

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎に対する治療効果の予測因子についての検討

研究協力者 鈴木 義之 虎の門病院 臨床検査部 副部長

研究要旨：自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis：AIH）は免疫抑制療法を行うことで組織学的改善が得られ、治療の第一選択薬になっていることは周知の事実である。しかしながら、長期に亘る免疫抑制剤の使用は糖尿病や骨粗鬆症といった様々な副作用や合併症のriskを高め、患者のQOLも損ねていることは無視できない事である。現在、第一選択としてステロイドが使用されてはいるものの、未だその適正な量を規定する指標が無く、経験と勘に頼った治療が行われている。このような現状を少しでも打破するため、いくつかの宿主の免疫学的パラメーターを測定し、よりAIHに特異的な指標を見つけ、かつ組織学的変化をみることでより有効な治療法を設定することを今年度のテーマとした。組織学的変化や治療反応性をみるためには、単年度での結果のみでは困難でありまだ途上ではあるが、アポトーシスのマーカーであるcytochrome Cが肝障害の程度をよりよく反映し、治療効果の指標となりえる可能性を見出した。そこで、我々は1999年に新しく提唱されたscoring systemによりdefinite AIHと診断された症例を対象とし、retrospectiveではあるがこのマーカーにつき検討した。

A. 研究目的

AIHに対する免疫抑制療法の至適量を設定するためには治療反応性の評価が必要となる。このため、昨年度までに、我々は自己免疫性肝炎として経過観察中であつた症例の肝組織を再度採取し、組織学的変化につき検討を行ってきた。その組織学的変化をもとに、治療反応性により免疫抑制剤の量が適正であつたかどうかを判断し、その量を決定するための血液生化学的検査や肝生検以外のパラメーターを見出すことを目的とした。

B. 研究方法

対象は、2006年12月現在当院外来通院中で経過観察を継続していることを確認しえたAIH症例64例で、いずれも組織学的検索を施行している症例を対象とした。このうち、48例につき複数回の肝生検を行いその組織学的変化を検討しており、改善、不変、悪化の三群に分けて以後の検討対象とした。

また、抗核抗体は間接蛍光抗体法（Hep-2細胞）、抗平滑筋抗体は間接蛍光抗体法、抗LKM1抗体は蛍光抗体法、HBs抗原はRIA法、HCV抗体はEIA（第3世代）、HCV-RNAはRT-PCR法、HLA typingは血清学的方法（判定困難な場合PCR-MPH法）を用いて測定した。また、治療経過中のパラメーターとして、保存血清を用いてTNF- α 、soluble Fas、Fas-ligand、cytochrome Cを測定した。

C. 研究結果

48例の組織学的変化は、改善31例（64.6%）、不変12例（25.0%）、悪化5例（10.4%）であり、免疫抑制療法が奏功している症例では、組織学的に改善が認められた。HLAを検索し得た症例において、治療反応性と組織学的変化の関連をみると、DR 8をもっている症例の治療反応性が最も悪く、DR14を有している

症例は治療反応性、組織学的改善度とも良好であつた。各種免疫学的パラメーターの中では、肝酵素との相関が最も認められたものはcytochrome Cであつた（ $R^2=0.5402$ ）。また、経時的に測定したパラメーターをみてみるとcytochrome Cが免疫抑制療法により30 ng/ml以下に抑えられている症例ではたとえ肝酵素が若干高値でも組織学的には改善がみられ、炎症も消退していた（図）。

図：cytochrome C（CYTC）からみた治療反応性

CYTC	ALT	肝組織改善	肝組織不変	肝組織悪化	計
安定	正常	4	1		5
安定	変動	2	2	1	5
変動	正常		3	1	4
変動	変動		1	2	3

D. 考察

AIHの長期にわたる組織学的変化を検討したが、免疫抑制療法を充分に行っている症例においては、組織学的改善が認められその予後は他の慢性肝疾患に比べ良好であると思われる。HLAの違いにより治療反応性に違いがあるとすれば、今後の免疫抑制療法の漸減法や治療開始のタイミング等につき検討されるべきと考える。

昨年までの我々の検討では、AIHも急性期においてはCTLを介した肝細胞障害が主体であり、障害が進むにつれADCCに主体が移っていく可能性を示した。このことは、急性発症例においては発症期に高 γ -glob.血症や抗核抗体などの免疫応答がまだ揃わないという現象からも推察できる。このような細胞障害の検討に加えてさらにアポトーシスのマーカーの解析（cytochrome C, TNF- α , soluble Fas Ligand）

を行ったことで、より病態を把握するための材料がそろったと考える。これらのマーカーの中では、cytochrome CがALTと最もよく相関しており肝内の炎症を反映している可能性が示された。さらに個々の症例をみても病勢をよく表しており新たな指標としての条件を満たしているものと考えられた。

3. その他 なし

E. 結 論

今回の我々の検討では、免疫抑制療法の奏功している症例では組織学的変化も良好であり、cytochrome Cがその指標となる可能性が示された。今後はさらに症例数を増やすこと、組織学的変化、治療の反応性とcytochrome Cとの関わりにつきprospectiveな研究を行なっていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 鈴木義之：自己免疫性肝疾患. year note 2006. 193-204, 2006.
- 2) Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, et al : Clinical and pathological characteristics of the autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis overlap syndrome. J Gastroenterol and Hepatology 19 : 699-706, 2004.
- 3) Suzuki Y, Kobayashi M, Hosaka T, et al : Peripheral CD8+/CD25+ lymphocytes may be implicated in hepatocellular injuries in patients with acute-onset autoimmune hepatitis. J Gastroenterol 39 : 649-653, 2004.
- 4) 鈴木義之：自己免疫性肝疾患の経過中overlap症候群へと変化した症例の検討. 医学と薬学 53 : 728-735, 2005.

2. 学会発表

- 1) 鈴木義之, 熊田博光：自己免疫性肝炎（AIH）の病態とHLA-DR抗原についての解析. 第5回日本消化器免疫学会総会, 1998.
- 2) 鈴木義之, 熊田博光：わが国における自己免疫性肝炎の予後. 一長期観察例における自己免疫性肝炎の病態と予後. 第2回日本肝臓学会大会, 1998.
- 3) 鈴木義之, 熊田博光：自己免疫性肝炎の今後の展開—自己免疫性肝炎の長期予後. 第86回日本消化器病学会総会, 2000.
- 4) 鈴木義之, 熊田博光：本邦における難治性肝疾患の実態と変遷—自己免疫性肝炎の変遷と最近の動向. 第88回日本消化器病学会総会, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

小児自己免疫性肝炎の全国調査

分担研究者 松井 陽 筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻 小児科学 教授

研究要旨：本研究では、小児自己免疫性肝炎の実態を明らかにするために、5年前から小児科医を対象に全国調査により新規症例の集積を試みてきた。3年間に12例のAIHまたはAIH/PSC overlapの新規発症があった。回答率から約10例/年の新規例があると推定された。今年度は2001年発症例に再度調査票を送付し5年後予後調査を行った。回収はまだ2症例のみであり、来年度以降も継続する必要がある。今まで明らかにされていなかった本邦小児の自己免疫性肝疾患の急性期を過ぎた時期の状態の評価を行い、再燃の頻度や望ましい維持治療法について検討していきたい。

