

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590822

研究課題名（和文）胆汁うっ滞性肝疾患病態形成における内因性レトロウイルス遺伝子の関与の検討

研究課題名（英文）Evaluation of endogenous retroviral genes at human cholestatic liver diseases.

研究代表者

上野 義之（UENO YOSHIYUKI）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70282126

研究成果の概要（和文）：

胆汁うっ滞性肝疾患の多くはその病因が不明であり原発性肝硬変（PBC）などでは自己免疫の関与が想定されている。近年他の領域の自己免疫疾患でレトロウイルス感染症の病態形成への関与が報告されたため、本研究では動物モデルやヒト検体での同ウイルスの探索を行い、さらにより高感度の検出系である次世代シーケンサーを用いた基礎検討を行い、一部の動物モデルの肝臓より内因性レトロウイルスの遺伝子産物を検出した。

研究成果の概要（英文）：

The pathogenesis of human cholestatic liver diseases remains to be unknown. Recently, the involvement of endogenous retroviral genes is reported in various human autoimmune diseases. In this study, we evaluated these genes in human samples as well as animal model. We detected some retroviral derived genes in female mouse liver. Furthermore, we have done several conditioning experiments using sensitive deep sequencing analyzer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011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：肝臓学

## 1. 研究開始当初の背景

胆汁うっ滞性肝疾患には原発性胆汁性肝硬変（以下 PBC）、原発性硬化性胆管炎（以下 PSC）、カロリー病などの疾患があるが、その多くの病因は不明である。特に、PBC については自己免疫の機序が想定されているが、その根拠として、①患者血清に抗ミトコンドリア抗体（AMA）が高頻度に存在する、②リン

パ球主体の細胞浸潤が病理的特徴である、③患者の T リンパ球に、AMA の主抗原である PDH に対する反応異常性が証明される、などがある。しかし、単なる自己免疫性疾患と異なり、なんらかの外来因子による病態成立を示唆する学説もあり、その根拠としては、①通常の自己免疫疾患と異なり免疫抑制剤が奏功しない、②PDH 抗原自体は細胞特異性がなく

普遍的に種々の細胞に存在する、③そのため、PBC における標的細胞である胆管上皮細胞に対する選択性の機序が不明である、④PBC 患者検体（血清、肝生検など）より、外来性抗原（細菌構成蛋白、ウイルス遺伝子など）などが検出できるという報告、などがあげられる。しかし、いずれも統一された見解を構成するまでの証拠はないのが現況である。その中で、最も近年話題となっているのは、PBC の患者の血清および所属リンパ節より、ある種のレトロウイルスの遺伝子が検出できるというものがある (Xu et al PNAS 100:1844)。これは、この報告に引き続く PBC に対する抗レトロウイルス療法の臨床試験に対する理論的根拠となっているが、その後の追試では否定的な見解が多い。

一方、PBC の病態解明のために、多くの動物モデルの作成が試みられてきたが、その中でも近年、NOD.c3c4 マウスが注目されている。このマウスは、ヒト PBC 同様に、①AMA を産生する、②リンパ球主体の胆管障害を起こす、③肝不全にて死亡する、といった類似性を有するものであるが、ヒト PBC と異なる病理学的特徴として、胆管上皮の異常増殖に起因するのう胞形成がある (Koarada J Immunol 173: 2315) (左図、Keratin 染色)。我々はこの、のう胞形成に関して、胆管上皮細胞特異的な Fas 抗原 (CD95) 発現異常が関与していることを報告した (後述業績 8) が、これのみでは AMA の産生といった自己免疫現象を説明することは不可能である。原発性胆汁性肝硬変 (以下 PBC) は、肝内胆管の進行性破壊と消失が特徴的な原因不明の疾患で、ウイルスもしくはウイルス関連因子の関与も推察されている。

