

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08758

研究課題名(和文) 細胆管反応における硫酸化糖鎖の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of sulfated glycans in ductular reactions

研究代表者

星野 瞳 (Hoshino, Hitomi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90500710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胆管反応の発生過程における硫酸化糖鎖の関与を調べることを目的とし、硫酸転移酵素の遺伝子を欠損させたマウスを用いて肝傷害モデルマウスを作製し、免疫組織染色による解析を行なった。野生型マウスにDDCを含む餌を与え、胆管細胞傷害型モデルマウスを作製し、DDCの投与期間に比例して細胆管反応の程度が高まることを確認した。これらの結果をもとに、硫酸転移酵素遺伝子欠損マウスを用いて胆管細胞傷害型モデルマウスを作製したが、細胆管反応の程度に関して、野生型マウスとの間に有意な差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

劇症肝炎をはじめとする種々の肝疾患では、門脈域周辺に細胆管反応がみられるが、その発生メカニズムや病理学的意義は十分には明らかになっていない。本研究では硫酸化糖鎖に着目して、細胆管反応の発生メカニズム解明を試みたが、モデルマウスを用いた実験で、硫酸化糖鎖が細胆管反応の発生メカニズムに関与することを明らかにできなかった。近年、ヒトで生じる肝傷害とモデルマウスで生じる肝傷害では病態形成に関与する分子が異なっていることが報告されており、モデルマウスの作製方法についても議論がなされている。細胆管反応の病理学的意義を明らかにすることは、慢性肝疾患、さらには癌の治療や予防に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the involvement of sulfated glycans in the development of ductular reactions. In this study, we prepared two types of liver injury model mice using mice deficient in the gene for sulfotransferase and analyzed the development of ductular reactions by immunohistochemical staining. Wild-type mice were fed DDC containing foods to prepare cholangiocytes injured model mice. We confirmed that ductular reactions were occurred and the severity was increased in a time-dependent manner. Based on these preliminary experiments, we prepared cholangiocytes injured model mice using mice deficient in the gene for sulfotransferase and examined whether the severity of ductular reactions were different comparing with wild-type mice. There was no significant difference between wild-type mice and mice deficient in the gene for sulfotransferase.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：肝傷害 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓は極めて高い再生能力をもち、通常は成熟した肝細胞が増殖することで損傷部位が補充される。その一方で慢性的に重篤な損傷を受けた場合、あるいは肝細胞自体の増殖が阻害された場合には、成熟肝細胞の増殖による補充が十分に行なわれず、代わりに肝細胞および胆管細胞のいずれにも分化可能な肝幹細胞 (hepatic progenitor cell; HPC) が門脈域周辺で活性化し、肝の再生が行なわれる (Williams *et al. Gastroenterology* 2014)。HPC 依存性の肝再生メカニズムは慢性肝炎などの病態を反映しているとして注目を集めているが、肝再生に關与する HPC の由来や性質、分化メカニズムについては詳しく分かっておらず、その解明が期待されている。HPC の由来については諸説あるが、なかでも有力と考えられているのがヘリング管である。胆道系の末梢部を構成する毛細胆管と細胆管の間には、ヘリング管と呼ばれる移行部分があり、ここに肝細胞と胆管細胞への分化能をもつ HPC が存在するとされている。

(2) ウィルス性慢性肝炎、アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH)、劇症肝炎など、種々の肝疾患では、背景肝の門脈域周辺で細胆管が増生する細胆管反応と呼ばれる現象がみられる。細胆管反応では胆管細胞、肝細胞、炎症細胞、血管内皮細胞、肝星細胞など、多様な細胞の關与が示されているが (Gouw *et al. Hepatology* 2011)、中でも胆管細胞の増殖、HPC の増加とその分化が特徴的である (Roskams *et al. Hepatology* 2004; Gouw *et al. Hepatology* 2011)。細胆管反応にみられる活性化胆管細胞は、炎症性または走化性サイトカインを産生して炎症細胞や間葉系細胞を誘導するほか、成長因子の産生により間葉系細胞の活性化と細胞外基質の合成を促す (Lazaridis *et al. Gastroenterology* 2004)。細胆管反応が肝線維化と相関することも報告されており (Clouston *et al. Hepatology* 2005)、肝線維化の進行によって発症する肝硬変や肝癌においても細胆管反応が關与すると考えられるが、詳細は明らかになっていない。

