

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03632

研究課題名(和文)細胞外小胞を介した胆道系恒常性維持システムとその破綻による肝疾患病態形成

研究課題名(英文)Biliary homeostasis regulated by extracellular vesicles and its dysregulation resulting in liver diseases

研究代表者

上野 義之(Ueno, Yoshiyuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70282126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：(1)胆汁サンプルからのEVの分離法の確立は、みらか研究所と共同研究を実施し、試薬を開発し胆汁からの分離に最適な方法を考案した。本法によりヒト胆汁うっ滞性肝疾患の胆汁サンプルが疾患ごとに異なる組成やバイオマーカーを持つことを明らかにした。(2)分離EVを、培養胆管上皮細胞の管腔側より添加し細胞の変化を検討し、基底膜側と管腔側に分離されるEVは、質・量とも異なっており異なる生理活性を持つことを明らかにした。さらに、(3)ヒト疾患(インターフェロン及び胆汁酸刺激によるヒトPSC in vitroモデル)において正常状態に比してより線維化増強作用を持つ線維化増強作用を基底側EVが持つことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、より効率が高く純度の高い胆汁中EVの分離法が開発された。本法を用いることにより、新たな疾患バイオマーカーや、創薬につながるデリバリー法の開発が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) To establish a method for separating EV from bile sample, we conducted joint research with Miraka Research Institute, developed a therapeutic drug, and devised the optimum method for separation from bile. This method revealed that bile samples of human bile stasis liver disease have different compositions and biomarkers for each disease. (2) Separated EV is added from the lumen side of cultured bile duct epithelial cells, and changes in the cells are examined. Clarified. Furthermore, (3) it was found that the basal EV has a fibrosis-enhancing effect that has a more fibrotic-enhancing effect than the normal state in a human disease (human PSC in vitro model stimulated with interferon and bile acid).

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆汁 細胞外小胞 胆汁うっ滞 胆管癌 原発性硬化性胆管炎

## 1. 研究開始当初の背景

近年確立された胆汁を介した胆汁酸や FXR などの核内受容体アゴニストの腸肝循環によりコレステロール代謝などを制御するという概念を裏付けるには、既成の血中の因子を介した細胞内制御機構で胆道系の恒常性システムで説明するのは効率性を鑑みても生体としての合理性を欠く。細胞外小胞 Extracellular Vesicle (EV) はナノメートルサイズの大きさの細胞の移送メカニズムにより生細胞及び死細胞から細胞外に放出される膜結合性の小胞である。(1) 後期ライソゾーム経路を介するもの (エクソゾーム)、(2) 原形質膜より直接芽出するもの (マイクロベジクル)、(3) アポトーシス中の細胞から放出される apoptotic body、が主な 3 つの形態であるが、EV に含まれているタンパク質、脂質、核酸、さらにマイクロ RNA (miRNA) は細胞間コミュニケーションの重要な伝達物質であることが近年明らかにされている。とりわけ極性を持つ上皮細胞などではドメイン特異的に放出して下流の細胞に影響を与えることも報告されている。これまで血液、尿、分泌液などの生体試料から EV の正常状態・病的状態での働きが多く報告されてきた。

一方、胆汁については肝細胞のタイトジャンクション間の毛細胆管に始まり小葉間胆管、隔壁胆管、肝外胆管へと次第に径を増す胆管上皮細胞からなる胆道系を通過し Vater 乳頭から小腸内に排出され、一部は回腸末端から再吸収されて門脈を介して肝臓に再分布する。胆汁中にはビリルビンや胆汁酸、さらには核内受容体アゴニストである FGF19 や FGF21 といったコレステロール代謝や胆汁産生性を制御する重要な分子が含まれていることも近年確立され、胆汁に含まれるさまざまな物質が生体の恒常性維持にクリティカルであることもトピックとなっている。一般的に胆汁の由来は、肝細胞の毛細胆管由来のものと胆管上皮細胞由来の胆管胆汁が混在すると考えられている。これまで胆汁内の EV についての報告は数編散見されているが、胆汁全体からみているためにいかなる細胞由来の EV がどのように働いているかは不明である。さらに肝細胞や胆管上皮細胞では基底側腔と毛細胆管側では異なる EV が放出されるが、その意義は不明である。

## 2. 研究の目的

今回「胆道系の恒常性維持は、胆汁中の EV に含まれる分子を介した伝達システムを用いた胆道を構成する細胞同士のクロストークにより成立されているのではないか？」という中心仮説を立て、それを示すために「(1) 肝細胞由来の EV と胆管上皮細胞由来の EV は異なる成分を持つ、(2) それぞれの EV 中の分子は下流の胆管上皮細胞に対して異なる細胞生物学的意味を持つ、(3) 胆汁うっ滞性肝疾患では EV に含まれる因子がさらに周囲の胆管上皮細胞の病態形成に影響する」という論点を立てた。本研究ではこの 3 つの命題を解明するために *in vitro* および *in vivo* の実験系を構築してアプローチした。

## 3. 研究の方法

本研究で設定した 3 つの「問い」に答えるために R1 年度より 3 年間で以下の実験を実施した。

### (1) マウスおよびヒト胆汁サンプルからの EV の分離法の確立

肝細胞及び胆管上皮細胞から分泌される EV は有機酸や胆汁酸などとミセルを構成して粘稠度が高く通常の超遠心法などでは分離が困難である。そのため界面活性剤処理などの前処理を必要とし、その処理検体を超遠心法や比重遠心法、さらにカラムなどによる分離を行なった。現時点では得られた分画が本当に EV であるかという検証のゴールドスタンダードはナノトラッキング法 (NTA) を用いた液中に存在する 30nm ~ 1000nm のナノ粒子の特性評価である。この手法は各粒子の直接的な観察と拡散の測定を個別かつ同時に行なうもので、この粒子ごとに測定する方法により、粒度分布および粒子数の測定結果が高い分解能で得ることができる。その上、粒子径と粒子数の両方を測定しうる。この手法により EV の 3 つの存在形式のうちいかなる由来の EV であるかの推測も可能である。この NTA 法を用いることにより分離した EV の質的・量的解析が可能となる。さらに分離した EV の分画毎に含まれる内容物について、質量解析装置、デジタル PCR 装置による微量解析を行なう。NTA 法の機器以外の本研究に必要な装置は申請者の研究室及び山形大学メディカルサイエンス推進研究所に常設されているものを使用した。ヒト胆汁うっ滞性肝疾患の胆汁サンプルがすでに審査を受け承認された研究計画に基づき実施した。

### (2) 胆汁中 EV の胆管上皮細胞に対する作用の検討

上記 NTA 法で確認した分離 EV を、培養ヒト及びマウス胆管上皮細胞の微絨毛を有する管腔側より添加し、細胞の変化を生理学的 (胆汁分泌能、重炭酸濃度)、免疫学的 (細胞内各種サイトカイン mRNA の変化、管腔側培養上清中のフロービーズアレイアッセイ)、線維化能 (MMP やコラーゲン産生能) について検討した。さらに EV 添加された胆管上皮細胞から二次的に新たに放出さ

れる EV を基底側腔及び管腔側よりそれぞれ回収し、2 次的な細胞間クロストークについても同様の検討をした。解析に必要な培養機器、デジタル PCR 装置、プレートリーダーや核酸分離装置などは申請者の研究室に常設され多ものを使用した。

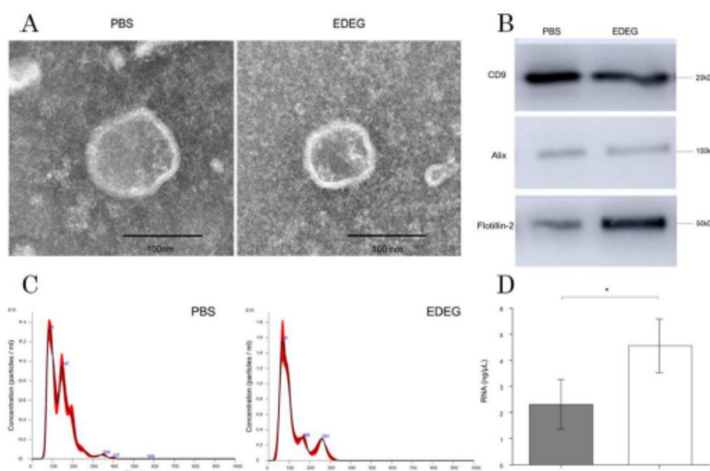
(3) 胆汁うっ滞性肝疾患では EV に含まれる因子がさらに周囲の胆管上皮細胞の病態形成に影響するかを検討するための in vitro および in vivo 実験系の確立

まず上記(1)で開発した手法で得られたヒト疾患（原発性硬化性胆管炎 PSC など）からの胆汁臨床検体から分離した EV、および胆汁うっ滞性肝疾患 in vitro マウスモデルから分離した EV を用いて、それぞれを in vitro の極性を保った培養系の管腔側に添加実験を行い、生理学的な機能（重炭酸分泌能、cAMP 濃度）、免疫学的パラメーター（サイトカイン産生能、HLA 表出、細胞老化）及び線維化（コラーゲン産生、MMP 産生能）を測定した。これらの測定に必要なリアルタイム PCR 装置、イメージリーダーさらに微量系の核酸定量に必要なデジタル PCR 装置は申請者の研究室に常設されたものを使用し、専従の補佐員により良好なメンテナンスを受けているものを使用した。

