

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461608

研究課題名(和文) 小児胆汁うっ滞性疾患における胆汁酸/糖・脂質代謝制御機構破綻のメカニズムの検討

研究課題名(英文) Investigation of aberrant regulation of bile acid, glucose, and lipid metabolism under chronic cholestatic state in pediatric liver disease.

研究代表者

近藤 宏樹 (KONDOU, Hiroki)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10373515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性胆汁うっ滞患者における胆汁酸代謝のメカニズムを解明するために、我々は胆道閉鎖症患者の摘出肝からマイクロダイセクション法を用いて組織肝細胞のmRNAを抽出し各分子のmRNAを測定した。その結果、胆汁酸合成律速酵素CYP7A1の発現が胆汁酸高値でありながら抑制されておらず、一方、FGFR4は活性化されていたが、ERKのリン酸化は抑制されていた。本研究は、慢性胆汁うっ滞患者においてFGF19による胆汁酸合成ネガティブフィードバック機構が破綻しており、そのメカニズムは肝細胞内においてERK経路が抑制されている為であることを報告した最初の研究である。

研究成果の概要(英文)：Regulatory mechanisms of bile acid synthesis under chronic cholestasis remain unclear. We analyzed molecules involving bile acid metabolism using liver and serum samples from 8 biliary atresia (BA) children and 4 non-cholestatic disease controls. CYP7A1 mRNA expression was not inhibited in BA microdissected hepatocyte-enriched tissue despite high serum bile acid concentrations. The FGF19 protein was synthesized in BA hepatocytes, and its serum concentration was elevated. FGFR4 was phosphorylated in BA livers. However, ERK phosphorylation was significantly decreased. This is the first study to demonstrate that the FGF19 pathway did not suppress bile acid synthesis due to downregulation of ERK pathway in BA patients.

研究分野：小児肝臓病学

キーワード：胆汁うっ滞 CYP7A1 FGF19 胆汁酸合成 SPRY2 HNF4 microdissection 胆道閉鎖症

1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は、胆汁の分泌や脂質の吸収に重要である。胆汁酸は肝細胞で合成された後、胆管に分泌され、その95%は回腸末端で再吸収されて門脈血行性に肝臓に戻るという腸肝循環が行われている。胆汁酸合成は、生理的条件下では生体内の胆汁酸プールが一定となるように厳密に制御されており、それには複数のネガティブフィードバック機構が働いている。一つ目は、胆汁酸は肝細胞に取り込まれた後、核内受容体 FXR にリガンドとして結合し、SHP を介して胆汁酸合成律速酵素である CYP7A1 の転写を抑制する (FXR/SHP 経路)。二つ目は、分泌型 FGF ファミリー分子の一つである FGF19 を介した経路である。胆汁酸は小腸上皮細胞内の FXR に結合すると、FGF19 が産生されて門脈血行に乗って肝臓に到達し、肝細胞膜上の FGF 受容体 4 (FGFR4) / Klotho (KLB) 受容体複合体に結合し ERK や c-JUN 経路を介してシグナル伝達が行われ CYP7A1 の転写を抑制する (FGF19/FGFR4 経路)。

FGF19 は胆汁うっ滞がなければ肝臓では産生されないが、肝外胆汁うっ滞の状態では肝細胞でも FGF19 の産生が行われ、SHP の上昇を伴わずに CYP7A1 の転写が強く抑制されることが報告された。慢性胆汁うっ滞の状態である胆道閉鎖症の肝臓では、従来の報告では CYP7A1 の発現が抑制されているとの報告があるが、血清中の胆汁酸濃度が高値であることと矛盾する。また、胆道閉鎖症 (BA) の肝臓は末期肝不全に至るまでは肝予備能が保たれていることが知られており、肝細胞の再生能力や薬剤代謝能も保たれている。このように慢性胆汁うっ滞を伴う胆道閉鎖症の肝臓における胆汁酸代謝の状態は明らかではない。

2. 研究の目的

慢性胆汁うっ滞の代表的疾患である胆道閉鎖症の肝臓において胆汁酸代謝の制御機構がどのように変化しているかを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

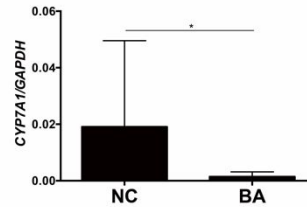
本研究計画は、大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認を受け、同意を得られた胆道閉鎖症 (BA) 8 名と非胆汁うっ滞症例 (NC) 4 例 (肝芽腫 2 例、肝血管腫 1 例、OTC 欠損症 1 例) の移植摘出肝および血清を用いて研究を行った。

また、肝組織中の mRNA プロファイルについては、従来は組織全体から RNA を抽出し解析に用いられていたが、今回、全肝臓、および肝小葉領域、線維化領域からマイクロダイセクション法を用いて別々に RNA を抽出し定量 PCR に用いた。その他、*in situ* Hybridization 法、免疫組織染色法にて組織中の発現を解析し、免疫沈降ウエスタンブロット法を用いて蛋白リン酸化の解析を行った。

4. 研究成果

(1) まずは、従来の報告の再現性を確認するため全肝臓から抽出した RNA を用いて BA 肝および

NC 肝における CYP7A1 mRNA を定量 PCR で測定した。その結果、従来の報告と一致して BA 肝では NC 肝より CYP7A1 mRNA が低いという結果となった (図1)。しかし血清中の胆汁酸濃度は NC と比較し BA で高値であった (表1)。

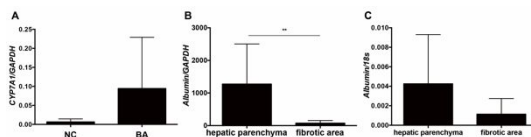


(図1)全肝臓 RNA 中の CYP7A1 発現量

	n	Total Bile Acids (μM)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)	T-Bil (mg/dl)	D-Bil (mg/dl)
N C	4	17.8 ± 13.7	122.5 ± 114.3	149.5 ± 230.6	126.0 ± 35.3	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.2
		240.5 ± 127.7 *	232.4 ± 96.9	110.5 ± 63.1	361.6 ± 240.9	7.3 ± 5.0* *	6.4 ± 4.3*

(表1)血清生化学データ

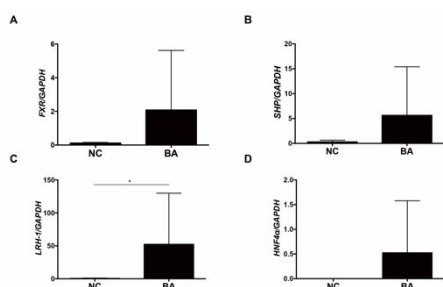
(2)胆汁酸合成は肝細胞内にて行われているが、BA 肝は肝硬変のため線維化領域が多く、全肝臓から抽出した RNA を用いた解析では肝細胞内における分子の発現を正確に評価できないと考え、肝小葉領域、線維化領域からマイクロダイセクション法を用いて別々に RNA を抽出し評価を行った。Albumin mRNA 量で検証すると肝小葉領域からの検体は線維化領域と比較して Albumin mRNA 量が多かったことから肝小葉領域からマイクロダイセクション法を用いて取り出した組織を hepatocyte-enriched tissue (HET) と定義し、以後の分子発現の評価に用いることとした。HET を用いて CYP7A1 mRNA を測定すると全肝臓の結果と逆に、有意差をもって CYP7A1 mRNA は NC 肝と比較して BA 肝で高値であり、血清中の胆汁酸濃度高いことと結果が一致した (図2)。



(図2)肝小葉領域と線維化領域における CYP7A1 および Albumin 発現量解析

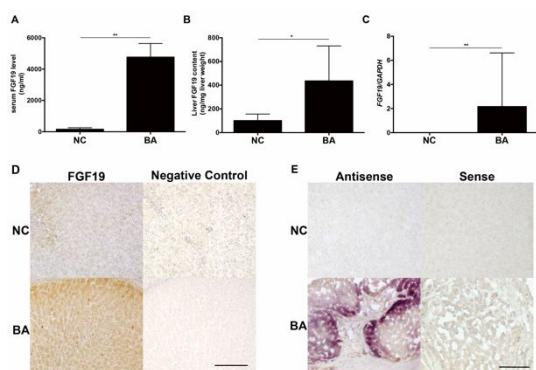
(3) それでは何故、高胆汁酸血症にもかかわらず CYP7A1 発現に対するネガティブフィードバック機構

が働いていないか調べるため、まずは FXR/SHP 経路を調べた。FXR および SHP mRNA の発現量は、いずれも BA 肝で高値でありシグナル伝達はされていた。SHP は LRH-1 や HNF4 と結合して CYP7A1 の転写を抑制することが知られているが、LRH-1 および HNF4 mRNA の発現量は、有意差は無かったものの、いずれも BA 肝で高値でありシグナル伝達はされていたにもかかわらず、CYP7A1 の転写は抑制されていないという結果となった(図 3)。



(図 3) FXR/SHP 経路分子の発現量解析

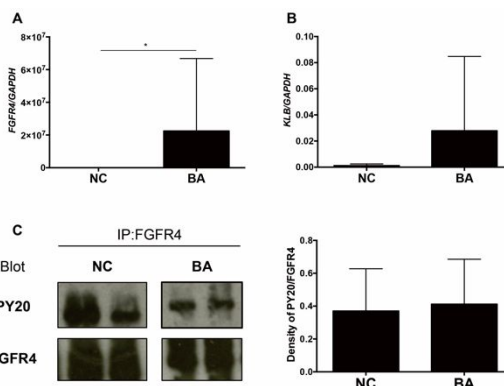
(4) 次に FGF19/FGFR4 経路につき、まず血清および肝臓中の FGF19 蛋白量を測定した。すると血清 FGF19 濃度、肝臓中 FGF19 量とも BA 肝で有意に増加していた。生理的条件下では FGF19 は肝細胞では産生されないため、実際に肝細胞が発現しているかどうか確認するために FGF19 mRNA を測定した結果 BA 肝で有意に高値であった。さらに詳細な検討を行うために免疫組織染色と *in situ* Hybridization を行い、FGF19 は BA 肝の肝細胞において転写され、その蛋白の少なくとも一部は BA 肝の肝細胞から分泌されていることが明らかとなった(図 4)。一方、NC 肝の肝細胞では FGF19 mRNA、蛋白とも発現がみられなかった。これは従来の報告にはなく、新規の発見であった。



(図 4) BA および NC 肝における FGF19 の発現解析

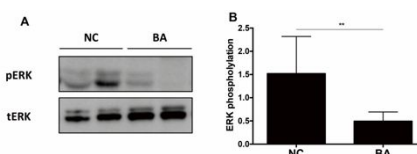
(5) 次に FGF19/FGFR4 シグナル伝達経路につき解析した。FGF19 は、肝細胞膜上の FGFR4/KLB 受容体複体に結合するが、FGFR4 および KLB mRNA とも BA 肝で発現が

上昇していた。さらに FGFR4 のリン酸化を確認したところ BA 肝、NC 肝ともリン酸化されていたことから BA 肝でも FGF19 のシグナルは抑制されておらず、肝細胞内に伝達されていることが分かった(図 5)。



(図 5) FGFR4/KLB の発現量と FGFR4 のリン酸化の解析

(6) 最後に FGFR4/KLB シグナル伝達経路の下流である ERK のリン酸化の状態を確認した。すると NC 肝では ERK はリン酸化されており FGF19 のシグナルが入ると CYP7A1 の転写が抑制される状態であるのに対し、BA 肝では ERK のリン酸化が有意に抑制されていることが判明した。このことが、慢性胆汁うっ滞の状態である BA 肝において CYP7A1 の発現量が抑制されていない一因であると考えられた。この事実、高胆汁酸血症にも関わらず胆汁酸合成が抑制されない少なくとも一つの原因であると考えられた(図 6)。



(図 6) ERK リン酸化の解析

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 0 件)

(学会発表) (計 1 件)

長谷川泰浩、近藤宏樹、他：胆道閉鎖症患者の肝臓では胆汁酸合成律速酵素 CYP7A1 の抑制機構の破綻が起きている。日本肝臓学会、2015 年

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

(その他) ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 宏樹 (KONDOU, Hiroki)

近畿大学・医学部奈良病院・講師

研究者番号：10373515

(2) 研究分担者

別所 一彦 (BESSHO, Kazuhiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 80423169