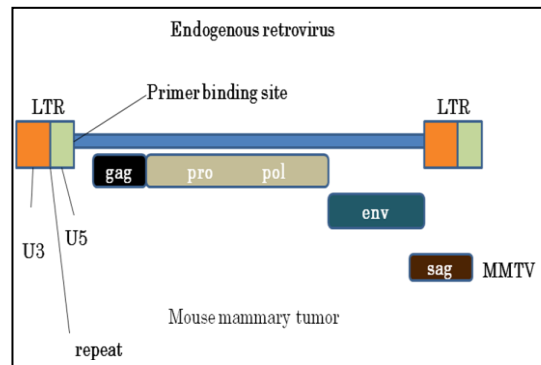
## 2. 研究の目的

NOD3C4 マウス及び PBC などヒト胆汁うっ滞性肝疾患における内因性のレトロウイルス由来の遺伝子断片の病態形成に関わる役割を探索した。また、さらに高感度の測定計を確立するために次世代シーケンサーを用いて、PBC 発症の原因解析を、①直接ウイルス genome をシーケンシングする方法、②血清内の遊離 miRNA を抽出することで検討した。

## 3. 研究の方法

肝臓、及び単離した胆管上皮細胞、及び血清などから核酸を抽出し、それらを検体として PCR 法を用いて、内因性レトロウイルスの遺伝子配列の有無を探索した。具体的には、主に NOD.c3c4 マウスの胆管上皮細胞より、内因性レトロウイルス由来の遺伝子、特にレトロウイルスの特徴でもある両端の LTR 配列には含まれる形での、*gag*、*pro*、*env*、*pol*、

*superantigen* の有無について分子生物学的な検討を行った。(下図)



さらに Superantigen は TCRV  $\beta$  の一部のサブタイプと MHC 分子と結合を非特異的に誘導しリンパ球の活性化を誘導するので、このような作用が NOD.c3c4 マウスのリンパ球であるか検討した。また、provirus がマウス genome に組み込まれ、マウスの種によって viremia を呈する場合や、ほとんど不活化され転写産物が認められないものまで多岐に及ぶため、適当なコントロールマウスを用いて、この内因性レトロウイルス由来遺伝子の有無を検討したが、一定の見解を得るまでの測定は不可能であった。

したがって、既存の方法ではこれ以上の確定的な回答を得ることが困難と考へて、新規の測定計の樹立を目指した探索的な検討を行った。

すなわち、より多くの遺伝子断片を検討できる次世代シーケンサーを用いて、このような検討が可能かについての探索的な検討も行った。より具体的には、まず① PBC 患者での検討の前に、この手法により外来性のウイルスを同定可能かどうか、C 型肝炎感染ヒト血清にて検討をおこなった。血清より遊離 RNA を抽出、mRNA-seq sample prep kit を用いて、ライブラリーを作成し、Illumina シーケンサーにてシーケンシング。② PBC 患者の血清内遊離 miRNA のプロファイリングを検討。血清より Trizol LS を用いて Total RNA を抽出、TruSeq small RNA sample prep kit を用いて、ライブラリーを作成し、シーケンシングを行った。

得られた膨大なリードは、bwa, samtools, cutadapt, UCSC などのプログラムを用いて、アセンブリーして統計学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

NOD3C4 マウスの検体からの内因性レトロウイルスの遺伝子配列の検出結果は、下図の通り、一部の雌マウスの肝臓のみに発現を認めた。

	Serum	Liver	BD	Chol	Sp	Kid
<b>gag</b>	N.T.	Pos (F)	N.C.	N.C.	Neg	N.T.
<b>pro</b>	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
<b>env</b>	N.T.	Pos (F)	N.C.	N.C.	Neg	N.T.
<b>pol</b>	N.T.	Pos (F)	N.C.	N.C.	Neg	Neg
<b>LTR</b>	Neg	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

F: female  
BD: bile duct  
Chol: cholangiocyte  
Sp: spleen  
Kid: kidney

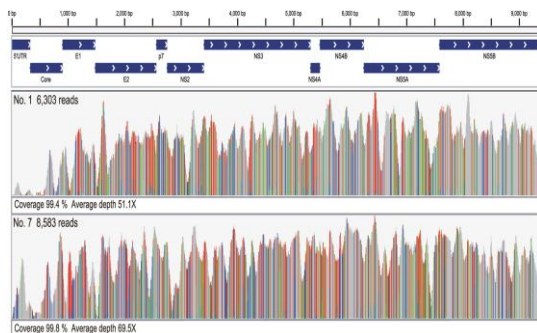
しかし、肝内病変を示しているにもかかわらず、マウスの個体により検出が異なっていたため、より高感度かつ定量性に富む検出系の確立が求められるとの判断に至った。

