

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10917

研究課題名(和文)胆道閉鎖症における制御性T細胞のsubpopulation解析

研究課題名(英文)Frequency and function of regulatory T cell subpopulation of biliary atresia

研究代表者

齋藤 武 (Saito, Takeshi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20406044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では胆道閉鎖症(BA)におけるTreg細胞の全身及び局所における頻度と機能をsubpopulation毎に検討した。末血CD4+CD25+FoxP3細胞の頻度とリンパ球増殖抑制率にはBA群とcontrol群で差を認めなかったが、CD4+CD25+CD45RA-CD127-FoxP3細胞のそれらはBA群で有意に低下していた。肝組織においても前者の頻度と分布には両群に差を認めなかったが、後者の出現頻度はBA群で有意に低く胆管上皮近傍への集積は極めて疎らであった。BAのTregにおける出現頻度と機能はsubpopulation毎に異なり、これが病因・病態形成に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the frequency and function of Treg subpopulation in the systemic and local cellular immunity, using not only generally accepted Treg marker (CD4, CD25, FoxP3) but also additional markers (CD45RA, CD127, and Helios). Even though no difference was found in the frequency and lymphocyte suppression capacity of CD4+CD25+FoxP3 cells found both in the systemic and local immunological environment between BA group and control group, those of CD4+CD25+CD45RA-CD127- cells were significantly lower in BA group than control group. In terms of hepatic immune environment, the frequency of CD4+CD25+FoxP3 cells did not yield significant difference between the groups, while that of CD4+CD25+CD45RA-CD127- cells was significantly lower than the control group. Thus, Treg subpopulation may be showing the different immunological behavior from conventional CD4+CD25+ Treg cells, possibly leading to the etiology and pathology of BA.

研究分野：小児肝胆道疾患

キーワード：制御性T細胞 胆道閉鎖症 自然免疫 小児外科学

### 1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症(Biliary Atresia: BA)の病因として全身と局所における細胞性免疫環境の不均衡がいわれ、Th1 や Th2 への偏向、Treg の frequency や機能の異常と破綻が示唆されてきた。Treg 研究は主として CD4+CD25+FoxP3+細胞を標的として研究が進んだが、最近ではこれ以外の真の(bona fide) Treg の同定と機能解析の重要性が指摘されるようになった。BA の Treg 研究はその端緒についたばかりであり、ましてや bona fide Treg の検討を試みた報告はない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、BA の制御性 T 細胞(regulatory T cell: Treg)を、従来の CD4+CD25+FoxP3+細胞に限定せず、新たに細胞表面マーカー(CD45RA, CD127)や転写因子(Helios, early growth response 2(Egr2))を利用して subpopulation 毎に分別し、真の(bona fide)Treg を同定して、その全身・局所における出現頻度、局在、機能や由来を解明することにある。

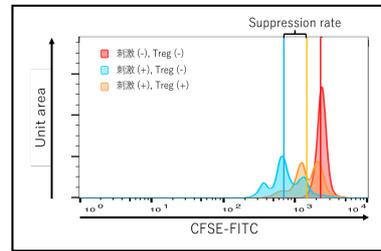
### 3. 研究の方法

#### (1) 末梢血単核球中の Treg subpopulation の頻度

CD4+CD25+FoxP3+ 細胞と CD4+CD25+CD45RA-FoxP3<sup>high</sup> 細胞、CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> 細胞の頻度を比較した。血液サンプル 50-100 μl に 5 倍量の 1×BD Pharm lyse を加え、軽く vortex した後室温で 15 分 incubate し赤血球を lysis した。得られた白血球を各標識抗体で染色し、FACS caliber (BD Biosciences) を用いて flow cytometry を行った。解析には FlowJo ver.10 を用いた。

#### (2) CFSE を用いたリンパ球増殖抑制試験による Treg subpopulation の抑制能の測定

血液サンプル約 3ml を PBS で洗い血清を除いたのち、Ficoll Plaques(GE healthcare)で比重遠心し単核球を採取する。MACS system(CD4+ CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human, Milteyi Biotec)で CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg を sorting し採取した。Treg subpopulation については CD127 と CD45A の各抗体を用い追加抽出した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell を CFSE で染色し、96 well U bottom plate にそれぞれ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cell を 3.0 × 10<sup>4</sup>/well, Treg subpopulation を 6.0 × 10<sup>3</sup>/well で播種し、CD3/28 microbeads, IL-2 で刺激を加え、37 °C, 5%CO<sub>2</sub> で 3 日間培養した。3 日後に細胞を回収し FACS caliber(BD Biosciences)で flow cytometry を行い FlowJo ver.10 で解析した。Effector T cell の positive control, negative control との CFSE 蛍光強度中央値の差を抑制率として算出しサンプル毎に比較した。



#### (3) FOXP3 遺伝子の Treg-specific demethylated region (TSDR)の脱メチル化定量

既報(Tatura et al. PLoS One. 2012;7)を参考に、TSDR 内にメチル化特異的のプローブ(HEX-labeled methylated FOXP3, TCGGCGTATTTCGG)、非メチル化特異的のプローブ(FAM-labeled unmethylated FOXP3, AGTTTGGTGTATTTGGT)及び両者の共通プライマー (forward primer: GAAATTTGTGGGGTGGGGTATTTGTTTT, reverse primer: ATCTACATCTAAACCCTATTATCACACCC)を設計・作成した。血液サンプルから DNA を抽出し、EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN)を用いて bisulfite 処理を行った。得られたサンプルを template とし、real time PCR を行った。

#### (4) BA 肝組織中における Treg subpopulation の個数と局在

手術時に採取した肝組織を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(ナカライテスク)で固定しパラフィン切片を作成した。抗原賦活化処理は 0.01M sodium citrate pH6.0 を緩衝液としたマイクロウェーブ法で行い、3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で10分間室温処理し内因性ペルオキシダーゼを失活させ、ブロッキングワン・ヒスト(ナカライテスク)を用いて 10 分間室温でブロッキングした。1 次抗体をのせ 4 日一晩 incubate し、2 次抗体はそれぞれ 1 時間・室温・遮光にて反応を行い、最後に DAPI 染色を行い封入した。抗体は以下のものを使用した。1 次抗体は Cytokeratin 19, FOXP3, CD4, CD45RA, CD127, Helios を用い、BZ-X 700(KEYENCE)で観察した。

#### (5) 生体マウス肝臓を用いた Treg subpopulation 採取法の検討

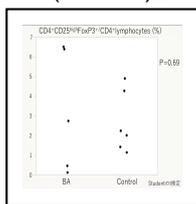
生体マウスを頸椎脱臼で犠死せしめ肝臓を摘出した。40 μm cell strainer 上で肝臓をすり潰し、33% Percoll で比重遠心を行い赤血球と単核球を抽出した。ペレットを 2ml の 1×BD Pharm lyse で再懸濁し、室温で 15 分 incubate し赤血球を lysis し単核球数を count した。

### 4. 研究成果

#### (1) 末梢血単核球中の CD4+CD25+FoxP3+ Treg と subpopulation の頻度

CD4<sup>+</sup>リンパ球中の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>high</sup> Treg の割合を計測した。BA 術前(採取日齢 56.3 ± 21.4)5 例と対照(同 123.5 ± 75.3)6 例を行い、BA 群で平均 3.2(± 3.1)%、対照群 2.7(±

1.6)%であった。両群で有意差はみられなかった(P=0.69)。

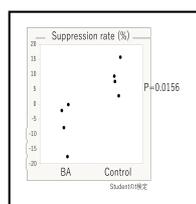
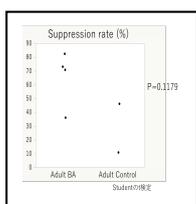


次いで Treg(CD4+CD25+細胞)を、他の細胞表面マーカーである CD45RA と CD127 を使って subpopulation に分離・抽出した。ある種の自己免疫性疾患では CD45RA+FoxP3low が resting 状態を、CD45RA-FoxP3high が活性化状態を、そして CD45RA-FoxP3low は非 Treg 細胞とみなすことがある。各 subpopulation の BA 群と対照群の出現頻度は、BA 群・対照群の順に  $3.4 \pm 2.4\% \cdot 2.6 \pm 1.9\%$  ( $p=0.32$ )、 $1.3 \pm 2.1\% \cdot 2.4 \pm 3.2\%$  ( $p=0.04$ )、 $2.3 \pm 1.7\% \cdot 2.0 \pm 1.8\%$  ( $p=0.25$ ) であり、活性化状態にある Treg が BA 群で有意に低値を示した。

両群は、一般的 Treg(CD4+CD25+細胞)の総数に有意差は認められないものの、その分画につき検討すると制御機能を有する Treg 分画(CD4+CD25+ CD45RA-CD127-FoxP3high)が有意に減少しており、これが BA の病態に関与している可能性が示唆された。

(2) CFSE を用いたリンパ球増殖抑制試験による CD4+CD25+Treg の抑制能の測定

BA 術前 4 例、対照 4 例で解析した。抑制率は BA で平均  $-7.0 (\pm 7.9)\%$ 、control では  $9.0 (\pm 5.4)\%$  と BA で有意な低下がみられた ( $p=0.0156$ )。一方、同様な検討を BA 術後成人患者でも解析した。CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>high</sup> Treg の割合は 5 例で平均  $1.6 (\pm 0.8)\%$ 、抑制率は 4 例で平均  $29 (\pm 25)\%$  と、control と比較し有意な差はみられなかった。



現在、Treg subpopulation についても検討しているところであり、CD4+CD25+細胞と CD4+CD25+ CD45RA-CD127-FoxP3high 細胞における機能面の差異の有無を検討している。

(3) TSDR を用いた quantitative analysis of methylated alleles (QAMA) assay

予備実験として、健康人の白血球から抽出した DNA を bisulfite 処理し実験を行った。しかし文献と同様の PCR 条件にも関わらず、メチル化側、非メチル化側とも増幅が得られなかった。PCR 条件の変更や、bisulfite 処理後の DNA の clean up、使用する DNA 量の調整等を試したが未だ増幅が得られていない。Bisulfite の処理過程、Real-time PCR のコンディショニングなどを調整するのと並行

して、類似の assay を行っている教室に協力を依頼し、原因の特定と手法の確立を急いでいる。

(4) 肝組織の免疫染色

BA 肝組織中における bona fide Treg の局在と発現量を探索した。免疫を施行すると BA では、一般的 CD4+CD25+細胞は一視野あたり肝小葉で  $7.7 \pm 3.4$  個/F、門脈域では  $8.6 \pm 5.4$  個/F ( $p=0.43$ ) で、ほぼ同様であった。抑制効果が顕著とされる CD4+CD25+CD45RA-CD127-FoxP3high 細胞の局在は、肝小葉  $5.4 \pm 2.5$  個/F に対し門脈域で  $2.3 \pm 2.0$  個/F と有意に減少していた ( $p=0.03$ )。対照では、CD4+CD25+細胞は  $4.3 \pm 3.1$  個/F(肝小葉) :  $6.5 \pm 3.6$  個/F(門脈域) ( $p=0.36$ )、

CD4+CD25+CD45RA-CD127-FoxP3high 細胞は  $2.3 \pm 1.6$  個/F(肝小葉) :  $4.7 \pm 2.8$  個/F(門脈域) ( $p=0.28$ ) であった。つまり、BA は対照に比し、小葉域・門脈域ともに存在する CD4+CD25+Treg 細胞は多いが、門脈域の CD4+CD25+CD45RA-CD127-FoxP3high 細胞は有意に少ないことが示唆された。

肝内樹状細胞(CD83 陽性)や Kupffer 細胞(CD68 陽性)の BA 肝における局在をみると、CD83 陽性細胞は肝小葉 : 門脈域 =  $18 \pm 7$  個/F :  $28 \pm 13$  個 ( $p=0.02$ )、CD68 細胞は  $7 \pm 4$  個/F :  $16 \pm 8$  個 ( $p=0.01$ ) と、いずれも門脈域に有意に多く、特に微小胆管近傍への集積が顕著であった。CD45RA-CD127-FoxP3high 細胞の門脈域における局在を多重染色で確認すると、分布は疎であり、その分布領域は CD68 陽性細胞が集中する胆管上皮細胞の基底膜側であった。対照の門脈域においては CD83 陽性 / CD68 陽性細胞の分布はまばらであり、微小胆管近傍への集積は顕著でなかった。対照的に CD45RA-CD127-FoxP3high 細胞は胆管上皮基底膜側に相応に存在していた。

(5) マウス肝組織からのリンパ球抽出

予備実験では、1 匹の生体マウスの肝臓全体から  $1.57 \times 10^6$  個の live mononuclear cell を得た (live cell : 26%)。現在その後の assay に必要十分な細胞数を確保できる組織量を検討している。今後ヒト肝臓からの Treg subpopulation 抽出を念頭に、bulky な肝移植時採取検体を用い予備実験を行う予定である。

<引用文献>

Roman Tatura, Jan Kehrmann et al. Quantification of Regulatory T Cells in Septic Patients by Real-Time PCR-Based Methylation Assay and Flow Cytometry. PLoS One 2012;7(11):e49962.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata

M, Komatsu S, Yoshida H(6 番目). Significance and indications for reoperative portoenterostomy in biliary atresia in light of long-term outcome. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2018 May;25(5):275-280. doi: 10.1002/jhbp.548. 査読有

Mitsunaga T, Higashimoto Y, Saito T, Iwai J. Usefulness of 99mTc-DTPA galactosyl human serum albumin liver scintigraphy for evaluating hepatic functional reserve after Kasai procedure. *J Pediatr Surg.* 2017;52:1925-1929. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.058. 査読有

Urushihara N, Saito T(7 番目), Ando H(8 名略). Classification of pancreaticobiliary maljunction and clinical features in children. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2017;24:449-55. doi: 10.1002/jhbp.485. 査読有

Saito T, Sakamoto A, Hatano M, Iwai J, Higashimoto Y, Yoshida H. Systemic and Local Cytokine Profile in Biliary Atresia. *Eur J Pediatr Surg.* 2017;27:280-87. doi: 10.1055/s-0036-1592136. 査読有

Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Yoshida H. Significance of imaging modalities for preoperative evaluation of the pancreaticobiliary system in surgery for pediatric choledochal cyst. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016;23:347-52. doi: 10.1002/jhbp.347. 査読有

Hamada Y, Ando H, Saito T(7 番目)(6 名略). Diagnostic criteria for congenital biliary dilatation 2015. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016;23:342-6. doi: 10.1002/jhbp.346. 査読有

Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ono S, Mise N, Yoshida H(7 番目). Evidence for viral infection as a causative factor of human biliary atresia. *J Pediatr Surg.* 2015;50:1398-404. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.04.006. 査読有

齋藤 武, 照井慶太, 中田光政, 小松秀吾, 柴田涼平(5 番目), 吉田英生(11 番目)(5 名略). 胆道閉鎖症に対する再手術. *小児外科* 2018;50:55-60. 査読無

齋藤 武, 照井慶太, 中田光政, 小松秀吾, 柴田涼平(5 番目), 吉田英生(10 番目)(4 名略). 胆道閉鎖症早期再手術: 再手術. *小児外科* 2018;50:257-260. 査読無

