

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：87301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860576

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変の発症・病態形成における新規疾患感受性遺伝子の役割

研究課題名(英文) Role of new disease-susceptibility gene in the development and pathogenesis of PBC

研究代表者

相葉 佳洋 (AIBA, YOSHIHIRO)

独立行政法人国立病院機構(長崎医療センター臨床研究センター)・臨床研究センター・研究員

研究者番号：70450955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人PBCの新規疾患感受性遺伝子として同定されたTL1Aは、PBC患者の血中・肝局所において顕著に増加していた。血中TL1Aは、治療薬であるウルソデオキシコール酸によりPBC非進行群において有意に減少するが、PBC進行群では持続高値であることが明らかとなった。これらの結果は、TL1AがPBC、特に進行群患者において新たな治療標的である可能性を示唆する。また、*in vitro*と*in vivo*の解析から、単球、マクロファージ、胆管上皮細胞から産生されるTL1Aは直接的に胆管障害に関与するよりも、Tリンパ球を介しPBCの病態形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Systemic and local levels of TL1A, a newly identified disease-susceptibility gene for PBC in a Japanese population, were increased in PBC patients. In response to UDCA treatment, serum TL1A levels were significantly decreased in early-stage PBC patients. On the other hand, they remained higher in late-stage PBC patients even after UDCA treatment. These results potentially indicate that TL1A might be a new therapeutic target for PBC, especially for the late-stage patients. In addition, *in vivo* and *in vitro* analyses indicate that TL1A signaling may be involved in PBC pathogenesis via infiltrating T lymphocytes rather than direct injury of intrahepatic bile ducts.

研究分野：肝臓病学

キーワード：原発性胆汁性肝硬変 疾患感受性遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により日本人 PBC の新規疾患感受性遺伝子 *TNFSF15* の同定に成功した。*TNFSF15* によりコードされる TL1A タンパクは、炎症性サイトカイン/Toll-like receptor (TLR) リガンドなどの刺激により血管内皮細胞やリンパ球で誘導されるサイトカインで、細胞増殖、アポトーシス、T 細胞の Th1、Th17 分化に関与する TNF スーパーファミリーリガンドである。これまでに、PBC の病理学的特徴として、胆管細胞のアポトーシス、胆管周囲の Th1 優位な微小環境、Th17 細胞の胆管周囲への浸潤などが報告されており、これらは TL1A が PBC の発症や病態形成へ深く関与している可能性を示唆している。

また、*TNFSF15* は、日本人の PBC とクローン病に対する最も強い疾患感受性遺伝子 (非 HLA 領域において) であるが、両疾患には、肉芽種形成、上皮細胞傷害などの共通する病態が認められることから、*TNFSF15* を含めた共通の病態形成経路の存在が示唆される。

### 2. 研究の目的

TL1A の PBC 発症・病態形成への関与を明らかにする為に、PBC の血清・肝局所における TL1A の発現解析、培養胆管細胞における TL1A 産生機構の解析、*in vitro*、*in vivo* 解析による TL1A シグナルの役割を検討した。また、日本人 PBC とクローン病の間で、*TNFSF15* 以外に共通する疾患感受性遺伝子の同定をおこなった。

### 3. 研究の方法

PBC 患者 110 症例、非 PBC 肝疾患患者 45 症例 (C 型肝炎 (CHC) 26 症例、自己免疫性肝炎 (AIH) 19 症例)、健常人 46 例を対象とし、血清・肝局所における TL1A 発現を ELISA、定量 PCR により測定した。TL1A 発現と病理スコア (線維化、肝炎、疾患活動性) の関連を検討した。PBC 肝生検組織を用いて免疫組織化学染色 (TL1A, DR3, CD3, CD68) をおこなった。

ヒト培養胆管上皮細胞を用いて、TL1A、TL1A のレセプターである DR3 発現を PCR、フローサイトメトリーにより解析した。ヒト培養胆管上皮細胞を TL1A で処理し、培養上清中サイトカイン、ケモカイン、カスパーゼ -3/7 活性測定によりアポトーシスの定量をおこなった。ヒト末梢血リンパ球から磁気ビーズを用いてナイーブ CD4 陽性細胞を分離し、Th17 細胞への分化環境下で TL1A の添加培養をおこなった。

日本人 PBC コホート (PBC1279 症例、健常人 1015 例) とクローン病コホート (クローン病 1312 症例、健常人 3331 例) を用いて、15 名の日本人 PBC 感受性遺伝子と日本人クローン病疾患感受性との関連、33 名の日本人クローン病感受性遺伝子と日本人 PBC 疾患感受性との関連を検討した。

### 4. 研究成果

#### PBC の血清・肝局所における TL1A の発現解析

PBC 患者の血中において TL1A が上昇していること、治療薬であるウルソデオキシコール酸投与により血中 TL1A は PBC 非進行群において有意に減少するが、PBC 進行群では持続高値であることが明らかとなった。PBC 患者の肝内における TL1A 遺伝子発現は、PBC の疾患活動性が高い群において、疾患活動性が低い群と比較し有意に高値であった。これらの結果は、TL1A が PBC の病態形成に関与するのみならず、PBC 進行群の新たな治療標的となる可能性を示唆する。TL1A は、CHC、AIH 患者の血中・肝局所においても上昇していたことから、肝疾患の慢性炎症に関与している可能性が示唆された。

