清アルブミン値が増加を観察できた。

石川は、近年明らかにされつつある、造血幹細胞の可塑性、多能性について、難治性肝疾患への画期的治療となりうるかについて検討を加えた結果、ヒト造血幹細胞由来肝細胞および胆管細胞をレシピエントマウス肝内に認め、しかも肝細胞は少なくともアルブミン産生能を有していること証明したことから、将来期待される画期的治療法である。

#### D. 結論

本研究班の今年度の成果として、

1. 既存の薬物としては、UDCA とベザフィブラートに加えてフェノフィブラートも有効である可能性を示す結果が得られた。

2. PBCの予後を規定するマーカーとして、血清マーカーでは血清トランスアミナーゼ値と抗gp210抗体価、病理学所見としてinterface hepatitisとlobulitisで表現される病理学的活動性が重要な因子であることが示唆された。

3. PBC治療の分子ターゲットとしては、分子生物学的検討により、PPAR $\alpha$ 、Wnt遺伝子が示唆された。

4. PBCの免疫制御療法として、PDC-E2 163-176反応性CD4 T細胞や自己抗原特異的CD8 T細胞、NK T細胞、あるいはiNKT細胞を操作することによる治療法の可能性が得られた。

5. 経口からの抗原投与による肝臓における免疫寛容誘導の可能性が示された。

6. 肝硬変に進行した症例に対しては、肝細胞移植療法や肝細胞増殖因子を用いた肝再生療法、幹細胞移植による再生療法の研究の可能性が示された。

当面はPBCの症候や合併症、さらには肝硬変・肝不全を改善する治療法の開発も必要であるが、PBCを根治的に治療する、あるいは進展を改善する治療法の開発が急務である。病理病態の解明によって明らかとなった候補分子を標的とした薬剤、あるいは特異的に免疫反応を抑えることができるような抗原特異的免疫療法の開発が必要とされる。また同時に、治療を適用する対象者を特定することが必要である。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishibashi H., Nakamura M, Shimoda S, Gershwin ME: T cell immunity and primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity Reviews*, 2 (1): 19 - 24, 2003
- 2) Shinji Shimoda, Akiyoshi Nishio, Hiromi Ishibashi and M. Eric Gershwin: Primary Biliary Cirrhosis Bench to Bedside, *The Pathophysiology of the Biliary Epithelia*, edited by Gianfranco Alpini, Domenico Alvaro, Marco Marzioni, Gene LeSage, and Nicholas LaRusso. LANDES BIOSCIENCE, GEORGETOWN, EUREKAH.COM, AUSTIN, 454p, 2003, pp330-348

3) Tanimoto H, Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Matsushita S, Gershwin ME, Harada M. Promiscuous T cells selected by *Escherichia coli*: OGDC-E2 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2003 May;20(3):255-63.

4) Masuda J, Omagari K, Ohba K, Hazama H, Kadokawa Y, Kinoshita H, Hayashida K, Hayashida K, Ishibashi H, Nakanuma Y, Kohno S: Correlation between histopathological findings of the liver and IgA class antibodies to 2-oxo-acid dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003 May;48(5):932-938.

5) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira K, Sakamoto K, Matsushita S, Tanaka A, Worman HJ, Gershwin ME, Harada M: Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, 2003 July; 124(7): 1915-1925. 2003

6) Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano A, Handa M, Baba E, Tsuneyama K, Nakamura M, Ishibashi H, Nakanuma Y, Gershwin ME, Harada M. Distinct costimulation dependent and independent autoreactive T-cell clones in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5): 1379-87

7) Kazufumi Dohmen, Toshihiko Mizuta, Makoto Nakamuta, Naoya Shimohashi, Hiromi Ishibashi, Kyosuke Yamamoto: Fenofibrate for patients with asymptomatic primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10(6):894-898

8) 大黒 学, 石橋大海: 原発性胆汁性肝硬変 (PBC), 原発性硬化性胆管炎 (PSC). 改訂第3版 外来診療のすべて, 高久史磨総監修, メジカルビュー社, 東京, pp442-443, 2003. 4. 10