共同研究者

鹿毛 政義 久留米大学医学部病理学教室 教授
須磨崎 亮 筑波大学アドミッションセンター 教授
工藤豊一郎 筑波大学臨床医学系小児科 講師
長谷川 誠 茨城西南医療センター病院小児科

A. 研究目的

これまで、本研究班で行ってきた小児自己免疫性肝炎（AIH）の全国調査を継続するとともに、本邦小児AIHの経過について明らかにすることを目的として、5年前に新規診断された症例のその後の経過について調査を行った。

B. 研究方法

1. 全国調査1次調査

新規に診断された18歳以下の自己免疫性肝炎の症例について、全国の大学病院小児科、小児病院内科および300床以上の総合病院小児科を対象としてアンケート調査を実施した。その年に新規に診断されたAIH、または自己免疫性肝疾患が疑われるが確定診断に至らないvariant例の数と肝生検の有無、2次調査への協力の是非を尋ねた。

2. 全国調査2次調査

1次調査で症例があり、2次調査への協力に同意を得た施設を対象に、診断時の症状、国際診断基準スコアの項目、画像所見（MRCPなど）、肝組織所見、診断後の治療と効果、合併症、寛解と再燃、さらに現在のALT、肝硬変・肝不全徴候、治療状況、最終診断、転帰（約1年後）などについて質問した。

3. 5年後予後調査

2次調査へ協力していただいた施設を対象に、診断から5年後の最終診断、転帰、現在の状態、合併症、治療内容、胆管病変の評価のための画像検査、追跡肝生検の有無などについて質問した。

（倫理面への配慮）

全国の症例を集積する段階で、個人を特定できるような情報ははじめから含まれないようにし、本研究の中で対象患者が診療において不利益を蒙ることのないように配慮した。

C. 研究結果

1次調査の回答率は3年間で67%であった。3年間で、AIHと各施設で診断した症例数が33例、自己免疫性肝疾患が疑われるが診断未確定の症例数が23例であった。2次調査の回答率は37%（計24例）であった。

このうち、当方でrevised AIH scoreを計算し改めて診断したところ、probable AIH以上が3年間で12例であった。

今回、5年後調査として5症例に調査票を送付したが、返答は3例で、うち1例は転院のため詳細不明という回答であった。1例は、発症時3歳のdefinite AIHの女児で、完全寛解し再燃はなかった。治療ははじめにステロイドパルスを行ったが、後はPSL・ウルソのみであった。経過中に潰瘍性大腸炎を合併した。診断時の肝組織はPSC様であったが、追跡肝生検はされておらず、MRCPやERCPも未施行であった。もう1例は、発症時7歳のAIH+PSCの女児で、ステロイドパルス後も部分寛解までであったが、再燃し再びステロイドパルスを行い完全寛解していた。PSL 5 mg/日、アザチオプリン75mg/日を継続中で、成長障害の合併がみられた。病理学的には診断時から肝硬変像であったが、肝硬変を示唆する症状や検査所見は今のところない。

D. 考察

昨年度までの調査結果から、小児例の特徴として、①厚生省診断基準のIgG値を満たさない例が多い。②IgGは年齢別基準値の上限との比を用い、revised AIH scoreで診断するのがよい。③病理像の特徴として、多核肝細胞が約半数でみられた。④AIH/PSC overlapとの鑑別が必要であり、MRCPやERCPが経過観察において必要である。ということが挙げられた。

E. 結論

まだ集積した症例数が少ないものの、重症難治例が多い印象を受けていたが、今回の5年後調査では予後不良の症例はなかった。今後も調査を継続する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎疾患関連遺伝子のゲノムワイド解析

研究協力者 清澤 研道 信州大学医学部 内科学第二 教授

研究要旨：AIHの疾患感受性遺伝子をマイクロサテライト解析にて、第6染色体短腕のHLA領域を網羅的に解析し、HLA-DR, -DQ領域にのみ、その存在が認められ報告した。今回は、マイクロサテライト解析を用いた全染色体領域の遺伝子多型解析を検討した。遺伝子多型の網羅的解析として、全染色体領域にわたる400のマイクロサテライトマーカーを用いた検索を行った。Pc<0.1の有意差をもって、疾患感受性を示すマーカーが7ヶ所、疾患抵抗性を示すマーカーが17ヶ所同定された。AIHの疾患に関連する遺伝子は多数存在する可能性があり、多因子遺伝疾患であることが強く示唆された。現在、そのマーカーの近傍の遺伝子をNCBI Map Viewer, NIHにて検索し、いくつかの候補遺伝子を同定し、それぞれについて解析中である。今後、遺伝子多型と、その産物である発現蛋白との関連を調べ、AIH発症の原因や臨床像との関連を検討する。

共同研究者

吉澤 要 信州大学医学部消化器内科 講師

A. 研究目的

AIHの疾患感受性遺伝子をマイクロサテライト解析にて、第6染色体短腕のHLA領域を網羅的に解析し、HLA-DR, -DQ領域にのみ、その存在が認められることを報告した（J Hepatol 2005）。

今回は、マイクロサテライト解析を用いた全染色体領域の遺伝子多型解析を行い、AIH疾患関連遺伝子を検索する。

B. 研究方法

1. 遺伝子多型の網羅的解析

AIH患者81名（男性15人、女性66人、平均55.9歳）、健常人80人のDNAを抽出し、全染色体を平均10.8cMでカバーする400個のマイクロサテライトマーカー（ABI PRISM Linkage Mapping Set Version 2.5 MD10）を用い、全染色体領域における疾患関連遺伝子の解析を行った。

また、AIH患者と健常人でallele頻度に有意差のあったマーカーにおいて、①HLA-DR 4 (+)(n=61)、DR 4 (-)(n=20)でのマーカーの陽性率、②経過観察が可能であったAIH患者67人において重症例（T.Bil 5mg/dl以上もしくはPT 40%以下）（n=33）と軽-中等症例（前記以外）（n=34）でのマーカーの陽性率を比較し、AIHの遺伝的差異と病態との関連性を検討した。

C. 研究結果

遺伝子多型の網羅的解析

9つのマーカー（D2S367, D6S309, D9S273, D11S902, D11S1320, D16S423, D17S938, D18S464, D18S68）において、特定のalleleの頻度が健常人よりもAIH患者において有意に高率であった。特に11番染色体上（11p15.1）のD11S902（allele No.156）、18番

染色体上（18p11.22）のD18S464（allele No.304）はAIH患者において高率に陽性であった（D11S902：28.4%vs7.5%、Pc=0.013、D18S464：25.9%vs6.0%、Pc=0.008）。加えて17個の疾患抵抗性マーカーも認められた。また、①DR 4 (+)、DR 4 (-)症例での感受性、抵抗性マーカーの陽性率を比較したところ、D11S902がDR 4 (-)症例よりもDR 4 (+)症例で高率に陽性であった。②AIH患者67人における重症例と軽-中等症例での感受性、抵抗性マーカーの陽性率の比較においては有意差は見られなかった。

D. 考察

マイクロサテライト解析を用いて全染色体領域の解析を行い、9個の感受性マーカーと17個の抵抗性マーカーを認め、AIHの疾患感受性に影響を与える遺伝子は多数存在することが示唆された。現在、そのマーカーの近傍の遺伝子をNCBI Map Viewer, NIHにて検索し、いくつかの候補遺伝子を同定し、それぞれについて解析中である。しかしながら、マーカーの個数が少なく、マイクロサテライトはDNA 100kbp上に1個程度存在することから、今後はより多数のマーカーを用いて解析を行うことが必要である。また、AIHと相関を示したマイクロサテライトマーカーの近傍において、疾患発現、重症度、治療効果等に関連のある遺伝子の検索を進めることが重要と考えられた。

E. 結論

AIHの疾患に関連する遺伝子は多数存在する可能性があり、多因子遺伝疾患であることが強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokosawa S, Yoshizawa K, Ota M, et al :

A genomewide DNA microsatellite association study of Japanese patients with autoimmune hepatitis type 1. *Hepatology* 45 : 384-390, 2007.