(3) 最近我々は、硫酸化糖鎖が正常肝の肝内胆管末梢部 (小葉間胆管からヘリング管) の内腔面に特異的に発現していることを明らかにした (Hoshino *et al. Lab Invest* 2016)。さらに肝内胆管末梢部に形態学的類似性が認められ、また HPC のマーカーである N-cadherin や neural cell adhesion molecule (NCAM) を発現していることから HPC 由来の癌腫と考えられている細胆管細胞癌 (cholangiolocellular carcinoma; CoCC) (Komuta *et al. Hepatology* 2008) においても、硫酸化糖鎖が腺管内腔面に特異的に発現していることを明らかにした (Hoshino *et al. Lab Invest* 2016)。

2. 研究の目的

(1) 肝癌の多くは、背景肝に慢性肝炎や肝硬変を伴っていることから、慢性的な肝傷害は肝癌の発生において重要であると考えられる。劇症肝炎をはじめとする種々の肝疾患では、門脈域周辺に細胆管反応がみられるが、その発生メカニズムや病理学的意義は十分には明らかになっていない。本研究は細胆管反応における硫酸化糖鎖の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞傷害型モデルマウスの作製

四塩化炭素 (CCl₄) の希釈に用いる溶媒の検討

Szende *et al.* の論文 (Szende *et al. Exp Toxic Pathol* 1994) を参考にしながら、四塩化炭素 (CCl₄) の投与による肝細胞傷害型モデルマウスを作製した。まずはじめに、野生型マウス (C57BL/6J) (日本 SLC、浜松) を用いて、CCl₄ の希釈に用いる溶媒を検討した。市販のコーン油 (味の素、東京)、オリーブ油 (味の素、東京)、ひまわり油 (昭和産業、東京) を用いて 25% CCl₄ を調製し、マウスの体重 1g あたり CCl₄ 4 μl (最終濃度 1 μl/g) を腹腔内へ投与し、これを週 2 回、4 週間実施した。マウスを安楽死させたのち肝臓を摘出し、ホルマリンで固定後、パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックから薄切した組織切片を作製し、胆管上皮のマーカーであるサイトケラチン 19 (CK19) の免疫組織染色を行なうことで CK19 陽性となる細胆管反応の出現頻度を解析した。

CCl₄ 投与量 (最終濃度) の検討

次いで、野生型マウスを用いて CCl₄ の投与量 (最終濃度) を検討した。上記において、各溶媒間で肝傷害の程度に差を認めなかったことから、本研究ではコーン油を CCl₄ の希釈溶媒として用いることにした。また、マウスへの負担を減らすため、腹腔内投与する投与量 (μl) を減らすことにし、50% CCl₄ を用いた。CCl₄ の投与量 (最終濃度) を 1 μl/g、2 μl/g、4 μl/g で比較を行なった。投与方法、投与期間は上記と同じ方法で行なった。なお、実験を進める中で、マウスに回復不能な異常がみられた場合には、即座に実験を打ち切り、人道的エンドポイントを適用して安楽死させた。

CCl₄ 投与期間の検討

次いで、野生型マウスを用いて CCl₄ の投与期間を検討した。上記の結果を踏まえ、CCl₄ の投与量 (最終濃度) を 1 μl/g とし、投与期間は 6 週間、10 週間、12 週間で比較を行なった。

チオアセトアミド (TAA) 投与期間の検討

CCl₄ の投与による肝細胞傷害型モデルマウスが作製できなかったため、チオアセトアミド (TAA) を用いて肝細胞傷害型モデルマウスの作製を行なった。滅菌水 1L あたり TAA 300 mg を溶解し、飲用水として野生型マウスに与えた。まずはじめに、TAA 水の投与期間を検討し、3 週間、6 週間

間、9週間、12週間で比較を行なった。

硫酸転移酵素2遺伝子欠損マウスを用いた肝細胞傷害型モデルマウスの作製

硫酸転移酵素2遺伝子欠損マウスにTAA水を9週間与えて肝細胞傷害型モデルマウスを作製し、細胆管反応の出現頻度を野生型マウスと比較した。

(2)胆管細胞傷害型モデルマウスの作製

3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)投与期間の検討

3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)の投与による胆管細胞傷害型モデルマウスを作製した。0.1% DDCを混ぜた飼料(フィードワン 横浜)を用意し、これをC57BL/6Jマウスに与えた。給餌期間を4週間、8週間、12週間に設定して、比較を行なった。

硫酸転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた胆管細胞傷害型モデルマウスの作製

硫酸転移酵素遺伝子2欠損マウスに0.1% DDCを混ぜた飼料を9週間与えて胆管細胞傷害型モデルマウスを作製し、細胆管反応の出現頻度を野生型と比較した。

4. 研究成果

(1)肝細胞傷害型モデルマウスの作製

四塩化炭素(CCl₄)の希釈に用いる溶媒の条件検討

25% CCl₄の溶媒としてコーン油、オリーブ油、ひまわり油を用いて条件検討を行なったが、いずれの場合においても、非投与群と比べてCK19陽性の細胆管反応の出現頻度、線維化の程度に大きな差はみられなかった。Szende *et al.*のラットを用いた実験(Szende *et al. Exp Toxicol Pathol* 1994)では、コーン油とひまわり油で希釈したCCl₄を用いた場合に線維化が増加すると報告があったが、マウスを用いた我々の実験ではこのような差がみられなかった。

四塩化炭素(CCl₄)のCCl₄投与量(最終濃度)の検討

投与するCCl₄の最終濃度について条件検討を行なった結果、4 μl/gの群では1回目の投与後に個体が死亡、最終濃度2 μl/gの群では2回目の投与後に個体が死亡し、最終濃度1 μl/gの群は、5回目の投与後に全ての個体が死亡した。これらの結果から、50% CCl₄はマウスにとって毒性が高く、実験に用いることは適さないことが明らかになった。そのため、肝細胞傷害を起こさせるためには、投与期間を長くするあるいは投与回数を増やすなどの対応が必要であると考えられた。

CCl₄投与期間の検討

25% CCl₄の投与期間を検討した結果、6週間、10週間、12週間のいずれの群においても、非投与群と比べてCK19陽性の細胆管反応の出現頻度、線維化の程度に差はみられなかった。CCl₄の投与による肝細胞傷害型モデルマウスを作製するため、CCl₄の希釈に用いる溶媒の検討、CCl₄の投与量(最終濃度)の検討、投与期間の検討を行なったが、いずれにおいても細胆管反応を伴った肝細胞傷害型モデルマウスの作製には至らなかった。

チオアセトアミド(TAA)投与期間の検討

TAA水の投与期間を検討した結果、3週間および6週間投与した群では、非投与群と比べてCK19陽性の細胆管反応の出現頻度、線維化の程度に大きな差はみられなかった。一方、9週間および12週間投与した群では、軽度な細胆管反応が生じていた。そこで抗硫酸化糖鎖抗体を用いて免疫組織染色を行ない、硫酸化糖鎖の比較を行なった。非投与群を含むいずれの群でも、ごく一部の胆管で硫酸化糖鎖が発現していたが、細胆管反応における硫酸化糖鎖発現はみられなかった。

硫酸転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた肝細胞傷害型モデルマウスの作製

硫酸転移酵素遺伝子2欠損マウスにTAA水を9週間与えて、肝細胞傷害型モデルマウスを作製し、細胆管反応の出現頻度を野生型マウスと比較した。野生型マウスおよび硫酸転移酵素遺伝子2欠損マウスのいずれにおいても、生じた細胆管反応の程度に差はみられなかった。

(2)胆管細胞傷害型モデルマウスの作製

3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine(DDC)投与期間の検討

DDCの投与期間を4週間、8週間、12週間で検討した結果、非投与群と比べて、4週間でCK19陽性の細胆管反応の増加がみられた。また、投与期間を8週間、12週間と増加させると、投与時間に比例してCK19陽性の細胆管反応の出現頻度が増加した。

硫酸転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた胆管細胞傷害型モデルマウスの作製

硫酸転移酵素遺伝子2欠損マウスにDDCを加えた飼料を9週間与えて、胆管細胞傷害型モデルマウスを作製し、細胆管反応の出現頻度を野生型マウスと比較した。野生型マウスおよび硫酸転移酵素遺伝子2欠損マウスのいずれにおいても、激しい細胆管反応が生じたが、両者の間で差はみられなかった。

<引用文献>

(1) Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson KR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology*. 41(4):809-18.2005.

(2) Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology*. 54(5):1853-63.2011.

(3) Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M. Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel

marker of cholangiolocellular carcinoma. *Lab Invest.* 96(12):1246-55.2016.

(4) Komuta M, Spee B, Borghst SV, Vos RD, Verslype C, Aerts R, Yano H, Suzuki T, Matsuda M, Fujii H, Desmet VJ, Kojiro M, Roskams T. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology.* 45(5):1544-56.2008.

(5) Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology.* 127:1565-77.2004.

(6) Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal P, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw ASH, Hytiroglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology.* 39(6):1739-45.2004.

(7) Szende B, Timar F, Hargitai. Olive oil decreases liver damage in rats caused by carbon tetrachloride (CCl₄). *Exp Toxicol Pathol.* 46(4-5):355-9.1994.

(8) Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology.* 146(2):349-356.2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 0件）

1. 著者名 Inamura S, Ito H, Taga M, Tsuchiyama K, Hoshino H, Kobayashi M, Yokoyama O.	4. 巻 39
2. 論文標題 Low-dose docetaxel enhanced the Anticancer effect of temsirolimus by overcoming autophagy in prostate cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5417-5425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13735.	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 Tsutsumiuchi M, Hoshino H, Kogami A, Tsutsumiuchi T, Yokoyama O, Akama TO, Kobayashi M.	4. 巻 99
2. 論文標題 Preferential expression of sialyl 6'-sulfo N-acetylglucosamine-capped O-glycans on high endothelial venules in human peripheral lymph nodes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 1428-1441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0267-0.	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 Tsutsumiuchi T, Hoshino H, Fujiieda S, Kobayashi M.	4. 巻 51
2. 論文標題 Induction of peripheral lymph node addressin in human nasal mucosa with eosinophilic chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology	6. 最初と最後の頁 268-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pathol.2019.01.002	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 Low S, Hirakawa J, Hoshino H, Uchimura K, Kawashim H, Kobayashi M	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of MAdCAM-1-expressing high endothelial venule-like vessels in colitis induced in mice lacking sulfotransferases catalyzing L-selectin ligand biosynthesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 415-425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155417753363.	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 Shinagawa T, Hoshino H, Taga M, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M	4. 巻 35
2. 論文標題 Clinicopathological implications to micropapillary bladder urothelial carcinoma of the presence of sialyl Lewis X-decorated mucin 1 in stroma-facing membranes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Urol Oncol	6. 最初と最後の頁 606.e17-606.e23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2017.06.004.	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 Yoshida H, Hoshino H, Imamura Y, Yoshimura H, Sano K, Kobayashi M	4. 巻 46
2. 論文標題 Role of sialyl 6-sulfo Lewis X in antitumor immunity against oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Pathol Med	6. 最初と最後の頁 759-765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jop.12585.	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 Inamura S, Shinagawa T, Hoshino H, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M	4. 巻 77
2. 論文標題 Appearance of High Endothelial Venule-Like Vessels in Benign Prostatic Hyperplasia is Associated With Lower Urinary tract Symptoms.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Prostate.	6. 最初と最後の頁 794-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23319.	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tsutsumiuchi T, Hoshino H, Fujieda S, Kobayashi M.
2. 発表標題 Induction of peripheral lymph node addressin in human nasal mucosa with eosinophilic chronic rhinosinusitis.
3. 学会等名 29th Annual conference of the society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsutsumiuchi M, Hoshino H, Kogami A, Tsutsumiuchi T, Yokoyama O, Akama O T, Kobayashi M.
2. 発表標題 Expression of sialyl 6' -sulfo N-acetyllactosamine -capped O-glycans on high endothelial venules.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoshino H, Yoshida H, Imamura Y, Yoshimura H, Sano K, Kobayashi M.
2. 発表標題 Role of sialyl 6-sulfo Lewis X in anti-tumor immunity against oral squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 28th Annual conference of the society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hoshino H, Kobayashi M.
2. 発表標題 Apical membrane expression of sialyl 6-sulfo Lewis X glycans in cholangiolocellular carcinoma.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida H, Hoshino H, Imamura Y, Yoshimura H, Sano K, Kobayashi M.
2. 発表標題 Role of sialyl 6-sulfo Lewis X in antitumor immunity against oral squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinagawa T, Hoshino H, Taga M, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M.
2. 発表標題 Clinicopathological implications to micropapillary bladder urothelial carcinoma of the presence of sialyl Lewis X-decorated mucin 1 in stroma-facing membranes.
3. 学会等名 27th Annual conference of the society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M.
2. 発表標題 Apical membrane expression of distinct sulfated glycans is a novel marker of cholangiolocellular carcinoma.
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M
2. 発表標題 Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma.
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
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	小林 基弘 (Kobayashi Motohiro) (00362137)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	内村 健治 (Uchimura Kenji) (20450835)	名古屋大学・医学系研究科・招へい教員 (13901)	