

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19611

研究課題名(和文)胆汁酸産生制御機構におけるSPRY2/LXRの役割に関する検討

研究課題名(英文) Study of role of SPRY2/FGF19 in regulation of bile acid synthesis

研究代表者

長谷川 泰浩 (Hasegawa, Yasuhiro)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10730369

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)：小児胆道閉鎖症患者(BA)から得られたサンプルを用いて胆汁酸産生の制御について解析した。肝細胞ではCYP7A1 mRNAの発現はBAでは血清胆汁酸濃度が高値であるにもかかわらず抑制されていなかった。血清FGF19濃度は上昇し、肝細胞でFGF19蛋白が合成されていることを認めた。一方でFGFR4は肝臓においてリン酸化されていたがSPRY2発現によりFGFR4下流でERKが不活性化されていた。肝細胞にクローズアップして解析すると、慢性胆汁鬱滞の状況下にある肝細胞では、SPRY2の発現増加によりERK経路が不活性化しCYP7A1 mRNAの適切な発現抑制が起こらず胆汁酸生合成は抑制されていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞にクローズアップして解析すると、慢性胆汁鬱滞の状況下にある小児胆道閉鎖症患者の肝細胞においては、SPRY2の発現増加によりERK経路が不活性化することでFGF19経路のCYP7A1 mRNAの適切な発現抑制が起こらず、胆汁酸生合成は抑制されていなかった。このことは胆道閉鎖症における急速な肝硬変、肝不全への進行のメカニズムの一因である可能性がある。

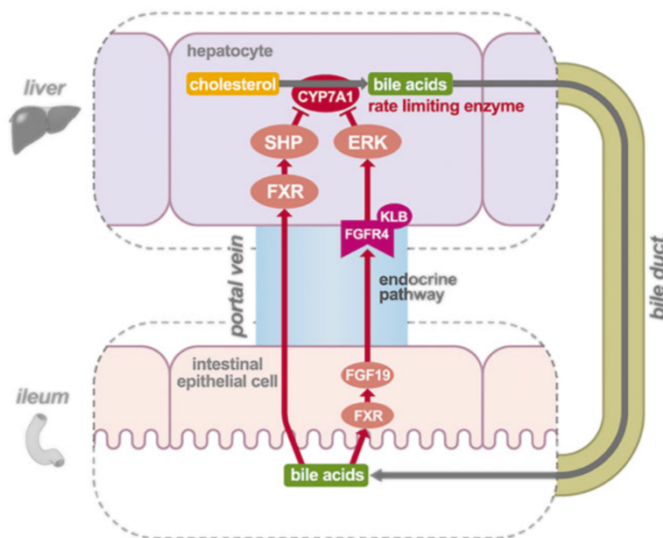
研究成果の概要(英文)：We analyzed the regulation of molecules in FGF19 signaling pathways using liver and serum samples from eight biliary atresia (BA) children. CYP7A1 mRNA expression was not inhibited in BA microdissected hepatocyte-enriched tissue (HET) despite high serum bile acid concentrations. The FGF19 protein was synthesized in BA HET, and its serum concentration was elevated. FGFR4 was phosphorylated in BA livers. However, ERK phosphorylation was significantly reduced. We examined SPRY2 expression to determine how the ERK pathway was inactivated downstream of the FGF receptor; the expression was significantly increased in BA HET. FGF19 was increased in BA hepatocytes. By focusing on its regulation in hepatocytes, we showed that the FGF19 pathway did not suppress bile acid synthesis, probably due to an altered mechanism involving upregulated SPRY2 in BA patients.

研究分野：小児肝臓学

キーワード：胆道閉鎖症 小児胆汁鬱滞性疾患 FGF19

1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は肝臓で合成、胆汁中に分泌され胆嚢に蓄えられた後、摂食と連動して十二指腸に分泌される。その後、小腸において脂肪のミセル化に関与し、その95%は回腸末端にて再吸収される。再吸収された胆汁酸は門脈血流に乗り、再び肝細胞に取り込まれる、いわゆる“腸肝循環”を形成している (Chiang JY. *Comprehensive Physiology* 2013)。胆汁酸の生合成は生理的状态では少なくとも2つの負のフィードバック機構によって厳密に制御されていることが知られている。1つめは回腸末端で再吸収された胆汁酸が門脈血流経由で肝細胞に取り込まれた後、肝細胞内の核内受容体 farnesoid X receptor (FXR)に結合し、small heterodimer partner (SHP)を介して胆汁酸合成の律速酵素である *CYP7A1* の転写を抑制する FXR/SHP 経路である (Goodwin B et al. *Molecular Cell* 2000)。