2) Umemura T, Ota M, Yoshizawa K, et al : Lack of association between FCRL3 and Fc γ RII polymorphisms in Japanese type 1 autoimmune hepatitis. *Clin Immunol* 122 : 338-342, 2007.

2. 学会発表

1) 吉澤要, 一條哲也, 小松通治, 他 : 自己免疫性肝炎におけるサイトカインの動向と病態. 第42回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.

2) 吉澤要, 一條哲也, 清澤研道 : 難治性自己免疫性肝炎の病態と治療. 第10回日本肝臓学会大会, パネルディスカッション, 札幌, 2006.

3) 吉澤要, 梅村武司, 清澤研道 : 原発性胆汁性肝硬変に対する生体肝移植後のde novo自己免疫性肝炎. 第10回日本肝臓学会大会, ワークショップ, 札幌, 2006.

4) 横澤秀一, 吉澤要, 他 : 自己免疫性肝炎におけるゲノムワイド遺伝子多型解析. 第48回日本消化器病学会大会, 札幌, 2006.

5) Yoshizawa K, et al : A genome-wide DNA microsatellite association study of autoimmune hepatitis type 1 in Japanese. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, Boston, 2006.

6) 吉澤要, 一條哲也, 清澤研道 : ゲノムワイドマイクロサテライト解析を用いた自己免疫性肝炎の疾患感受性と遺伝子多型. 第36回日本肝臓学会東部会, シンポジウム, 東京, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅲ－２．原発性胆汁性肝硬変分科会

12. 原発性胆汁性肝硬変全国調査（第27報）	39
関西医科大学 内科学第三講座 講師 廣原 淳子	
13. 沖縄県における無症候性PBCの疫学調査	42
琉球大学医学部 非常勤講師 佐久川 廣	
14. 胆汁うっ滞性肝疾患の新規バイオマーカーの探索	45
東北大学病院 消化器内科 講師 上野 義之	
15. PBCの分子疫学	47
高知大学医学部 消化器内科学 教授 大西 三朗	
16. トランスポーターに作用する新規胆汁うっ滞治療薬の探索	49
東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学 教授 杉山 雄一	
17. PBC患者における肝内MRP4の発現	51
福岡大学医学部 第三内科 教授 向坂彰太郎	
18. 原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態進展に伴う遺伝子発現変化と予後予測遺伝子の検討	53
金沢大学大学院医学系研究科 恒常性制御学 教授 金子 周一	
19. 原発性胆汁性肝硬変におけるToll-like receptorの病態への関与	55
福島県立医科大学 内科学第二講座 助教授 大平 弘正	
20. 原発性胆汁性肝硬変に関わる自然免疫異常の研究	57
帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科 非常勤講師 宮川 浩	
21. PBCの胆管病変形成における自然免疫の関与	58
金沢大学大学院医学系研究科 形態機能病理学 教授 中沼 安二	
22. PBCの病態形成における細胞傷害性T細胞の研究	60
高知大学医学部 免疫学 教授 宇高 恵子	
23. 自己免疫性肝疾患類似GVHR肝病態変化に対する制御性T細胞の関与－免疫組織化学解析－	61
東京医科大学霞ヶ浦病院 消化器内科 教授 松崎 靖司	
24. 原発性胆汁性肝硬変の胆管障害機序に関する研究	63
国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター センター長 石橋 大海	
25. PBC患者由来の自己抗原反応性T細胞の解析	65
九州大学大学院医学系研究院臨床医学部門 病態修復内科学 助手 下田 慎治	
26. 自己免疫性肝炎における抗ミトコンドリア抗体出現の意義	67
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 助教授 大曲 勝久	

27. 門脈圧亢進症とPBCの病態	69
愛媛大学大学院医学系研究科 先端病態制御内科学 教授 恩地 森一	
28. ベザフィブレードの胆汁分泌に対する影響の検討	71
国立病院機構九州医療センター 消化器科 医長 中牟田 誠	
29. 硬化性胆管炎の実態	74
東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授 小俣 政男	
30. 小児期の原発性硬化性胆管炎の特徴	76
国際医療福祉大学附属熱海病院 小児科 教授 藤澤 知雄	
31. 原発性硬化性胆管炎の全国調査	78
帝京大学医学部 内科 教授 滝川 一	
32. 原発性硬化性胆管炎に合併する腸管病変に関する検討	80
香川大学医学部 消化器・神経内科 教授 栗山 茂樹	

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変全国調査（第27報）

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学 内科学第三講座 講師

研究要旨：本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査の長期追跡症例の検討により、本邦におけるPBCの実態と予後の変遷を明らかにすることにある。合併する自己免疫性疾患によってPBCの臨床的病像および予後に大きく異なる点はなかった。HCCの合併例では、診断時男性、高齢、血清アルブミン低値、総コレステロール低値、組織学的進展例、症候性PBCであることが有意に認められた。またHCC合併例は非合併例に比して明らかに予後不良であり、その生命予後に寄与する因子は診断時の年齢と血清アルブミン値であった。

共同研究者

仲野 俊成 関西医科大学 大学情報センター医療情報部
關 壽人 関西医科大学 内科学第三講座
岡崎 和一 関西医科大学 内科学第三講座

A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis, PBC）の全国調査は1980年より実施され、その集計・解析を継続して行なってきた。今回は、合併症についてとくに自己免疫性疾患合併例、また近年報告例の増加している肝細胞癌（HCC）合併例における臨床像と予後について解析した。

B. 研究方法

第12回PBC全国調査までの登録症例数は5742例に及ぶ（表1）。合併する自己免疫性疾患の検討では合併症に関する情報の充足する1990年以降に登録された4,329例を対象とした。またHCCに関する検討では1980～2003年の登録症例のうち診断時あるいは経過観察の時点でHCC合併に関する情報が確認されている3,644例を対象とした。なお、B型・C型肝炎ウイルス感染例は対象から除外した。予後解析の検討では、生存率はKaplan-Meier法により解析し、多変量解析にはSAS JMP Ver.5を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

表1：PBC全国調査

	新規登録例数	総調査例数
第1回調査（1980）	166	166
第2回調査（1982）	95	126
第3回調査（1984）	165	238
第4回調査（1987）	420	572
第5回調査（1989）	569	693
第6回調査（1990）	295	987
第7回調査（1992）	487	1,310
第8回調査（1994）	711	2,060
第9回調査（1996）	765	2,526
第10回調査（1998）	707	2,666
第11回調査（2001）	769	2,539
第12回調査（2003）	630	3,127
		5,742

（個人情報管理）

「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省告示第2号、平成14年6月17日付け）告示以降の本研究にあたっては同告示を遵守し、「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（厚生労働省、平成16年12月24日付け）に則り、研究グループ外に個人情報管理者を設置することを含めた厳格な個人情報管理システムを構築し、研究対象とした登録症例の個人情報漏洩等について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

