

令和元年6月10日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05283

研究課題名(和文) 肝病理組織抽出検体を用いたピロシーケンシングによる胆汁うっ滞性肝疾患の病態解析

研究課題名(英文) Pyrosequencing using liver biopsy specimens for evaluating pathogenesis of cholestatic liver diseases.

研究代表者

上野 義之 (Ueno, Yoshiyuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70282126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,230,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆汁うっ滞性肝疾患患者の病理パラフィン包埋切片からの次世代シーケンサーによるライブラリー作成用の核酸抽出を行ない、同一患者の血清からの抽出核酸検体との整合性も比較検討した。その結果、核酸抽出が良好な検体からはピロシーケンスも可能となり、これまでに報告のない細菌門に属する外来性微生物の16sRNAを同定した。これらについては、同一個体の経時的な追跡により、再現性を持って検出されたため、病態形成との関連について、さらに検討を進めた。その結果、適切な内部コントロールを用いて疾患特異性を確認した。今回確立した方法で十分に特異性がある外来性遺伝子を再現性を持って検出可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

厚生省の指定難病となっている原発性胆汁性胆管炎などの胆汁うっ滞性肝疾患の病態形成期所を明らかにするために肝病理組織標本から微量の核酸検体を抽出し、次世代シーケンサーで外来性遺伝子を検出する系を作成した。さらに、同様の手法を用いて、血液中からの検体も抽出し、簡素織病本からのものと整合性がとれるかについても検討した。その結果これまでに報告されていない、「門」レベルでの外来性微生物由来の遺伝子を再現性を持って検出した。さらに疾患特異性を検証するため、適切な疾患コントロールを用いて検討し、今回の手法の特異性も確認した。こんごは「種」レベルで外来遺伝子を同定することが必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have extracted DNAs from paraffin embedded pathological specimens from patients with cholestatic liver diseases such as primary biliary cholangitis. We have used laser micro-dissection methods to extract DNAs, and constructed the libraries from deep sequencing. Similarly, we extracted DNAs from serum samples with identical patients, and compared their libraries along with their clinical backgrounds. After adequate adjustments, we have found novel external 16rRNAs from both liver and serum samples. We have identified these pathogens at phylum levels. To further identify these exogenous genes, adequate primer designing seems to be feasible.

研究分野：肝臓病学

キーワード：外来性遺伝子 レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法 次世代シーケンサー 胆汁うっ滞性肝疾患 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管上皮細胞 (IBEC) は肝細胞と共に肝臓を構築する上皮細胞である。ウイルス性肝炎やアルコール性肝疾患では肝細胞が主標的細胞であるが、IBEC を標的とする肝疾患は PBC や PSC などといった胆汁うっ滞性肝疾患であり、進行性の経過を取った場合は有効的な内科的治療は存在しない。そのためこれらの疾患は厚生労働省の定める指定難病とされている。病態形成のメカニズムが不明であるものの、これらの疾患形成の機序については自己免疫の機序が想定されており、実際リンパ球の浸潤や多彩な自己抗体の存在などがその仮説を支持してきた。とりわけ、PBC においては抗ミトコンドリア抗体 (AMA) といった特徴的な自己抗体が存在しており、そのため病態形成の解明はこの AMA 産生機序との関係からアプローチされることが多かった。しかし、これまで 30 年間にわたるさまざまな自己抗体をめぐる取り組みは他の膠原病と同様に PBC の病態形成メカニズムの本質に迫ることはできなかったのが事実である。

一方、IBEC に関しては、肝細胞と異なり分離培養の方法が 1980 年代後半まで確立しなかったことより、その細胞生物学的な解析は遅れていた。しかし、1990 年代半ばには分離法が確立したことにより、肝細胞と IBEC の細胞生物学的な違いが種々報告されるようになり、申請者らも IBEC の基本特性について報告を重ねてきた (PNAS 91; 1994, PNAS 93; 1996)。さらに IBEC の細胞生物学的特性について、海外連携協力者である Alpini 博士らと共同研究を進めその成果として、腎臓の尿細管細胞と同様に、肝内胆管上皮細胞にも heterogeneity が存在し解剖学的・生理学的に非常にユニークな違いを保持すること (Gastroenterology, 110; 1996) や、炎症や胆汁うっ滞などの病理的な状況下で異なる反応性を呈することなどを明らかにした (Hepatology, 35; 2002)。このことは、病理学的に「小葉間胆管サイズ」を選択的に破壊する PBC の病態を明らかにする上で、極めて重要な成果である。

PBC や PSC に特徴的な病理学的所見として、同じ小葉間胆管でも門脈域により、リンパ球浸潤や輪状線維化といった特徴的な所見を呈するものと病変が無いものが肝組織中に混在している点が挙げられる。

2. 研究の目的

今回の研究は、この病理学的多様性に着目し、病変のある IBEC と無病変の IBEC 及びその周囲に発現される遺伝子の違いを分子病理学的手法により明らかにすることを目的とした。すなわち、「病変のある IBEC 周囲に発現される遺伝子は無病変の IBEC と異なる」という仮説を立て、それを証明するためにこれまで培った細胞生物学的な手法を応用することにした。より具体的には、これまで申請者らは報告した (PBC の患者血清ではウイルス性肝炎などの他肝疾患と miRNA 発現プロファイルが異なること、PloS One. 8: e66086, 2013) 次世代シーケンサーを用いた手法をさらに展開し、i) 肝組織中の多様な門脈域から laser capture microdissection (LCM) 法を用いて遺伝子検体を回収し、ii) それをさらに次世代シーケンサーによるピロシーケンスを行い、病変を有する IBEC 周囲に特異的に発現される遺伝子、とりわけ外来性遺伝子の発現を定量的に検討した。さらに、iii) 微量の 16S rRNA の検出のためにより高感度定量系である digital PCR 装置により微細な違いを明らかにする、ことを目標とした。そして外来分子について、培養細胞を用いた invitro 検証で病態形成についてのメカニズムを探索する、ことを副次目標とした。

3. 研究の方法

平成 28 年度 4 月より約 18 カ月の予定で行うのは、胆汁うっ滞性肝疾患ヒト病理組織からの LCM 法による核酸抽出と、それに続く次世代シーケンサーを用いたピロシーケンシングを実施した。これにより、病変特異的な IBEC とその周囲に存在する超微量の外来性の遺伝子を含めた網羅的検索を行うことができた。

現在の標準的な LCM では、例えば数個のがん細胞を選択して、そこから核酸を抽出することが可能である。一世代前の LCM では操作が煩雑な上、回収できる核酸試料の品質に問題があることが多かったが、申請者らが所属する山形大学医学部内のメディカルサイエンス推進研究所では最新の LCM を保有しており、これらの機種では鮮明なモニター下で標的とする領域をペンで囲むだけで作業は終了する。実際にこれまで申請者らは肝病理組織中の門脈域より、胆管細胞とその周囲の浸潤リンパ球を選択したのから、それぞれ核酸検体を回収して発現している小分子である miRNA を定量する研究を行っている (Hepatology 60: S1)。したがって LCM 法自体に対する技術的な裏付けは十分有していると考えた。

ここからの 16S rRNA などの外来性遺伝子を含めた抽出のための試料調製には、既に市販のプロトコールが数種確立しており、本研究では申請者らが既に使用経験のある QIAGEN 社のキットを使用し、主にピロシーケンスのための核酸試料抽出を行った。

