

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890188

研究課題名（和文） inv マウスを用いた胆管発生異常に関する分子生物学的検討

研究課題名（英文） Molecular biological investigation in the hepatobiliary maldevelopment using inv transgenic mice

研究代表者

嶋寺 伸一（SHIMADERA SHINICHI）

京都府立医科大学・附属病院・専攻医

研究者番号：30453096

研究成果の概要：

inv mouse における胆管発生異常とくに肝内胆管の発生異常、そしてその結果としての DPM が閉塞性黄疸を来すメカニズムを追究することを目的とし、inv homozygote mouse を作成し、ductal plate malformation と閉塞性黄疸の関連性について、胆管およびその周囲の炎症、組織形態学的変化について、正常核型（野生型）を対照として検討を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科

キーワード：発生・分化、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は長年にわたり難病指定を受けながら、その病態解明には至っていない疾患であるが、更なる治療成績向上のためには、胆道閉鎖症の発生原因、その病態を解明することが不可欠である。折しも、inv 遺伝子の transgenic mouse (inv mouse) が内臓逆位と重症黄疸を示すことが報告され(Yokoyama T, et al. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. Science 30;260(5108):679-82. 1993.)、我々も共同研究者（萌芽研究[No.17659556]）の指導のもと、inv mouse の胆道閉鎖症モデルマウスと

しての意義を追究してきたところである。これまでの研究から inv mouse では閉塞性黄疸と肝内の ductal plate malformation (DPM) の所見が得られ、胆管発生異常に起因する胆道閉鎖症のモデルマウスとしての意義が示唆された。

2. 研究の目的

発生過程の inv マウス胎仔における胆管発生異常に関して免疫組織化学的手法、分子生物学的手法を用いて正常マウスと比較検討する。

3. 研究の方法

- (1) *inv* heterozygote mouse 雌雄を mating させ、妊娠マウスから胎仔を摘出し、PCR にて *inv* 遺伝子の有無を決定し、[*inv/inv*][*inv/+*][*+/+*]の核型に分類する。
- (2) 平成 20 年度：妊娠 9 日目から 13 日目と追って胎仔を採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック肝組織から薄切切片を作成し、HE 染色、免疫組織学的染色 (NF- κ B) を行い、*inv* mouse における肝内胆管周囲の炎症細胞浸潤、NF- κ B の発現を観察する。以上のことを正常核型をコントロールとして比較検討した。

4. 研究成果

- (1) PCR 法にて *inv* gene の発現は明確に示され、*inv* マウスを確立させた。
- (2) *inv* mouse における肝内胆管周囲に炎症細胞浸潤、NF- κ B の発現を一部で得た。しかし染色性が安定せず、現在 PCR 法による NF- κ B 発現を試み、primer を準備し、パラフィン固定肝組織切片から total RNA を順次抽出し、サンプルを集めている段階にある。
- (3) 胆道閉鎖症の肝切片では胆管上皮に NF- κ B の発現を認め、炎症を示唆する所見を得た。

以上から *inv* mouse における閉塞性黄疸と胆管周囲の炎症の関連が証明される可能性がある。

- (4) その他：*inv* mouse の胆道閉鎖症モデルマウスとしての意義。

① Serum biochemical study

Blood samples from 12 *inv* mice and 12 wild-type littermates were obtained (Table 1). In the *inv* mice, the level of serum total bilirubin was 8.1 ± 3.8 mg/dL, and that of direct bilirubin was 4.4 ± 2.4 mg/dL, as compared with 0.3 ± 0.3 and 0 mg/dL, respectively, in the wild type. The serum AST level was 692 ± 418 IU/L, that of ALT was 46 ± 11 IU/L, and that of GGT was 269 ± 185 IU/L, in the *inv* mice, compared to 131 ± 37 , 39 ± 13 , and 3.7 ± 2.8 IU/L, respectively, in the wild type. Therefore, all these parameters, except the serum level of ALT, were significantly higher in the *inv* mice than in the wild type ($P < .05$). No progressive obstructive jaundice, related to age after birth, was indicated from these results.

