

小児期・移行期を含む包括的対応を要する希少難治性肝胆膵疾患の調査研究

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症に関する研究

研究分担者（順不同）

近藤 宏樹 近畿大学医学部奈良病院 小児科 准教授

虫明聡太郎 近畿大学医学部奈良病院 小児科 教授

林 久允 東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室 講師

研究要旨

日本国内における小児胆汁うっ滞症例のうち未診断の症例における遺伝子診断を進め、新たな進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（Progressive familial intrahepatic cholestasis ; PFIC）を同定した。PFICにおける疾患概要・診断基準・重症度分類について作成し、日本小児栄養消化器肝臓学会の承認を受け、厚生労働省の審査を経て、2021年7月に新たな指定難病に指定された。また、2021年2月より小児胆汁うっ滞性疾患レジストリの運用を開始し、登録を進めている。以上の成果を元に、PFIC診療ガイドラインの作成を開始した。

A. 研究目的

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症（Progressive familial intrahepatic cholestasis ; PFIC）は、乳児期に発症し、常染色体劣性遺伝形式をとる家族性の肝内胆汁うっ滞症である。特徴としては、直接ビリルビン、血清胆汁酸およびAST・ALTの高値を呈するが、 γ GTP値は正常もしくは軽度高値のみである。Byler病が疾患の基礎概念になったが、その後分子生物学の発展により原因遺伝子のことなる3つの型に分類された。いずれも慢性肝内胆汁うっ滞を呈して進行性・致死性の経過をとる。1969年に米国ユダヤ人家系の家族性肝内胆汁うっ滞症が報告された。その家系の名前をとってByler病とよばれたが、これがPFICの臨床概念のもとになった。乳児期に発症し、直接ビリルビン高値、小腸吸収障害、成長障害、致死性胆汁うっ滞を呈する。

PFIC 1型(PFIC1; Byler病)は18q21.31に存在する*ATP8B1* 遺伝子にエンコードされたアミノリン脂質の輸送にかかわる*FIC1*の異常によって発症する。PFIC 2型(PFIC2)は染色体2q31.1に位置す

る*ABCB11* 遺伝子にエンコードされた胆汁酸トランスポーターであるBSEP(bile salt export pump)の異常によって発症する。PFIC 3型(PFIC3)は染色体7q21.12に位置する*ABCB4* 遺伝子にエンコードされたMDR3(multidrug resistance 3)の異常によって発症する。PFIC 4型(PFIC4)は染色体9q21.11に位置する*TJP2* 遺伝子にエンコードされたタイトジャンクション蛋白TJP2の異常により毛細胆管の構造異常によって発症する。PFIC 5型(PFIC5)は染色体12q23.1に位置する*NR1H4* 遺伝子にエンコードされた核内受容体FXRの異常により発症する。近年、新たなPFIC疾患候補遺伝子が続々と報告されている。Myosin 5B (MYO5B)は腸管において小胞体封入症の表現型をもたらすが肝臓においてもBSEPの適切な局在やリサイクリングに関与し胆汁うっ滞の表現型を示すことが報告された。他にもタイトジャンクション関連分子であるUbiquitin Specific Peptidase 53 (USP53)やLipolysis stimulated lipoprotein receptor (LSR)、細胞内輸送関連分子であるVacuolar protein sorting-associated protein 33B (VPS33B)や

Kinesin-like protein KIF12（KIF12）の欠損症も報告されている。しかし、エビデンスがわずかであり、これらの欠損症については自然歴や病態生理に関して、さらなる検討が必要である。PFIC 病型の名称については、PFIC1 は FIC1 欠損症、PFIC2 は BSEP 欠損症のように呼んだ方が良いとの意見も存在する。

