

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590744
 研究課題名 (和文) 免疫学的胆管炎における小葉間胆管選択性を解明するための細胞生物学的研究
 研究課題名 (英文) Cell biological analysis for studying the target-specific mechanism involved in immune-mediated cholangitis.
 研究代表者
 上野 義之 (Ueno Yoshiyuki)
 東北大学・病院・講師
 研究者番号：70282126

研究成果の概要：

ヒト胆管細胞を用いて、等電点電気泳動法にて小葉間胆管および細胆管由来の蛋白を展開し、スポットの同定を行った。さらに、インターフェロン γ にて誘導されるスポットを検討することにより、表出される蛋白をスクリーニングし臨床的な意義付けを行った。その結果、約 15 の分子が、発現上昇していることがわかり、そのうち同定が可能であった Annexin A2 について検討を進めたところ、細胞内のカルシウム濃度や ATP によりその作用が調整されていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：原発性胆汁性肝硬変、プロテオミクス、胆管細胞、MALDI-TOFMS

1. 研究開始当初の背景

難治性の肝疾患である原発性胆汁性肝硬変 (PBC) を含む胆汁うっ滞性肝疾患では、特異的な疾患の診断法が存在しないために、早期の診断や治療介入が困難なものとなっている。これらヒト胆汁うっ滞性肝疾患に対する新たな疾患マーカーの探索が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、最新のタンパク質の分析法を用い、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

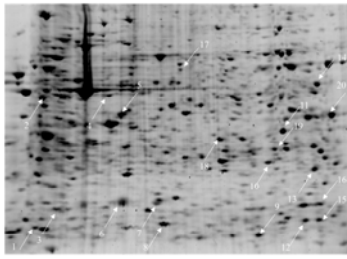
3. 研究の方法

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。さらに *in vitro* での検討により、ANNEXIN A2 の強制発現系を作成し、種々の細胞内伝達物質が胆汁うっ滞の病態といかに関連するかを検討した。

4. 研究成果

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 MALDI-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 病理倦怠において、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倦怠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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Glaser S, Demorrow S, Francis H, Ueno Y, Gaudio E, Vaculin S, Venter J, Franchitto A, Onori P, Vaculin B, Marzioni M, Wise C, Pилanthanonnd M, Savage J, Pierce L, Mancinelli R, Alpini G. Progesterone stimulates the proliferation of female and male cholangiocytes via autocrine/paracrine mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G124-G136. (査読有り)
2. Chuang YH, Ridgway WM, Ueno Y, Gershwin ME. Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:333-347. (査読有り)
3. Demorrow S, Francis H, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Onori P, Franchitto A, Vaculin B, Vaculin S, Alpini G. Anandamide inhibits cholangiocyte hyperplastic proliferation via activation of thioredoxin 1/redox factor 1 and AP-1 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G506-519. (査読有り)
4. Francis H, Glaser S, Demorrow S, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Dostal D, Onori P, Franchitto A, Marzioni M, Vaculin S, Vaculin B, Katki K, Stutes M, Savage J, Alpini G. Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H1 histamine receptor stimulation by activation of the IP3/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C499-513. (査読有り)
5. Fava G, Marzioni M, Francis H, Glaser S, Demorrow S, Ueno Y, Benedetti A, Alpini G. Novel interaction of bile acid and neural signaling in the regulation of cholangiocyte function. *Hepatol Res* 2007;37 Suppl 3:S420-429 (査読有り)
6. Fava G, Ueno Y, Glaser S, Francis H, Demorrow S, Marucci L, Marzioni M, Benedetti A, Venter J, Vaculin B, Vaculin S, Alpini G. Thyroid hormone inhibits biliary growth in bile duct-ligated rats by PLC/IP3/Ca²⁺-dependent downregulation of SRC/ERK1/2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1467-1475. (査読有り)
7. Francis H, Franchitto A, Ueno Y, Glaser S, Demorrow S, Venter J, Gaudio E, Alvaro D, Fava G, Marzioni M, Vaculin B, Alpini G. H3 histamine receptor agonist inhibits biliary growth of BDL rats by downregulation of the cAMP-dependent PKA/ERK1/2/ELK-1 pathway. *Lab Invest* 2007;87:473-487. (査読有り)
8. Francis H, LeSage G, DeMorrow S, Alvaro D, Ueno Y, Venter J, Glaser S, Mancino MG, Marucci L, Benedetti A, Alpini G. The alpha2-adrenergic receptor agonist UK 14,304 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by downregulation of the cAMP system in bile duct-ligated rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1252-1262. (査読有り)
9. Glaser SS, Ueno Y, Demorrow S, Chiasson VL, Katki KA, Venter J, Francis HL, Dickerson IM, Dipette DJ, Supowit SC, Alpini GD. Knockout of alpha-calcitonin gene-related peptide reduces cholangiocyte proliferation in bile duct ligated mice. *Lab Invest* 2007;87:914-926. (査読有り)
10. Kakazu E, Kanno N, Ueno Y, Shimosegawa T. Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2007;179:7137-7146.
11. Marzioni M, Ueno Y, Glaser S, Francis H, Benedetti A, Alvaro D, Venter J, Fava G, Alpini G. Cytoprotective effects of taurocholic acid feeding on the biliary tree after adrenergic denervation of the liver. *Liver Int* 2007;27:558-568.