さらに近年、胆汁酸の再吸収と連動して fibroblast growth factor (FGF) 19 が小腸上皮において産生され、門脈血行性に肝臓に輸送された後に肝細胞形質膜上の受容体 FGF receptor (FGFR)4/ β klotho (KLB)複合体と結合し、extracellular signal-regulated kinase (ERK)経路を介して *CYP7A1* の転写を抑制することが発見された (Inagaki T et al. *Cell Metabolism* 2005. 左図 (*Hepatol Res* 2019))。

しかし生理的な状態での胆汁酸産生制御機構の研究が進んでいる一方で、胆汁うっ滞による慢性肝障害に対する生体適応反応としての胆汁酸代謝制御機構は十分には解明されていない。特にヒトにおける解析は乏しく、現在までに胆道閉鎖症の小児 18 例の解析、成人の膵腫瘍による肝外胆汁うっ滞患者 22 名の解析があるのみである。2つの報告はともに胆汁うっ滞下では *CYP7A1* が抑制され、生体内で新たな胆汁酸産生が抑制されていることを示唆している (Chen HL et al. *Pediatr Res* 2008, Schaap FG et al. *Hepatology* 2009)。ただし、実際の胆汁うっ滞患者においては、血清胆汁酸の濃度は内科的、外科的治療にきわめて抵抗性であり、血漿交換のように胆汁酸を直接除去するような治療を行って一旦低下した血清胆汁酸も、治療後速やかに高値となる。

2. 研究の目的

胆汁酸の生合成は生理的条件下で厳しく制御されているが、胆道閉鎖症 (BA) をはじめとする小児胆汁鬱滞性疾患などの慢性胆汁鬱滞下の状況にある患者におけるこれらのシグナル伝達経路の調節機構は不明である。また肝臓は肝硬変に進展すると線維組織の割合が増加し、相対的に胆汁鬱滞を制御する場所である肝細胞の割合が減少する。BA では急速に肝硬変へと進行する。しかし現在までに行われた小児胆汁鬱滞性疾患における肝臓を用いた研究では対象者から採取した肝臓を線維細胞、肝細胞合わせた形で「肝臓」として解析、考察されているため、肝細胞で行われている事象は過小評価されていると考えられる。我々はレーザーマイクロダイセクションの手法を用いて肝臓から肝細胞を抽出し、肝細胞内での事象にクローズアップすることで BA 小児患者におけるこれらのシグナル伝達経路の制御を研究した。

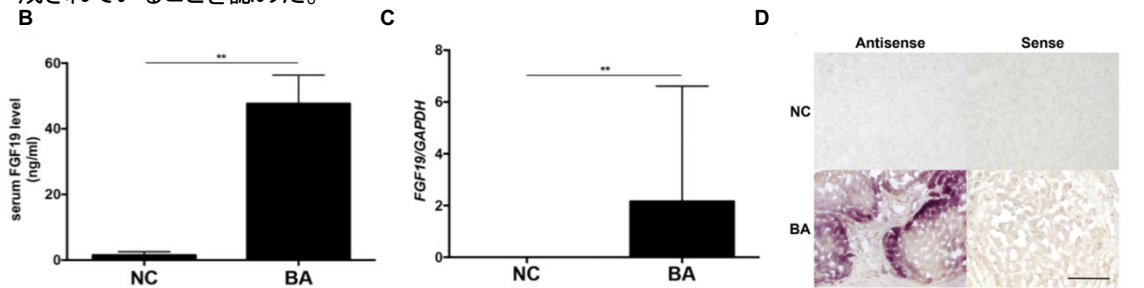
3. 研究の方法

我々は8名のBA小児患者、対照として4名の胆汁鬱滞のない小児疾患コントロールから得られた肝臓及び血清のサンプルを用いて、これらのシグナル伝達経路の分子制御について解析した。

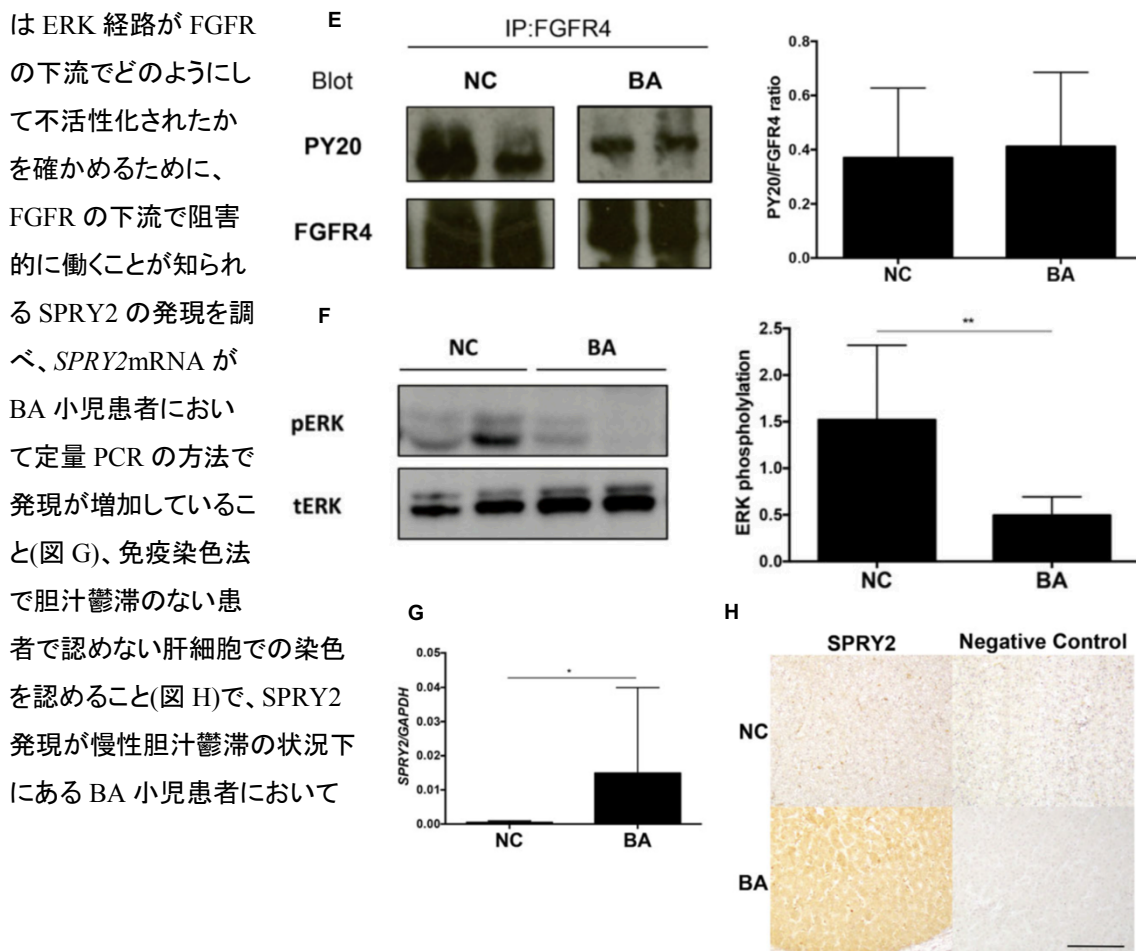
4. 研究成果

レーザーマイクロダイセクションで作成した肝細胞が豊富な組織(HET)において、*CYP7A1* mRNAの発現はBA小児患者では血清胆汁酸濃度が高値であるにもかかわらず抑制されていなかった(図A)。BA小児患者では血清のFGF19タンパク濃度は上昇していた(図B)。

さらに定量PCRおよび *in situ* hybridization の方法で *FGF19* mRNA の発現を認めること(図 C, D)で、BA 小児患者の HET においては FGF19 タンパクが合成されていることを認めた。



同様の事象は、胆汁鬱滞のない患者では認めなかった。一方で FGFR4 は BA の肝臓においてリン酸化されており(図 E)、FGF19 のシグナルは肝細胞膜までは到達していることが確認できた。しかしその下流の ERK のリン酸化が有意に減少し(図 F)、ERK 経路が不活性化されていることを認めた。我々は ERK 経路が FGFR



の下流でどのようにして不活性化されたかを確かめるために、FGFR の下流で阻害的に働くことが知られる SPRY2 の発現を調べ、*SPRY2* mRNA が BA 小児患者において定量 PCR の方法で発現が増加していること(図 G)、免疫染色法で胆汁鬱滞のない患者で認めない肝細胞での染色を認めること(図 H)で、*SPRY2* 発現が慢性胆汁鬱滞の状況下にある BA 小児患者において

有意に増加していることを認めた。

レーザーマイクロダイセクションの方法を用いて肝細胞にクローズアップして解析すると、慢性胆汁鬱滞の状況下にあるBA小児患者の肝細胞においては、SPRY2の発現増加によりERK経路が不活性化することでFGF19経路のCYP7A1 mRNAの適切な発現抑制が起こらず、胆汁酸合成は抑制されていなかった(右図)。このことはBAにおける急速な肝硬変、肝不全への進行のメカニズムの一因である可能性がある。

<引用文献>

1. Hasegawa Y, Kawai M, Bessho K, Yasuda K, Ueno T, Satomura Y, Konishi A, Kimura T, Ikeda K, Tachibana M, Miyoshi Y, Michigami T, Kondou H, Ozono K CYP7A1 expression in hepatocytes is retained with upregulated fibroblast growth factor 19 in pediatric biliary atresia. *Hepatol Res.* 2019 Mar;49(3):314-323

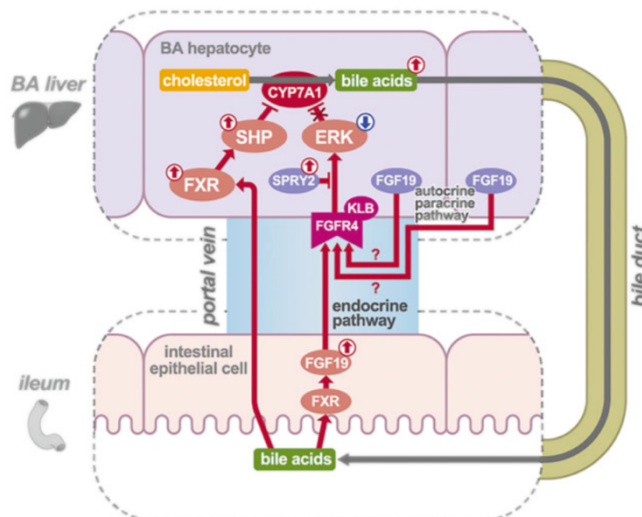
5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Hasegawa Y, Kawai M, Bessho K, Yasuda K, Ueno T, Satomura Y, Konishi A, Kimura T, Ikeda K, Tachibana M, Miyoshi Y, Michigami T, Kondou H, Ozono K CYP7A1 expression in hepatocytes is retained with upregulated fibroblast growth factor 19 in pediatric biliary atresia. *Hepatol Res.* (査読あり), 49(3), 2019, 314-323, DOI: 10.1111/hepr.13245.
2. Fukuoka T, Bessho K, Tachibana M, Satomura Y, Konishi A, Yasuda K, Kimura T, Hasegawa Y, Ueno T, Miyoshi Y, Ozono K Total Bile Acid Concentration in Duodenal Fluid Is a Useful Preoperative Screening Marker to Rule Out Biliary Atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (査読あり), 67(3), 2018, 383-387, DOI: 10.1097/MPG.0000000000002037.
3. Hayashi H, Naoi S, Togawa T, Hirose Y, Kondou H, Hasegawa Y, Abukawa D, Sasaki M, Muroya K, Watanabe S, Nakano S, Minowa K, Inui A, Fukuda A, Kasahara M, Nagasaka H, Bessho K, Suzuki M, Kusuhara H Assessment of ATP8B1 Deficiency in Pediatric Patients With Cholestasis Using Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages. *EBioMedicine.* (査読あり), 27, 2018, 187-199, DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.10.007.
4. 長谷川泰浩, これって肝臓病? 「皮膚掻痒症」, 小児内科, (査読なし), 48巻6号, 2016, 838-842

[学会発表](計5件)

1. 長谷川泰浩 和田珠希 福岡智哉 里村宜紀 安田紀恵 木村武司 橘真紀子 別所一彦 三善陽子 大藺恵一 「小児胆汁うっ滞性肝疾患における成長・栄養障害の検討」 第51回日本小児内分分泌学会学術集会:2017年9月28-30日, 大阪
2. Yasuhiro Hasegawa, Kazuhiko Bessho, Hiroki Kondou, Kiyotaka Kosugiyama, Yoko Miyoshi*, Koichi-Ito, Ayano Inui, Hironori Nagasaka 'Effects of bezafibrate on the cholestasis, pruritus and



dyslipidemia in patients with alagille syndrome' The World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2016; 2016 年 10 月 5-8 日, Montreal, Canada

3. 長谷川泰浩 近藤宏樹 別所一彦 川井正信 安田紀恵 上野豪久 里村宜紀 小西暁子 木村武司 倉川佳世 三善陽子 道上敏美 大藺恵一「胆道閉鎖症患者の肝臓では胆汁酸生合成律速酵素CYP7A1の抑制機構の破綻が起きている」第42回日本小児栄養消化器肝臓学会: 2015年 10月16-18日, 広島
4. 長谷川泰浩 近藤宏樹 別所一彦 川井正信 安田紀恵 上野豪久 里村宜紀 小西暁子 木村武司 倉川佳世 三善陽子 道上敏美 大藺恵一「胆道閉鎖症患者の肝臓では胆汁酸生合成律速酵素CYP7A1の抑制機構の破綻が起きている」第32回日本小児肝臓研究会:2015年7月 25-26日, 鳥取
5. 長谷川泰浩 近藤宏樹 別所一彦 林久允 直井聡太郎 里村宜紀 小西暁子 安田紀恵 三善陽子 大藺恵一「フェニル酪酸は進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型の強い搔痒感を改善する」第 118 回日本小児科学会学術総会:2015 年 4 月 17-19 日, 大阪

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。