9) 下田慎治, 上平幸史, 石橋大海: 自己免疫性肝疾患の成因, 自己免疫性肝疾患-EBMに基づく診断と治療-. *Modern Physician* 23(4): 460-462, 2003. 4

10) 中村 稔, 下田慎治, 石橋大海: 特集: 原発性胆汁性肝硬変-最近の話題一、2、原発性胆汁性肝硬変の成因 1) ミトコンドリア抗原と免疫応答. *臨牀消化器内科*, 18(5): 545-551, 2003. 5

11) 石橋大海: エキスパートに学ぶ治療戦略. 難渋する症例をどうするか. 自己免疫性肝



炎. 今月の治療 10 (臨時増刊): S156-S160, 2003. 5  
12) 石橋大海: はじめに. 特集: Molecular mimicry (分子模倣)と疾患. 医学のあゆみ, 206(11):859 - 863, 2003. 9  
13) 下田慎治, 中村 稔, 石橋大海: Molecular mimicry (分子模倣)と疾患 ⑥肝疾患-原発性胆汁性肝硬変と分子擬態. 医学のあゆみ, 206(11):859 - 863, 2003. 9  
14) 石橋大海, 大黒 学: 自己免疫性肝炎の急性発症とⅡ型 AIH. 肝臓 44(9):431-434, 2003. 9

## 2. 学会発表

1. 横山照史, 小森敦正, 瀧井康, 吉田由紀, 中村稔, 上平幸史, 下田慎治, 右田清志, 八橋弘, 石橋大海. ヒト初代培養胆管上皮細胞における Toll-like receptor (TLR) の発現とその機能解析. 第 33 回日本免疫学会総会, 2003. 12. 8-10, 福岡  
2. 吉田由紀, 中村稔, 瀧井康, 下田慎治, 小森敦正, 横山照史, 大黒学, 植木俊仁, 右田清志, 八橋弘, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変における抗 gp210 抗体の産生機序. 第 33 回日本免疫学会総会, 2003. 12. 8-10, 福岡  
3. 瀧井康, 中村稔, 横山照史, 吉田由紀, 小森敦正, 伊東正博, 八橋弘, 原田実根, 石橋大海. Laser Capture Microdissection を用いた原発性胆汁性肝硬変の門脈域サイトカイン遺伝子発現の解析. 第 33 回日本免疫学会総会, 2003. 12. 8-10, 福岡  
4. 上平幸史, 下田慎治, 中村稔, 河野聡, 半田瑞樹, 石橋大海, 林田一洋. 原発性胆汁性肝硬変における CD28 陰性 CD4 陽性 T 細胞の

頻度および同 T 細胞の胆管上皮との相互作用について. 第 39 回 日本肝臓学会総会, 2003. 5. 22-23, 福岡

5. 上平幸史, 下田慎治, 中村稔, 河野聡, 半田瑞樹, 石橋大海, 林田一洋. 原発性胆汁性肝硬変における CD4+CD25+ regulatory T cell の検討. 第 39 回 日本肝臓学会総会, 2003. 5. 22-23, 福岡

6. 下田慎治, 上平幸史, 河野聡, 半田瑞樹, 中村稔, 石橋大海. 原発性胆汁性肝硬変の自己抗原反応性 T 細胞の CD28 分子発現について. 第 39 回 日本肝臓学会総会, 2003. 5. 22-23, 福岡

7. 上平幸史, 下田慎治, 中村稔, 河野聡, 半田瑞樹, 石橋大海, 林田一洋. ヒト肝内胆管上皮細胞 (HIBEC) の T 細胞に対する抑制作用. 第 39 回 日本肝臓学会総会, 2003. 5. 22-23, 福岡

