

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等政策研究事業)
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究
分担研究報告書

肝不全に至った PBC 症例の調査研究

研究協力者 中村 稔 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症
病態制御学系専攻 肝臓病学講座 教授

研究要旨: UDCA 治療により PBC の予後は改善しつつあるが、未だ肝不全に進行し肝移植が必要となる症例が少なからず存在するため、これらの症例の重症化機構の解明は、PBC 研究に残された重要な課題のひとつである。国立病院機構肝ネット登録症例のコホート研究から、①黄疸・肝不全に至った PBC 症例の約 70%は治療開始時に既に総ビリルビンが 1.5mg/dl 以上の進行症例であること、②黄疸・肝不全に至った PBC 症例の約 80%は gp210 抗体陽性であること、③gp210 抗体陽性症例でも、発症早期から治療が開始されて服薬コンプライアンスの良好な症例の予後は良好であることが示された。また、肝移植時の摘出肝には腫大肝と委縮肝があり、残存胆管の程度もまちまちであり、黄疸・肝不全に至る過程には、胆管と肝細胞障害に関連した様々な因子が heterogeneous に関与していることが示唆された。

欧米人で PBC の中・長期予後予測に有用として最近報告された GLOBE score を用いた日本人 PBC の黄疸・肝不全進行予測の sensitivity は 0.720, specificity は 0.649 であったが、GLOBE score に gp210 抗体を因子として加えることにより、黄疸・肝不全進行予測の sensitivity は 0.818, specificity は 0.878 に向上した。今後は、PBC の病型、活動性、進行度、治療反応性などを表す様々なマーカーを用いてさらに検討を重ね、日本人に最も有用かつ簡便な PBC の中・長期予後予測式を作成し、全国規模の PBC 共同研究で予後予測式の validation を行う必要がある。また、日本人 PBC-GWAS の解析データを用いて、PBC の進行パターンによる病型分類の確立、PBC の重症化の分子標的の同定などを、遺伝子レベルから試みる必要がある。

A. 研究目的

近年、UDCA や bezafibrate を用いた治療により PBC の予後は改善しつつあるが、未だ肝不全に進行し肝移植が必要となる症例が少なからず存在する。これらの症例の病態解明と新しい治療法の開発は、PBC 研究に残された重要な研究課題のひとつである。

本研究では、肝不全、肝移植に至った PBC 症例の臨床的特徴を明らかにするとともに、PBC の重症化に関与する危険因子を用いて PBC の中・長期予後予測式を作成して、重症化が予測される症例の早期診断

法を確立する。

B. 研究方法

1、本研究は、国立病院機構肝ネット PBC 共同研究班 (32 施設) に平成 14 年から現在までに登録されている約 1,300 PBC 症例を対象として、PBC の黄疸・肝不全進行と関連する諸因子の解析を行い、肝不全、肝移植に至った PBC 症例の危険因子を明らかにする。

2、同定された危険因子を用いて、PBC の黄疸・肝不全進行の中・長期予後予測式 (Japanese GLOBE score) を作成する。

3、日本人 PBC の発症・進展に関わる遺伝因子の網羅的遺伝子解析 (GWAS) (長崎医療センター倫理委員会承認 2010. 10. 4) へ参加した全国の大学病院 26 施設と日本肝移植研究会 (会長: 京都大学 上本伸二教授) に所属する肝臓移植外科 5 施設を対象として、肝不全、肝移植症例の臨床情報の調査・収集を行い、上記予後予測式の validation を行う。

4、日本人 PBC-GWAS 共同研究 (PBC 1, 381 cases) の解析結果から PBC の病型分類や重症化に関連する遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

本研究では、文部科学省、厚生労働省、経済産業省の三省による平成 20 年 12 月 1 日一部改正の“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”および厚生労働省による平成 20 年 7 月 31 日全部改正の“臨床研究に関する倫理指針”を順守し、全ての検体および患者情報は連結可能匿名化する。また、長崎医療センター臨床研究センター内にも個人情報管理者をおき、患者情報の取り扱い、保護・管理には細心の注意をはらう。