このように調整された核酸資料を基に次世代シーケンサーを用いたピロシーケンスを行うが、その理論的基盤は既に確立している。ピロシーケンス法では、1 度のランで約 100 万リード数、1 リード長あたり約 600bp が得られ、ピロシーケンス法を適用しない従来法と比較すると、リード数が劣るものの、リード長は圧倒している。さらに、プライマーの上流部分に各環境サンプルを区別する 10 bp 程度のタグ (バーコード) を付与することにより、一度のランで複数の環境サンプルを解析することが可能となる (バーコード解析)。したがって、この方法を応用すれば、肝病理組織より切り出した同一患者の異所性の胆管上皮細胞サンプルにおいても同時に多数検体を解析することが可能である。そのため現在までにさまざまな環境における細菌群集構造がピロシーケンス法により解析された実績がある (Nakayama et al, Biosci. Microflora, 29; 2010)。これまでの既存の外来遺伝子探索法としては、古くから、クローンライブラリー法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE 法) などが使われてきた。クローンライブラリー法では、16SrRNA 遺伝子の全長を解読でき、「種」レベルの決定が可能であるが、一つの検体環境中から 100 クローンを解析するだけでも多大な労力とコストがかかる。一方、DGGE 法では、各環境中の細菌群集構造を視覚的に捉えられることが最大の特長であるが、得られる配列が 200 bp 程度であるので、データベースで相同性検索しても “Uncultured bacterium” や “Unclassified bacterium” の情報しか得られないことがしばしばある。今回のピロシーケンス法を用いた解析ではリード長の長さを利点として外来遺伝子の探索、とりわけ相同性探索で有利な点は明らかである。

この LCM 法と次世代シーケンサーでピロシーケンスを組み合わせて行う手法の確立と実際のアッセイに 18 カ月を見込んだ。

4. 研究成果

平成 28 年度は胆汁うっ滞性肝疾患の肝病理標本からの 16S RNA の測定のための基礎的店頭として、血清よりサンプルを抽出して次世代シーケンサーを用いて腸内細菌由来の外来遺伝子探索を行った。遺伝子調整の手法として超遠心法よりもスピンカラム法が RNA の純度が高いなどの知見を見出し、実際胆汁うっ滞性肝疾患患者の血清から外来最近由来の新規 16S RNA を見出した。具体的には、16S rRNA などの外来性遺伝子を含めた抽出のための試料調製には、既に市販のプロトコールが数種確立しており、本研究では申請者らが既に使用経験のある QIAGEN 社のキットを使用し、主にピロシーケンスのための核酸試料抽出を行った。さらに、調整された核酸資料を基に次世代シーケンサーを用いたピロシーケンスを行った。この方法を応用すれば、肝病理組織より切り出した同一患者の異所性の胆管上皮細胞サンプルにおいても同時に多数検

体を解析することが可能であると考えた。今回のピロシーケンス法を用いた解析ではリード長の長さを利点として外来遺伝子の探索、とりわけ相同性探索で有利な点は明らかであると思われた。