正常肝組織における TL1A 産生細胞は、胆管細胞、血管、クッパー細胞、浸潤単核球であった。PBC 肝組織では、傷害胆管ならびに傷害胆管の周囲に多く認められる CD68 陽性肝浸潤単核球 (単球・マクロファージ) に強い発現が認められた。

#### 胆管細胞における TL1A 産生機構の解析

PBC 肝局所の TL1A 増加の一因として、胆管上皮細胞の活性化が関与している可能性が考えられたので、培養胆管上皮細胞における TL1A 産生機構の解析をおこなった。培養胆管上皮細胞における解析により、胆管における TL1A の発現が PCR、蛍光免疫染色、フローサイトメトリー解析により確認された。培養胆管上皮細胞は、細胞表面に膜型 TL1A を発現し、Phorbol 12-Myristate 13-acetate による活性化により TL1A 遺伝子発現ならびに膜型 TL1A タンパクの発現を上昇させ、Ectodomain shedding を介し可溶性 TL1A を産生することが明らかとなった。一方で、血管内皮細胞において TL1A 誘導因子と報告されている炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 刺激では、培養胆管上皮細胞の TL1A 産生誘導を認めなかった。

#### PBC における TL1A シグナルの役割

PBC 病態形成における TL1A シグナルの役割を明らかにするために、まず PBC 肝生検組織を用いて TL1A のレセプターである DR3 発現細胞を解析した。DR3 は、胆管細胞、肝細胞、CD3 陽性浸潤単核球 (T 細胞) で陽性であった。Th17 細胞である CD3 陽性 IL-17 陽性細胞も DR3 陽性であった。

次に、TL1A が胆管上皮細胞のサイトカイン産生やアポトーシスに及ぼす影響を検討した。TL1A は培養胆管上皮細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生や抗 Fas 抗体、TRAIL、CD40 リガンドによる培養胆管上皮細胞のアポトーシス誘導に顕著な影響を及ぼさなかった。一方で、TL1A は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の Th17 細胞への分化を促進した。以上の結果から、単球、マクロファージ、胆管上皮細胞から産生される TL1A は、胆管上皮細胞

胞のサイトカイン・ケモカイン産生、アポトーシス誘導を介し直接的に胆管障害に関与するよりも、Tリンパ球を介しPBCの病態形成に関与する可能性が示唆された。

### 日本人PBCとクローン病に共通する疾患感受性遺伝子の同定

日本人のPBCとクローン病に共通する疾患感受性遺伝子として *TNFSF15*, *CXCR5*, *ICOSLG*, *IL12B*, *STAT4*, *NFKB1* を同定した。両疾患の発症に対し、*TNFSF15*, *CXCR5*, *ICOSLG* のリスクアレルは同一であったが、*IL12B*, *STAT4*, *NFKB1* のリスクアレルは異なっていたことから、これらの遺伝子多型は両疾患の病態形成の共通性と異質性に関与している可能性が考えられた。PBCの発症経路を考察する上で重要な知見になると考える。

#### 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4件)

1. Yoshihiro Aiba, Keiko Yamazaki, Nao Nishida, Minae Kawashima, Yuki Hitomi, Hitomi Nakamura, Atsumasa Komori, Yuta Fuyuno, Atsushi Takahashi, Takaaki Kawaguchi, Masakazu Takazoe, Yasuo Suzuki, Satoshi Motoya, Toshiyuki Matsui, Motohiro Esaki, Takayuki Matsumoto, Michiaki Kubo, Katsushi Tokunaga, Minoru Nakamura. Disease susceptibility genes shared by primary biliary cirrhosis and Crohn's disease in the Japanese population. *Journal of Human Genetics*. 2015. doi: 10.1038/jhg.2015.59 (掲載確定印刷中). 査読有

2. Yuki Hitomi, Minae Kawashima, Yoshihiro Aiba, Nao Nishida, Mika Matsushashi, Hitoshi Okazaki, Minoru Nakamura, Katsushi Tokunaga. Human primary biliary cirrhosis-susceptible allele of rs4979462 enhances *TNFSF15* expression by binding NF-1. *Human Genetics*. 2015;134(7):737-47. 査読有

3. Yoshihiro Aiba, Kenichi Harada, Atsumasa Komori, Masahiro Ito, Shinji Shimoda, Hitomi Nakamura, Shinya Nagaoka, Seigo Abiru, Kiyoshi Migita, Hiromi Ishibashi, Yasuni Nakanuma, Nao Nishida, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, Hiroshi Yatsushashi, Minoru Nakamura. Systemic and local expression levels of TNF-like ligand 1A and its decoy receptor 3 are increased in primary biliary cirrhosis. *Liver International*. 2014;34(5):679-88. 査読有