1. 合併症の概要

1990年～2003年の新規登録症例4,329例のうち記載のあった合併症で最も多いのは自己免疫性疾患866例（20.0%）であり、その他消化器疾患166例（3.8%）、循環器疾患107例（2.5%）、代謝疾患87例（2.0%）、呼吸器疾患40例（0.9%）、血液疾患36例（0.8%）、腎尿路系疾患27例（0.6%）、婦人科疾患11例（0.3%）、その他不明113例（2.6%）である。

2. 合併する自己免疫性疾患に関する検討

1) 自己免疫性疾患の内訳とその頻度（表2）：既報の如く、シェーグレン症候群、慢性甲状腺炎、関節リウマチの合併が多く、この傾向は1990年以前の登録症例と比較しても変わりはない。その病態に免疫機序が関与すると考えられる種々の疾患の報告があった。なお、重複例は1疾病81.9%、2疾病14.9%、3疾病3%、4疾病0.3%であった。

2) 主な自己免疫性疾患合併例における臨床的病像と予後（表3）：主な合併症であるシェーグレン症候群、慢性甲状腺炎、関節リウマチについて合併例群と自己免疫性疾患非合併例群間で診断時臨床データと予後につき比較検討した。合併例群では女性、高齢、血清アルブミン低値、総コレステロール低値であることが有意な傾向を示したが、生存率では各疾患とも群間に有意差は認められなかった。

表 2 : 合併する自己免疫性疾患の内訳

〈n = 4329 : 1990年～2003年新規登録症例〉

・シェーグレン症候群	482 (11.1%)
・慢性甲状腺炎	276 (6.4%)
・関節リウマチ	149 (3.4%)
・レイノー現象	117
・全身性硬化症	96
・CREST症候群	31
・皮膚筋炎	12
・MCTD	10
・潰瘍性大腸炎	9
・SLE	6
・多発性硬化症	6
・ITP	5
・サルコイドーシス	5
・重症筋無力症	4
・抗リン脂質抗体症候群	4
・大動脈炎症候群	4
・AIHA	2
・PN	1
・ベーチェット病	1
・その他	17

表 3 : 主な自己免疫性疾患合併症例における臨床所見と予後

	非合併	SJS	Has	RA
Sex F (%)	86.5	95.9*	92.0*	96.5*
Age*	54.9	56.8*	56.6*	56.5
T-Bil* (mg/dℓ)	1.11	1.10	0.92	0.96
Alb* (g/dℓ)	4.05	3.94*	3.98	3.83*
T-cho* (mg/dℓ)	218.3	210.1*	211.8	198.7*
His I + II (%)	82.7	79.6	80.8	82.0
病期 a(%)	75.2	72.9	76.9	75.3
生存率 10年	89.0	91.9	95.6	96.5

*p<0.05
CTRL : 自己免疫性疾患非合併例 (n=2262)
SJS : シェーグレン症候群 (n= 435)
Has : 慢性甲状腺炎 (n= 251)
RA : 関節リウマチ (n= 142)

3. HCC合併例の検討

- 1) 診断時におけるHCC合併例44例と追跡調査により経過観察中にHCCの発症を確認した33例、計77例の報告があった。そのうちデータ不十分例および肝炎ウイルス感染例を除外した60例(診断時32例, 経過中発症28例, 平均観察期間72.5ヶ月)を解析対象とした。
- 2) HCC合併群と非合併群における診断時臨床像の比較(表4): HCC合併例は非合併例に比較して男性に多く, 高齢で, 血清アルブミン低値, 総コレステロール低値であり, 組織学的進展例, 症候性に有意に多かった。

表 4 : HCC合併群と非合併群における臨床所見

	HCC (+)	HCC (-)	P
症例数	60	3584	
Sex (M:F)	15:45	455:3129	0.0048
Age (Mean±SD)	62.5±11.3	54.8±11.1	<0.0001
T-Bil (Mean±SD)	1.65±1.85	1.21±2.21	0.1398
Alb (Mean±SD)	3.51±0.63	4.05±0.52	<0.0001
T-cho (Mean±SD)	187.8±61.8	223.9±86.9	<0.0001
組織学的病期 (Scheuer I/II/III/IV)	5/15/8/13	1377/890/394/120	<0.0001
Use of UDCA (%)	80.0	82.7	0.3367
臨床病期 (a:s)	15/45	2625/959	<0.0001

3) HCC合併群と非合併群における予後と死因(表5): HCC合併群では癌死が最も多い死因であり非合併群では肝不全・消化管出血が主たる死因となっている。

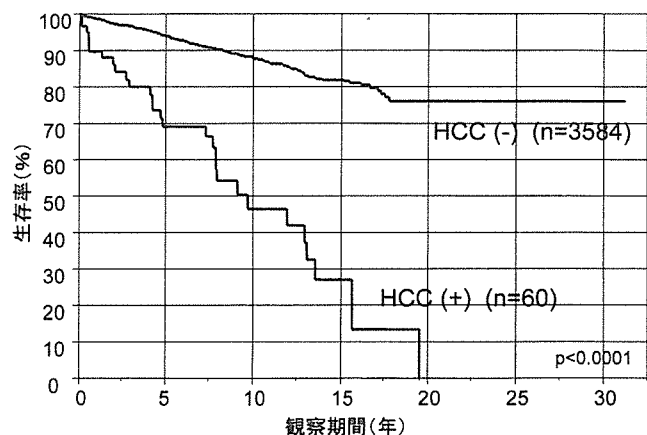
表 5 : 予後

(n=3078例不明を除く)

	HCC (+) N=55	HCC (-) N=3078
生存	19	2641
死亡	36	359
肝不全	10	233
消化管出血	3	39
肝不全+消化管出血	0	5
癌死	16	—
その他	7	82
肝移植	0	23

4) HCC合併群と非合併群の生存率の比較: HCC合併群60例と非合併群3,584例について各々の5年生存率は69.2%, 94.1%, 10年生存率は46.6%, 88.0%であり, 各群相互間にp<0.0001以下で有意差が認められた(図1)。

図 1 : HCC合併群と非合併群における生存率比較



- 5) HCC合併群における予後規定因子の検討：
HCC合併群の生命予後に影響を及ぼす因子についてCox比例ハザードモデルを用い多変量解析したところ、診断時年齢、血清アルブミン値が有意因子として選択された(表6)。

表6：HCC合併群の予後に影響する因子の解析
—比例ハザードモデル—

	OR	SE	(95%CI)	X ²	p value
Age	0.1521	0.0414	0.0787-0.2432	19.34	0.0000
Alb(g/dl)	-1.8610	0.6226	-3.2217-0.7291	10.86	0.0010
Histology(2-1)	0.8428	1.3323	-1.4834-4.0903		
Histology(3-2)	1.8927	0.7690	0.4218-3.5290	7.80	0.0503
Histology(4-3)	-1.5190	0.9094	-3.4017-0.2244		
Clinical stage	-0.3957	0.3502	-1.1323-0.2638	1.3493	0.2454