平成 29 年度の技術基盤を形成する研究では、少数例の患者の血清サンプルより比較的珍しい腸内細菌叢由来の遺伝子断片を検出することができた。今後はこの結論が妥当かという点について、肝組織抽出検体を用いて確認するとともに、多数例の患者検体を用いて、適切な疾患コントロールをおきつつ検討を重ねていくことが重要であると思われた。年度途中研究の中核をなすレーザーキャプチャーマイクロダイセクション機器が修理不能となり、代替え機を準備するために約 3~4 ヶ月の進捗が遅れた。その後代替え機の導入により、肝病理標本からの抽出は行なうことが可能となった。引き続きパラフィン包埋切片からの次世代シーケンサーによるライブラリー作成用の核酸抽出を行なった。一部の症例ではレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法による切り出しも可能であり、それらの検体では血清からの抽出核酸検体との整合性も比較検討した。その結果、細胞浸潤が多い検体では主にリンパ球由来の核酸検体が良好な品質で抽出されたのに比し、胆管上皮細胞由来の核酸検体は良及びその品質が不十分なためにそのままでは次世代シーケンサーでのライブラリー作成が困難であることが判明した。核酸抽出が良好な検体からはピロシーケンスも可能となり、その結果これまでに報告のない細菌門に属する外来性微生物の 16 s RNA が同定された。これらについては、同一個体の経時的な追跡により、再現性を持って検出されたため、胆汁性肝疾患の病態形成との関連について、さらに検討を進めることとなった。さらに同遺伝子は血液中からも分離されたために、肝病理組織標本と血液という入手方法が全く異なるものでどちらが今後研究を展開する上で優位性があるかという検討を進めるために、主に血液由来の外来性遺伝子を同様の方法で検出する系の確立することも進めた。その結果、肝病理検体と同様なライブラリーを作成することが可能であり、大腸菌などの適切な内部コントロールを置いて、疾患特異性を肝病理標本と血液双方で進めて、検出方法の妥当性を検証し、われわれが確立した方法で十分に特異性があることを確認した。平成 30 年度は主に前年度に樹立したパラフィン包埋切片からの次世代シーケンサーによるライブラリー作成用の核酸抽出を行い、血清中とのデータ比較を多数例で行なった。その結果ほぼ 45% 程度原発性胆汁性胆管炎患者の検体では血清と肝病理標本に共通する、これまでに報告のない細菌門に属する外来性微生物の 16 s RNA が同定した。これらについては、同一個体の経時的な追跡により、発症前には検出されず、発症後の検体のみで検出されることを確認した。複数の症例で再現性を持って検出されたため、胆汁性肝疾患の病態形成との関連について、さらに経時的な検討を進めた。その結果、臨床データの改善と共に同外来遺伝子が消退する例も認め、病状の進展とも関連する可能性が示唆された。さらに同遺伝子は分類学上、「門」レベルでの同定にとどまるため、より個体を特定できる「属」「種」レベルでの同定のため、検出のためのプライマー設定を行なった。ただし、「種レベル」まで特異性を高めると検出力が低下することも経験したため、より適切なプライマーの設計が必要であると考えられた。今回認めた細菌門のうち、代表的な菌種を入手し、その核酸をポジティブコントロールとして、デジタル PCR で肝病理組織標本もしくは血液から特異的に検出できる系の設計を行なった。その結果、肝病理検体と同様に血液からも同等の結果を得ることができた。今後は今回見出した外来性微生物について「門」レベルから「種」レベルまで同定を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yagi M., Tanaka A., Abe M., Namisaki T., Yoshiji H., Takahashi A., Ohira H.,

Komori A., Yamagiwa S., Kikuchi K., Yasunaka T., Takaki A., Ueno Y., Honda A., Matsuzaki Y., Takikawa H. Symptoms and health-related quality of life in Japanese patients with primary biliary cholangitis. Sci Rep. 2018;8:12542.10.1038/s41598-018-31063-8 (査読あり)

2. Mizuno K., Ueno Y. Autonomic Nervous System and the Liver. Hepatol Res. 2017;47:160-5.10.1111/hepr.12760 (査読あり)

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., Tani ai 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., Yatsuhashi 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. Hum Mol Genet. 2017;26:650-9.10.1093/hmg/ddw406 (査読あり)

4. Asai Y., Yamada T., Tsukita S., Takahashi K., Maekawa M., Honma M., Ikeda M., Murakami K., Munakata Y., Shirai Y., Kodama S., Sugisawa T., Chiba Y., Kondo Y., Kaneko K., Uno K., Sawada S., Imai J., Nakamura Y., Yamaguchi H., Tanaka K., Sasano H., Mano N., Ueno Y., Shimosegawa T., Katagiri H. Activation of the Hypoxia Inducible Factor 1alpha Subunit Pathway in Steatotic Liver Contributes to Formation of Cholesterol Gallstones. Gastroenterology. 2017;152:1521-35 e8.10.1053/j.gastro.2017.01.001 (査読あり)

〔学会発表〕(計 3件)

1. Katsumi T, Nishina T, Mizuno K, Haga H, Okumoto K, Ueno Y: miR-139-5p express specifically in serum and tissue of PBC, and can be involved in clinical progression. International Digestive Disease Forum 2017, Hong Kong (China), June 2017

2. 勝見智大, 上野義之: NGS を用いた Metagenome 解析による原発性胆汁性胆管炎での外来抗原検索. 第 59 回日本消化器病学会大会, (JDDW 2017), 福岡市; 2017 年 10 月

3. 勝見 智大, 上野 義之: 原発性胆汁性肝硬変における miR-139-5p を介した新規炎症反応制御メカニズムの同定. 第 52 回日本肝臓学会総会, 千葉市; 2016 年 5 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

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。