C. 研究結果

1、国立病院機構肝ネット共同研究参加 32 施設で、2000 年以降に肝不全死あるいは肝移植に至った PBC 症例は 39 例 (肝不全死 26 例、肝移植 13 例) であった。肝移植を施行された 13 症例は全て移植時の年齢が 61 歳以下であり、61 歳以下で移植をうけずに肝不全で死亡した症例は 12 例であった。62 歳以上の症例 14 例は全て肝不全死であった。

2、経過観察開始時に総ビリルビンが 1.5mg/dl 以上であった症例は 28 例 (71.8%) と、肝不全・肝移植に進行した症例の多くは経過観察開始時には既に進行症例であった。

3、gp210 抗体、centromere 抗体、SS-A 抗体陽性率は、順に 79.5%, 28.2%, 17.9% であり、経過観察開始時に gp210 抗体が陰性であった 5 症例は経過観察中に gp210 抗体が陽性化した。

4、gp210 抗体陽性症例でも、発症早期か

ら治療が開始されて服薬コンプライアンスの良好な症例の予後はきわめて良好であった。

5、肝移植時の摘出肝には腫大肝と委縮肝があり、残存胆管の程度もまちまちであり、黄疸・肝不全に至る過程には、胆管と肝細胞障害に関連した様々な因子が heterogeneous に関与していることが示唆された。

6、欧米人で PBC の中・長期予後予測に有用として最近報告された GLOBE score を用いた日本人 PBC の黄疸・肝不全進行の sensitivity は 0.720, specificity は 0.649 であった。

7、GLOBE score に gp210 抗体を因子として加えることにより下記予測式を作成できた。

$$\text{Japanese score} = 0.995 * \text{male} + 0.504 * \ln_gp210 - 0.747 * \text{albumin} + 2.151 * \ln_bililubin + 1.182 * \ln_alp$$

本予測式を用いると、黄疸・肝不全進行予測の sensitivity は 0.818, specificity は 0.878 に向上した。

8、PBC 非進行症例と肝不全、肝移植に至った PBC 進行症例との GWAS による遺伝子多型の比較検討から同定された Protein X は、肝不全に至った症例の肝組織で発現が著明に増加し、その局在も毛細胆管測から細胞内部に変化していた。Protein X は PBC 重症化に関連した分子の可能性があり、解析を進めている (論文準備中)。

9、日本人 PBC-GWAS 研究を継続・拡大し (PBC cases 1,893, controls 8,017)、新たに PBC 疾患感受性遺伝子 *PRKCB* を同定した。これで、我が国で同定された新規 PBC 疾患感受性遺伝子は、*TNFSF15*, *POU2AF1*, *PRKCB* の三種類となった。

D. 考察

今後は、PBC の病型、活動性、進行度、治療反応性などを表す様々なマーカーを用いてさらに検討を重ね、日本人に最も有用かつ簡便な PBC の中・長期予後予測式を作成し、全国規模の PBC 共同研究で予後予測式の validation を行う必要がある。ま

た、日本人 PBC-GWAS の解析データを用いて、PBC の進行パターンによる病型分類の確立、PBC の重症化の分子標的の同定などを、遺伝子レベルから試みる必要がある。

E. 結論

PBC の発症・進行・重症化には、胆管細胞や肝細胞の障害・防御機構、自己抗体産生の背景にある免疫異常、薬剤に対する治療反応性、などに関連した複数の遺伝因子と環境因子が複雑に関与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Nakamura H, Tanaka A, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Abe M, Nakao K, Yamagiwa S, Kaneko S, Honda M, Umemura T, Ichida T, Seike M, Sakisaka S, Harada M, Yokosuka O, Ueno Y, Senju M, Kanda T, Shibata H, Himoto T, Murata K, Miyake Y, Ebinuma H, Taniai M, Joshita S, Nikami T, Ota H, Kouno H, Kouno H, Nakamura M, Fukushima N, Kohjima M, Komatsu T, Komeda T, Ohara Y, Muro T, Yamashita T, Yoshizawa K, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Sugi K, Ario K, Takesaki E, Naganuma A, Mano H, Yamashita H, Matsushita K, Yamauchi K, Makita F, Nishimura H, Furuta K, Takahashi N, Kikuchi M, Masaki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Komori A, Migita K, Ito M, Nagaoka S, Abiru S, Yatsushashi H, Yasunami M, Shimoda S, Harada K, Egawa H, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Takikawa H, Ishibashi H, Chayama K, Mizokami M, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Genome-wide association studies identify *PRKCB* as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Hum Mol Genet.* 2016, in press