(査読有り)

12. Meng F, Henson R, Wehbe-Janeck H, Smith H, Ueno Y, Patel T. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem* 2007;282:8256-8264. (査読有り)
13. Moritoki Y, Lian ZX, Wulff H, Yang GX, Chuang YH, Lan RY, Ueno Y, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. AMA production in primary biliary cirrhosis is promoted by the TLR9 ligand CpG and suppressed by potassium channel blockers. *Hepatology* 2007;45:314-322. (査読有り)
14. Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, Yamagiwa Y, Fukushima K, Gershwin ME, Shimosegawa T. Amniotic epithelial cell-derived cholangiocytes in experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Hepato Res* 2007;37:286-294. (査読有り)
15. Nakagome Y, Ueno Y, Kogure T, Fukushima K, Moritoki Y, Ridgway WM, Eric Gershwin M, Shimosegawa T. Autoimmune cholangitis in NOD.c3c4 mice is associated with cholangiocyte-specific Fas antigen deficiency. *J Autoimmun* 2007;29:20-29. (査読有り)
16. Taffetani S, Glaser S, Francis H, Demorrow S, Ueno Y, Alvaro D, Marucci L, Marzioni M, Fava G, Venter J, Vaculin S, Vaculin B, Lam IP, Lee VH, Gaudio E, Carpino G, Benedetti A, Alpini G. Prolactin stimulates the proliferation of normal female cholangiocytes by differential regulation of Ca²⁺-dependent PKC isoforms. *BMC Physiol* 2007;7:6-6. (査読有り)
16. Ueno Y, Francis H, Glaser S, Demorrow S, Venter J, Benedetti A, Fava G, Marzioni M, Alpini G. Taurocholic acid feeding prevents tumor necrosis factor-alpha-induced damage of cholangiocytes by a PI3K-mediated pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:942-949. (査読有り)
17. Ueno Y, Fukushima K, Nakagome Y, Kido O, Shimosegawa T. Bioinformatic approach for cholangiocyte pathophysiology. *Hepato Res* 2007;37 Suppl 3:S444-448. (査読有り)
18. Ueno Y, Moritoki Y, Shimosegawa T, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis:

what we know and what we want to know about human PBC and spontaneous PBC mouse models. *J Gastroenterol* 2007;42:189-195. (査読有り)

19. Yahagi K, Ueno Y, Nomura E, Fukushima K, Moritoki Y, Kogure T, Kojima Y, Negoro K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Mapping of a disease susceptibility locus in the HLA region for Primary Biliary Cirrhosis in Japan. *Hepato Res* 2007;37:270-275. (査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