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) 特になし

## II. 分担研究報告

PBC の治療法に関する文献的考察

主任研究者 石橋 大海 国立病院長崎医療センター 臨床研究センター長

**研究要旨：** 画期的治療法開発のいとぐちを掴むことを目的に、これまでに報告された PBC に関する治療法の文献を検索し、その治療法の有効性について検討した。PBC が自己免疫性疾患と考えられることから、免疫抑制療法の有効性が考えられるが、これまで試みられてきた免疫抑制薬はいずれも非特異的な免疫抑制薬であり、いずれも毒性を上回る有効性はランダム化対照研究によって得られていない。ウルソデオキシコール酸（UDCA）は進展を抑えて死亡ないし肝移植までの期間を延長でき、しかも毒性・副作用が少ない“生理的な”薬剤として現在標準的な治療法として用いられている。肝移植後の再発も抑える可能性が示されている。最近では UDCA に抵抗性の症例に対してフィブラート系の薬剤が有効とする報告が集積している。もっとも効果を発揮できるフィブラートの同定とともに、さらなる効果を期待しての薬剤の開発が望まれる。

当面は PBC の症候や合併症、さらには肝硬変・肝不全を改善する治療法の開発も必要であるが、PBC を根治的に治療する、あるいは進展を改善する治療法が開発が急務である。病理病態の解明によって明らかとなった候補分子を標的とした薬剤、あるいは特異的に免疫反応を抑えることができるような抗原特異的免疫療法が開発が必要と思われる。また同時に、治療を適用する対象者を特定することが必要である。

A. 研究目的

PBC の成因が明らかにされていない現在、PBC を治癒に導く根治的治療法はまだ確立していない<sup>1)</sup>。本研究の目的は、これまで文献で報告された PBC の治療法に関する成績を検討することにより、治療を受けるべき対象、施す治療の種類を明らかにし、画期的治療法は開発のいとぐちを掴むことである。

B. 研究方法

PubMed ないしはこれまで出版された専門誌を用いて PBC の治療法に関する文献を 1985 年より 2003 年 12 月に至るまで網羅的に検索した。ここでは、合併症に対する治療は簡潔にとどめ、主に、PBC そのものの治療法について検討した。

C. 研究成績

PBC の治療法開発の目標は、基本的には、1) 発症を予防する。2) 現在既に発症している PBC を治癒に導く、ことである。1) については、抗ミトコンドリア抗体が陽性であるが、まだ生化学データが異常を示していない患者や、肝移植を行った患者でまだ再発が認められていない患者が対象となる。これまでの研究では、1)

病気の進行を止めるあるいは緩徐化し、生命予後の延長、ないしは肝移植までの期間を延長する。2) 病気あるいは合併症による症状を緩和し、患者の QOL を向上する。3) 肝不全に至った肝臓を移植ないしは再生医療によって再生させる、ことで徐々にではあるが成果が挙げられている。

PBC の治療法開発において、短期的な治療効果判定指標は血清生化学データの改善であるが、Endpoint は肝移植までの時期を遅らせる、または死亡率を低下させることである。しかし、PBC は経過が長く、効果判定に長時間を要するために、次善の指標として肝組織の改善が指標とされている。

PBC の予後を改善するために多くの薬剤が試みられてきたが、大きく、1) 免疫抑制薬、2) 抗線維化薬、3) 親水性胆汁酸、フィブラート、に分けることができる。

1. ウルソデオキシコール酸（UDCA）

UDCA は肝細胞保護作用、利胆作用のほか IL-1、IL-2 の産生抑制作用、免疫グロブリン産生抑制作用および MHC クラス I、クラス II の発現抑制作用などの免疫調節作用が認められている

が、これら免疫抑制効果の発現機序として、グルココルチコイド非存在下であっても UDCA によりグルココルチコイド・レセプター (GR) が核内に移行して DNA に結合し、遺伝子転写機構を調節する機序が報告されている<sup>2)</sup>。

PBC に対する UDCA の治療効果は国内外において評価され、現在、PBC の第一選択薬として広く認められている。UDCA は既に FDA に承認されており、我が国においても保険に収載されている。本剤は、1987 年の Poupon ら<sup>3)</sup> の報告を契機に世界各国で試みられるようになり、その後、ランダム化試験にて、長期投与における安全性と肝機能および自覚症状の改善に優れた薬剤であるとともに、長期使用は肝移植までの期間を延長することが明らかにされた<sup>4-11)</sup>。本邦においても 1990 年に厚生省調査研究班によって二重盲検試験が行われ、AST, ALT, ALP, T. Chol, IgM などの改善が証明されている<sup>5)</sup>。しかしながら、生化学検査値の改善は一致した成績であるが、肝組織および生命予後の改善については必ずしも一致していない。最近のメタアナリシスは予後の改善について疑問を投げかけているが、UDCA の有効性を否定するものではない<sup>12)</sup>。最近、UDCA の有効性を支持する報告が出された<sup>13)</sup>。

UDCA の効果がみられない症例として、AIH とのオーバーラップ症候群がみられる<sup>14)</sup>。また、進行期 (Scheuer stage III, IV) に対する本剤の効果は疑問視されており、さらに、PBC 症例の多くでは生化学的な UDCA の効果が期待できるものの、中には抵抗性を示すものが存在する。UDCA が抵抗性を示す症例に対して免疫抑制薬との併用療法も試みられているが、UDCA 単独療法よりもいいとの明らかな成績は得られていない<sup>15)</sup>。

## 2. ベザフィブラート Bezafibrate

高脂血症薬の一つであるベザフィブラート (ベザトール<sup>®</sup>) が胆道系酵素の低下作用を有する新たな PBC 治療薬として注目され<sup>16-18)</sup>、厚生労働省「難治性の肝疾患研究」班においても臨床試験がなされている。

ベザフィブラートの作用機序は、肝細胞毛細胆管側に存在する MDR3-P 糖蛋白の発現の増加をもたらすことによりリン脂質の胆汁中への分泌を促進することであり、胆管に排泄されたリン脂質により疎水性胆汁酸のミセル化が促進し非活化することにより胆管上皮細胞障害が軽減することが推察されている。

MDR3-P 糖蛋白の機能は *mdr2* ノックアウトマウスで解析された。マウス *mdr2* およびヒト MDP3-P 糖蛋白はアミノ酸レベルで 90% 以上の相同性が認められる。*mdr(-/-)* マウスは早期に胆汁うっ滞をきたし胆汁性肝硬変に至る。初期病変は慢性非化膿性破壊性胆管炎の像を呈し、PBC の組織像と類似している。この *mdr(-/-)* マウスに *MDR3* 遺伝子を導入すると、病変が完全に生じなくなる。ヒトにおいては、家族性進行性肝内胆汁うっ滞症の 1 亜型 (タイプ 3) が *MDR3* の変異によるものであることが明らかにされた。*PPAR $\alpha$*  を介して炎症を鎮静化することにより *MDR3*-P 糖蛋白の発現を増加する可能性も推察されている<sup>17)</sup>。

## 3. 免疫抑制薬

免疫抑制薬については、これまで Azathioprine、Ciclosporine、Colchicine、Corticosteroids、D-Penicillamine、Methotrexate について報告されてきた。しかし、これらはすべてケーススタディであり、よくデザインされたランダム化対照試験による試験によって予後を改善することが証明された薬剤はない。逆にこれらの薬剤では、副作用の出現が問題になっている。

Corticosteroids については、自己免疫性肝炎 overlap 症候群などの活動期など、限られた時期の使用は有効性を発揮し、有用であるとの報告がなされている。

### 1) アザチオプリン Azathioprine

6 年間の前向きコントロール・スタディで、いくらかの効果はみられるものの、組織や予後の改善はみられていない<sup>19, 20)</sup>。

### 2) コルヒチン Colchicine

コルヒチンは細胞骨格の微小管の蛋白を脱重合し、コラーゲンの産生抑制による抗線維化作用を有する。臨床化学データは改善することが知られるが、肝組織ステージの改善は証明されていない。また、単独投与は UDCA の効果を超えないと結論されている。しかし、生存率はプラセボ群に比して延長し、副作用は少なく有用であるとの報告<sup>21)</sup> もあり、UDCA 単剤で無効の場合は併用を考慮すべきとされている<sup>22, 23)</sup>。

### 3) サイクロスポリン Ciclosporine

効果は限られており、高血圧症や腎障害などの副作用が前面に出てくる<sup>25)</sup>。

### 4) メソトレキセート Methotrexate

PBC 症例において、低用量 (分割投与で 15mg/週) のメソトレキセート単独、あるいは UDCA、