

原発性胆汁性肝硬変における疾患特異的遺伝子発現の基礎検討

上野義之 山形大学・内科学第二講座・教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）は、肝内胆管の進行性破壊と消失が特徴的な原因不明の疾患である。しかしその病因の詳細は不明であり、一定の見解を得るに至っていない。本研究では、より感度が高く定量性にもすぐれている次世代シーケンサーを用いて、PBC に特徴的に発現される血清内の短鎖遺伝子断片についてその特徴的な発現プロファイルを検討した。その結果、血清内の遊離 miRNA の内数種類で PBC と他のウイルス性肝疾患で異なる発現プロファイルを持つものを同定した。さらにこの解析法が、PBC の病態解析及び亜病型の診断にも有用である可能性が示唆され、今後はこの miRNA が他の肝線維化マーカーといかなる相関を持つか検討することが必要と思われた。

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は原因不明の疾患で、その病因は未だ不明である。一方、近年次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の超大量解析が進んでおり、肝疾患領域でも次世代シーケンサーを用いた解析、とりわけマイクロ RNA の報告が散見されている。マイクロ RNA（以下 miRNA）は短鎖 RNA であり、標的となる分子の発現を調整する多彩な役割を有している。肝疾患では主にウイルス性肝炎でそれぞれ発現が特徴的な miRNA の報告がなされてきた。今回、PBC の患者の血清より得られた検体を用いて、血清内の遊離 miRNA を網羅的に検討した。本年度は、特に技術的な検討を行うために、PBC と他の肝疾患と比較することにより miRNA プロファイリングによる階層的クラスタ分類が技術的に可能かということについて、少数例での端索的検討を行った。

A. 研究方法

PBC 患者の血清内遊離 miRNA のプロファイリングを検討。血清より Trizol LS を用いて Total RNA を抽出、TruSeq small RNA sample

prep kit を用いて、ライブラリーを作成し、シーケンシングを行った。疾患コントロールとして同数の慢性 B 型肝炎、同数の慢性 C 型肝炎、そして健常者からの検体を用いて検討した。ミスマッチの許容は 1% で行い、ANOVA による有意差検討で統計学的さを認めたものについてはさらに定量的 PCR 法にて発現の多少を検討した。

B. 研究結果

(1) PBC 患者血清 5 検体の血清内遊離 miRNA のプロファイリングを行い、B 型肝炎、C 型肝炎、健常者と多群比較しクラスタリング ANOVA（分散分析）で $P < 0.05$ を抽出した。P-value が計算できたものは 670 個あり、解析の結果得られたものは、110 個の miRNA。110 個の miRNA について発現パターンによるクラスタリングを行い、ヒートマップを作成したところ、PBC は一つの群を形成した。さらに定量的 PCR 法で発現を定量したところ、次世代シーケンサーで特徴的に低値であった miRNA はこの方法でも低値であることが確認

された。

- (2) 亜病型ごとの検討では、門亢症型と、肝不全型で特異的に低下する miRNA が拾い上げられ、定量的 RT-PCR でも低下が確認された。

C. 考察

血清内遊離 miRNA を解析することにより、疾患の新たな特徴を見い出せる可能性があり、発症原因の解明に迫ることができる。今後、さらに症例数を増やして PBC に特徴的な miRNA や新規 miRNA の同定を行い、さらに肝線維化マーカーとの比較を行う予定である。

D. 結論

次世代シーケンサーによる miRNA 解析は、PBC の発症に関係する miRNA の探索に有用であり、さらに、亜病型ごとに異なる発現プロファイルを有している可能性が示された。PBC の線維化マーカーの探索にも有用なツールになる可能性が示された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mancinelli R, Franchitto A, Glaser S, Meng F, Onori P, Demorrow S, Francis H, Venter J, Carpino G, Baker K, Han Y, **Ueno Y**, Gaudio E, Alpini G. GABA induces the differentiation of small into large cholangiocytes by activation of Ca²⁺/CaMK I-dependent adenylyl cyclase 8. *Hepatology*. 2013 Jul; 58 (1):251-263.
- 2) Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, **Ueno Y**, Nakayama K, Shimosegawa T. Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers. *PLoS one*. 2013 Jun; 8 (6):e66086.
- 3) Harada K, Hirohara J, **Ueno Y**, Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, Ichida T, Nakanuma Y. Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. *Hepatology*. 2013 May; 57 (5):1942-1949.
- 4) Renzi A, DeMorrow S, Onori P, Carpino G, Mancinelli R, Meng F, Venter J, White M, Franchitto A, Francis H, Han Y, **Ueno Y**, Dusio G, Jensen KJ, Greene JJ, Jr., Glaser S, Gaudio E, Alpini G. Modulation of the biliary expression of arylalkylamine N-acetyltransferase alters the autocrine proliferative responses of cholangiocytes in rats. *Hepatology*. 2013 Mar; 57 (3):1130-1141.
- 5) **Ueno Y**. The Current Endeavors to Understand the Pathogenesis of Intractable Liver Diseases. *Tohoku J Exp Med*. 2012 Mar; 226 (3):171-175.
- 6) Ninomiya M, **Ueno Y**, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T. Use of Illumina Deep Sequencing Technology To Differentiate Hepatitis C Virus Variants. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar; 50 (3):857-866.
- 7) Francis HL, DeMorrow S, Franchitto A, Venter JK, Mancinelli RA, MA White, Meng F, **Ueno Y**, Carpino G, Renzi A, Baker KK, Shine HE, Francis TC, Gaudio E, Alpini GD, Onori P. Histamine