D. 考 察

自己免疫性疾患の合併はPBCの病態に自己免疫機序が関与する傍証とされている。PBCと他自己免疫疾患の合併頻度に関する報告は16～63%と様々であり、35～41%の頻度で複数の疾患を有することが報告されている。今回、主たる合併自己免疫性疾患であるシェーグレン症候群、慢性甲状腺炎、関節リウマチにおける予後について検討したが、合併例群と非合併例群間に有意差は認められなかった。PBCの予後は肝病変の重症度に関連しており合併する自己免疫疾患が生命予後に影響を及ぼすことは稀であると考えられる。しかし合併症によってはQOLの低下を招く場合があり本症の経過中も十分な全身的観察が必要である。

PBCにおけるHCCの合併は比較的稀とされてきたが、患者の長期生存例の増加に伴って肝細胞癌合併例の報告が近年集積されつつある。そこで今回は、PBC診断時および経過中に肝細胞癌を合併した症例における臨床像および予後について非合併例と比較検討した。合併例は男性、高齢、血清アルブミン低値、総コレステロール低値、組織学的および臨床病期の進展した症例に有意に多く、ウイルス性肝炎からの発癌と同様病期の進展とともに発癌の危険性が高まることが推定される。HCC合併例は明らかに予後不良であり、肝炎ウイルスマーカー陰性のPBCであっても病期進展例ではHCCの発生に留意した定期的スクリーニング検査が必要であろう。

E. 結 論

PBCの合併症とくに自己免疫性疾患およびHCC合併例における臨床像と予後について検討した。合併する自己免疫性疾患によってPBCの臨床的病像および予後に大きく異なる点はなかった。HCCの合併例は男性、高齢、血清アルブミン低値、総コレステロール低値、組織学的進展例、症候性PBCに多い傾向が認められた。またHCC合併例は非合併例に比して明らかに予後不良であり、その生命予後に寄与する因子は診断時年齢と血清アルブミン値であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 廣原淳子, 仲野俊成, 大西三朗: 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の全国調査からみた他臓器疾患との関連. 第10回日本肝臓学会大会, ワークショップ, 札幌, 2006.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

沖縄県における無症候性PBCの疫学調査

研究協力者 佐久川 廣 琉球大学医学部 非常勤講師

研究要旨：大部分のPBC症例が40歳以上の女性であることより、これらの群に対象を絞ってPBCの有病率を求めた。人間ドックを受診した女性で γ -GTP >68 IU/ ℓ の者に対して、2次検診受診を勧奨し、200名が受診した。200名中、AMA陽性が11名であった。AMA陽性者の中で7名はPBCと診断され、またAMA陰性者の中の3例が肝生検でPBCと診断された。これらの結果より、40歳以上の女性の0.35%がPBCで、全体の有病率は、865(95%CI, 321~1409)/100万人と推定された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の約70%は無症候性である。PBCの疫学調査はこれまでCase-finding studyやAMA screeningで行われていたが、前者では無症候性の症例を見逃しやすく、有病率は低く見積もられ、後者では逆に有病率が実態より高くなる傾向があった。そこで、より実態に近い有病率を推定するためにPBC患者の特徴である中年以降の女性で、胆道系酵素の上昇を伴う点に注目し、対象を絞った疫学調査を実施した。

B. 研究方法

人間ドック受診者の中で、女性で、 γ -GTPが高値を示す全症例に対して、2次検診受診を勧奨し、 γ -GTP上昇の原因について調査した。

2次検診の内容は、○問診（肝疾患の既往歴、飲酒歴、薬剤服用歴、家族歴、輸血歴等）。○血液検査（GOT, GPT, ALP, γ -GTP, ZTT, ANA, AMA, IgG, IgM等）、○腹部超音波検査である。2次精査受診者の中で、①AMA ≥ 20 倍、②IgM >270 mg/dl、③ γ -GTPが100IU/ ℓ 以上の上昇が持続する、④超音波検査で慢性肝疾患を示唆する所見がある。これらの①~④の内いずれか1つ以上を満たす症例に対して、肝生検を勧めた。

PBCの診断は、1) AMAが蛍光抗体法で40倍以上、2) 慢性の胆道系酵素の上昇、3) 組織所見がPBCにDiagnosticあるいはProbableの3項目の2つ以上を満たす場合とした。

C. 研究結果

γ -GTP上昇を示す200名の女性が2次検診を受診した。そのうち、AMA陽性：11例、IgM >270 mg/dl：15例で①、②のいずれか一つ以上を満たす症例が21例であった（5例はAMA ≥ 20 倍且つIgM >270 mg/dlであった）。これら21例を表に示す（表1）。21例中13名に対して肝生検を施行した。PBCと診断したのは10例（9例に対して肝生検を施行）で、そのうち2例はAMA陰性であったが、組織像よりPBCと診断した。2次検査の結果③、④のいずれかを満たしたのは43例で、うち17例に肝生検を施行した。これらの症

例の中で、1例（症例7）は組織学的にPBCにDiagnosticで、PBCと診断した。その他、サルコイドーシス1例、脂肪肝1例、残りの14例は組織学的に軽度の変化で、 γ -GTP上昇の原因不明であった（表2）。原因不明とした中で、症例13はEIA法によるAMA（AMA-M2）が陽性で、経過観察中 γ -GTPは常に100IU/ ℓ を示し、蛍光抗体法によるAMAも肝生検から4年後に20倍と弱陽性となっており、PBCが強く疑われる症例であった。

2次検診を受診した200例の臨床診断は、PBC：10例、PBC疑い：2例、脂肪肝：46例、原因不明：96例、一過性肝障害：32例で、それ以外に薬剤性、アルコール性、甲状腺機能障害等が少数含まれた（表3）。

D. 考察

今回の調査で、 γ -GTP上昇を示した人間ドック受診女性のうち5%がPBCと診断された。この結果より沖縄県における無症候性のPBCの有病率を求めてみた。まず、平成17年度の1年間に人間ドックを受診した40歳以上の女性3,840名のうち γ -GTP >68 IU/ ℓ の者が248名（6.5%）であった。また、今回調査した200名の γ -GTP異常者のうち、40歳以上が184例であり、PBCと診断された10例は全て40歳以上であった。したがって、40歳以上の γ -GTP >68 IU/ ℓ を示す女性の5.4%がPBCということになり、これは40歳以上の女性全体の0.35%（95%CI, 0.13~0.57%）になる。40歳以上の女性は沖縄県の人口の22%を占め、PBCの89%は40歳以上の女性（我々の施設で肝生検にて診断されたPBC72例のうち64例（89%）が40歳以上の女性であった）であることより、沖縄県のPBCの有病率は、865(95%CI: 321~1409)/100万人と推定された。2005年時点での沖縄県の人口が約136万人であることより沖縄県のPBCの概数は1,176人と推定された。一方、2005時点で、沖縄県のPBCの特定疾患医療受給者は179名であり、症候性の症例はPBC全体の1/3であることを考慮すると少なく見積もっても540人くらいの患者が存在すると考えられる。実際我々の施設や関連施設で診断されているPBCは300名以上おり、沖縄県全体で1,000例前後の症例が存在する可能性は十分ある。

本調査にはいくつかの問題点がある。すなわち、(1) γ -GPT >68 IU/ ℓ のスクリーニングは適切か、(2) 2次検診受診者は γ -GPT異常を示す女性を代表していたか、(3) 主にAMA陽性あるいはIgM >270 mg/dlを示す女性を肝生検の対象にしたが、それ以外の女性にPBCがどの程度存在するか、等である。