#### 4. 研究成果

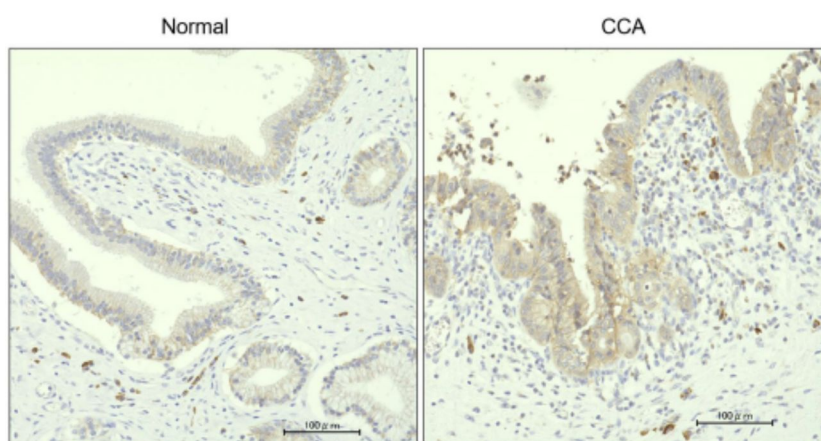
(1) マウスおよびヒト胆汁サンプルからの EV の分離法の確立

肝細胞及び胆管上皮細胞から分泌される EV は有機酸や胆汁酸などとミセルを構成して粘稠度が高く通常の超遠心法などでは分離が困難であった。そのためみらか研究所と共同研究を実施



し、特殊な前処置薬を開発し、胆汁からの分離に最適な方法を考案した。(業績1)その結果従来のPBSを使用する方法に比して、より高純度にEVの分離が可能である方法を見出した(図1、A,B,C,Dそれぞれの画像において左のPBSを用いた方法に比して、本研究で開発した方法はより純度及び濃度が良好なEVを分離し得たことを電子顕微鏡、電気泳動法、ナノサイト法などで確認した)

さらに、本分離法を用いたEVの分離によりヒト胆汁うっ滞性肝疾患の胆汁サンプルが疾患ごとに異なる組成やバイオマーカーを持つことを明らかにした。(業績1)(図2)



本研究法で開発した方法で Claudin3 が胆管癌症例の胆汁中 EV で特異的に増加し、実際の臨床検体の病変部で増強していることを初めて明らかにした。

(2) 胆汁中 EV の胆管上皮細胞に対する作用の検討

上記 NTA 法で確認した分離 EV を、培養ヒト及びマウス胆管上皮細胞の微絨毛を有する管腔側より添加し、細胞の変化を生理学的（胆汁分泌能、重炭酸濃度）、免疫学的（細胞内各種サイトカイン mRNA の変化、管腔側培養上清中のフロービーズアレイアッセイ）、線維化能（MMP やコラーゲン産生能）について検討した。その結果、基底膜側と管腔側に分離される EV は、質・量とも異なっており異なる生理活性を持つことが明らかになった。さらに EV 添加された胆管上皮細胞から二次的に新たに放出される EV を基底側腔及び管腔側よりそれぞれ回収し、線維芽細胞や免疫細胞などの 2 次的な細胞間クロストークについても同様の検討をした。その結果基底側側に放出される EV がより線維化や炎症反応に関与することがみいだされた（未発表データ）。

(3) 胆汁うっ滞性肝疾患ではEVに含まれる因子がさらに周囲の胆管上皮細胞の病態形成に影響するかを検討するための in vitro および in vivo 実験系の確立

まず上記(1)で開発した手法で得られたヒト疾患(原発性硬化性胆管炎 PSC など)からの胆汁臨床検体から分離したEV、および胆汁うっ滞性肝疾患 in vitro マウスモデルから分離したEVを用いて、それぞれを in vitro の極性を保った培養系の管腔側に添加実験を行い、生理学的な機能(重炭酸分泌能、cAMP 濃度)、免疫学的パラメーター(サイトカイン産生能、HLA 表出、細胞老化)及び線維化(コラーゲン産生、MMP 産生能)を測定した。その結果、インターフェロン及び胆汁酸刺激によるヒト PSC in vitro モデルにおいて正常状態に比してより線維化増強作用を持つ線維化増強作用を基底側 EV が持つことを見出した。本検討が、疾患特異的なのかについて、さらに良性の疾患モデル(胆管結紮ラット)を用いてさらに含まれるEVを回収して検討中である(未発表データ)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda C, Haga H, Makino N, Inuzuka T, Kurimoto A, Ueda T, Matsuda A, Kakizaki Y, Ishizawa T, Kobayashi T, Sugahara S, Tsunoda M, Suda K, Ueno Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Utility of Claudin-3 in extracellular vesicles from human bile as biomarkers of cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81023-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Haga H., Sato H., Koseki A., Saito T., Okumoto K., Hoshikawa K., Katsumi T., Mizuno K., Nishina T., Ueno Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 A machine learning-based treatment prediction model using whole genome variants of hepatitis C virus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0242028.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 胆管がんのバイオマーカー	発明者 池田千咲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-74425	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------