Table 1 Serum biochemical study (mean \pm SD)

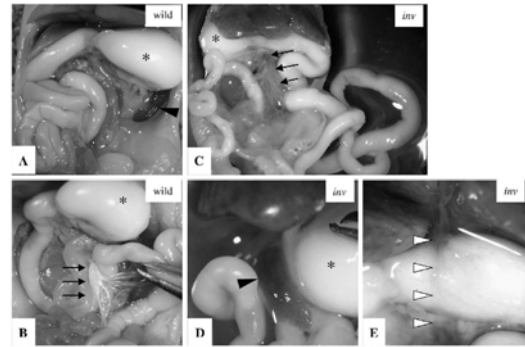
Mice	Total bil (mg/dL)	Direct bil (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)
<i>inv</i> (n = 12)	$8.1 \pm 3.8^*$	$4.4 \pm 2.4^*$	$692 \pm 418^*$	46 ± 11	$269 \pm 185^*$
Wild type (n = 12)	0.3 ± 0.3	0	131 ± 37	39 ± 13	3.7 ± 2.8

bil indicates bilirubin.

* $P < .05$ compared with Wild type.

② Macroscopic observation of intra-abdominal anomalies

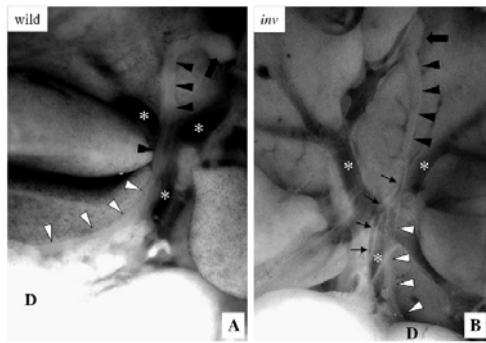
Twelve wild type mice and 12 *inv* mice were examined. In the wild type, the stomach was found on the left side and the duodenum on the right side, with a single spleen on the left (Fig. 1A). The supra mesenteric artery and Treiz ligament were found in all wild type mice (Fig. 1B). On the other hand, in all the *inv* mice except one, the stomach was found on the right side, the duodenum on the left side, and a single spleen on the right (Fig. 1C, D). In some cases, intestinal malrotation (Fig. 1C) and/or preduodenal portal vein (Fig. 1E) were found as associated anomalies. In summary, 11/12 (92%) *inv* mice had situs inversus, 4/12 (32%) had intestinal malrotation, and 3/12 (24%) had preduodenal portal vein.



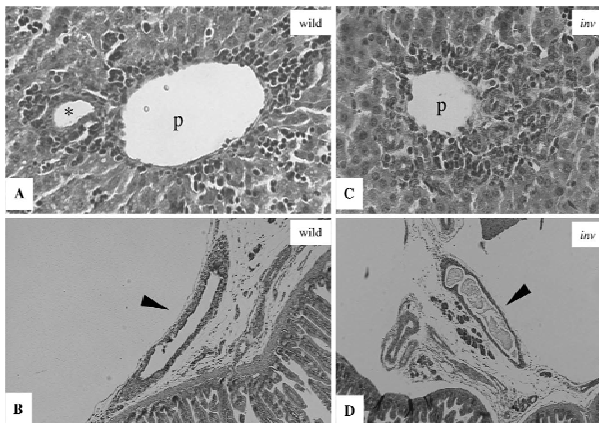
One *inv* mouse showed no signs of situs inversus, but had distinct jaundiced skin as the other *inv* mice. In the wild type, all cases had no anomalies as described above (data not shown).

