

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2015～2016

課題番号：15K19357

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変の黄疸・肝不全型進行に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms involved in progression to jaundice and liver failure in primary biliary cholangitis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発性胆汁性胆管炎(PBC)の黄疸・肝不全型進行関連遺伝子としてNELFCD/CTS2を同定した。血中CTS2は、PBC黄疸・肝不全型進行群で有意に増加し、総ビリルビン、血小板、アルブミン、ASTと相関した。PBC黄疸・肝不全型進行群の肝細胞において、著しく増加したCTS2タンパクは毛細胆管側から細胞胞質内へ局在を変え、一部はリソソームから逸脱していた。HuH7にCTS2を過剰発現させると、アミノ酸飢餓、クロロキン誘導性の細胞死が促進された。これらの結果から、PBCの黄疸・肝不全型進行に発現増加と局在変化したCTS2が、細胞死を介して関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We identified NELFCD/CTS2 as loci associated with progression to jaundice and liver failure (end-stage) in primary biliary cholangitis (PBC). Serum CTS2 levels were significantly higher in end-stage than other stages (early-stage or late-stage) in PBC. The levels of CTS2 were significantly correlated with those of aspartate transaminase, total bilirubin, platelet count, and albumin in the blood of PBC. The levels of CTS2 protein in hepatocytes were increased with the progression of PBC. In end-stage PBC, the localization of CTS2 was translocated from peri-bile canalicular region to inner cytoplasmic region of hepatocytes, where a part of CTS2 was not co-localized with endosomal/lysosomal vesicles. Chloroquine and amino acid starvation enhanced cell death in CTS2 transfected HuH7. These results indicated that the increased expression and altered localization of CTS2 might be implicated in the progression of PBC via cell death.

研究分野：肝臓学

キーワード：原発性胆汁性胆管炎 原発性胆汁性肝硬変 GWAS CTS2 カテプシン

1. 研究開始当初の背景

近年、原発性胆汁性胆管炎(原発性胆汁性肝硬変より名称変更:PBC)の早期診断とウルソデオキシコール酸(UDCA)やベザフィブレードを用いた治療法の普及によりPBCの病態コントロールが良好となり、PBC患者の多くは無症候性そのまま長期間経過する(非進行群)ことが可能となった。一方、PBC患者の約10-20%は治療抵抗性で肝硬変・肝不全へと進行する黄疸・肝不全進行群であり、肝移植以外には救命方法がない。しかしながら、PBC黄疸・肝不全進行の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

PBC黄疸・肝不全進行の分子メカニズムを解明するために、PBCの黄疸・肝不全進行に関連する遺伝子領域を同定する。同定したPBC黄疸・肝不全関連遺伝子であるリソソーム酵素カテプシンZ(CTSZ)に着目し、CTSZのPBC肝組織・血清中における動態と肝機能データ・病理スコアとの関連解析ならびにCTSZを介する肝細胞障害機構の*in vitro*解析をおこなう。

3. 研究の方法

PBC患者を肝生検または臨床症状によりPBC非進行群(ショイヤー分類1 or 2, 門脈圧亢進症や肝硬変がない)PBC進行群(ショイヤー分類3 or 4, 門脈圧亢進症や肝硬変があるが持続する黄疸がない:総ビリルビン2.0 mg/dL未満)PBC黄疸・肝不全進行群(持続する黄疸がある:総ビリルビン2.0 mg/dL以上)に分類した。

PBC黄疸・肝不全型進行群173症例とPBC非進行群1204症例を用いて、ゲノムワイド関連解析を実施した。肝組織におけるNELFCD、CTSZのタンパクとmRNA発現を免疫組織染色法と定量PCR法により解析した。肝組織におけるCTSZタンパクの局在を免疫蛍光染色により解析した。血中CTSZタンパクをELISA法により測定した。走査型電子顕微鏡を用いて、PBC黄疸・肝不全型進行患者の肝細胞内構造を観察した。肝ガン細胞株HuH7、HepG2にCTSZを過剰発現させた細胞株を作製し、デスリガンド(TNF- α 、FasL)、小胞体ストレス(タブシガルギン、ツニカマイシン)、リソソーム・オートファジー機能障害(クロロキン、アミノ酸飢餓)によって誘導される肝細胞死に対するCTSZの関与を検討した。

4. 研究成果

PBC黄疸・肝不全進行関連領域の同定

PBC黄疸・肝不全型進行群173症例とPBC非進行群1204症例を対象としたゲノムワイド関連解析を実施し、PBC黄疸・肝不全型進行と最も関連が強い領域として20番染色体領域に存在するNELFCD/CTSZ(OR = 2.16, $P = 7.94 \times 10^{-8}$)を同定した。

PBC肝組織におけるNELFCDとCTSZタンパクの発現解析

PBC黄疸・肝不全型進行に対するNELFCDとCTSZの関与を検討するために、PBC患者の肝組織におけるNELFCDとCTSZタンパクの発現を免疫組織染色により解析した。

NELFCDタンパクは、肝組織に存在するすべての細胞(肝細胞、浸潤単核球、肝類洞細胞、胆管、内皮)の細胞質と核に発現していた。陽性細胞におけるNELFCDタンパクの発現量は、PBC黄疸・肝不全型進行群とPBC非進行群との間で顕著な差は認められなかった。

CTSZタンパクは、肝細胞、単球、マクロファージ、クッパー細胞に高発現していたが、胆管、内皮、浸潤リンパ球にほとんど発現していなかった。PBC黄疸・肝不全進行群の肝細胞におけるCTSZタンパク発現は、PBC非進行群やウイルス性肝疾患の患者と比較して、顕著に増加していた。PBC黄疸・肝不全型進行群の肝組織におけるCTSZタンパクの増加は、ウエスタンブロッティング法でも確認された。

これらの結果から、我々はCTSZに着目し、PBC黄疸・肝不全進行におけるCTSZの解析をおこなった。

肝細胞におけるCTSZの局在解析

正常肝、PBC非進行群ならびに慢性C型肝炎(CHC)患者の肝細胞におけるCTSZタンパクは、毛細胆管側においてリソソームマーカーLAMP1と共局在していた。一方、PBC黄疸・肝不全型進行の肝細胞におけるCTSZタンパクは、毛細胆管側から細胞質に局在を変えLAMP1と非共局在であった。

肝細胞におけるCTSZタンパクの発現増加と局在変化メカニズムの解析

PBC黄疸・肝不全進行群の肝組織におけるCTSZタンパクの発現増加が、転写制御によるものか翻訳後制御によるものかを明らかにするために、肝組織中のCTSZ mRNAを定量した。肝組織中のCTSZ mRNA発現は、PBC黄疸・肝不全進行群とPBC非進行群との間で、有意な差は認められなかった。PBC黄疸・肝不全進行群の肝組織におけるCTSZタンパクは翻訳後制御によるものと考えられた。

PBC黄疸・肝不全進行群の肝細胞と同様に、約1週間、肝臓の総胆管を結紮した胆汁鬱滞モデルマウス(BALB/c)の肝細胞では、細胞質内に強いCTSZ顆粒が多く認められた。これらの結果から、PBC黄疸・肝不全進行群の肝細胞の細胞質におけるCTSZタンパクの増加は、胆汁鬱滞により誘導されている可能性が考えられた。

胆汁鬱滞により誘導される細胞内骨格の異常がCTSZタンパクの増加・局在変化に関与するか否かを検討するために、細胞内極性を有する肝癌細胞株HepG2を単層培養し、毛細胆管収縮を阻害するサイトカラシンB、微小管形成を阻害するコルヒチンで処理した

が、顕著な CTSZ タンパクの蓄積と局在変化を認めなかった。今後、他の細胞内骨格阻害剤や細胞内輸送阻害剤により CTSZ の局在変化や細胞質内での CTSZ 蓄積が誘導されるか検討する必要がある。

血中 CTSZ タンパクの解析

PBC 黄疸・肝不全進行群の血中 CTSZ は、PBC 非進行群や CHC 患者と比較し有意に増加した。(PBC 黄疸・肝不全進行群 v.s. PBC 非進行群 $P = 5.3 \times 10^{-7}$, PBC 黄疸・肝不全進行群 v.s. CHC $P = 2.37 \times 10^{-6}$)。血中 CTSZ タンパクは、総ビリルビン ($r = 0.66$, $P = 1.26 \times 10^{-6}$)、AST ($r = 0.58$, $P = 7.1 \times 10^{-6}$) と正の相関を、アルブミン ($r = -0.67$, $P = 1.1 \times 10^{-6}$)、血小板 ($r = -0.74$, $P = 4.4 \times 10^{-7}$) と負の相関を示した。血中の CTSZ タンパクは、UDCA 治療により有意に変化しなかったが、肝移植により有意に減少した ($P = 8.1 \times 10^{-4}$)。これらの結果から、血中 CTSZ は PBC の重症化マーカーになる可能性が示唆された。