PFIC は肝細胞から胆汁中への胆汁酸トランスポートの異常のため、乳児期から慢性の肝内胆汁うっ滞とそれに伴う成長障害、睡眠障害を伴う著明な掻痒感、脂溶性ビタミン欠乏症を呈し、肝硬変・肝不全へと進行性の経過をとる。PFIC1 では、さらに *ATP8B1* 遺伝子が複数臓器に発現するために膵炎、難聴、下痢などの多彩な症状を呈する。生存率は 5 歳で 50%、20 歳で 10%程度と見積もられている。現状では根本的な治療は存在しない。その一方で、肝細胞における BSEP の機能低下が PFIC1 の胆汁うっ滞に関与することが観察されている。

これまでの研究で、われわれは尿素サイクル異常症(UCD)治療薬として日本では 2012 年に薬価収載されたフェニル酪酸ナトリウム(4PB)が、ラットにおいて毛細胆管膜上における BSEP 発現量を顕著に増加させ、肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄の促進作用を有することを示した(Hayashi et al. *Hepatology*, 2007)。また、肝内胆汁うっ滞の動物モデルにおいて、4PB を投与した場合には、BSEP の発現量低下が抑制され、胆汁流が回復すること、すなわち肝内胆汁うっ滞が軽減することも明らかとした。従って、4PB がヒトに対しても BSEP の発現量を増加させ、肝内胆汁うっ滞を改善する可能性が期待された。そこでわれわれは先行研究として、PFIC2 型患者 1 例、PFIC1 型患者 3 例に対して 4PB の投与を行った。PFIC2 型患者では、6 か月間の投与において肝機能、胆汁うっ滞の著明な改善が認められ、生化学検査値は正常化し、肝組織病理像も観察された(Hayashi et al. *J Pediatr*. 2014)。一方、PFIC1 型患者では、肝機能、胆汁うっ滞の改善は得られなかったが、掻痒感の著明な改善を得て、皮膚所見の改善および夜間の

睡眠の中断が消失し熟睡を得ることができた (Hasegawa et al. *Orphanet J Rare Dis*. 2014)。

PFIC の診療に関するガイドラインは存在せず、PFIC の日本における症例数、発生頻度、自然歴などの疫学調査に必要性から、まず、日本小児栄養消化器肝臓学会会員が所属する大学病院、病院、診療所 207 施設において現在および以前に通院していた PFIC 患者（疑い含む）の実数調査を実施した。回答があったのは 100 施設(48.3%)で、症例を有していたのは 20 施設であった。結果の内訳は、PFIC1 24 名、PFIC2 26 名、PFIC3 4 名、分類不明・疑い症例 15 名であった。次に、成人における調査として、平成 30 年度の厚生労働科学研究難治性疾患政策研究事業『小児期発症の希少難治性肝胆膵疾患の移行期を包含し診療の質の向上に関する研究（仁尾班）』において帝京大学・田中篤教授に依頼し、2017 年 8 月に一次調査として日本肝臓学会役員・評議員、日本小児栄養消化器肝臓学会役員・運営委員、日本小児外科学会認定施設・教育関連施設、日本肝胆膵外科学会高度技能専門医修練施設、以上国内 636 施設に一次調査票を送付した。さらに、二次アンケートとして症例を有すると回答した 20 施設に現在通院している、もしくは以前通院していた PFIC 患者につきカルテ調査を各施設の倫理委員会にはかり承認が得られた施設から順次カルテ調査を実施した。そして、18 歳以上症例における PFIC 症例数は PFIC1 3 人・PFIC2 0 人・不明 1 人という結果だった。

本研究の課題として、PFIC の診断水準の向上、研究基盤の構築のために疾患レジストリの構築に取り組む。また、疫学調査も継続して日本における疾患エビデンスの基盤を固め小慢・指定難病登録症例の実態把握と重症度分類改定もリンクさせつつ、診療ガイドラインの作成に必要なエビデンスの集積を行い、移行期医療の阻害要因解明を行うこととした。

B. 研究方法

まず、日本における胆汁うっ滞症において遺伝子診断がされていない例につき、診断確定を促進する

目的で、日本胆道閉鎖症研究会の支援を受け、施設会員を対象に「胆道閉鎖症を否定された原因不明の黄疸・胆汁うっ滞症例」について Google form にて調査を実施施設にアンケートを送付した。さらに、二次アンケートとして「該当症例あり」との回答を頂いた施設に、名古屋市立大学が保有する「新生児・乳児胆汁うっ滞網羅的遺伝子解析システム」を紹介し遺伝子診断を各主治医に進めるように促した。

次に、小児期発症の肝内胆汁うっ滞性疾患を対象としたレジストリ研究を開始した (<https://www.circle-registry.org/>)。35 都道府県・55 医療機関（2022 年 3 月）が参加している。

国内の小児胆汁うっ滞性肝疾患の診断に際しては、通常の検査の他に、以下の必須の特殊検査が実施されている。

- ・遺伝子診断：名古屋市立大学、筑波大学
- ・病理診断：久留米大学
- ・胆汁酸分析：順伸クリニック

本研究ではこれらの検査に先立ち、患者基礎情報を登録する構成である。登録後は、初回の追跡調査を半年後、以降は一年毎に追跡調査を実施する。

（倫理面への配慮）

本研究は、各施設における倫理委員会の審査受け、承認を得られた上で実施している。

C. 研究結果

「胆道閉鎖症を否定された原因不明の黄疸・胆汁うっ滞症例」についてアンケートを依頼した結果、日本胆道閉鎖症研究会の 68 施設より回答あり。未診断例について「新生児・乳児胆汁うっ滞網羅的遺伝子解析システム」を紹介し遺伝子解析を進めたところ、PFIC1 1 例、Dubin-Johnson 症候群 1 例を新たに診断出来た。

これまでの疫学調査を合わせると、PFIC の臨床経過は、乳児期に急速に胆汁うっ滞性肝硬変へ進行し肝移植に至る例、一旦改善するが再び増悪する例、黄疸発作を繰り返す例といった具合にその経過は多様であった。

一方、PFIC の成人症例は日本国内では非常に少なく、把握できた症例は全て小児期に肝移植を受け

た症例であった。

次に、課題名「小児期発症の胆汁うっ滞性肝疾患を対象とした多施設前向きレジストリ研究」に関し、京都大学の中央倫理委員会での一括審査を取得した。また中央倫理委員会への委託審査が認められていない施設に関しては、各施設での個別審査により実施承認を得た。2022 年 3 月時点で、35 都道府県・55 医療機関で実施承認を得ている。2021 年 1 月に本研究のキックオフ・ミーティングを行い、2 月より実際の運用を開始した。2022 年 3 月末日時点での登録数は 77 名（うち PFIC 3 名）である。

また、PFIC の疾患概要・診断基準・重症度分類を作成し、日本小児栄養消化器肝臓学会の承認を得たのち、厚生労働省の審査を経て令和 3 年 7 月に PFIC を難病医療助成制度（指定難病）に追加していただくことが出来た。

以上の成果を元に、仁尾班分担研究者、日本小児栄養消化器肝臓学会・学術委員会肝臓部門委員および同・ガイドライン委員会委員を中心にガイドライン作成委員会を組織し、日本小児栄養消化器肝臓学会にガイドライン作成ワーキンググループ結成の申請書を提出し、承認待ちである。

D. 考察

全世界的な疫学としては、2009 年の Orphanet Journal of Rare Diseases では 5 万から 10 万出生に 1 名の患者発生率が推測されている。また 2010 年の Journal of Hepatology 誌に掲載された報告によれば全世界における調査で、生存率は 5 歳で 50%、20 歳で 10%程度と見積もられている。一方で本邦では全国の医療施設における栄養消化器肝臓分野を専門とする医師において知られている疾患にも関わらず、これまで本邦においては正確な患者数、病歴、予後などの疫学データも存在しなかった。

これまでの仁尾班から支援を受けた調査から、およその PFIC 小児および成人患者数を把握できたが、今回、さらに診断確定がされていない国内胆汁うっ滞症例についても遺伝子診断を進め、新たな PFIC を同定できた。今後、疫学調査のデータをまとめ論

文化する予定である。

また、PFIC の成人症例は日本国内では非常に少なく、把握できた症例は全て小児期に肝移植を受けた症例であり、現時点で移行期医療に関する問題は見いだせなかった。

次に、小児期発症の肝内胆汁うっ滞性疾患を対象としたレジストリ研究の運用を開始することができた。新たな診療ガイドラインの作成に向けては、ガイドライン等の問題点把握し、かつ小慢・指定難病登録症例の実態把握と重症度分類改定もリンクさせるよう求められている。これまでの調査結果を解析し、ガイドラインに資するエビデンスを構築しつつ、前向きレジストリ研究を推進する。PFIC2 に対する医師主導治験の結果、フェニル酪酸ナトリウム（ブフェニール®）が承認されれば世界初の新規治療法として記載することができる。また、新たな検査法として単球由来マクロファージを用いた PFIC1 検査、胆汁うっ滞パネル、IRUD 遺伝子検査など疾患特異的検査をガイドラインに盛り込むべく、新たな原因遺伝子の探索「小児胆汁うっ滞性疾患の病態進展機構の理解、予後予測因子の探索に関する研究(後方視的研究)」を進行中である。

以上のデータを集約して PFIC 診療ガイドラインの作成を開始した。

PFIC が指定難病となったことにより、罹患患者の医療費が公費負担となり、PFIC 患者の負担軽減が図られることとなった。また、従来、PFIC の様な希少難病の新規治療法の開発研究は、1) マーケットが小さいこと(治療薬の対象となる患者さんが少なく、開発のメリットが少ないということ)、2) 病因が不明であるために治療薬の開発が難しいこと、などの理由から製薬会社からは敬遠されてきた傾向が否めなかったが、指定難病に追加されたことにより脚光を浴びることにより、病因・病態研究や新規治療法の開発が大きく加速することが期待でき、大きな前進と考える。

E. 結論

日本国内における小児胆汁うっ滞症例のうち未診

断の症例における遺伝子診断を進め、PFIC 小児および成人患者数が、ほぼ把握できた状態と考える。

小児胆汁うっ滞性疾患レジストリの運用を開始した。また、PFIC における疾患概要・診断基準・重症度分類について作成し、日本小児栄養消化器肝臓学会の承認を受け、厚生労働省の審査を経て、新規指定難病に指定された。また、PFIC 診療ガイドラインの作成を開始した。

F. 研究発表

論文発表

- 1). Nakano S, Osaka S, Sabu Y, Minowa K, Hirai S, ○ Kondou H, Kimura T, Azuma Y, Watanabe S, Inui A, Bessho K, Nakamura H, Kusano H, Nakazawa A, Tanikawa K, Kage M, Shimizu T, Kusuhara H, Zen Y, Suzuki M, ○ Havashi H. Effect of food on the pharmacokinetics and therapeutic efficacy of 4-phenylbutyrate in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Scientific Report*. 2019 ;9:17075.
- 2). Zen Y, ○ Kondou H, Nakazawa A, Tanikawa K, Hasegawa Y, Bessho K, Imagawa K, Ishige T, Inui A, Suzuki M, Kasahara M, Yamamoto K, Yoshioka T, Kage M, ○ Havashi H. Proposal of a liver histology-based scoring system for bile salt export pump deficiency. *Hepatology Research*. 2020;50:754-762.
- 3). Mizutani A, Sabu Y, Naoi S, Ito S, Nakano S, Minowa K, Mizuochi T, Ito K, Abukawa D, Kaji S, Sasaki M, Muroya K, Azuma Y, Watanabe S, Oya Y, Inomata Y, Fukuda A, Kasahara M, Inui A, Takikawa H, Kusuhara H, Bessho K, Suzuki M, Togawa T, ○ Havashi H. Assessment of Adenosine Triphosphatase Phospholipid Transporting 8B1 (ATP8B1) Function in Patients With Cholestasis With ATP8B1 Deficiency by Using Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages. *Hepatol Commun*. 2020 Sep 26;5(1):52-62.

- 4). ○ Hayashi H, Osaka S, Sakabe K, Fukami A, Kishimoto E, Aihara E, Sabu Y, Mizutani A, Kusuhara H, Naritaka N, Zhang W, Huppert SS, Sakabe M, Nakamura T, Hu YC, Mayhew C, Setchell K, Takebe T, Asai A. Modeling Human Bile Acid Transport and Synthesis in Stem Cell-Derived Hepatocytes with a Patient-Specific Mutation. *Stem Cell Reports*. 2021 Feb 9;16(2):309-323.
 - 5). Okamoto T, Sonoda M, Ogawa E, Ito S, Togawa T, ○ Hayashi H, Okajima H, Uemoto S. Long-term Outcomes of Living-donor Liver Transplantation for Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 1. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2021 Mar 1;72(3):425-429.
 - 6). Osaka S, Nakano S, Mizuno T, Hiraoka Y, Minowa K, Hirai S, Mizutani A, Sabu Y, Miura Y, Shimizu T, Kusuhara H, Suzuki M, ○ Hayashi H. A randomized trial to examine the impact of food on pharmacokinetics of 4-phenylbutyrate and change in amino acid availability after a single oral administration of sodium 4-phenylbutyrate in healthy volunteers. *Mol Genet Metab*. 2021 Apr;132(4):220-226
 - 7). Nakajima Y, Osaka S, Mizuno T, Yokoi K, Nakano S, Hirai S, Hiraoka Y, Miura Y, Suzuki M, Kusuhara H, ○ Hayashi H. Influence of food on pharmacokinetics and pharmacodynamics of 4-phenylbutyrate in patients with urea cycle disorders. *Mol Genet Metab Rep*. 2021 Sep 4;29:100799.
 - 8). Li CZ, Ogawa H, Ng SS, Chen X, Kishimoto E, Sakabe K, Fukami A, Hu YH, Mayhew CN, Hellmann J, Miethke A, Tasnova NL, Blackford SJI, Tang ZM, Syanda AM, Ma L, Xiao F, Sambrotta M, Tavabie O, Soares F, Baker O, Danovi D, ○ Hayashi H, Thompson RJ, Asai A. Human iPSC-derived hepatocyte system models cholestasis with tight junction protein 2 deficiency. *JHEP Rep*. 2022 Feb 1;4(4):100446.
 - 9). 児玉匡、上野豪久、正嶋和典、出口幸一、野村元成、阪龍太、田附裕子、○ 近藤宏樹、別所一彦、奥山宏. PFIC1 型、4 型に対し生体肝移植を行った 2 例. 日本小児外科学会雑誌. 2021;57(6):965-970.
2. 学会発表
 - 1). ○ 林久允
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型の病態解明を基盤とした創薬研究
京都小児外科セミナー 2019/04/14
 - 2). ○ Hisamitsu Hayashi
Development of Novel Medical Therapy for Pediatric Liver Diseases with Intrahepatic Cholestasis
APASL STC Tokyo 2019 2019/4/19
 - 3). Satoshi Nakano, Shuhei Osaka, Yusuke Sabu, Kei Minowa, Saeko Hirai, Takeshi Kimura, Yoshihiro Azuma, Satoshi Watanabe, Ayano Inui, Kazuhiko Bessho, Toshiaki Shimizu, Mitsuyoshi Suzuki, ○ Hisamitsu Hayashi
Effect of food on pharmacokinetics and therapeutic efficacy of 4-phenylbutyrate in progressive familial intrahepatic cholestasis
ESPGHAN 2019 2019/6/5
 - 4). ○ 林久允
トランスポーター関連希少疾患に対する新規治療戦略の開発を指向した創薬研究
第 26 回 HAB 研究機構学術年会 2019/06/21
 - 5). 里村宜紀、別所一彦、福岡智哉、木村武司、橘真紀子、三善陽子、長谷川泰浩、○ 林久允、戸川貴夫、大園恵一
VIPAS39 に変異を同定しえた本邦初の ARC 症候群 2 型の 1 例
第 36 回日本小児肝臓研究会 2019/7/13
 - 6). 佐分雄祐、水谷歩、伊藤彰吾、伊藤孝一、楠原洋之、戸川貴夫、○ 林久允
家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型の病型鑑別を目的とした ABCB11 の病因変異の解析
第 36 回日本小児肝臓研究会 2019/7/13
 - 7). 水谷歩、佐分雄祐、伊藤彰吾、伊藤孝一、楠原

- 洋之、戸川貴夫、○林久允
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者が保因する変異が病因遺伝子の splicing に及ぼす影響の検討
第 36 回日本小児肝臓研究会 2019/7/13
- 8). ○林久允
難治性肝内胆汁うっ滞症の医薬品開発研究を基盤としたリバーストランスレーショナルリサーチ
第 11 回小児肝臓・肝移植研究会 2019/09/28
- 9). 平井沙依子、中野聡、箕輪圭、鈴木光幸、○林久允、清水俊明
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型に対するフェニル酪酸ナトリウムの効果
～ 当院 2 例の治療経過 ～
第 11 回小児肝臓・肝移植研究会 2019/09/28
- 10). ○Hisamitsu Hayashi
Translational and reverse translational research on pediatric cholestatic liver diseases
THE 14th SUGIYAMA LABORATORY (RIKEN) OPEN SYMPOSIUM 2019/10/11
- 11). ○林久允
家族性肝内胆汁うっ滞症の成因、診断、治療に関する最新知見
第 46 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2019/11/3
- 12). 水谷歩、佐分雄祐、伊藤彰吾、伊藤孝一、楠原洋之、戸川貴夫、○林久允
家族性肝内胆汁うっ滞症患者の保因変異が病因遺伝子の splicing に及ぼす影響に関する検討
第 46 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2019/11/3
- 13). ○林久允
肝内胆汁うっ滞症に対する創薬研究を基盤としたリバーストランスレーショナルリサーチ
順天堂大学第 2 回若手研究者コミュニティー 2019/11/13
- 14). ○Hisamitsu Hayashi
Repurposing of 4-phenylbutyrate for treatment of pediatric liver diseases with intrahepatic cholestasis
JDDW2019 2019/11/22
- 15). 水谷歩、佐分雄祐、楠原洋之、○林久允
Atp11c 欠損は肝臓を起因とする TG 代謝異常を呈する
第 37 回日本小児肝臓研究会 2021/6/6
- 16). 水谷歩、○林久允
Atp11c 欠損により生じる TG 代謝異常の機序解析
第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2021/10/2
- 17). 田村隆太郎、武井一、鈴木光幸、成高中之、佐々木隆浩、村井毅、木村昭彦、清水俊明、楠原洋之、入戸野博、○林久允
Atp11c 欠損により生じる TG 代謝異常の機序解析
第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2021/10/2
- 18). ○林久允
小児遺伝性肝疾患の病態解明と治療戦略の創出
第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2021/10/2
- 19). ○林久允
小児期発症の胆汁うっ滞性肝疾患を対象とした多施設前向きレジストリ研究 (CIRCLE) の立案の経緯、進捗状況、今後の展望
第 48 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2021/10/2
- 20). 田村隆太郎、武井一、鈴木光幸、成高中之、佐々木隆浩、村井毅、木村昭彦、清水俊明、楠原洋之、入戸野博、○林久允
胆汁酸 3 位グルクロン酸抱合体の肝取り込みには OATP1B1、OATP1B3 が寄与する
第 42 回日本胆汁酸研究会 2021/11/27

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 出願番号：特願 2021-197450

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
総合研究報告書

発明の名称：難治性肝疾患の治療薬

出願日（優先日）：2021年 12月 6日（特

許権残存期間：20年 0月）

出願人（特許権者）：林 久允、佐分 雄祐、

田村 隆太郎

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし