

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08342

研究課題名(和文) マイクロRNAに着目したカロリ病+先天性肝線維症の新たな治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic approaches for biliary cystogenesis of Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis based on the analysis of microRNAs

研究代表者

佐藤 保則 (Sato, Yasunori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30324073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：カロリ病+先天性肝線維症の動物モデルであるPCKラットを用いた検討で、PCKラット培養胆管細胞ではmiR-125b-1-3pの発現低下とこれに関連したSmoothenedの発現亢進があり、Hedgehogシグナル伝達系の活性化による胆管細胞の過剰な増殖があることをin vitroで見出した。PCKラットにSmoothenedアンタゴニスト(cyclopamine)を投与することで、肝内胆管の拡張と腎嚢胞の形成をin vivoで有意に抑制することに成功した。以上の結果から、Hedgehogシグナル伝達系の阻害はカロリ病+先天性肝線維症の新たな治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The polycystic kidney (PCK) rat was analyzed as an animal model of Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis in this study. In vitro experiments revealed that PCK cholangiocytes were characterized by the reduced expression of miR-125b-1-3p, and the resultant overexpression of Smoothened and the Hedgehog signaling activation led to overgrowth of PCK cholangiocytes. In vivo administration of Smoothened antagonist (cyclopamine) significantly reduced the severity of bile duct dilatation and kidney cyst formation of the PCK rats. These results indicate that inhibition of the Hedgehog signaling represents a potential target of therapy for Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis.

研究分野：人体病理学

キーワード：肝臓 胆道 分子病理

1. 研究開始当初の背景

カロリ病は胆管細胞の過剰な増殖、分泌に起因する肝内胆管の多発性、嚢状の拡張をきたす疾患で、高率に先天性肝線維症 (congenital hepatic fibrosis, CHF) を合併する。カロリ病+CHF は常染色体劣性多発嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD) の肝胆管病変としても知られる。カロリ病+CHF, ARPKD の病態形成には primary cilia の異常が深く関与し、その病態は常染色体優性多発嚢胞腎 (autosomal dominant PKD, ADPKD) と共通する点も多い。

これまでの研究で、カロリ病+CHF, ARPKD の治療薬としてソマトスタチンアナログの有効性が注目されており、その他、histone deacetylase 6 や Cdc25A phosphatase, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, matrix metalloproteases などが治療標的となりうる事が報告されている。カロリ病+CHF や ARPKD, ADPKD の病態形成におけるマイクロ RNA の関与を検討した論文は数編あるのみで、その詳細は十分解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、カロリ病+CHF および ARPKD の動物モデルである polycystic kidney (PCK) ラットを用い、その病態形成の機序を特にマイクロ RNA に着目した解析から明らかにすることで、カロリ病+CHF の新たな治療標的を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験は金沢大学動物実験委員会、ヒト試料を用いた研究は金沢大学医学倫理審査委員会の承認を得て行った。

PCK ラット、正常 (SD) ラットの培養胆管細胞から total RNA を抽出後、マイクロアレイにより胆管細胞が発現するマイクロ RNA の網羅的解析を行った。発現量に差のあったマイクロ RNA の標的予測を行い、PCR ラット培

養胆管細胞で Smoothed (Smo) の発現亢進があることを予測した。その予測に基づき、Smo を介する細胞内シグナル伝達系である Hedgehog シグナル伝達系に着目し、以降の検討を行った (なお、Hedgehog シグナル伝達系は、primary cilia を介する細胞内シグナル伝達系としてよく知られた経路の一つである)。

培養胆管細胞における Hedgehog シグナル伝達関連分子 (sonic hedgehog [Shh], patched1, Smo, Gli1, Gli2) および Gli の標的分子である cyclin D1 の発現を RT-PCR, ELISA, 免疫染色で検討した。一連の分子の発現はラットおよびヒトカロリ病の肝組織切片を用いた免疫染色でも検討した。

Hedgehog 阻害剤として cyclopamine (Smo アンタゴニスト) を使用し、培養胆管細胞の細胞増殖活性を WST-1 assay, 嚢胞形成能を 3 次元培養, アポトーシスの程度を TUNEL 法と ssDNA ELISA で評価した。また、標的とする miRNA mimic のトランスフェクトを行い、細胞増殖活性と Smo の発現変動を検討した。

In vivo での検討として、cyclopamine (10 mg/kg) をラットに 4 週間、腹腔内に連日投与し、肝胆管病変と腎嚢胞に及ぼす効果を検討した。肝内胆管拡張と肝線維化、腎嚢胞の程度は組織切片を用いた morphometry により評価した。また、肝組織切片を用いて Ki67 と cyclin D1 に対する免疫染色を行い、胆管細胞における Ki67 標識率と cyclin D1 標識率を検討した。肝線維化に関連した検討として、肝組織から total RNA を抽出し、線維化関連分子の発現を RT-PCR で検討した。

統計学的検討は *t*-test と Mann-Whitney *U*-test によった。

4. 研究成果

PCK ラット、正常ラットの培養胆管細胞を用いて、マイクロアレイにより網羅的にマイクロ RNA の発現解析を行った結果、18 種のマイクロ RNA は正常ラットと比較して PCK ラッ

トで発現量が 1/3 以下に低下し, 18 種のマイクロ RNA は PCK ラットで発現量が 3 倍以上に増加していた。これらの中で, PCK ラットにおいて最も発現が低下していた miR-125b-1-3p (PCK/normal ratio = 0.10) に着目し, Smo を miR-125b-1-3p の標的の一つとして予測した。

培養胆管細胞における Smo の発現を qRT-PCR と ELISA で検討した結果, PCK ラット培養胆管細胞では mRNA, 蛋白レベルにおける Smo の発現が正常ラットより有意に増加し, さらに PCK ラット培養胆管細胞への miR-125b-1-3p mimic のトランスフェクトは Smo の mRNA, 蛋白レベルでの発現を低下させた。

以上の結果から, PCK ラット胆管細胞では, Smo を介した細胞内シグナル伝達系である Hedgehog シグナル伝達系の活性化があり, それによる細胞増殖活性の亢進が胆管拡張に関与すると仮説し, 以降の検討を進めた。

PCK ラット, 正常ラットの培養胆管細胞に, Hedgehog シグナル伝達関連分子である Shh, patched1, Gli1, Gli2 の発現があることを RT-PCR と免疫染色で確認した。Hedgehog シグナル伝達系で標的分子の転写を活性化する Gli1, Gli2 に関して, 免疫染色による検討で Gli2 は PCK ラット, 正常ラットの培養胆管細胞の核にその発現をよく認めしたが, Gli1 は正常ラット培養胆管細胞の核に発現はほとんどなく, PCK ラットでは Gli1 の核内への移行をしばしば認めた。培養胆管細胞における Gli の標的分子である cyclin D1 mRNA (*Ccnd1*) は, PCK ラットで正常ラットより発現が亢進していた。

胆管細胞における Smo と cyclin D1 の過剰発現および Gli1 の核発現は, PCK ラットとヒトカリリ病の肝組織切片を用いた免疫染色でも確認した。

PCK ラット培養胆管細胞への cyclopamine 投与は細胞増殖活性と Gli1 の核内への移行

を抑制し, 3 次元培養で嚢胞形成を有意に抑制した。また, 胆管細胞への miR-125b-1-3p mimic のトランスフェクトは PCK ラット培養胆管細胞の細胞増殖活性を有意に抑制した。さらに, cyclopamine は PCK ラット培養胆管細胞の cyclin D1 の過剰発現を mRNA, 蛋白レベルで抑制した。

PCK ラットへの cyclopamine を in vivo で投与した結果, cyclopamine は PCK ラットでみられる血清学的な ALT と ALP の異常高値を有意に低下させた。Cyclopamine 投与により肝重量と腎重量に変化はなかったが, 肝臓と腎臓の切片を用いた morphometry による検討で PCK ラットの肝内胆管拡張と腎嚢胞は有意に抑制された (図 1, 2)。これに対応して, 胆管細胞における Ki67 標識率と cyclin D1 標識率は cyclopamine 投与により低下した。

Sirius red 染色を施した肝組織切片で評価した肝線維化の程度は, cyclopamine を投与した PCK ラットでやや軽減する傾向があったが, 統計学的な有意差はなかった ($P=0.09$) (図 3)。肝組織における collagen mRNA (*Col1a1*), alpha-SMA mRNA (*Acta2*) は PCK ラットの cyclopamine 投与群, 非投与群で有意差はなかった。

以上の結果から, PCK ラットの胆管細胞では miR-125b-1-3p の発現低下に関連して Smo の発現が亢進し, その下流で Gli を介して cyclin D1 が過剰発現することにより胆管細胞の増殖と胆管拡張を生じる機序が示唆された。本研究から, Hedgehog シグナルの阻害はカリリ病 + CHF の肝内胆管拡張, および ARPKD の腎嚢胞の抑制に有効な新たな治療法となる可能性が示唆された。

一連の研究成果を英文論文として The American Journal of Pathology 誌に投稿した結果, Major revision となり, 現在, 査読者から指摘のあった事項に関する追加実験を行っている。

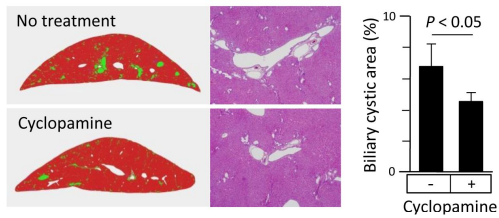


図1 PCKラットの肝内胆管拡張に対するcyclopamineの投与効果

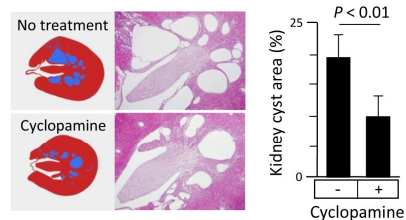


図2 PCKラットの腎嚢胞に対するcyclopamineの投与効果

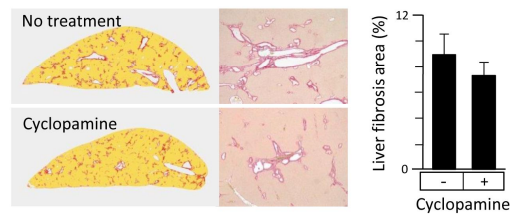


図3 PCKラットの肝線維化に対するcyclopamineの投与効果 (Sirius red染色)

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

1. 佐藤保則, 山村美奈子, 佐々木素子, 原田憲一. Hedgehog シグナルの阻害は Caroli 病動物モデル PCK ラットの肝内胆管拡張を抑制する. 第 54 回日本肝臓学会総会. 2018 年.

〔図書〕(計1件)

1. 佐藤保則, 中沼安二ほか. 胆道疾患を診る医師のための胆道病理テキスト. 南江堂. 2015 年. 138-140 ページ.

〔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

佐藤 保則 (SATO YASUNORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30234073

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()