肝細胞死に対する CTSZ の関与の検討

走査型電子顕微鏡を用いた解析により、PBC 黄疸・肝不全型進行群の肝細胞内リソソームは、巨大な濃い内容物小体 (dense body) を含み、一部のリソソームは断片化が認められた。リソソームから逸脱したカテプシンが細胞死に関与することが報告されていることから、肝細胞死に対する CTSZ の関与を検討した。

肝癌細胞株 HuH7 において、CTSZ 過剰発現によりクロロキン、アミノ酸飢餓により誘導される細胞死を促進した。一方、デスリガンド (TNF- α , Fas L)、小胞体ストレス (タブシガルギン、ツニカマイシン) により誘導される肝細胞死に、CTSZ 過剰発現は顕著な影響を及ぼさなかった。これらの結果から、CTSZ は一部の肝細胞死を促進する可能性が考えられた。今後、PBC 黄疸・肝不全進行患者の肝細胞において、上記のような細胞死が誘導されているか検証する必要がある。

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 2 件)

Hitomi Y, Kojima K, Kawashima M, Kawai Y, Nishida N, Aiba Y, Yasunami M, Nagasaki M, Nakamura M, Tokunaga K. Identification of the functional variant driving ORMDL3 and GSDMB expression in human chromosome 17q12-21 in primary biliary cholangitis. 査読有. Sci Rep. 2017;7(1):2904. doi: 10.1038/s41598-017-03067-3.

Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Nakamura H, Tanaka A, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Abe M, Nakao K, Yamagiwa S, Kaneko S,

Honda M, Umemura T, Ichida T, Seike M, Sakisaka S, Harada M, Yokosuka O, Ueno Y, Senju M, Kanda T, Shibata H, Himoto T, Murata K, Miyake Y, Ebinuma H, Taniai M, Joshita S, Nikami T, Ota H, Kouno H, Kouno H, Nakamuta M, Fukushima N, Kohjima M, Komatsu T, Komeda T, Ohara Y, Muro T, Yamashita T, Yoshizawa K, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Sugi K, Ario K, Takesaki E, Naganuma A, Mano H, Yamashita H, Matsushita K, Yamauchi K, Makita F, Nishimura H, Furuta K, Takahashi N, Kikuchi M, Masaki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Komori A, Migita K, Ito M, Nagaoka S, Abiru S, Yatsushashi H, Yasunami M, Shimoda S, Harada K, Egawa H, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Takikawa H, Ishibashi H, Chayama K, Mizokami M, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. 査読有. Hum Mol Genet. 2017;26(3):650-659. doi: 10.1093/hmg/ddw406.

[学会発表] (計 4 件)

相葉佳洋、川嶋実苗、西田奈央、人見祐基、小森敦正、茶山一彰、安波道郎、徳永勝士、中村稔 日本人原発性胆汁性肝硬変の新規疾患感受性遺伝子 PRKCB, ETS1 の同定 第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5.21 ホテル日航熊本 (熊本県、熊本市)

相葉佳洋、小森敦正、中村稔 原発性胆汁性肝硬変における TL1A の役割 第 41 回日本肝臓学会西部会 2015.12.3 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

相葉佳洋、原田憲一、西田奈央、川嶋実苗、人見祐基、小森敦正、八橋弘、徳永勝士、中村稔 日本人原発性胆汁性肝硬変における黄疸・肝不全進行関連遺伝子の同定 第 52 回日本肝臓学会総会 2016.5.19 ホテルニューオータニ幕張 (千葉県、千葉市)

Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. Nakamura M, Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Komori A, Shimoda S, Tanaka A, Nagasaki M, Tokunaga K, PBC consortium in Japan. APASL 2017.2.19 上海(中国).

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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相葉 佳洋 (AIBA YOSHIHIRO) 独立行政法
人長崎医療センター・臨床研究センター・研
究員 研究者番号：70450955