

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04164

研究課題名(和文) 原発性胆汁性胆管炎模倣培養系からのゲノム・脂質情報を利用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment methods for primary biliary cholangitis by genome and lipid information from disease mimic culture system

研究代表者

下田 慎治 (Shimoda, Shinji)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：30279319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：PBC環境では免疫細胞からのIFNG産生が亢進する一方、胆管細胞のIFNG感受性には変化がないことが明らかになった。また、PBC胆管細胞で発現亢進する遺伝子として炎症関連9遺伝子が抽出された。この中で免疫染色が可能な4遺伝子がコードするタンパク質は全てPBC胆管で対照肝疾患と比較して亢進し、さらに胆管炎の活動性に比例してPBC胆管での発現亢進が明らかになった。また、脂質情報から胆管細胞と免疫細胞との接触で産生されるPGE2に免疫制御機能があり、PGE2産生をインドメタシンで抑制すると共培養で免疫細胞から産生されるIFNG量が増加することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PBCで病態を修飾する鍵分子の一つとして免疫細胞が産生するIFNGの役割が明らかになり、新たな疾患バイオマーカー・治療標的分子として注目されるようになった。今後、細胞障害活性が強い胆汁酸刺激を緩和するといった標準治療には抵抗を示す症例を中心に、IFNG下流シグナルを制御するJAK/STAT阻害剤を用いた新たな治療法の展開が可能である。さらに胆管細胞で発現亢進する炎症関連タンパク質の機能を調べることで、標的細胞からの抗炎症・線維化治療の開発が期待できる。また遺伝子にコードされない脂質代謝の観点からも炎症制御研究が展開できることが示された。

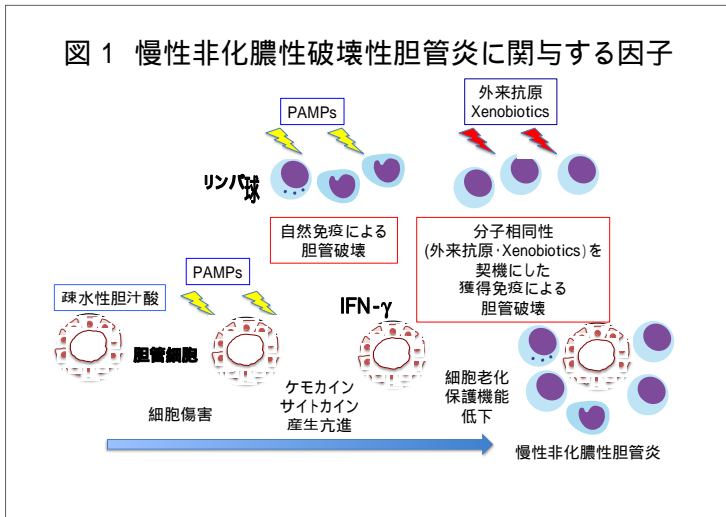
研究成果の概要(英文)：While production of interferon g (IFNG) is increased in primary biliary cholangitis (PBC), IFNG sensitivity of biliary epithelial cells (BEC) was not changed. And 9 inflammation related genes were extracted as increased expression genes in BEC from PBC. Among these 9 genes, immune staining was available for 4 genes encoding proteins, and these 4 proteins expression was increased in BEC from PBC, and these expressions were correlated to cholangitis activities. Furthermore from lipid information, prostaglandin E2 (PGE2) that is produced from the contact of BEC with immune cells had immune regulatory function, and it was clarified that IFNG production from immune cells increase in case of the suppression of PGE2 production by indomethacin.