③ Macroscopic observation of the hepatoduodenal ligament

In the wild type, a gall bladder was found on the liver, a cystic duct was found to be connected to the common bile duct (CBD), and the CBD was connected to the duodenum (Fig. 2A). In the *inv* mouse, the gall bladder was found on the liver and a cystic duct was found to be connected to the CBD. A cystic artery was found along with the cystic duct. The CBD was found connected to the duodenum. These findings were the same as those in the wild type. No cystic, anomalous, or fibrosing changes in extrahepatic bile ducts were observed from the porta hepatis to the duodenum (Fig. 2B).



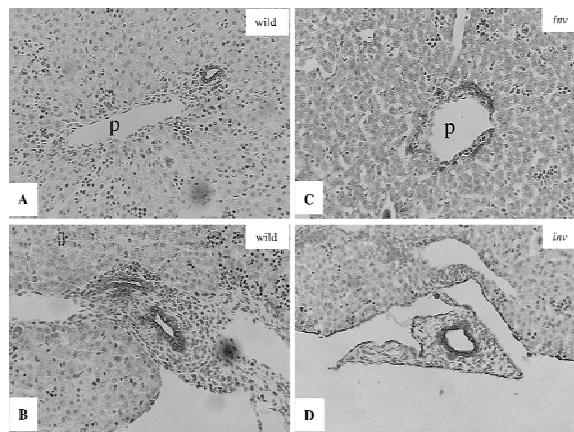
④ Sections of liver stained with HE
In the wild type, a fully patent intrahepatic bile duct, lined with a single layer of cuboidal columnar epithelial cells, was found in the portal triad (Fig. 3A). A patent CBD was found from the porta hepatis to duodenum, being approximately 60 μm in diameter (Fig. 3B). In the inv mouse, no patent intrahepatic bile duct was found in the periportal region. Instead, proliferative intrahepatic biliary epithelial cells were found to be surrounding the portal vein (Fig. 3C). A patent CBD approximately 80 μm in diameter was found, the continuity as well as the patency of which was preserved from the porta hepatis to duodenum, without any fibrosis or inflammation (Fig. 3D). In addition, no cystic changes in the CBD were found in any of the mice.



⑤ Sections of liver stained with anti-CK

immunohistochemistry

In the wild type, a densely stained and fully patent intrahepatic bile duct was recognized in the periportal region (Fig. 4A). A patent CBD was found at the porta hepatis as well as in the sections stained with HE (Fig. 4B). In the inv mouse, proliferative biliary epithelial cells were found to be surrounding the portal vein in a circular alignment (Fig. 4C). A fully patent CBD was found at the porta hepatis as in the wild type (Fig. 4D).



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 3 件)

- ① Shimadera S, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Fumino S, Ono S, The significance of steroid therapy after hepatportoenterostomy in infants with biliary atresia, *European Journal of Pediatric Surgery*, 17 巻、100-103 頁、2007 年、査読有
- ② Shimadera S, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Fumino S, Yokoyama T, The inv mouse as an experimental model of biliary atresia, *Journal of Pediatric Surgery*, 42 巻、1555-1560 頁、2007 年、査読有
- ③ Shimadea S, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Ono S, Fumino S, Significance of ductal plate malformation in the postoperative clinical course of biliary atresia, *Journal of Pediatric Surgery*, 2 巻、304-307 頁、2008 年、査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① Shinichi Shimadera, Significance of ductal plate malformation in the

postoperative clinical course of
biliary atresia 、 54th Annual
International Congress of British
Association of Paediatric Surgeons、
July 17-20, 2007, Edinburgh, UK

- ② 嶋寺伸一、木村 修、樋口恒司、文野誠
久、佐々木康成、出口英一、胆道閉鎖症
術後経過における肝内胆管嚢胞状拡張の
意義、第45回日本小児外科学会学術集会、
平成20年5月28日、つくば国際会議場、
つくば

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋寺 伸一 (SHIMADERA SHINICHI)
京都府立医科大学・附属病院・専攻医
研究者番号：30453096