2. Higuchi T, Oka S, Furukawa H, Nakamura M, Komori A, Abiru S, Nagaoka

S, Hashimoto S, Naganuma A, Naeshiro N, Yoshizawa K, Shimada M, Nishimura H, Tomizawa M, Kikuchi M, Makita F, Yamashita H, Ario K, Yatsushashi H, Tohma S, Kawasaki A, Ohira H, Tsuchiya N, Migita K. Association of a single nucleotide polymorphism upstream of ICOS with Japanese autoimmune hepatitis type 1. *J Hum Genet.* 2016, in press

3. Hisamoto S, Shimoda S, Harada K, Iwasaka S, Onohara S, Chong Y, Nakamura M, Bekki Y, Yoshizumi T, Ikegami T, Maehara Y, He XS, Gershwin ME, Akashi K. *J Autoimmun.* 2016 Dec; 75:150-160.

4. Rapid Increase in Serum Low-Density Lipoprotein Cholesterol Concentration during Hepatitis C Interferon-Free Treatment. Hashimoto S, Yatsushashi H, Abiru S, Yamasaki K, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Uchida S, Bekki S, Kugiyama Y, Nagata K, Nakamura M, Migita K, Nakao K. Hydrophobic bile acids suppress expression of AE2 in biliary epithelial cells and induce bile duct inflammation in primary biliary cholangitis. *PLoS One.* 2016 Sep 28; 11(9):e0163644.

5. Sun Y, Irwanto A, Toyo-Oka L, Hong M, Liu H, Andiappan AK, Choi H, Hitomi Y, Yu G, Yu Y, Bao F, Wang C, Fu X, Yue Z, Wang H, Zhang H, Kawashima M, Kojima K, Nagasaki M, Nakamura M, Yang SK, Ye BD, Denise Y, Rotzschke O, Song K, Tokunaga K, Zhang F, Liu J. Fine-mapping analysis revealed complex pleiotropic effect and tissue-specific regulatory mechanism of TNFSF15 in primary biliary cholangitis, Crohn's disease and leprosy. *Sci Rep.* 2016 Aug 10; 6:31429.

6. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y,

- Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep*. 2016 Apr 19; 6:24767.
7. Nagaoka S, Abiru S, Komori A, Sasaki R, Bekki S, Hashimoto S, Saeki A, Yamasaki K, Migita K, Nakamura M, Ezaki H, Yatsushashi H. Hepatic flares promote rapid decline of serum hepatitis B surface antigen (HBsAg) in patients with HBsAg seroclearance: A long-term follow-up study. *Hepato Res*. 2016 Mar;46(3):E89-99.
8. Maeda Y, Migita K, Higuchi O, Mukaino A, Furukawa H, Komori A, Nakamura M, Hashimoto S, Nagaoka S, Abiru S, Yatsushashi H, Matsuo H, Kawakami A, Yasunami M, Nakane S. Association between Anti-Ganglionic Nicotinic Acetylcholine Receptor (gAChR) Antibodies and HLA-DRB1 Alleles in the Japanese Population. *PLoS One*. 2016 Jan 25; 11(1):e0146048.
9. 中村 稔. 原発性胆汁性胆管炎. 2017 今日の治療指針 P529-531, 福井次夫 高木誠 小室一成 編集、医学書院、東京、2017
10. 中村 稔. ここまでわかった PBC の疾患感受性遺伝子 肝胆膵 74(2) 279-289 2017
2. 学会発表
1. Nakamura M, Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Komori A, Shimoda S, Tanaka A, Nagasaki M, Tokunaga K, PBC consortium in Japan. Genome-wide Association Studies Identify *PRKCB* as A Novel Genetic Susceptibility Locus for Primary Biliary Cholangitis in the Japanese Population. The 26th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2017) 2017. 2. 19, Shanghai Convention Center, China.
2. Satomi Hisamoto, Shinji Shimoda, Kenichi Harada, Sho Iwasaka, Shinya Onohara, Yong Chong, Minoru Nakamura, Yuki Bekki, Tomoharu Yoshizumi, Toru Ikegami, Yoshihiko Maehara, Xiaosong He, M. Eric Gershwin, Koichi Akashi. Hydrophobic Bile Acids Suppress Expression of Ae2 in Biliary Epithelial Cells and Induce Bile Duct Inflammation in primary Biliary Cholangitis. AASLD The Liver Meeting 2016, November 11-15, Boston
3. M. Kawashima, Y. Hitomi, N. Nishida, K. Kojima, Y. Kawai, H. Nakamura, M. Yasunami, K. Chayama, Y. Aiba, M. Nagasaki, K. Tokunaga, M. Nakamura, PBC Consortium in Japan (PBCCSJ). Genome-wide association study identifies *PRKCB* as a novel genetic factor for primary biliary cirrhosis in the Japanese population. The 66th American Society of Human Genetics Annual Meeting 2016. 10. 18-22 Vancouver, Canada.
4. Y. Hitomi, K. Kojima, M. Kawashima, Y. Kawai, N. Nishida, Y. Aiba, M. Yasunami, M. Nagasaki, M. Nakamura, K. Tokunaga. Identification of the primary functional variants for primary biliary cirrhosis (PBC) susceptibility loci by high-density association mapping and *in silico/in vitro* functional analyses. The 66th American Society of Human Genetics Annual Meeting 2016. 10. 18-22 Vancouver, Canada
5. Yuki Hitomi, Kaname Kojima, Minae Kawashima, Yosuke Kawai, Nao Nishida, Yoshihiro Aiba, Michio Yasunami, Masao Nagasaki, Minoru Nakamura, Katsushi Tokunaga. Imputation analysis using reference panel of 1,070 Japanese individuals (1KJPN) and *in silico / in vitro* functional analyses identified functional variants for primary biliary cirrhosis (PBC) susceptibility. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016. 4. 3-7, Kyoto

International Conference Center, Kyoto

6. 中村 稔 病態解明のための遺伝学的アプローチ School of Autoimmune Liver Disease (SAIL) 2017.1.7-8 セミナーハウス クロス・ウェーブ幕張、千葉

7. HITOMI Yuki, AIBA Yoshihiro, YASUNAMI Michio, NAKAMURA Minoru, TOKUNAGA Katsushi. Identification of the casual variants in human primary biliary cirrhosis (PBC) by the combination of a genome-wide association study, whole-genome sequencing, and *in silico/ in vitro* functional analyses. 日本免疫学会総会 2016.12.5-7 沖縄コンベンションセンター ラグナガーデンホテル、沖縄

8. 中村 稔 統合データベースを活用した肝・胆道系の難治性疾患”原発性胆汁性胆管炎”の疾患関連遺伝子解析 トーゴーの日 シンポジウム 2016, 2016.10.5-6 東京大学弥生講堂 一条ホール、東京

9. 樋口貴士, 岡 笑美, 古川 宏, 小森敦正, 八橋 弘, 中村 稔, 川崎 綾, 土屋尚之, 右田清志. 日本人における自己免疫性肝炎発症に関わる遺伝要因. 第44回 日本臨床免疫学会総会 2016.9.8-10 京王プラザホテル、東京

10. 人見祐基, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変(PBC)の発症と関連する機能的遺伝子多型(casual variant)の同定. 第52回日本肝臓学会総会 2016.5.19-20 ホテルニューオオタニ幕張 東京ベイ幕張ホール、千葉

11. 相葉佳洋, 西田奈央, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変における黄疸・肝不全進行関連遺伝子の同定. 第52回日本肝臓学会総会 2016.5.19-20 ホテルニューオオタニ幕張 千葉

G. 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