研究分野：消化器病学

キーワード：原発性胆汁性胆管炎 胆管細胞 免疫細胞 網羅的アレイ解析 脂質情報

1. 研究開始当初の背景

PBC は、慢性非化膿性破壊性胆管炎と抗ミトコンドリア抗体の出現を特徴とする



臓器特異的自己免疫疾患であるが、根治治療の開発には至っていない。詳細な病態解析のため、我々はおもに生体肝移植時の摘出肝臓検体を用いてきた。図1に示すように、(1)PBCでは疎水性胆汁酸暴露と腸内細菌叢由来の pathogen associated molecular patterns (PAMPs)が経門脈的に運ばれてくることで肝内小型胆管細胞が傷害されると共に、ケモカインやサイトカインといった免疫関連物質の産生を亢進させることで積極的に免疫に

関与すること、(2)PAMPs で活性化されたリンパ球(主に NK 細胞)が自己胆管細胞を攻撃し胆管由来の自己抗原が放出されること、(3)外来抗原と自己抗原の分子相同性により当初は外来抗原に対して準備されていた T 細胞が自己抗原表出胆管細胞の攻撃へと至ること、(4)最終的に自然免疫の異常と獲得免疫の異常が相俟って慢性非化膿性破壊性胆管炎の病態が形成されることを示してきた。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、肝移植時摘出肝臓・脾臓を用いた生体外PBC模倣培養系を樹立し、細胞外環境の変化により胆管炎が進展する過程を明らかにした。本研究では、樹立した培養システムにおいて網羅的DNAマイクロアレイ解析で取得した胆管細胞・免疫細胞由来の遺伝子情報と、肝生検から得られるPBCに特徴的な遺伝子情報の結果を統合し、PBC関連遺伝子を選択し生物学的特徴付けを行う。さらに免疫細胞との接触で胆管細胞から産生される多くの脂質情報を採取して免疫反応との関連性を明らかにする。これにより (A)新たなPBCバイオマーカーの確立、(B)治療標的遺伝子を同定しその発現制御コンパウンドの網羅的探索までを本研究で遂行し、次世代治療法の開発へと結びつける。

3. 研究の方法

(1) PBC生体肝臓移植時の摘出肝臓から胆管細胞、同時に摘出する脾臓から免疫細胞を採取した。PBC環境を再現するためにPAMPsであるToll様受容体リガンドと疎水性胆汁酸で刺激した胆管細胞と、無刺激胆管細胞を準備した。自己免疫細胞と胆管細胞を共培養する系における胆管細胞として、刺激後胆管細胞と無刺激胆管細胞を用いた。それぞれの胆管細胞と共培養後の免疫細胞を回収し、網羅的アレイ解析を行い、両者を比較検討した。

(2) IFNGで刺激して、胆管細胞が産生するケモカインCXCL10の量を比較した。

(3) 免疫細胞と胆管細胞を接触させた培養上清を回収し、網羅的な脂質情報を回収し、免疫反応との関連づけを行った。

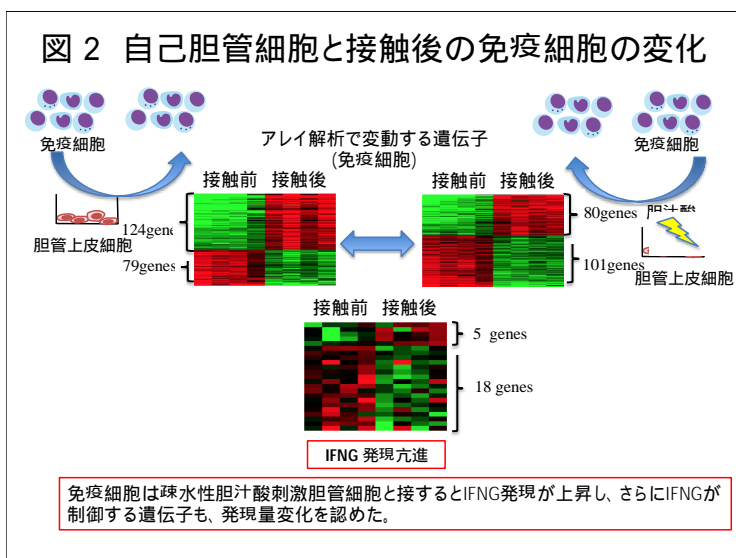
(4) 胆管細胞をToll様受容体リガンドと疎水性胆汁酸で繰り返し刺激して、変動する遺伝子群の情報を網羅的アレイ解析より得た。さらに (1)の結果から胆管細胞をIFN-gで刺激することで変動する遺伝子群の情報も同様に得た。

(5) PBC肝生検検体と転移性肝癌からの健常部分検体を用いた網羅的アレイ解析にて、PBCで有意に変動する遺伝子群の情報を得た。

(6) PBC胆管で有意に発現亢進する遺伝子として9遺伝子が候補に上がった。その中で免疫染色が可能な4遺伝子が対応するタンパク質について、胆管での発現をPBCとHCV肝炎で比較し、さらにPBC胆管炎の程度との相関を評価した。

4. 研究成果

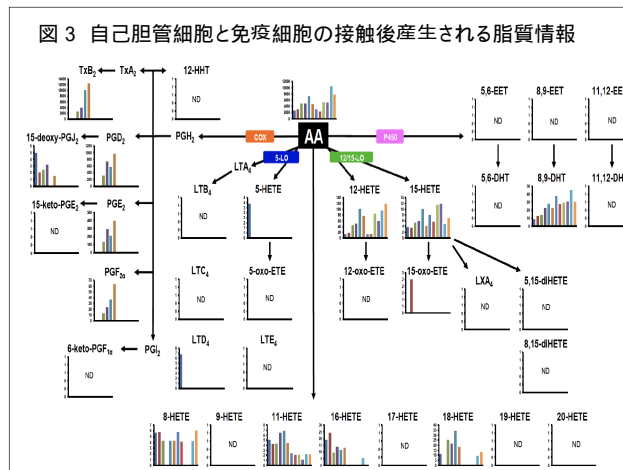
(1) 図2に示すように、4名のPBC症例を用いて胆管細胞と接触前後での自己免疫細胞での発現変動遺伝子を網羅的に解析した。無刺激胆管細胞と接触後免疫細胞



で発現が亢進する遺伝子が124、発現が減弱する遺伝子が79あった。PBC環境を模倣した刺激胆管細胞と接触後免疫細胞で発現が亢進する遺伝子が80、発現が減弱する遺伝子が101あった。両者を比較して有意に変動する5+18=23遺伝子の中で、

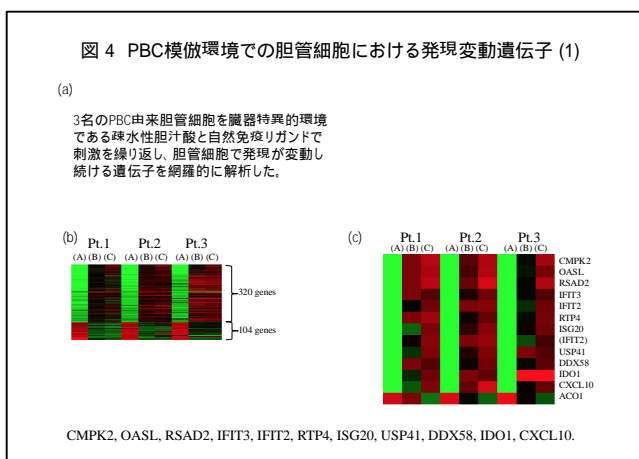
PBC模倣環境における接触によって有意に免疫細胞で発現亢進する遺伝子としてIFNGが抽出された。また、ここで抽出された遺伝子の中にPBC ゲノムワイド関連解析で疾患感受性候補遺伝子として同定された遺伝子は含まれていなかった。

(2) 8例のPBCと16例のHCV肝硬変由来の胆管細胞をIFNGで刺激して胆管細胞が産生する様々なサイトカイン・ケモカイン量を比較したが、PBCと対照疾患で産生に差を認めなかった。



(3) 自己胆管細胞と免疫細胞の接触後培養上清に放出される脂質情報を採取した。

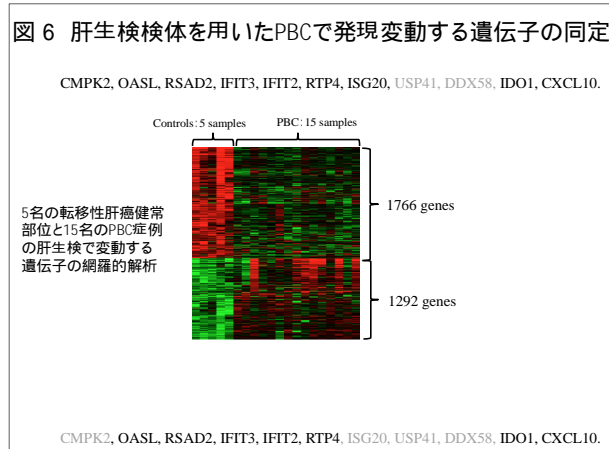
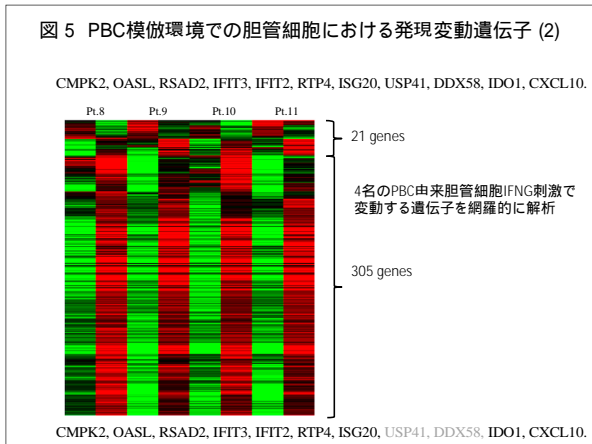
その結果、図3に示すようにプロスタグランジンE2(PGE2)の産生亢進を認めた。また、PGE2産生をインドメタシンで抑制した場合の、免疫細胞からの更なるIFNG産生亢進を認めた。



(4) PBC環境を模倣して3名のPBC胆管細胞を疎水性胆汁酸 + Toll様受容体リガンド刺激を繰り返した。その結果図4に示すように、1度の刺激で発現が亢進する遺伝子320、発現が減弱する遺伝子104を認めた。2度目の刺激で発現が亢進し続ける遺伝子として11、発現が減弱し続ける遺伝子1を認めた。また、ここでも抽出された遺

伝子の中にPBC ゲノムワイド関連解析で疾患感受性候補遺伝子として同定された遺伝子は含まれていなかった。

(5) (1)で明らかになったIFNGを用いて4名のPBC胆管細胞を刺激した。図5に示すように刺激で発現が減弱する遺伝子21、発現が亢進する遺伝子305を認めた。(4)の結果と合わせることで、PBC模倣培養系で胆管細胞において発現が亢進する遺伝子として9遺伝子を抽出した。また、ここで抽出された遺伝子の中にPBC ゲノ



ムワイド関連解析で疾患感受性候補遺伝子として同定された遺伝子は含まれていなかった。

(6)肝生検で得られた15名のPBC肝組織と手術時に得られた5名の転移性肝癌健常部位の比較を行った。

図6で示すように、PBCで発現が減弱する遺伝子1766、発現が亢進する遺伝子1292を認めた。PBC模倣培養系で明らかになった発現亢進9遺伝子の中で7遺伝子が共通してPBC肝組織で発現亢進していた。

(7)これまでの経過で統合された7遺伝子は全てタンパク質をコードする遺伝子であった。免疫細胞からも産生されるケモカイン遺伝子を省いた6遺伝子の中で免疫染色が可能であった4タンパク質の胆管上皮での発

現をPBC($n=19$)とHCV肝炎($n=22$)で比較した。その結果全4タンパク質のPBCでの疾患特異的発現亢進が明らかになった。

(8)PBC($n=71$)における4タンパク質の胆管細胞での発現を評価した。その結果、全4タンパク質の胆管炎活動性に比例した発現亢進が明らかになった。

以上の結果から、PBCではゲノムワイド関連解析の結果から疾患感受性遺伝子候補が複数同定されているが、PBC環境での胆管細胞からのアプローチでは同一遺伝子は抽出されなかった。しかし、PBC環境での免疫細胞からの有意なIFN γ 産生と、脂質情報からプロスタグランジンE2(PGE2)がその制御を行っていることが明らかになった。さらに、PBC環境での胆管細胞で発現亢進する遺伝子がコードするタンパク質が、疾患特異的にかつ疾患活動性に相関してPBC胆管細胞で発現が亢進することが明らかになった。従って、IFN γ -PGE2軸に着目することと胆管細胞で発現亢進するタンパク質の機能解析を行うことで、PBC治療の選択肢が飛躍的に増えることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Terziroli Beretta-Piccoli B, et al, Shimoda S, et al, Gershwin ME.	4. 巻 105
2. 論文標題 The challenges of primary biliary cholangitis: What is new and what needs to be done.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Autoimmun.	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2019.102328.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hitomi Y, et al, Shimoda S, et al., Nakamura M.	4. 巻 102
2. 論文標題 POGLUT1, the putative effector gene driven by rs2293370 in primary biliary cholangitis susceptibility locus chromosome 3q13.33.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36490-1.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi A, Furusyo N, Ogawa E, Nomura H, Dohmen K, Higashi N, Takahashi K, Kawano A, Azuma K, Satoh T, Nakamuta M, Koyanagi T, Kato M, Shimoda S, Kajiwara E, Hayashi J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cost-effectiveness analysis of sofosbuvir plus ribavirin in patients with genotype 2 chronic hepatitis C: an analysis with real world outcomes from a multicentre cohort in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMJ Open.	6. 最初と最後の頁 e023405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2018-023405.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa E, Furusyo N, Nakamuta M, Nomura H, Satoh T, Takahashi K, Koyanagi T, Kajiwara E, Dohmen K, Kawano A, Ooho A, Azuma K, Kato M, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group.	4. 巻 49
2. 論文標題 Glecaprevir and pibrentasvir for Japanese patients with chronic hepatitis C genotype 1 or 2 infection: Results from a multicenter, real-world cohort study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 617-626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kido-Nakahara M, Nakahara T, Furusyo N, Shimoda S, Kotoh K, Kato M, Hayashi J, Koyanagi T, Furue M.	4. 巻 99
2. 論文標題 Pruritus in Chronic Liver Disease: A Questionnaire Survey on 216 Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Derm Venereol.	6. 最初と最後の頁 220-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3064.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bae SK, Gushima T, Saito N, Yamanaka I, Matsuo Y, Yoshida S, Kawano I, Henzan H, Shimoda S, Eto T, Takahashi K.	4. 巻 54
2. 論文標題 HBV reactivation after hematopoietic stem cell transplantation and rituximab-containing chemotherapy: a 12-year experience at a single center.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplant.	6. 最初と最後の頁 629-631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-018-0355-6.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawano A, Shigematsu H, Miki K, Ichiki Y, Morita C, Yanagita K, Takahashi K, Dohmen K, Nomura H, Ishibashi H, Shimoda S.	4. 巻 57(11)
2. 論文標題 Diabetes Mellitus Prevents an Improvement in the Serum Albumin Level During Interferon-free Sofosbuvir-based Therapy for Chronic Hepatitis C Patients: A Multi-institutional Joint Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 1533-1542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa E, Furusyo N, Nomura H, Dohmen K, Higashi N, Takahashi K, Kawano A, Azuma K, Satoh T, Nakamura M, Koyanagi T, Kato M, Shimoda S, Kajiwara E, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group	4. 巻 47(1)
2. 論文標題 Short-term risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication following direct-acting anti-viral treatment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aliment Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 104-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida N, Aiba Y, Hitomi Y, Kawashima M, Kojima K, Kawai Y, Ueno K, Nakamura H, Yamashiki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Soejima Y, Yoshizumi T, Takatsuki M, Tanaka A, Harada K, Shimoda S, Komori A, Eguchi S, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Nishida N, Aiba Y, Hitomi Y, Kawashima M, Kojima K, Kawai Y, Ueno K, Nakamura H, Yamashiki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Soejima Y, Yoshizumi T, Takatsuki M, Tanaka A, Harada K, Shimoda S, Komori A, Eguchi S, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aiba Y, Harada K, Ito M, Suematsu T, Aishima S, Hitomi Y, Nishida N, Kawashima M, Takatsuki M, Eguchi S, Shimoda S, Nakamura H, Komori A, Abiru S, Nagaoka S, Migita K, Yatsuhashi H, Tokunaga K, Nakamura M	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Increased expression and altered localization of cathepsin Z are associated with progression to jaundice stage in primary biliary cholangitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa E, Furusyo N, Azuma K, Nakamuta M, Nomura H, Dohmen K, Satoh T, Kawano A, Koyanagi T, Oho A, Takahashi K, Kato M, Shimoda S, Kajiwara E, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group	4. 巻 159
2. 論文標題 Elbasvir plus grazoprevir for patients with chronic hepatitis C genotype 1: A multicenter, real-world cohort study focusing on chronic kidney disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antiviral Res.	6. 最初と最後の頁 143-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima M, et al, Shimoda S, et al, Nakamura M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 650-659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bekki Y, Yoshizumi T, Shimoda S, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Kuno A, Narimatsu H, Shirabe K, Maehara Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Hepatic stellate cells secreting WFA+ -M2BP: Its role in biological interactions with Kupffer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1387-1393.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Shimoda S.
2. 発表標題 Autoimmunity against biliary epithelial cells.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田 慎治, 原田 憲一, 中村 稔
2. 発表標題 技術革新がもたらした消化器研究のパラダイムシフト PBC診断・治療バイオマーカーと新たな治療標的分子の確立
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田 慎治 原田 憲一, 中村 稔
2. 発表標題 自己免疫性肝疾患:病態解明と治療法の進歩 新たなPBC治療標的分子の同定と治療へのアプローチ
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田慎治
2. 発表標題 胆管細胞・免疫細胞から明らかにする原発性胆汁性胆管炎の病態
3. 学会等名 第55回日本消化器免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下田慎治
2. 発表標題 自己免疫性肝疾患の診断と治療の進歩 PBCで鍵となるIFN-g産生とUDCA有効性の疾患模倣培養系を用いたメカニズム解析
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下田慎治
2. 発表標題 PBCでは病態に深く関与する免疫細胞からのIFN-g産生をUDCAが制御する
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimoda S
2. 発表標題 Molecular mechanism of autoimmune liver diseases, especially PBC
3. 学会等名 「JSH-EASL Joint Session Autoimmune Liver Diseases including PBC and PSC: Europe and Japan」（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下田 慎治, 小野原 伸也, 中村 稔, 原田 憲一
2. 発表標題 難治性肝胆道疾患(PBC/PSC/AIH)診療の進歩と今後の課題 原発性胆汁性胆管炎(PBC)の新規治療開発に向けて
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下田 慎治, 小野原 伸也, 中村 稔
2. 発表標題 自己免疫性肝疾患のパラダイムシフト 原発性胆汁性胆管炎(PBC)模倣培養系とゲノムワイド関連解析(GWAS)を統合して得られる遺伝子情報の機能解析
3. 学会等名 第103回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinji Shimoda
2. 発表標題 Immune responses in primary biliary cholangitis
3. 学会等名 The 1st JSGE Asian Session (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinji Shimoda
2. 発表標題 molecular mechanism of PBC
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference 2017 Nagasaki (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 憲一 (Harada Kenichi) (30283112)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	中村 稔 (Nakamura Minoru) (40217906)	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・客員研究員 (87301)	
研究分担者	有田 誠 (Arita Makoto) (80292952)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授 (32612)	
研究分担者	吉住 朋晴 (Yoshizumi Tomoharu) (80363373)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	