本調査の前に行った臨床例での検討では、肝生検で診断されたPBC72例中70例(97%)が γ -GPT >68 IU/ ℓ であった。72例のうちALPの異常者は61例(85%)で、スクリーニングとしては γ -GPTが優れていることは明らかである。しかしながら、無症候性のPBCの中には、 γ -GPTが68IU/ ℓ 以下の女性も相当数存在するものと思われる。また、今回200例の γ -GPT異常を示す女性が2次検診を受診したが、 γ -GPTの値を2次検診受診者とそうでない者とで比較すると、2次検診受診者の γ -GPTが高い傾向にあった。したがって、PBCの有病率を高く見積もっている可能性がある。さらに、(3)の問題点について検討すると、臨床例72例中71例(99%)がAMA陽性あるいはIgM >270 mg/dlであったが、今回の調査でAMA陰性且つIgM正常群の中にPBCが1例、PBC疑いが1例含まれた。しかしながら、 γ -GPT異常を示す女性全てを肝生検の対象にするのは非現実的であり、ほとんどのPBC症例がAMA陽性あるいはIgM >270 mg/dlの群に含まれることを考えると精密検査の対象はこれらの群に絞るべきと思われた。

無症候性のPBCの有病率を正確に求めることは困難であるが、今回のように対象を絞って段階的にスクリーニングすることで、より実態に近い有病率を求めることが可能かと思われる。

E. 結 論

γ -GTPが高値を示す、40歳以上の女性の中には相当数の無症候性のPBCが存在すると思われる、これらの症例に対して、PBCを念頭において診療することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, et al : Epidemiology of primary biliary cirrhosis among women with elevated γ -glutamyl transpeptidase levels in Okinawa, Japan. Hepatol Res 26 : 330-336, 2003.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願, 登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 : AMA陽性 and/or IgM >270 mg/dl (n=21)

症例	年齢	GPT	GOT	ALP	ANA	AMA	IgM	病理	診断
1	66	41	177	272	—	320	971	Diagnostic	PBC
2	63	52	87	484	40	320	418	Diagnostic	PBC
3	41	61	213	551	—	320	651	ND	PBC
4	45	95	128	245	160	80	498	Compatible	PBC
5	54	65	152	327	—	80	227	NSC	PBC
6	48	49	154	473	—	80	253	Compatible	PBC
7	49	69	118	425	—	40	156	Diagnostic	PBC
8	53	44	102	386	—	20	165	NSC	原因不明
9	61	32	109	449	—	20	118	MC	原因不明
10	51	33	143	410	—	20	144	ND	原因不明
11	52	23	69	363	—	20	272	ND	PBC疑
12	28	48	81	188	—	—	627	ND	一過性
13	67	40	130	550	40	—	506	MC	原因不明
14	52	102	87	137	1280	—	473	Compatible	PBC
15	48	57	69	284	—	—	394	ND	原因不明
16	54	33	314	384	—	—	392	NSC	原因不明
17	36	66	70	148	—	—	370	ND	一過性
18	46	82	290	590	—	—	337	Diagnostic	PBC
19	58	49	69	300	—	—	310	ND	一過性
20	51	29	209	403	40	—	281	CH	原因不明
21	31	43	77	280	—	—	279	ND	アルコール

ND : not done ; NSC : non-specific change ; MC : minimal change, CH : chronic hepatitis

表 2 : γ -GTP高値持続 and/or 慢性肝疾患疑い (n=17)

症例	年齢	GPT	GOT	ALP	ANA	AMA	IgM	病理	診断
1	49	18	74	433	—	—	208	Sarcoid	サルコイトーシズ
2	48	36	96	235	80	—	94	NSC	原因不明
3	47	49	112	474	640	—	165	MC	原因不明
4	36	47	127	232	160	—	129	Normal	原因不明
5	60	103	129	345	—	—	251	NASH	原因不明
6	44	43	140	250	—	—	185	MC	原因不明
7	59	24	141	539	—	—	175	PBC	PBC
8	47	30	142	256	—	—	206	MC	原因不明
9	60	76	150	385	—	—	187	MC	原因不明
10	44	24	152	309	80	—	258	MC	原因不明
11	45	61	157	260	—	—	—	MC	原因不明
12	51	40	162	213	80	—	100	MC	原因不明
13	52	41	164	435	—	—	149	NSC	原因不明
14	53	188	197	583	—	—	148	NSC	原因不明
15	44	26	203	342	—	—	158	MC	原因不明
16	49	50	213	798	40	—	198	Normal	原因不明
17	50	133	231	348	—	—	87	FL	脂肪肝

ND : not done ; NSC : non-specific change ; MC : minimal change, FL : ifatty lever

表 3 : 2次検診受診者 (n=200) の臨床診断

診断名	症例数	%	肝生検施行例
PBC	10	5	9
PBC疑い	2	1	1
脂肪肝	46	23	1
薬剤性	4	2	0
アルコール性	3	1.5	0
AIH疑い	2	1	0
原因不明	96	48	18
一過性	32	16	0
その他	5	2.5	1

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

胆汁うっ滞性肝疾患の新規バイオマーカーの探索

研究協力者 上野 義之 東北大学病院 消化器内科 講師

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変に代表される胆汁うっ滞性肝疾患の新規バイオマーカーの探索を目的としてヒト正常胆管細胞を用いたプロテオミクス法による探索的研究を行った。インターフェロン γ により誘導されるスポットを解析し、有意な変動を認めたスポットから蛋白を同定し、さらにヒト臨床検体を用いて興味のある分子の発現の確認とその意義について検討した。

A. 研究目的

胆汁うっ滞性肝疾患の新規のバイオマーカーの探索を目的とする。

B. 研究方法

ヒト正常肝より株化した肝内胆管上皮細胞を用い、その細胞をIFN γ で刺激したものと、コントロールでサブトラクション法で発現蛋白のスポット解析を行い、PMF法にて、蛋白の同定を行った。さらに、同定可能な蛋白についてはヒト病理検体を用いてその意義を検討した。

C. 研究結果

2次元電気泳動により、ヒト胆管細胞をIFN γ で刺激した際に有意に誘導されるスポットのうち、16個がMALD-TOFMSにて解析可能であり、さらに、15個は同定することが可能であった。とりわけ、ANNEXIN A2については、ヒトPBC病理検体において、その染色性が確認され、胆管上皮細胞を標的とするヒト炎症性疾患との関連が示唆された。さらに同定された、そのほかの細胞についても病理検体において表出が確認され、新規の胆管細胞障害のマーカーとしての可能性が示された。

D. 考察

新しい蛋白解析法を用いることにより、新規の胆管細胞のバイオマーカー探索の基盤的研究を行えた。今後は、得られた結果の臨床的意義付けを行うとともに、更なるマーカーの発見をより精度を上げて行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, et al : IL-2 receptor $\alpha^{-/-}$ mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 44 : 1240-1249, 2006.
- 2) Tamai K, Fukushima K, Ueno Y, et al :

Differential expressions of aquaporin proteins in human cholestatic liver diseases. *Hepatol Res* 34 : 99-103, 2006.

- 3) Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, et al : Lack of evidence that bone marrow cells contribute to cholangiocyte repopulation during experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Liver Int* 26 : 457-466, 2006.
- 4) Meng F, Yamagiwa Y, Ueno Y, et al : Over-expression of interleukin-6 enhances cell survival and transformed cell growth in human malignant cholangiocytes. *J Hepatol* 44 : 1055-1065, 2006.
- 5) Marzioni M, Francis H, Benedetti A, et al : Ca²⁺-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathol* 168 : 398-409, 2006.
- 6) Mack CL, Tucker RM, Lu BR, et al : Cellular and humoral autoimmunity directed at bile duct epithelia in murine biliary atresia. *Hepatology* 44 : 1231-1239, 2006.
- 7) Glaser S, Alvaro D, Francis H, et al : Adrenergic receptor agonists prevent bile duct injury induced by adrenergic denervation by increased cAMP levels and activation of Akt. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 : G813-826, 2006.
- 8) Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al : Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology* 130 : 1270-1282, 2006.
- 9) Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al : Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291 :

G307-317, 2006.

- 10) Fukushima K, Ueno Y, Inoue J, et al :
Filopodia formation via a specific Eph
family member and PI3K in immortalized
cholangiocytes. Am J Physiol Gastrointest
Liver Physiol 291 : G812-819, 2006.
- 11) Kogure T, Ueno Y, Kawagishi N, et al :
The model for end-stage liver disease score
is useful for predicting economic outcomes
in adult cases of living donor liver
transplantation. J Gastroenterol 41 : 1005-
1010, 2006.
- 12) Fukushima K, Ueno Y : Bioinformatic
approach for understanding the
heterogeneity of cholangiocytes. World J
Gastroenterol 12 : 3481-3486, 2006.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 1件申請中
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

PBCの分子疫学

主任研究者 大西 三朗 高知大学医学部 消化器内科学 教授

研究要旨：無症候群PBCから症候性へ移行する症例を識別するためのマーカーを見出すことは、PBCの予後改善に関して重要な課題である。PBCの慢性胆汁うっ滞症という臨床的側面から、胆汁酸代謝に関わる分子に関して機能的解析を試みる。現在、胆汁酸トランスポーター、organic anion transporter (OATP), phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) に関して症例を蓄積して遺伝子多型解析を行っている。

A. 研究目的

本調査研究班で行なわれているPBCの全国調査によると、無症候性-PBC、症候性-PBCの10年生存率はそれぞれ92.1%、61.7%で、症候性-PBCの予後は明らかに不良である。無症候性-PBCの予後は比較的良好であるが、約20%の症例は症候性に進展している。UDCAが治験薬として使用され始めて症候性への移行期間は約10年延長されたもののこの20%という移行率には変化がない。PBCは自己免疫疾患と考えられているが、発症メカニズムは不明であり、特異的治療法は確立していない。UDCAはPBCの治療薬として広く使用されているが、早期に投与開始しなければ予後を改善しないことが国内外の報告から明らかとなってきた。現在進行する症例とそうでない症例を識別するマーカーがないことから、診断がつけば治療を開始することが原則である。このマーカーが明らかになれば治療すべき症例が選択でき、病態解明の端緒となりうる。

平成17年度の本研究班で報告したように、UDCA抵抗性の非黄疸PBCの60~70%がベザフィブラートの追加投与に反応し生化学的改善が認められる。最近胆汁代謝に関わる分子機構が次々と解明されており、ベザフィブラートの作用点も次第に明らかになってきた。すなわち、胆汁酸をミセル化するリン脂質を胆汁中に輸送するphosphatidylcholine flippase、肝細胞から類洞に胆汁酸をくみ出すorganic anion transporter (OATP)、胆管上皮細胞のapical membraneに存在し胆汁酸を細胞内へ移送するsodium-dependent bile salt transporter (Asbt)、basolateral membrane側に発現し胆汁酸を血管腔へ排出するmultidrug resistance protein 3 (Mrp3)、肝細胞に存在し胆汁酸をリガンドとする核内オーファン受容体farnesoid X receptor (FXR)、回腸細胞内の胆汁酸結合・輸送タンパクbile acid-binding protein (BABP)などが挙げられる。

PBCの病態は自己免疫と、胆汁うっ滞である。ベザフィブレートで調節される胆汁酸代謝に関わる分子の機能的解析をすることは、意義のあることと考えられる。我々はPBC患者において前述の分子を含め候補遺伝子アプローチを開始している。今回は、胆汁酸

トランスポーターのひとつであるOATP、またリン脂質の産生に関わるphosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT)の遺伝子多型について検討を行なった。

B. 研究方法

対象はPBC22例と、OATPに関しては報告された日本人での頻度を対照とし、PEMTは健常者150人を対照として解析した。既に報告されているSNPのうちOATP-B (SLC27A9)のOATP-B*3 (S486F)、OATP-C (SLC27A6)のOATP-C*1b (N130D)、PEMTのV175Mをシーケンス法にて解析した。

C. 研究結果

OATP-B (S486F)

	PBC	Control
*1/1	8	129
*1/3	13	111
*1/3	1	27

Odds ratio : 0.61 (0.25-1.51)

OATP-C (N130D)

	PBC	Control
*1a/1a	3	29
*1a/1b	12	115
*1b/1b	3	75

Odds ratio : 1.30 (0.49-3.49)

PEMT (V175M)

	PBC	Control
V/V	21	143
V/M	1	7
M/M	0	0

Odds ratio : 1.03 (0.12-8.78)

D. 考 察

現在は症例数が少ないこともあり、一定の傾向は見出されないが、今後例数を増やし他の胆汁酸代謝に関わる分子に対しても検討を加える。

E. 結 論

胆汁酸代謝に関わる分子のうちベザフィブレートによって調節されるものの機能的解析をすることは、意義のあることと考えられ、今後各分子の遺伝子多型について検討を行なう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayase Y, Iwasaki S, Akisawa N, et al :
Similar anti-mitochondrial antibody reactivity profiles in familial primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 33:33-38, 2006.
- 2) Hirose A, Ono M, Saibara T, et al :
Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat steatohepatitis. *Hepatology*. In press.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

トランスポーターに作用する新規胆汁うっ滞治療薬の探索

分担研究者 杉山 雄一 東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学 教授

研究要旨：bile salt export pump (BSEP) は、肝細胞の胆管側膜上に発現し、肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄を担うトランスポーターである。我々はこれまでに、BSEPの遺伝的欠損が原因で発症する進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型 (PFIC2) の病態発症機構について解析を行い、ヨーロッパのPFIC2患者において頻度の高いE297G, D482G変異は、BSEPの胆汁酸輸送機能自体には直接的に影響を与えないが、BSEPの細胞膜上への移行過程に異常を引き起こすことを明らかにした。両変異体は、胆汁酸輸送機能自体は正常であることから、低毒性かつBSEPの細胞膜上の発現量を増加させる化合物は、両変異を持つPFIC2患者の治療薬になることが期待される。本年度は、薬物によるPFIC2の治療を目指し、治療候補化合物の有効性をBSEP発現細胞を用いて評価した。その結果、4-phenylbutyrate (4 PBA) は、細胞膜上のBSEP発現量を上昇させ、BSEPによる細胞膜を介した胆汁酸の輸送を増加させることが示唆された。この効果は、野生型BSEP、変異型BSEP発現細胞ともに観察されたことから、4 PBAはPFIC2のみならず、妊娠時など他の肝内胆汁うっ滞に対しても有用であることが期待される。

A. 研究目的

bile salt export pump (BSEP) は、肝細胞の胆管側膜上に発現し、肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄を担うトランスポーターである。我々はこれまでに、BSEPの遺伝的欠損が原因で発症する進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型 (PFIC2) の病態発症機構について解析を行い、ヨーロッパのPFIC2患者において頻度の高いE297G, D482G変異は、BSEPの胆汁酸輸送機能自体には直接的に影響を与えないが、BSEPの細胞膜上への移行過程に異常を引き起こすことを明らかにした (Hayashi et al., *Hepatology* 2005 41(4): 916-24.)。両変異体は、胆汁酸輸送機能自体は正常であることから、低毒性かつBSEPの細胞膜上の発現量を増加させる化合物は、両変異を持つPFIC2患者の治療薬になることが期待される。本研究では、PFIC2の薬物による治療を目指し、BSEP発現細胞を用いて治療候補化合物の有効性を評価した。

B. 研究方法

ヒト野生型BSEP, E297G BSEP, D482G BSEP組換えアデノウイルスを作成し、このウイルスを極性細胞であるMDCKII細胞に感染させることにより、発現細胞を構築した。治療候補化合物の有効性は、トランスウェル上で培養したヒト野生型BSEP及び変異型BSEP発現細胞における放射標識タウロコール酸 ($[^3\text{H}]$ TC) の経細胞輸送量から評価した。変異型BSEPはこれまでの研究から、小胞体の品質管理機構に折れたたみ不良タンパク質として認識されることにより、ゴルジ体以降への輸送が阻害されていると想定された。そのため、治療候補化合物としては、小胞体の品質管理機構に関わる分子シャペロンの阻害剤、及び他の変異型膜タンパク質の細胞膜上発現量を増加させる化合物を選択した。また、臨床への迅速な応用を考慮し、低毒性化合物から治療候補化合物を選択した。

BSEP発現細胞において、有効性が確認された化合物は、SDラットに投与を行い、肝胆管側膜上におけるBSEP発現量の評価、及び、 $[^3\text{H}]$ TCを定速静注し、定常状態での $[^3\text{H}]$ TCの胆汁排泄クリアランスを算出することにより、in vivoにおける有効性も検討した。

C. 研究結果

ヒト野生型BSEP及び変異型BSEP発現細胞を用いて $[^3\text{H}]$ TCの経細胞輸送を測定し、候補化合物の有効性を検討した結果、4-phenylbutyrate (4 PBA) で処理することにより、basal側からapical側への輸送量は野生型 BSEP, E297G BSEP, D482G BSEP 発現細胞でそれぞれ約1.5, 2.5, 3.0倍増加した。一方、apical側からbasal側への輸送には変化が観察されなかった。対照としたGFP発現細胞においては、basal側からapical側及び、apical側からbasal側への輸送量は変化しなかった。細胞内の $[^3\text{H}]$ TC濃度を測定し、apical膜を介した輸送に対する4 PBAの効果を定量的に評価した結果、ヒト野生型BSEP, E297G BSEP, D482G BSEP発現細胞では、それぞれ約1.7, 3.0, 2.8倍の増加したが、GFP発現細胞では変化が観察されなかった。このことから、BSEPによるapical膜を介した $[^3\text{H}]$ TCの輸送は4 PBAにより増加することが示唆された。また、ビオチニレーション法の結果から、4 PBA処理時には、細胞膜上の野生型BSEP, E297G BSEP, D482G BSEP発現量が、それぞれ約1.8, 3.1, 2.6倍増加していることが明らかとなった。

4 PBAを投与したラット肝から胆管側膜を濃縮した分画であるCanalicular membrane vesicleを調整し、ウエスタンブロッティングを行った結果、非投与群に比して約3倍BSEP発現量が上昇した。また、 $[^3\text{H}]$ TCを定速静注し、定常状態における $[^3\text{H}]$ TCの胆汁排泄クリアランスを算出したところ、投与群で

は非投与群に比して約3倍の増加することが明らかとなった。

D. 考 察

4 PBAは尿サイクル異常症の治療薬として臨床での投与が認められている低毒性化合物である。この化合物は、小胞体の品質管理機構により折れたたみ不良タンパク質として認識され、細胞膜への移行が阻害されている変異型膜タンパク質の細胞膜上発現量を増加させる作用を持つことも報告されている。代表的な変異型タンパク質として、嚢胞性線維症患者において高頻度で保持されているCFTR Δ 508があげられる。この変異型タンパク質は、小胞体で品質管理機構に関わる種々の分子シャペロンと相互作用するために、小胞体以降への移行が阻害されるが、4 PBAはこの相互作用を弱めることにより、小胞体以降への移行を可能にし、細胞膜上発現量を増加させる。これまでの我々の研究より、変異型BSEPはCFTR Δ 508と同様に小胞体の品質管理機構に認識される折れたたみ不良タンパク質と考えられたことから、4 PBAは細胞膜上の変異型BSEP発現量を増加させる、すなわちPFIC 2の有効な治療薬となることが想定され、本研究を着想するに至った。

野生型及び変異型BSEP発現MDCKII細胞を用いたin vitro実験及びSDラットを用いたin vivo実験の結果、4 PBA処理により増加するBSEPを介した $[^3\text{H}]$ TC輸送量は、細胞膜上BSEP発現量の上昇の程度と対応することが明らかとなった。このことから、4 PBAは、細胞膜上のBSEP発現量を増加させることにより、BSEPによる細胞膜を介した胆汁酸の輸送を増加させると考えられる。

4 PBAによる細胞膜上発現量増加作用は、CFTRでは変異型のみであるのに対し、BSEPでは野生型、変異型ともに観察されたことから、BSEPとCFTRで細胞膜発現量増加に関わる機構が異なる可能性が考えられる。現在、小胞体からゴルジ体への移行の促進作用のみならず、転写・翻訳の促進作用による細胞内全体での発現量増加に伴った細胞膜上での発現量上昇、及び細胞膜上での安定化作用による発現量増大などを仮定し、研究を進めている。

妊娠、敗血症時の肝内胆汁うっ滞時では、細胞膜上のBSEP発現量が顕著に減少していることが動物モデルを用いた検討から明らかにされている。4 PBAは、変異型BSEPのみではなく、野生型BSEPの発現量も増加させたことから、PFIC 2のみならず、これらの肝内胆汁うっ滞も軽減できる可能性がある。今後、胆汁うっ滞動物モデル、及び臨床試験を行うことで、4 PBAの病態時における有効性に関して更に明らかにしていきたいと考えている。

E. 結 論

以上の検討より、4 PBAは、細胞膜上のBSEP発現量を増加させることにより、BSEPによる細胞膜を介した胆汁酸の輸送を増加させると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mita S, Suzuki H, Akita H, et al : Inhibition of bile acid transport across Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-Inducing drugs. Drug Metab Dispos 34 : 1575-1581, 2006.

2. 学会発表

- 1) 林久允, 高田龍平, 鈴木洋史, 他 : 胆汁酸トランスポーター BSEP/Bsep の輸送機能に関するヒト, ラット間における種差の検討. 第14回肝病態生理研究会, 京都, 2006.
- 2) 林久允, 大貫玲子, 杉山雄一 : 4-phenylbutyric acidの新規胆汁うっ滞改善薬としての可能性. 第4回東日本胆汁酸研究会, 東京, 2006.
- 3) 林久允, 杉山雄一, 4-phenylbutyrateの新規胆汁うっ滞改善薬としての可能性. 第28回胆汁酸研究会, 米子, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし