

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11514

研究課題名(和文) 母親由来キメラ細胞が引き起こす胆道閉鎖症の免疫学的病因解明と発症予防の可能性探索

研究課題名(英文) Maternal DNA in the peripheral blood of patients with biliary atresia affect the prognosis

研究代表者

連 利博 (MURAJI, Toshihiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20140444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：患者7例の母児間の混合リンパ球試験を行った。6例に母親の患児抗原刺激に対する反応は第三者による反応より様々な程度に小さかった。予後良好の1例は、寛容形成がなく、患児は母親に対して強く反応しており、母親Th1のエフェクターリンパ球を排除できると考えられた。今後の評価は、反応する細胞のphenotypeを確認と、患児末梢血に母親細胞が存在するかどうかである。予後が異なる2例で、患児の抗原刺激による母親の反応が第三者と同等な一組があった。異なる点は患児の母親抗原刺激の反応が予後不良例で第三者と同等に強い反応であったである。今後、抗原刺激で分化増殖する細胞のphenotypeを見る必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症は発症メカニズムが解明されていない疾患である。胆道閉鎖症の原因とMaternal microchimerismの関連を明らかにし、病因の解明に寄与すると考えられる。Maternal microchimerismと胆道閉鎖症の疾患メカニズムとの関連が明らかになることで、胎生期からの診断と予防方法の解明、また新たな治療の開発、ひいては肝移植に依らない自己肝生存率の改善に大いに寄与することが期待できる。また、患者の肝生検組織中の母親細胞の肝内分布を解析することにもつながり、最終的に母親細胞が組織障害を惹起することを明らかにし、予防法解明につなげることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：A mixed lymphocyte test between mother and infant of 7 patients was performed.

In 6 cases, the mother's response to the child's antigen stimulation was variously smaller than the response by the third party. One patient with a favorable prognosis did not have tolerance formation and the patient had a strong reaction to the mother, suggesting that she could eliminate effector lymphocytes from Th1. Further evaluation should confirm the phenotype of the responding cells and whether or not maternal cells are present in the peripheral blood of the child. In two cases with different prognosis, there was a group in which the mother's reaction to the patient's antigen stimulation was equivalent to that of a third party. The difference is that the mother's antigen stimulation response of the patient was as strong as that of a third party in the case of poor prognosis. In the future, it is necessary to look at the phenotype of cells that differentiate and proliferate upon antigen stimulation.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 母親キメラリズム 母親寛容 混合リンパ球試験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### ・胆道閉鎖症(Biliary Atresia : BA)について

胆道閉鎖症(BA)は新生児期から乳児期早期にかけて、肝内外胆管の閉塞に伴う黄疸、灰白色便、胆汁うっ滞に伴う肝障害を主症状として発症する。我が国では 10000 出生に 1 人、年間約 100 例が発症する。治療法としては肝門部肝空腸吻合術(葛西手術)が標準術式として確立されているが、減黄不良に伴う肝不全や、黄疸の改善後も進行する肝線維化、あるいは反復する胆管炎のため、思春期までに約半数が肝移植を必要とする難病である。また、肝移植の導入により生命予後は改善しているものの、拒絶反応のコントロールのため長期にわたり免疫抑制剤の投与を必要とするなど、患者・家族の負担が非常に大きく、自己肝生存率の向上は重要な課題である。肝移植のために切除された全肝はほとんどの症例で左外側区域が委縮し、右葉が再生結節として肥大していることが報告されている。本症の疾患メカニズムは未だ解明されておらず、自己免疫疾患と類似の病態として理解されるにとどまり、国際的に病因解明のための研究が活発にされている。

### ・Maternal microchimerism について

一般的に、母親細胞は妊娠中に経胎盤的に胎児に迷入し、各組織に生着することは稀ではないとされている。この母児細胞の共存状態を Maternal microchimerism と呼び、この現象は胎児が母親細胞に対し寛容となる仕組みと認識されているが、一方で免疫学的バランスが崩れれば、母親細胞は免疫学的に胎児を攻撃する病態(Graft-versus-Host Disease)も起こりうる。小児の代表的な自己免疫疾患である若年性皮膚筋炎において末梢血および傷害筋肉内にも母親由来キメラ T 細胞が存在し、自己リンパ球刺激に対し母親の末梢血リンパ球は特異的に memory 反応を示すことが報告された。すなわち、妊娠早期に胎児細胞がまず母親に移行し naive cell が感作されたのち、effector cell として胎児に迷入した結果、memory response として胎児の組織を攻撃するメカニズムが想定されている。

我々の研究グループは BA 患児の肝組織においても母親由来キメラ細胞(MCC)が存在することを示し、BA における自己免疫疾患様の病態は母親由来キメラ細胞が惹起する Graft-versus-Host Disease (GVHD) が本態である可能性について報告した(文献 3-5)。我々はさらにこの報告を踏まえ、BA 患者の抗原により感作された母親細胞が妊娠早期に胎児に迷入し発症途上にある胆管上皮を免疫学的に攻撃することによって胆管が荒廃するという仮説に至った。

そこで、母親末梢血リンパ球の BA 患者の抗原刺激に対する反応を定量化し、非 BA 同胞のそれと比較することで、この仮説を証明することが病因・病態に不可欠であるという着想に至った。また、胎児からの臍帯静脈血はそのほぼ半量が門脈左枝に流入する。そのため、左外側区域に母親由来の迷入細胞がトラップされる可能性が高いことから、肉眼的にも形態学的にも左右で肝線維化の程度の差異が生じているものと考えた。

## 2. 研究の目的

- ・母親の末梢血リンパ球の BA 患者抗原に対する反応性を、非 BA 同胞抗原に対する反応と比較することにより、妊娠期間中に胎児の抗原による感作の有無を明らかにする。
- ・BA 患者末梢血中の母親由来キメラ細胞の存在の有無を評価し、存在する場合は患者自身の抗原との反応性を評価することで、母親細胞の患者への免疫寛容の有無を明らかにする。
- ・葛西手術時に行う肝の左右両葉の生検組織における母親由来キメラ細胞を定量的に比較することにより、肝線維化の分布差(左右差)が microchimerism の程度と相関するかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 母親末梢血リンパ球の BA 患者抗原に対する反応性の評価

母親末梢血からリンパ球を採取、5x10<sup>5</sup> 個に調製し、BA 患者の末梢血単核細胞に放射線照射した

もの(以下、照射 PBMC)を stimulator として培養する。

ELISPOT 法により IFN- $\gamma$  を測定し、非 BA 同胞の照射 PBMC への反応と定量的に比較する。

#### **(1) 末梢血検体の採取**

鹿児島大学小児外科で葛西手術を行い外来経過観察中の BA 患者のうち、BA に罹患していない同胞をもつ、2 歳から 10 歳までの患者を選定する。インフォームド・コンセントを取得した上で、患者、母親、同胞から採血を行う。

#### **(2) ELISPOT 法による母親末梢血リンパ球の BA 患者抗原反応性の解析**

母親から採取した末梢血より Ficoll 比重遠心法 (Lymphoprep) により PBMC を分離し、BA 患者の X 線照射 PBMC を stimulator としてリンパ球混合培養 (MLR) を行う。対象群として、非 BA 同胞の照射 PBMC を stimulator とした培養も行う。24 時間培養後、IFN- $\gamma$  を産生する細胞の頻度を、ELISPOT アッセイを用いて測定し両者を比較する

#### **BA 患者末梢血中の母親由来キメラ細胞の定量および患者抗原に対する反応性の検討**

・BA 患者末梢血から PBMC を採取し、母親から遺伝していない HLA (NIMA) 抗体を用いて母親由来キメラ細胞の存在及びキメラ T 細胞上のメモリー/エフェクター細胞マーカーの発現をフローサイトメーター (FCM) を用いて解析する。

・母親由来キメラ細胞が存在していた場合、NIMA 抗体を用いて母親由来キメラ細胞を磁気細胞分離装置 (MACS) で分離し、BA 患者の照射 PBMC を stimulator として MLR を行う。この時、非胆道閉鎖の同胞の照射 PBMC 刺激を stimulator とした培養を対照群とする。24 時間培養後、ELISPOT 法により IFN- $\gamma$  を産生細胞の頻度を測定し、対照群と比較する

母親末梢血リンパ球の BA 患者抗原に対する反応性の評価については、新患一例で母児間リンパ球混合試験結果を父子間試験結果と比較することができた。BA 患者は母親刺激では刺激指数が 2.6、父親刺激では 1.9 と母親刺激が強かった。これは、過去に本人が母親抗原刺激に遭遇しているというメモリー・リスポンスであると理解すれば、仮説に合致している結果である。

次に BA 患者の末梢血中に母親細胞の存在を確認することであるが、まずは鋭敏な方法である母親由来 DNA を PCR で探索しようとし、数例で非遺伝性 HLA 抗原からプローブ作成を試みたが、困難である事が判明し、本研究で実績を上げている米国シアトルの Fred Hutchinson Cancer Research Center に研究協力を求めた。研究協力を得ることができることになり、平成 30 年 6 月に渡米し方法論を確立することになった。一方、新しい手術患者のみならずフォロー中の 4 歳までの自己肝生存者を対象とすることになっている。この準備期間中に 7 例の検体から DNA を抽出し、米国シアトルの Fred Hutchinson Cancer Research Center へ検体を郵送し解析中である。

### **4. 研究成果**

#### **(1) 母児間混合リンパ球試験：**

鹿児島大学新患者 7 例の母児間の混合リンパ球試験を行うことができた。6 例に母親の患児抗原刺激に対する反応は第三者による反応より様々な程度に小さく、母親は一般的に子どもに対して寛容が形成されているものであり、この結果は理解の範囲である。しかし、残り 1 例は、寛容形成がなく、患児は母親に対して強く反応しており、予後良好例であることより、母親 Th1 のエフェクターリンパ球を排除できると考えればキメリズム仮説に矛盾しない。これを証明するには、反応する細胞の phenotype を確認することと、患児末梢血に母親細胞が存在するかどうかである。また、興味があるのは、予後が異なる 2 例で、患児の抗原刺激による母親の反応が第三者と同等な一組があった。異なる点は患児の母親抗原刺激の反応が予後不良例で第三者と同等に強い反応であったである。このことは、反応したリンパ球が制御性 T 細胞であれば矛盾はない。今後、抗原刺激で分化増殖する細胞の phenotype を見る必要がある。

## (2) 病理形態学的研究：

母親キメリズムに伴う GvHD が仮説の本質であり、血管内皮は非自己抗原に対する免疫反応の場である。胆道閉鎖症においては早期から門脈圧亢進症を合併している症例があり、必ずしも胆汁鬱滞性の肝線維化に伴ってののではなく、門脈低形成が病態の本質であるのかもしれない。BA 肝の門脈域における門脈枝の数と大きさの計測を行った。門脈域の門脈枝は対照例に比較し有意に減少していたので論文化した (Morphometric demonstration of portal vein stenosis and hepatic arterial medial hypertrophy in patients with biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 35:529-537, 2019 )。さらに、その門脈低形成は予後と関連していることが判明し、論文化した (Microvascular proliferation of the portal vein branches in the liver of biliary atresia patients at Kasai operation is associated with a better long-term clinical outcome. *Pediatr Surg Int* 35:1437-1441, 2019 )。

母親キメリズムに伴う GvHD が本研究仮説の本質であり、血管内皮は非自己抗原に対する免疫反応の場であるため仮説に矛盾しない結果である。

「BA 患児は母親に対して寛容が成立しているかどうか」を分析するのが目的であるが、通常母親は患児に対して寛容を形成しているはずであるが、1 例において母親が患児抗原刺激に対して強く反応していた。患児もまた母親抗原に対して強く反応していた。本症例は予後良好なので、増殖した母親細胞は制御性 T 細胞と考え、患児は Th1 の反応で母親細胞を排除できると考えれば矛盾はない。本症例で末梢血に母親細胞が残存するのかを今後評価する必要がある。患児は母親に対しては攻撃力患児の母親細胞への攻撃性(すなわち排除できるかどうか)と母親細胞の患児への攻撃性とだが、少なくとも、第三者の抗原刺激に同等の反応を示せば、寛容は成立していないといえよう。5 例中 4 例は寛容でなく、これらの症例では予後良好であったことから、母親を排除できるとすれば仮説に矛盾はない。また、新患 1 例で母児間リンパ球混合試験結果を父子間試験結果と比較することができた。BA 患者は母親刺激では刺激指数が 2.6、父親刺激では 1.9 と母親刺激が強かった。これは、過去に本人が母親抗原刺激に遭遇しているというメモリ・リスponsであると理解すれば、仮説に合致している結果である。

米国シアトルにある Fred Hutchinson Cancer Research Center に赴き 4 例において BA 患者の末梢血中に母親細胞の存在を確認する分析ができた。そのうちの 1 例では BA 患児と母親間の混合リンパ球試験も施行できた。本患児では末梢血中の Buffy coat および血漿中に同胞コントロールより母親由来キメラ細胞を多数認め、母親抗原に対する反応では患児は同胞よりも母親に寛容であることが判明したが、患児の抗原に対する母親リンパ球の反応では同胞より弱く寛容であることが判明し、仮説とは矛盾した結果であった。現在、症例 7 例を追加し、米国シアトルへ検体を郵送し分析を行っており、分析結果を待っている状態である。症例の積み重ねを行い、根治術後の予後との関連を評価する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Muraji Toshihiro, Tanaka Hidenori, Ieiri Satoshi	4. 巻 79
2. 論文標題 Ethnic variation in the incidence of biliary atresia correlates with the frequency of the most prevalent haplotype in its population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 668-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humimm.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masuya Ryuta, Kaji Tatsuru, Mukai Motoi, Nakame Kazuhiko, Kawano Takafumi, Machigashira Seiro, Yamada Waka, Yamada Koji, Onishi Shun, Yano Keisuke, Moriguchi Tomoe, Sugita Koshiro, Kawano Masato, Noguchi Hiroyuki, Suzuhigashi Masaya, Muto Mitsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Predictive factors affecting the prognosis and late complications of 73 consecutive cases of esophageal atresia at 2 centers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1027-1033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-018-4326-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 榎屋 隆太、家入 里志、連 利博、中目 和彦、川野 孝文、春松 敏夫、山田 和歌、町頭 成郎、向井 基、加治 建	4. 巻 54
2. 論文標題 胆道閉鎖症葛西手術後患者における自己肝生存率に対する予後因子の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1324-1331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11164/jjsps.54.7_1324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Naoya, Muraji Toshihiro, Ohtani Haruo, Masumoto Kouji	4. 巻 47
2. 論文標題 The accumulation of regulatory T cells in the hepatic hilar lymph nodes in biliary atresia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1282-1286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-017-1502-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muraji Toshihiro, Ohtani Haruo, Ieiri Satoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Unique manifestations of biliary atresia provide new immunological insight into its etiopathogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1249-1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4155-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 連 利博、榎屋隆太、向井 基、家入里志	4. 巻 50
2. 論文標題 特集 胆道閉鎖症アップデート: GvHD仮説からみた成因と発症時期	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 16-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Masuya R, Muraji T, Ohtani H, Mukai M, Onishi S, Harumatsu T, Yamada K, Yamada W, Kawano T, Machigashira S, Nakame K, Kaji T, Ieiri S
2. 発表標題 Morphometrical analyses on the narrowing of portal veins and thickening of media of hepatic arteries in the liver of biliary atresia.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuya R, Muraji T, Ohtani H, Mukai M, Yano K, Kawano M, Onishi S, Yamada K, Yamada W, Kawano T, Machigashira S, Nakame K, Kaji T, Ieiri S
2. 発表標題 Morphometrical analyses on narrowing of portal veins and thickening of hepatic arteries in liver of biliary atresia.
3. 学会等名 The 51st Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎屋隆太, 連 利博, 大谷明夫, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 山田和歌, 川野孝文, 中目和彦, 向井 基, 加治 建, 家入里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症の葛西手術時肝生検検体における門脈枝および肝動脈枝の形態計測学的検討
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎屋隆太, 連 利博, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 山田和歌, 川野孝文, 中目和彦, 向井 基, 加治 建, Sami B Kanaan, J Lee Nelson, 家入里志
2. 発表標題 定量的PCRを用いた母親由来キメラ細胞の定量および母児間混合リンパ球培養との比較検討を行った胆道閉鎖症患児の1例
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018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	家入 里志  (IEIRI Satoshi)  (00363359)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	
研究分担者	大西 峻  (ONISHI Shun)  (10614638)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員   (17701)	
研究分担者	諸富 嘉樹  (MOROTOMI Yoshiki)  (20263907)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師   (24402)	

## 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	増本 幸二 (MASUMOTO Kouji) (20343329)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	
研究分担者	原 博満 (HARA Hiromitsu) (20392079)	鹿児島大学・歯学部医学系・教授  (17701)	
研究分担者	加治 建 (KAJI Tatsuru) (50315420)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任教授  (17701)	
研究分担者	武藤 充 (MUTO Mitsuru) (70404522)	鹿児島大学・歯学部鹿児島大学病院・講師  (17701)	
研究分担者	榎屋 隆太 (MASUYA Ryuta) (90448572)	宮崎大学・医学部・助教  (17601)	
研究分担者	堀池 正樹 (HORI I KE Masaki) (30464621)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師  (24402)	
研究分担者	古川 泰三 (FURUKAWA Taizo) (20515291)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授  (24303)	