4. Yoshihiro Aiba and Minoru Nakamura. The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*. 2013. doi: 10.1155/2013/258164. 査読有

[学会発表](計11件)

1. Yoshihiro Aiba, Keiko Yamazaki, Nao Nishida, Minae Kawashima, Yuki Hitomi, Atsumasa Komori, Michiaki Kubo, Katsushi Tokunaga, Minoru Nakamura. SHARED DISEASE-SUSCEPTIBILITY GENES BETWEEN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS AND CROHN'S DISEASE IN THE JAPANESE POPULATION. The 50th International Liver Congress. 2015.4.25. ウィーン(オーストリア)

2. Yuki Hitomi, Minae Kawashima, Yoshihiro Aiba, Nao Nishida, Minoru Nakamura, Katsushi Tokunaga. Identification of primary biliary cirrhosis - susceptible variant in human *TNFSF15* locus and its functional analysis. 第43回 日本免疫学会総会. 2014.12.12. 国立京都国際会館(京都府,京都市).

3. 相葉佳洋、山崎慶子、川嶋実苗、西田奈央、小森敦正、久保充明、徳永勝士、中村稔. 日本人の原発性胆汁性肝硬変とクローン病における疾患感受性遺伝子の共通性と異質性. 第59回 日本人類遺伝学会. 2014.11.19-22. タワーホール船堀. (東京都)

4. 相葉佳洋、小森敦正、伊東正博、右田清志、人見祐基、川嶋実苗、西田奈央、徳永勝士、八橋弘、中村稔. PBC肝組織のTL1Aの局在とTL1Aがヒト胆管上皮細胞に及ぼす影響の検討. 第42回 日本臨床免疫学会総会. 2014.9.25-27. 京王プラザホテル(東京都)

5. 相葉佳洋、山崎慶子、川嶋実苗、西田奈央、小森敦正、久保充明、徳永勝士、中村稔. 日本人の原発性胆汁性肝硬変とクローン病に共通する疾患感受性遺伝子の検討. 第51回 日本消化器免疫学会. 2014.7.11. 京都大学医学部芝蘭会館. 京都府(京都市)

6. Yoshihiro Aiba, Atsumasa Komori, Masahiro Ito, Kiyoshi Migita, Hiroshi Yatsushashi, Minoru Nakamura. Analysis of TL1A production mechanism in human biliary epithelial cells. The 49th International Liver Congress. 2014.4.9-12. ロンドン(イギリス)

7. Yoshihiro Aiba, Komori A, Ito M, Migita K, Yatsushashi H, Nakamura M. The mechanism of TL1A production in human biliary epithelial cells. 2013.12.11-13. Annual Meeting of The Japanese Society for

Immunology, 2013. (第42回日本免疫学会総会) 2013. 12.11. 幕張メッセ. 千葉県(千葉市)

8. 相葉佳洋、小森敦正、伊東正博、右田清志、八橋 弘、中村 稔. ヒト胆管上皮細胞における TL1A 産生機構の解析. 第41回日本臨床免疫学会総会. 2013.11.27-29. 海峡メッセ下関. 山口県(下関市)

9. Yoshihiro Aiba, Kenichi Harada, Atsumasa Komori, Masahiro Ito, Shinji Shimoda, Shinya Nagaoka, Seigo Abiru, Kiyoshi Migita, Hiromi Ishibashi, Yasuni Nakanuma, Nao Nishida, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, Hiroshi Yatsushashi, Minoru Nakamura. Systemic and local expression of TNF-like ligand 1A and its decoy receptor 3 are increased in primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) the Liver Meeting. 2013.11.3. ワシントン D.C. (アメリカ)

10. 相葉佳洋、原田憲一、小森敦正、阿比留正剛、長岡進矢、右田清志、伊東正博、中沼安二、八橋 弘、中村 稔. 原発性胆汁性肝硬変の肝局所における TL1A 産生機構の解明. 第50回日本消化器免疫学会総会. 2013.8.1. ホテルグランドヒル市ヶ谷. (東京都)

11. 相葉佳洋、原田憲一、小森敦正、伊東正博、阿比留正剛、長岡進矢、石橋大海、中沼安二、八橋 弘、中村 稔. 日本人原発性胆汁性肝硬変患者における TL1A の役割. 第49回日本肝臓学会総会. 2013.6.6-7. 京王プラザホテル. (東京都)

〔図書〕(計1件)

原発性胆汁性肝硬変患者における TL1A と DcR3 の臨床的意義. 【特集: 自己免疫性肝臓疾患の病態解明の進歩.】

相葉佳洋、小森 敦正、長岡 進矢、阿比留正剛、右田 清志、伊東 正博、石橋 大海、八橋 弘、中村 稔. 消化器と免疫. 49:15-17.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

相葉 佳洋 (AIBA YOSHIHIRO)

独立行政法人国立病院機構 長崎医療センター臨床研究センター 研究員

研究者番号: 70450955