1. Xia XF, Xiao YH, Gao DB, Ueno Y, LeSage GD. DIFFERENTIAL EFFECTS OF RETINOIC ACID (RA) ON RAR AND PPAR delta SIGNALING INCREASES APOPTOSIS IN LARGE CHOLANGIOCYTES AND PROMOTES SURVIVAL IN SMALL CHOLANGIOCYTES. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2, 2008
2. Woo K, Sathe MN, Kresge C, Parameswara V, Esser V, Ueno Y, Venter J, Alpini G, Feranchak AP. Functional Differences in Atp Release and P2 Receptor-Mediated Secretion between Small and Large Mouse Cholangiocytes: Potential Existence of a Purinergic Signaling Axis Along the Intrahepatic Biliary Tract. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2 2008
3. Moritoki Y, Lian ZX, Tsuneyama K, Wakabayashi K, Yang GX, Yoshida K, Ueno Y, Gershwin ME. B Cell Deficiency Exacerbates Liver and Intestinal Inflammation in a Murine Model of Autoimmune Cholangitis. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2 2008
4. Mancinelli R, Gaudio E, Onori P, Franchitto A, Carpino G, DeMorrow S, Ueno Y, Alvaro D, Francis H. Taurocholate Feeding to Bile Duct Ligated (Bdl) Rats Prevents Caffeic Acid-Induced Bile Duct Damage by Increased Cholangiocyte Vegf Expression. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2 2008
5. Lam IP, Glaser SS, Gaudio E, Ueno Y, Chow BK, Antonello V, Sferra R, Onori P, Alvaro D, Vaculin B, Venter J, Francis H, Mancinelli R, Carpino G, Chiasson V, Alpini G. Knockout of

- Secretin Receptor Decreases the Proliferation of Large Cholangiocytes in Bile Duct Ligated (Bdl) Mice. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2 2008
6. Kokazu E, Ueno Y, Kondo Y, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kogure T, Inoue J, Tamai K, Shimosegawa T. An Imbalance in Plasma Amino Acids of Advanced Cirrhotic Patients Influences the Intracellular Amino Acids of Peripheral Blood Mononuclear Cells, and the Imbalance Suppresses the Maturation of Dendritic Cells Via Mtor/S6k Signaling Pathway. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2 2008
 7. Alpini G, Gaudio E, Supowit S, Ueno Y, Franchitto A, Onori P, Venter J, Francis H, Vaculin B, Kopriva S, Wise C, Mancinelli R, Savage JM, Chiasson V, DiPette DJ, Glaser S. LACK OF alpha-CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (alpha-CGRP) REDUCES BILE ACID-INDUCED INCREASE IN BILIARY PROLIFERATION. AASLD SanFrancisco, U.S.A Nov 2 2008
 8. Glaser S, Gaudio E, Francis H, Ueno Y, Onori P, Franchitto A, Venter J, Alvaro D, Vaculin BT, Kopriva S, Savage J, Alpini G. Bile acid feeding prevents hepatic artery ligation-induced bile duct injury in bile duct ligated rats (BDL) by PI3K/AKT-dependent activation of cholangiocyte VEGF-a expression. DDW San Diego, U.S.A May 14, 2008
 9. Kido O, Fukushima K, Ueno Y, Inoue J, Jefferson DM, Shimosegawa T. Compensatory role of inducible annexin A2 for impaired biliary epithelial anion exchange activity of inflammatory cholangiopathy. DDW San Diego, May 14, 2008
 10. Kido O, Fukushima K, Ueno Y, Inoue J, Jefferson DM. Compensatory role of inducible annexin A2 for impaired biliary epithelial anion exchange activity of inflammatory cholangiopathy. Journal of Hepatology 2008;48:S173-S173. EASL, Milan, Italy, April 17, 2008
 11. 中込 悠, 上野義之他, NOD. c3c4 マウス胆管上皮におけるFas抗原発現減弱と病態との関連 日本肝臓学会総会 平成 19 年 6 月 1 日 東京
 12. 城戸 治, 上野義之他. プロテオミクスによる新たな胆汁うっ滞性肝疾患特異的マーカーの探索 日本肝臓学会総会 平成 19 年 6 月 1 日、東京
 13. 上野義之他, α -Calcitonin gene-related peptide (CGRP)は胆汁うっ滞時の胆管細胞増殖を抑制する 日本肝臓学会総会 平成 19 年 6 月 1 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 義之 (UENO YOSHIYUKI)

東北大学・病院・講師

研究者番号 70282126

(2) 研究分担者

福島 耕治 (FUKUSHIMA KOJI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 20400476