

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15921

研究課題名(和文) 原発性胆汁性胆管炎におけるmiR-139-5p生体内分子機構の解明と創薬開発応用

研究課題名(英文) The molecular mechanism of miR-139-5p in Primary Biliary Cholangitis

研究代表者

勝見 智大 (Katsumi, Tomohiro)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：70637355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：初年度は培養細胞を用いた miRNA 干渉によるサイトカイン制御の検証を行った。miR-139-5p干渉を行ったところ培養上清中の TNF- α 低下傾向を認めこれによりmiR-139-5p が炎症性サイトカイン制御因子として機能していることを検証できた。次年度はPBC モデルマウスを用いた miR-139-5p の生体内発現効果の検討を行った。NOD.c3c4 マウスの尾静脈に miR-139-5p inhibitorを投与することで、PBC肝臓内で低発現させるとTNF- α の低下をきたすことを確認した。従ってmiR-139-5pはPBC病態形成に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により難治性肝疾患であるPBCの病態が解明しうる可能性がある。最終的にはmiRNAをターゲットとした創薬開発応用につながることを期待される。根治療法としては肝移植しかなかったPBC治療に大きなブレイクスルーをもたらす成果であったと思われる。

研究成果の概要(英文)：In the first year, we verified cytokine regulation by miRNA interference in cultured cells. When miR-139-5p interference was performed, TNF- α in the culture supernatant tended to decrease, confirming that miR-139-5p functions as an inflammatory cytokine regulator. In the next fiscal year, we examined the in vivo expression effect of miR-139-5p using PBC model mice. It was confirmed that administration of miR-139-5p inhibitor to the tail vein of NOD.c3c4 mice resulted in a decrease in TNF- α when it was underexpressed in PBC liver. Therefore, miR-139-5p was shown to be involved in the pathogenesis of PBC.

研究分野：肝臓

キーワード：PBC microRNA

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性胆管炎 (PBC) は胆管上皮障害を特徴とする慢性胆汁うっ滞型肝疾患であり、その病因としては自己免疫機序、遺伝的素因、環境因子など考えられているが未だ明らかにされていない。また PBC は予後良好な緩徐進行型と、予後不良な門脈圧亢進症型、黄疸肝不全型という亜病型に分類されるがその病態の違いも未だ解明されていない。根治的治療は肝移植のみである現状からも難治性肝疾患として PBC に対する今後のより効果的な治療薬開発に向けた基礎研究が必須である。

2. 研究の目的

以前に我々は細胞間コミュニケーションツールやバイオマーカーとしても有用な microRNA に着目し、次世代シーケンサーによる網羅的解析により PBC 病型毎に異なる発現パターンを持つことを特定した。また、PBC 肝内リンパ球において miR-139-5p が高発現していることで、c-FOS 抑制を介した新規炎症制御メカニズムが関与していることを初めて解明した。

本研究ではこれらの成果を発展させ、miR-139-5p が PBC 病態進行に関与しうる特異的な因子として着目し、培養細胞及び PBC モデルマウス実験により胆管障害増悪機序を解明することを目的とした。さらにこの microRNA を標的とした分子標的治療薬の開発に向けた基礎研究を行い、今後の臨床応用へと発展させることを最終的な本研究の目的に設定した。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた miRNA 干渉によるサイトカイン制御の検証

miR-139-5p が PBC 肝内リンパ球で高発現しており、c-FOS 発現を抑制することで TNF- α 産生過剰となり胆管障害増悪を誘導する機序を特定しているが、この結果を踏まえて、培養細胞を用いて miRNA 干渉し miR-139-5p を低発現させる。この培養系に置いて炎症性サイトカイン(特に TNF- α)が産生低下しこれまでの研究結果と対する結果となりうるかどうかを検討する。培養細胞としてはヒト胆管上皮細胞(H69)を使用し、細胞に miR-139-5p inhibitor を lipofection 法で投与し細胞内 miR-139-5p を発現低下させる。その後炎症性サイトカインを ELISA で測定する。

PBC モデルマウスを用いた miR-139-5p の生体内発現効果の検討

前年度までの研究結果を踏まえて PBC モデルマウス(NOD.c3c4)へ miR-139-5p を投与し低発現させることで生体内での直接的な作用を検討する。miRNA 導入は NOD.c3c4 マウスの尾静脈に miR-139-5p を投与する。microRNA は PBC 肝臓内で低発現させる inhibitor を使用する(各 10 匹)。初回投与後 24h、48h、72h 後に同様の手技を繰り返す。miRNA 投与量は試薬プロトコールに従う(7mg/kg/匹)。

マウス PBC 肝組織変化の検討：最終投与 24h 後に各マウスの肝組織と血液を採取し、肝組織中の microRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認し、miR-139-5p 投与後の肝組織の変化を比較する。また炎症性サイトカインも ELISA にて測定し miRNA 導入後の変化を検証する。

4. 研究成果

H69 において予定通りに lipofection 法で miR-139-5p inhibitor を投与した。miR-139-5p は高率に発現低下していることをリアルタイム PCR で確認した。次に炎症性サイトカイン測定として培養上清中の TNF- α 濃度を ELISA で測定した。miR-139-5p 発現低下させたものの、特定の炎症性サイトカイン濃度の有意な変化までは認めなかった。miR-139-5p の標的因子である c-FOS に関しても発現変化は認めなかった。これは microRNA は翻訳後抑制というメインな機能が主体であるため単純な microRNA 抑制のみではその標的因子の増加まではすぐには影響しないものと予想された。

前年度の vitro の結果を踏まえて、vivo 実験として PBC モデルマウス(NOD.c3c4)を用いて検証した。NOD.c3c4 マウスの尾静脈に miR-139-5p(lipofection 法)を投与した。これは肝臓内で低発現させる inhibitor を使用した(合計 10 匹)。血液検査上は肝胆道系酵素が有意な差はないものの inhibitor 投与群では改善傾向にあった。また肝組織を検証したところ今回は明らか

な胆管炎の改善や変化は認めなかった。しかしマウス生体内の血清内炎症性サイトカインを測定したところ TNF- α が有意な差を持って低下していた。 miR-139-5p の PBC における病態改善効果の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----