齋藤 武, 照井慶太, 中田光政, 小松秀吾, 小原由紀子, 柴田涼平(6 番目), 吉田英生(10 番目)(3 名略). 先天性胆道拡張症の最前線. 先天性胆道拡張症の画像診断. *胆と膵* 2017;38:343-349. 査読無

齋藤 武, 吉田英生. 周産期医学必修知識第 8 版 胆道閉鎖症 周産期医 2016;46 増:787-790. 査読無

[学会発表](計 10 件)

Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Ohara Y, Shibata R(6 番目), Yoshida H(10 番目)(3 名略). Significance and Indication of Revision in Biliary Atresia. 第 54 回日本小児外科学会学術集会 2017 (日小外会誌 .2017;53:615.)

齋藤 武, 照井慶太, 中田光政, 小松秀吾, 柴田涼平(5 番目), 吉田英生(10 番目)(4 名略). Alonso-Lej/戸谷分類型の variation と課題. 第 40 回日本膵・胆管合流異常研究会 2017 (日膵胆管合流異常研究会プロシーディング. 59-60)

Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Yoshida H. Significance and Indication of Revision in Biliary Atresia. 50th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2017

齋藤 武, 照井慶太, 中田光政, 小松秀吾, 小原由紀子, 柴田涼平(6 番目), 吉田英生(10 番目)(4 名略). BA 再手術適応の統計学的検討. 第 43 回日本胆道閉鎖症研究会. 2016 (日小外会誌 . 2017;53:341)

齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 吉田英生(8 番目)(3 名略). 当科における胆道閉鎖症(BA)の再手術の意義と適応について. 第 53 回日本小児外科学会学術集会. 2016 (日小外会誌 . 2016;52:531.)

齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 吉田英生(8 番目)(3 名略). 当科における胆道閉鎖症(BA)の肝移植以外再手術の意義について. 第 42 回日本胆道閉鎖症研究会. 2015 (日小外会誌 . 2017;53:158)

齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 吉田英生(11 番目)(6 名略). 当科における小児先天性胆道拡張症術後肝内結石症例の臨床的検討. 第 38 回日本膵・胆管合流異常研究会. 2015 (日膵胆管合流異常研究会プロシーディング . 2015;38:96.)

齋藤 武, 小原由紀子, 坂本明美(3 番目), 幡野雅彦(9 番目), 吉田英生(10 番目)(5 名略). 胆道閉鎖症における Th17/Treg バランスと Treg の意義. 第 52 回日本小児外科学会学術集会. 2015 (日小外会誌 . 2015;51:546.)

齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 吉田英生. 当科の胆道閉鎖症 (Biliary Atresia; BA) 疑い症例に対する診断アプローチとその成績. 第 52 回日本小児外科学会学術集会. 2015 (日小外会誌. 2015;51:511.)

Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Yoshida H. Management Strategy for Intrahepatic Calculi after Radical Surgery for Pediatric Choledochal Cyst. 62th Annual Meeting of the British Association of Pediatric Surgeons. 2015

〔図書〕(計 2 件)

日本小児栄養消化器肝臓学会. 小児消化器内視鏡ガイドライン. 診断と治療社. 発行者 藤実彰一 2017年5月19日 初版第1刷発行. 1-116.

齋藤 武, 吉田英生. 小児外科. ナースの外科学改訂 7 版, 磯野可一編, 中外医学社, 東京. 2017:525-41.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 武 (SAITO, Takeshi)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 20406044

(2) 研究分担者

幡野 雅彦 (HATANO, Masahiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 20208523

吉田 英生 (YOSHIDA, Hideo)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 60210712

坂本 明美 (SAKAMOTO, Akemi)  
千葉大学・バイオメディカル研究センター・准教授  
研究者番号: 90359597

(3) 連携研究者

柴田 涼平 (SHIBATA, Ryouhei)  
千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 90748766

笈田 諭 (OITA, Satoru)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 90813543

(4) 研究協力者

( )