

小児性肝内胆汁うっ滞症の新規診断法及び治療薬の開発

東京大学大学院 薬学系研究科 分子薬物動態学教室
林 久允

1. はじめに

小児の先天性肝内胆汁うっ滞は、多様な疾患を含んだ症候群であり、各疾患の予後は大きく異なる。予後不良な疾患の一例として、希少難治性肝疾患である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC; progressive familial intrahepatic cholestasis) が知られている。PFICは、原因遺伝子の違いによりPFIC1~3に大別されるが、ATP8B1の遺伝子変異が原因となるPFIC1、ABCB11の遺伝子変異が原因となるPFIC2に対しては治療法が確立しておらず、肝移植が奏効しなければ致死性の経過をたどる。そのため、PFIC1、PFIC2に対する治療薬の開発が切望されている。

ABCB11は、肝毛細胆管側膜 (CM; canalicular membrane) に発現し、肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄を担うABCトランスポーターである。我々は培養細胞を用いた解析から、PFIC2症例の60%以上では、ABCB11のCM発現量が減少している一方で、胆汁酸の輸送活性自体は維持していることを見出した(1)。さらに本知見に基づき、独自の評価系を作成し、種々の低分子化合物をスクリーニングすることにより、ABCB11のCM発現量を増加させる作用を有する化合物の1つとして、尿素サイクル異常症の治療薬である4-phenylbutyrate (4PB) を同定した(2)。4PBの本薬理作用は実験動物においても確認された。また、尿素サイクル異常症患者を対象としたレトロスペクティブ研究を実施したところ、4PB投与開始後に、ABCB11機能と逆相関するパラメーターである血中胆汁酸濃度の低下が観察され、肝組織を用いた解析ではABCB11の発現増加が認められた(3, 4)。従って、ヒトにおいても4PBの服用により、ABCB11のCM発現量が増加するものと推測され、4PBはPFIC2に対して治療効果を示すことが期待される。以上の背景より、本研究では、PFIC2に対する4PBの有効性、安全性を評価すべく、PFIC2症例を対象とした探索的臨床研究を実施した。

ATP8B1はABCB11の機能、発現制御に関わることが報告されている(5, 6)。従って、PFIC1症例ではATP8B1の機能破綻を介し、2次的にABCB11活性が低下することが、病態発症に繋がっている可能性が考えられ、PFIC2と同様に4PBによる治療効果が期待される。そこで本研究では、PFIC1も対象疾患として試験を遂行した。

2. 方法

PFIC1、PFIC2の臨床症状は類似しており、臨床所見によるサブタイプ判定は不可能であることから、遺伝子解析、in vitro試験をベースにサブタイプ確定診断を行った。具体的には、まずPFIC患者の末梢血を用いてATP8B1、ABCB11遺伝子のゲノム解析を行い、遺伝子変異部位を同定後、変異を導入したATP8B1、ABCB11を発現させた培養細胞を作成することにより、当該変異がATP8B1、ABCB11の発現量、タンパク質活性に及ぼす影響を評価した。サブタイプの診断後、4PBのPFIC症例に対する有効性、安全性を評価するための用量漸増試験を実施した。尿素サイクル異常症に対する承認量よりも低用量から試験を開始し、1ヶ月ごと、3段階に分けて用量を承認量まで増量した(低用量→中用量→高用量(承認量))。有効性が認められた用量では4ヶ月まで投与期間を延長

した。臨床所見、血液生化学検査値に加え、試験開始前後の肝組織病理像の変化に基づき、4PBの治療効果を評価した。

本研究は、報告者の所属する東京大学大学院薬学系研究科を始めとする全ての共同研究機関の倫理委員会の承認の下、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、患者の保護者から書面による同意を取得した後に実施した。

3. 結果

● PFIC1、PFIC2の確定診断

臨床所見により、PFIC1、あるいはPFIC2疑いと診断された6症例の保護者から、試験参加の同意を取得し、遺伝子検査を実施した。その結果、6症例の内訳は、PFIC1 3症例、PFIC2 2症例、その他 1症例であることが明らかになった。

PFIC2症例において認められた変異 (Patient 1: c. 3692G>A (p. R1231Q), Patient 2: c. 1211C>A (p. D404G))を導入したABCB11を発現するHEK293T細胞を構築し、ビオチニレーション法、細胞免疫染色法を行ったところ、両変異によりABCB11の細胞膜発現量は顕著に低下していた。一方、本細胞から細胞膜ベシクルを調製し、ATP依存的な胆汁酸輸送活性、すなわちABCB11の輸送活性を測定したところ、両変異体は胆汁酸輸送活性は保持していた。以上の結果から、両PFIC2症例は4PBによる治療効果が期待できる症例であることが明らかとなった。

● PFIC1、PFIC2症例に対する4PBの用量漸増試験

上記6症例のうち、PFIC1 3症例、PFIC2 2症例の保護者から、本臨床研究への参加同意を頂き、試験を開始した。これまでにPFIC2 2症例に対する試験が終了しており、PFIC1 3症例については、試験進行中である。両PFIC2症例では、低用量、中用量での投与期間中は、血液生化学検査値の有意な変化は観察されなかったが、高用量に増量して1週間ほどで、血液生化学検査値が改善し始め、試験終了時には、肝障害マーカーであるALT、AST、ビリルビン値などは正常化していた。また、肝組織を用いた病理学解析、生化学実験から、試験終了時に採取した検体では、試験開始前に採取した検体に比して、BSEPの発現量が増加しており、胆汁うっ滞像、PFIC2に特徴的な病理像である巨細胞性変化が顕著に低下していた。PFIC症例では、肝障害に伴い、夜も眠れないほどの強い掻痒感が惹起され、QOLが著しく低下する。Whittingtonらにより提唱された掻痒感の評価手法を用い (pruritus score) (7)、両症例の経過を評価したところ、高用量に増量後、掻痒感は著明に改善した。血液生化学検査値、pruritus scoreともに、試験終了2ヶ月後から徐々に悪化し、4ヶ月後には試験開始前の値に戻った。試験期間中に、4PBの服用によると考えられる副作用は観察されなかった。

4. 考察

以上のように、我々はPFIC2の治療戦略をin vitro解析の結果に基づき立案した後、PFIC2治療薬の候補化合物として4PBを同定し、本研究において実際にPFIC2症例を対象とした探索的臨床研究を実施することにより、これまで肝移植以外に治療法が存在しなかったPFIC2の薬物による治療の可能性を世界に先駆けて示した。現在、医薬品としての承認申請に向けた治験の準備を臨床医の先生方と進めている。

5. 発表論文、参考文献

1. **Hayashi H**, Takada T, Suzuki H, Akita H, Sugiyama Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* 2005;41:916-924.
2. **Hayashi H**, Sugiyama Y. 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* 2007;45:1506-1516.
3. **Hayashi H**, Inamura K, Aida K, Naoi S, Horikawa R, Nagasaka H, Takatani T, et al. AP2 adaptor complex mediates bile salt export pump internalization and modulates its hepatocanicular expression and transport function. *Hepatology* 2012;55:1889-1900.
4. **Hayashi H**, Mizuno T, Horikawa R, Nagasaka H, Yabuki T, Takikawa H, Sugiyama Y. 4-Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocanicular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J Hepatol* 2012;56:1136-1144.
5. Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull LN, Knisely AS, Strautnieks SS, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology* 2004;126:756-764.
6. Paulusma CC, de Waart DR, Kunne C, Mok KS, Elferink RP. Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content. *J Biol Chem* 2009;284:9947-9954.
7. Whittington PF, Whittington GL. Partial external diversion of bile for the treatment of intractable pruritus associated with intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1988;95:130-136.

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、済生会横浜市東部病院 小児肝臓消化器科 乾あやの先生、獨協医科大学越谷病院 小児科 永井 敏郎先生、井上 建先生、大阪大学大学院医学系研究科 小児科学 近藤 宏樹先生、長谷川 泰浩先生のご協力を賜りました。先生方のご協力に謝意を表すとともに、ご支援いただきました公益財団法人 アステラス病態代謝研究会に深謝いたします。