次世代シーケンサーを用いた解析に関しては、最初に基礎条件設定のため、C型肝炎感染血清2検体の解析をおこなった。今回行った基礎的検討では、得られた試料の品質がその後の解析に大きな影響をもたらすことがわかり、以下の解析では一定の品質を担保された検体のみを用いて解析を行った。下図に今回用いた典型的な試料の品質を示す。



今回の一連の検討では、1,000万-3,000万リード/1レーン解析され、C型肝炎由来のリードは0.1%程度であった。

ヒト由来ではない外来性の遺伝子断片も多数認められた。そのため、ヒト胆汁うっ滞性疾患の新たな病因解析の手段として、次世代シーケンサーを用いた方法が有力な手段となり得ることがわかった。また逆に、C型肝炎患者以外の試料からは、C型肝炎ウイルスに由来する遺伝子断片は全く検出できず(下図)、



次世代シーケンサーを用いた解析が非常に特異性が高いことも示された。また同じ慢性C型肝炎の患者であっても、その血液中のウイルスの多様性は全く異なっており、次世代シーケンサーをこれらの違いを明快にかつ定量性に豊かな形で検出可能であることが示された。② PBC患者血清5検体の血清内遊離miRNAのプロファイリングを行い、B型肝炎、C型肝炎、健常者と多群比較シクスタリングANOVA(分散分析)で $P < 0.05$ を抽出した。P-valueが計算できたものは670個あり、解析の結果得られたものは、110個のmiRNA。110個のmiRNAについて発現パターンによるクラスタリングを行い、ヒートマップを作成したところ、PBCは一つの群を形成した。考察 次世代シーケンサーはウイルス解析においても強力なツールになることが示され、新規ウイルスを同定することも可能である。PBC患者血清にて今後、解析予定することにより、疾患の新たな特徴を見い出せる可能性があり、発症原因の解明に迫ることが可能であると思われる。

## 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8件)

1. Ninomiya M, Ueno Y, Shimosegawa T. PBC: Animal Models of Cholangiopathies and Possible Endogenous Viral Infections. International journal of hepatology. (査読有) 2012;2012:649290.
2. Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T. Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. Journal of clinical microbiology. (査読有) 2012;50(3):857-866.
3. Meng F, Francis H, Glaser S, Han Y, DeMorrow S, Stokes A, Staloch D, Venter J, White M, Ueno Y, Reid LM, Alpini G. Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. Hepatology. (査読有) 2012;55(1):209-221.
4. Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, Demorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, Dipette DJ, Onori P, Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. American journal of physiology Gastrointestinal and liver

physiology. (査読有) 2011; 301(2): G297-305.

5. Woo K, Sathe M, Kresge C, Esser V, Ueno Y, Venter J, Glaser SS, Alpini G, Feranchak AP. Adenosine triphosphate release and purinergic (P2) receptor-mediated secretion in small and large mouse cholangiocytes. Hepatology. (査読有) 2010;52(5):1819-1828.

6. Ueno Y, Ambrosini YM, Moritoki Y, Ridgway WM, Gershwin ME. Murine models of autoimmune cholangitis. Curr Opin Gastroenterol. (査読有) 2010;26(3):274-279.

7. Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Treatment of Primary Biliary Cirrhosis: A new challenge? Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology. (査読有) 2010;40(1):61-68.

8. 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. Laboratory investigation (査読有) 2009;89(12):1374-1386.

[学会発表] (計1件)

Francis HL, Meng F, Onori P, Venter J, White M, Ueno Y, Franchitto A, Renzi A, Gaudio E, Alpini G. H1 and H2 Histamine Receptor Agonists Differentially Stimulate the Regeneration of Small and Large Cholangiocytes by Activation of Ca(2+) and Camp-Dependent Mechanisms, Respectively. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases 2011/11/7 San Francisco, 米国

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 義之 (UENO YOSHIYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 70282126

(2) 研究分担者

福島 耕治 (KOJI FUKUSHIMA)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 20400476

(平成19-20年度 研究分担者)

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: