

平成30年6月13日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870438

研究課題名(和文) ウルソデオキシコール酸が効かないPBC症例の原因解明と新規治療戦略の基盤作製

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism underlying poor response to UDCA in PBC patients

研究代表者

稲嶺 達夫 (INAMINE, Tatsuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：00549628

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)の治療薬であるウルソデオキシコール酸(UDCA)やベザフィブラートへの反応性に関わる機序の解明を目指した。胆汁酸合成の律速酵素CYP7A1およびその転写因子のPGC-1の遺伝子多型(SNPs)は、PBC肝硬変進行との相関が過去に示されていたが、今回PBC患者のUDCA反応性とは相関しなかった。また、細胞実験において、ベザフィブラートはCYP7A1のプロモーター活性およびプロモーターSNPの機能に影響しなかった。一方で、CYP7A1活性の個人差を規定する新たな因子としてPGC-1のrs8192678を同定した。

研究成果の概要(英文)：The original research goal was to reveal mechanisms underlying individual difference of reactivity to ursodeoxycholic acid (UDCA) or bezafibrate treatment in Japanese patients with primary biliary cholangitis (PBC). In the study, genetic polymorphisms of CYP7A1, which is the rate-limiting enzyme in the classical bile acid synthetic pathway, as well as of PGC-1, which is a transcriptional inducer of CYP7A1, were not associated with UDCA response of PBC patients. Reporter gene assay demonstrated that bezafibrate does not affect neither activity of CYP7A1 promoter nor function of the promoter SNP of CYP7A1. On the other hand, rs8192678 that is a missense variant of PGC-1 was shown to be involved in hepatic CYP7A1 activity in a healthy Japanese.

研究分野：薬物治療学

キーワード：遺伝子多型 胆汁酸 薬物治療 胆汁うっ滞性肝疾患

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は、慢性非化膿性破壊性胆管炎による小葉間胆管の減少と、それに起因する胆汁うっ滞を特徴とする慢性肝疾患である。通常、第一選択薬ウルソデオキシコール酸 (UDCA) により PBC 患者の肝胆系検査値は改善するが、PBC 患者の一部は UDCA に反応せず、肝硬変や肝不全に進行する。現在、この UDCA 不応例に対して、ベザフィブラートの追加投与が有効であるとされているが、なぜ UDCA の治療効果に個人差が存在するのか、なぜ UDCA 不応例に対してベザフィブラートが有効なのか、その詳細な機序は明らかではなく、PBC 治療戦略における重要な課題となっていた。

研究代表者らは (以下、代表者とする)、UDCA 不応のメカニズムを解明するにあたって、胆汁酸ホメオスタシスに注目した。肝内胆汁酸量は胆汁酸ホメオスタシスにより調節されている。胆汁うっ滞時、過剰な胆汁酸に反応した肝細胞は、肝細胞内の胆汁酸を減少させるため、胆汁酸の合成・代謝・取込・排出に関わる遺伝子の転写を制御する。さらに、UDCA もまた、これら胆汁酸ホメオスタシスに関わる遺伝子群の転写を調節することで治療効果を発揮すると考えられている。

これまでに代表者は、胆汁酸合成の律速酵素 CYP7A1 (遺伝子名 *CYP7A1*) および、その転写を正に制御している HNF4 α (*HNF4A*) と PGC-1 α (*PPARGC1A*) の遺伝子の一塩基多型 (SNPs) が PBC の長期的な肝硬変進行と相関することを示した。CYP7A1 は胆汁酸合成の律速酵素であり、体内胆汁酸プールサイズを規定する。そのため、胆汁うっ滞時には、複数の経路が CYP7A1 の転写を抑制し、過剰な胆汁酸の蓄積を軽減する。しかし、PBC 肝硬変進行と相関を示した *CYP7A1* プロモーター SNP の肝硬変進行リスクアレルは、胆汁酸蓄積下においても *CYP7A1* 転写活性を相対的に高く保つことを、細胞を用いた実験で代表者は明らかにした。また、同様に肝硬変進行と相関を示した PGC-1 α の SNP についても、その肝硬変進行リスクアレルは、*CYP7A1* 転写を増加させることを示した。これらの結果は、CYP7A1 や PGC-1 α の肝硬変進行リスク遺伝子型を持つ PBC 患者の肝臓では、CYP7A1 が高発現し、胆汁酸の合成が増加していることを示唆している。さらに、UDCA 不応 PBC 患者にベザフィブラートを投与すると、肝臓における CYP7A1 活性が抑制されることが報告されている。以上より、代表者は以下の仮説を立てた。

- CYP7A1 発現量が高い PBC 患者では、PBC が重症化する。
- CYP7A1 高発現型の PBC 患者は UDCA に対して不応となる。
- ベザフィブラートは、CYP7A1 高発現型 PBC 患者の肝臓において CYP7A1 転写を抑制することで治療効果を発揮する。

2. 研究の目的

前述の仮説を検証するために、以下を研究の目的とした。

- (1) **CYP7A1 転写における遺伝的個体差が PBC 進行に影響を与えることを明らかにする。** そのために、実際にヒトの肝臓において CYP7A1 酵素活性に遺伝的個体差があること、胆汁うっ滞モデルマウスが *Cyp7a1* 過剰発現により重症化することを示す。
- (2) **CYP7A1 発現の変化が UDCA の治療効果に与える影響を明らかにする。** そのために、PBC 患者において、遺伝子型間で UDCA 治療効果に差があることを示す。
- (3) **CYP7A1 が高発現している胆汁うっ滞性肝障害に対するベザフィブラートの効果を明らかにする。** そのために、ベザフィブラートが *CYP7A1* 高発現プロモーターを抑制することを示し、*Cyp7a1* 過剰発現マウスの胆汁うっ滞における UDCA やベザフィブラートの治療効果を示す。

3. 研究の方法

(1) CYP7A1 酵素活性の遺伝子型間での比較

長崎大学の健康な学生 50 名を対象として、PBC の肝硬変進行と相関した CYP7A1、PGC-1 α 、HNF4 α 遺伝子の SNPs と、CYP7A1 酵素活性マーカーである血清中の 7- α -hydroxycholest-4-en-3-one (C4) 量との相関解析を行った。

CYP7A1 発現には日内変動があるため、発現が高い正午から午後 3 時までの間に採血を行った。採取した血液の血球画分より NucleoSpin Blood を用いてゲノム DNA を抽出した。CYP7A1 rs3808604、HNF4A rs6017340 および rs6031587、PPARGC1A rs8192678 の 4 SNPs を解析対象とした。遺伝子型決定は、polymerase chain reaction (PCR) -restriction fragment length polymorphism 法または PCR-high resolution melting curve analysis 法により行った。また、血清から C4 を含む画分を抽出し、高速液体クロマトグラフィー-UV 検出法により血清 C4 濃度を求めた。多群間での増加・減少傾向の検出を行う Jonckheere-Terpstra trend test により遺伝子型間で C4 濃度を比較した。本研究は長崎大学・ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認の下実施され、参加者には文書によるインフォームド・コンセントを行い、研究参加の同意を得た。

(2) UDCA 治療効果の遺伝子型間での比較

PBC 肝硬変進行に関する過去の相関研究とは異なる PBC 患者群を対象とした。PBC の肝硬変進行と相関し、同時に、細胞実験で機能性 SNPs であることが示された *CYP7A1* rs3808607 および *PPARGC1A* rs8192678 と UDCA 治療効果との相関解析を行った。PBC

患者は国立病院機構肝臓病研究班の PBC 研究に 2008 年 9 月から 2011 年 11 月までの間に登録された PBC 患者のうち、UDCA 単独による治療を受け、治療効果判定の情報のある患者 158 名を対象とした。治療開始時点で肝硬変など進行ステージにある患者は除外した。UDCA 治療効果の判定には、日本の PBC 診療ガイドラインの評価基準と国際的評価基準（バルセロナ基準、パリ基準、トロント基準）で共通して用いられる ALP を用いた。UDCA 開始 2 年後において ALP 正常値上限の患者を good responder 群、正常値上限 < ALP 正常値上限 1.5 倍の患者を fair responder 群、ALP > 正常値上限 1.5 倍の患者を poor responder 群とした。解析は、反応不良群（poor + fair）と反応良好群（good）に再分類し、二群間で遺伝子型の頻度を比較した。加えて、治療反応性の違いをより明確にした不応群（poor）と反応良好群（good）間でも解析を行った。

採取した血液の血球画分より NucleoSpin Blood を用いてゲノム DNA を抽出した。rs3808604 および rs8192678 の遺伝子型決定は、上記（1）と同様に行った。また、アレルや遺伝子型の出現頻度の比較には Chi-squared test を用いた。本研究は長崎大学および長崎医療センターのヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認の下実施され、参加者には文書によるインフォームド・コンセントを行い、研究参加の同意を得た。

(3) レポーター遺伝子アッセイ

肝細胞株 HepG2 を用いた細胞実験を行い、ベザフィブラートが *CYP7A1* の転写を調節するかどうか、また、PBC 肝硬変進行と相関を示した *CYP7A1* のプロモーター SNP のアレル間でベザフィブラート刺激の影響が異なるかどうかを明らかにした。*CYP7A1* の転写開始点を含むプロモーター領域 850 bp を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを作製し、HepG2 細胞株に遺伝子導入した。遺伝子導入 6 時間後にベザフィブラートで刺激し、48 時間後のルシフェラーゼ遺伝子の発現量を測定し、アレル間で比較した。さらに、ベザフィブラートに加えてデキサメタゾン、トランスレチノイン酸、ビリルビン、リファンピシンなど各種核内受容体アゴニストでも同様に刺激し、核内受容体が上記 SNP に与える影響を明らかにした。

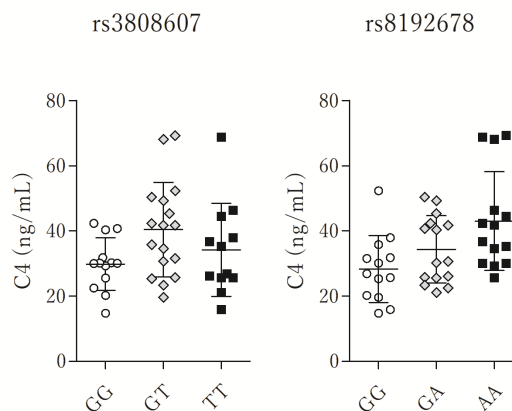
4. 研究成果

(1) *CYP7A1* 酵素活性への遺伝子多型の影響

PBC 肝硬変進行と相関し、かつ、細胞系の実験で *CYP7A1* の転写活性に影響することが示唆された *CYP7A1* のプロモーター SNP の rs3808607 と *PPARGC1A* のミスセンス SNP の rs8192678 が実際にヒトの肝臓における *CYP7A1* の酵素活性に影響しているかどうかを明らかにするために、*CYP7A1* 酵素活性マ

ーカーである C4 の血清中濃度を各 SNP の遺伝子型間で比較した。健常成人 50 名中、食事や採血の時間を揃えた 42 名を解析対象とした。今回、血清 C4 測定系を確立するまでに時間を要し、当初予定していた PBC 患者の血清を用いた解析は期間中に実施できなかった。

CYP7A1 rs3808607 の遺伝子型間で、血清 C4 濃度に差は見られなかった。一方、*PPARGC1A* rs8192678 の遺伝子型間で C4 濃度に差が見られ、A アレルの数に比例して C4 濃度が増加していた(GG 28.31 vs GA 34.36 vs AA 43.03 ng/mL, $P = 0.007$)。また、PBC 肝硬変進行と相関を示した *HNF4A* の rs6017340 および rs6031587 についても、同様に解析を行ったが、遺伝子型間で血清 C4 濃度に差は見られなかった。



過去の代表者の結果より、PGC-1 α ミスセンス SNP である rs8192678 の A アレルは PBC 肝硬変進行のリスクアレルであり、A アレルを組み込んだ PGC-1 α 発現プラスミドは、G アレルを組み込んだものと比較して細胞実験系での *CYP7A1* 転写活性化能が高いことを示している。以上より、*PPARGC1A* の rs8192678 は生理条件下での *CYP7A1* の転写および酵素活性に影響すること、および、同機構が PBC の肝硬変進行に寄与することが示唆された。

CYP7A1 は胆汁酸合成の律速酵素であり、その生理的役割から胆汁うっ滞性肝疾患だけでなく、コレステロール代謝の関わる心疾患などにおいても注目されている。*CYP7A1* 酵素活性の個人差を決める新たな因子として *PPARGC1A* の SNP を同定した今回の成果は、肝疾患研究だけでなく代謝性疾患研究においても有用な知見となりうる。

(2) UDCA 治療効果への遺伝子多型の影響

CYP7A1 の発現量の個人差が PBC 患者における UDCA 治療効果に影響するかどうかを明らかにするために、UDCA 治療効果と *CYP7A1* および *PPARGC1A* SNPs との相関解析を行った。UDCA 単独による治療を受けた PBC 患者 158 名中、poor responder が 9 名、fair

responder が 36 名 ,good responder が 113 名であった。したがって、解析に用いた再分類後の人数はそれぞれ、反応良好群 (113 名)、反応不良群 (43 名)、不応群 (9 名) となった。

UDCA 反応不良群 反応良好群間で、*CYP7A1* rs3808607 および *PPARGCIA* rs8192678 のアレル・遺伝子型の出現頻度に差はなかった。さらに、UDCA 不応群 反応良好群間での解析においても、2 SNPs のアレル・遺伝子型の出現頻度に差はなかった。

代表者の過去の研究において、上記 *CYP7A1* と *PPARGCIA* の 2 SNPs は PBC の肝硬変進行との相関が示された SNPs である。今回の成果から、*CYP7A1* や *PPARGCIA* の SNPs は、PBC の長期的な進行には寄与する一方で、UDCA の治療効果に影響する因子ではないことが示唆された。

(3) レポーター遺伝子アッセイ

CYP7A1 高発現型のプロモーターに対してベザフィブラートが抑制効果を示すかどうかを明らかにするために、HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイを行った。

結果、rs3808607 を含む *CYP7A1* プロモーターはベザフィブラート刺激に反応せず、ルシフェラーゼ遺伝子の発現に変化はなかった。また、rs3808607 の A アレルは C アレルと比べて高い *CYP7A1* のプロモーター活性を持つが、アレル特異的なベザフィブラート反応性は示さなかった。

さらに、他の核内受容体のアゴニストであるデキサメタゾン、トランスレチノイン酸、ピリルピン、リファンピシンによる刺激もアレル特異的なレポーター遺伝子発現の変化を示さなかった。

代表者の過去の研究において、核内受容体 FXR アゴニストであるケノデオキシコール酸による刺激も rs3808607 のアレル特異的な反応を示さなかった。以上より、ベザフィブラートは *CYP7A1* プロモーターの転写活性を直接制御しないこと、*CYP7A1* プロモーター SNP の rs3808607 は *CYP7A1* の転写に影響する一方で、ベザフィブラートの受容体である *PPARα* や他の核内受容体の影響は受けないことが示唆された。

(4) その他

上記 (1) ~ (3) の成果より、*CYP7A1* プロモーターはベザフィブラートによる転写制御を受けず、また、プロモーター SNP の rs3808607 は PBC 患者の UDCA 治療効果と相関を示さなかった。したがって、UDCA 反応に関わる機序解明を目的として *CYP7A1* 過剰発現マウスを輸入し動物実験を行うことは妥当ではないと判断し、当初予定していた動物実験は中止した。

一方、UDCA 治療効果に寄与する新たな遺伝因子探索を目的として、これまでに代表者によって PBC 発症との関連が示されたリン

脂質トランスポーター ATP8B1 (遺伝子名 *ATP8B1*) の SNP rs2663849 と UDCA 治療効果との相関解析を行ったところ、UDCA 反応不良群 反応良好群間で遺伝子型の出現頻度に差を認めた。同 SNP は HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいても *ATP8B1* 転写に影響する機能性 SNP であることが示された。今後は、ATP8B1 を含めた新たな機序をターゲットにして、UDCA 治療効果の機序解明を目指す。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

ATP8B1 多型は原発性胆汁性肝硬変患者の UDCA 治療応答性に関与する。後藤奈津海、鵜池美希、谷口隼輔、稲嶺達夫、近藤新二、中村稔、塚元和弘。日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、横浜市パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

本研究課題期間終了時点で未発表の研究論文および学会発表の情報は、発表後、代表者が所属する研究室のホームページで随時公開する。

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/treat/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲嶺 達夫 (INAMINE, Tatsuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・助教

研究者番号：00549628

(2) 研究協力者

井川 千鶴 (IGAWA, Chizuru)

鵜池 美希 (UNOIKE, Miki)

後藤 奈津海 (GOTO, Natsumi)

牧本 彩花 (MAKIMOTO, Ayaka)