stimulates the proliferation of small and large cholangiocytes by activation of both IP₃/Ca²⁺ and cAMP-dependent signaling mechanisms. *Lab Invest.* 2012 Mar; 92:282-294.

- 8) Meng F, Francis H, Glaser S, Han Y, Morrow SD, Stokes A, Staloch D, Venter J, White M, **Ueno Y**, Reid LM, Alpini G. Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. *Hepatology.* 2012 Jan; 55 (1):209-221.
- 9) Quinn M, **Ueno Y**, Pae HY, Huang L, Frampton G, Galindo C, Francis H, Horvat D, Millin MM, Morrow SD. Suppression of the HPA axis during extrahepatic biliary obstruction induces cholangiocyte proliferation in the rat. *Ame J Physiol GI Liver.* 2012 Jan; 302 (1):182-193.
- 10) Francis HL, DeMorrow S, Franchitto A, Venter JK, Mancinelli RA, MA White, Meng F, **Ueno Y**, Carpino G, Renzi A, Baker KK, Shine HE, Francis TC, Gaudio E, Alpini GD, Onori P. Hepatic and Pancreatic Systems Histamine stimulates the proliferation of small and large cholangiocytes by activation of both IP₃/Ca²⁺ and cAMP-dependent signaling mechanisms. *Lab Invest.* 2011 Nov; 92:282-294.
- 11) Ninomiya M, **Ueno Y**, Shimosegawa T. PBC: Animal Models of Cholangiopathies and Possible Endogenous Viral Infections. *Int J Hepatol.* 2011 Jun; 2012:Article ID:649290, 6 pages.

2. 学会発表

- 1) Katsumi T, Ninomiya M, Shimosegawa T, Mizuno K, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, **Ueno Y**. Ability of miRNA Profiling to Distinguish the Clinical Course of Patients with Primary Biliary Cirrhosis: Comprehensive Analysis with Deep Sequencing. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Washington DC.
- 2) Graf A.B, Francis H.L, Hargrove L, Kennedy L, Hodges K.M, Greene J.F, **Ueno Y**. Knockout of the histidine decarboxylase (HDC) gene reduces biliary hyperplasia in cholestatic bile duct ligated (BDL) mice. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Washington D.C. USA.
- 3) Meng FY, Francis H, Glaser S, Han YY, DeMorrow S, Stokes A, Staloch D, Venter J, White M, **Ueno Y**, Reid LM, Alpini G. Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Boston.
- 4) Graf A.B, Francis H.L, Hargrove L, Kennedy L, Hodges K.M, Greene J.F, **Ueno Y**. The mast cell stabilizer, cromolyn sodium, reduces bile duct ligated-induced biliary hyperplasia: a novel role for the in vivo paracrine influence of mast cells on biliary proliferation. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Washington D.C. USA.
- 5) Kakazu E, Kondo Y, Kogure T, Ninomiya M, Kimura O, Morosawa T, Iwata T, **Ueno Y**, Shimosegawa T. An imbalance in plasma amino acids of advanced cirrhotic

patients suppresses the maturation of dendritic cells by reducing the intracellular ATP due to interference with the mitochondrial TCA cycle.

AASLD annual meeting, November 2012. Boston. 2012.11.09-13.

- 6) Ninomiya M, Kondo Y, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Funayama R, Nagashima T, Morosawa T, Iwata T, Nakayama K, **Ueno Y**, Shimosegawa T.

Characterization of circulating microRNAs in patients with primary biliary cirrhosis by Illumina deep sequencing. AASLD annual meeting, November 2012. 2012.11.09-13. Boston.

- 7) Glaser SS, Meng FY, Venter J, White M, Francis H, **Ueno Y**, Franchitto A, Onori P,

Gaudio E, Alpini G. Increased synthesis of secretin from S cells and cholangiocytes during cholestasis increases large cholangiocyte proliferation by both paracrine/autocrine mechanisms. AASLD annual meeting, November 2012. 2012.11.09-13. Boston.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし