

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20791296
研究課題名（和文） 胆道閉鎖症動物モデルーヤツメウナギの可能性一
研究課題名（英文） Biliary Atresia in Lamprey
研究代表者
森井 真也子（MAYAKO MORII）
秋田大学 医学部 医員
研究者番号：10375280

研究成果の概要（和文）：

ヤツメウナギ (*Lethenteron reissneri*) は、変態期に胆道系が完全に消失する生物であり、形態的類似性から胆道閉鎖症（BA）のモデル動物と報告されてきた。本研究においては分子生物学的手法を用いて、BAおよびヤツメウナギの類似点、相違点について再評価した。2年間の成果として、ヤツメウナギにおける胆管消失がカスパーゼカスケードを介したアポトーシスによるものであること(Morii et. al. 2010 Anat. Rec.)、また近年報告が散見されている通り、BAにおいても胆管上皮細胞のアポトーシスを認めること(Morii et. al 2009 Biliary Atresia)を報告した。この結果からヤツメウナギは**胆管消失機序**、**胆管消失後の胆汁酸代謝機構**の2点の解明をもってBAのモデルとなることを結論した。

研究成果の概要（英文）：

A unique anatomical situation exists in all lamprey species in that the adult liver possesses no bile ducts. A non-parasitic lamprey in Japan, *Lethenteron reissneri*, stop feeding at the commencement of metamorphosis and they completely lose their entire bile-transport apparatus during metamorphosis. The degeneration of bile ducts is considered to depend on programmed cell death or apoptosis; however, molecular evidence of apoptosis is still lacking. By using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining, and immunohistochemistry with an antibody against active caspase-3 (of the caspase family of cysteine proteases), we showed that the epithelial cells of the cystic duct and gall bladder became TUNEL-positive by metamorphosing stage 2. Immunohistochemical staining of active caspase-3, a key mediator of the apoptotic cascade, showed that the apoptotic signal was initiated in the region around the cystic duct at metamorphic stage 1. In later stages, active caspase-3-positive epithelial cells were also observed in the large intrahepatic bile duct and peripheral small intrahepatic bile ducts. At stage 2, bile canaliculi between hepatocytes were dilated and displayed features resembling canaliculi in cholestasis. Onset of apoptosis around the cystic duct, which is the pathway for the storage of bile juice, and progression of apoptosis toward the large intrahepatic bile duct, which is the pathway for the secretion of bile juice, may lead to temporal intrahepatic cholestasis. Our present study is the first precise spatial and temporal analysis of apoptosis of epithelial cells of the biliary tract system during metamorphosis of any lamprey species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症・ヤツメウナギ・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

ヤツメウナギ (*Lethenteron reissneri*) は幼生期には胆道系が存在し胆汁を腸管へ排出しているが、変態期には1度形成された胆道系が完全に消失する。形態的類似性から1970年代ころより胆道閉鎖症のモデル動物となり得る可能性があるとしてされてきたが、ヒトとは非常に異なった種であるため、形態のみを比較した論議ではヒト胆道閉鎖症研究に貢献できない背景があった。

2. 研究の目的

近年発展のめざましい分子生物学的手法を用いて、胆道閉鎖症およびヤツメウナギの類似点について再検討し、胆道閉鎖症モデル動物としてヤツメウナギを再評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幼生、成体および変態期のヤツメウナギについて、肝臓の連続切片を作成し、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いてその基本構造を解析した。

(2) 変態期ヤツメウナギについて胆管消失

にたいするアポトーシスの関与を評価するため、TUNEL法および抗活性型カスパーゼ3抗体による免疫染色を行った。

(3) ヒト胆道閉鎖症におけるアポトーシスの関与を明らかにするため、初回手術時の肝門部結合織塊対して、TUNEL法および、抗活性型カスパーゼ3抗体による免疫染色をおこなった。

(4) ヤツメウナギ初代培養細胞にアポトーシスを誘導し、活性型カスパーゼ3の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

① 幼生では毛細胆管、肝内胆管、肝外胆管、胆嚢というヒトに類似した胆道系を認めた。肝臓は小葉構造を示さない。あたかも全体が一つの小葉のような構造であり、中心に門脈、肝動脈、門脈が配置し、辺縁に肝静脈を認めた。電子顕微鏡による観察では、肝細胞間に毛細胆管を認めた。

成体では胆管上皮細胞を認めず、電子顕微

鏡による観察でも毛細胆管にいたる全ての胆道系が完全に消失していた。しかし、肝線維化や肝細胞障害を疑わせる像は認めなかった。

②変態期の個体ではTUNEL法により、胆嚢、胆嚢管および、ヒトの肝門部付近に相当すると考えられる集合管の胆管上皮が染色された。さらにTUNEL法で染色された胆管を中心に広範囲の胆管上皮が抗活性型カスパーゼ-3抗体による免疫染色によって染色された。変態の初期に一時的に毛細胆管は拡張し細胞間隙の開大を認めた。

③ 過去5年間の胆道閉鎖症7症例について、初回手術に採取した肝外胆管組織を検討した。病型はⅢ-b1- ν が5例、Ⅲ-a2-oが1例、Ⅲ-a1- ν が1例であった。7例中3例は葛西術後に減黄が得られず1歳以内に生体肝移植を施行した。減黄の得られなかった3例のうちo型を除いた2例中2例で肝門部結合織内の胆管上皮がTUNEL法陽性であった。減黄の得られた4例中1例の肝門部結合組織内の胆管上皮がTUNEL陽性であった。総胆管上皮細胞は7例中2例に認めo型の1例でTUNEL陽性の上皮を認めた。胆嚢上皮細胞は7例中5例で確認でき、減黄された1例でTUNEL陽性の上皮を認めた。これは肝門部胆管上皮が陽性であった症例と同一であった。抗活性型カスパーゼ3抗体による免疫染色はブロック作成から2ヶ月のo型において総肝管に相当する結合織内の微小な胆管で高率に陽性であった。ブロック作成から2年を経過した症例ではTUNEL陽性の胆管においても抗活性型カスパーゼ3抗体の核への集積を認めなかった。

④ ヤツメウナギの表皮を剥離し遊走法を

用いて初代培養系を確立した。この培養細胞に対して、スタウロスポリンを用いてアポトーシスを誘導した際、活性型カスパーゼ3が誘導された。

(2) 研究成果

①～④の研究結果から以下のごとく、研究成果を得た。

ヤツメウナギにおける胆管消失がカスパーゼカスケードを介したアポトーシスによるものであることを確認し報告した(Morii et. al. 2010 Anat. Rec.)。さらに、ヤツメウナギでは胆管消失にともなって一時的に肝内胆汁鬱滞がみられるが、その後黄疸や肝臓障害は認めなかった。

また、近年報告が散見されている通り、ヒト胆道閉鎖症においても高率に胆管上皮細胞のアポトーシスを認めることを確認し報告した(Morii et. al 2009 Birialy Atresia)。さらに検討が必要であるが、葛西手術後の減黄と肝門部切離端における胆管上皮細胞のアポトーシスは関連する傾向があり、胆道閉鎖症の病因病態にアポトーシスが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

この結果からヤツメウナギは**胆管消失機序、胆管消失後の胆汁酸代謝機構**の2点の解明をもってヒト胆道閉鎖症研究に貢献できる可能性があり、ヒト胆道閉鎖症モデルとなることを結論した。

(3) 今後の展望

今後の展望としては、胆管上皮アポトーシスを調節する分子機構について、また胆管消失後に機能すると考えられる胆汁酸代謝、排泄にかかわる分子やその制御機構について研究を進める予定である。ヤツメウナギとヒトの初代培養細胞を対象に共通因子の発見、制御法の開発を目指したい。この成果をヒト胆

道閉鎖症の病因・病態の解明からさらには新たな治療法の臨床応用に結び付けたいと考えている。

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2件)

① Mayako Morii, Yoshihiro Mezaki, Noriko Yamaguchi, Kiwamu Yoshikawa, Mitsutaka Miura, Katsuyuki Imai, Hiroaki Yoshino, Taku Hebiguchi, Tatsuzo Hebiguchi, Haruki Senoo, Onset of Apoptosis in the Cystic Duct During Metamorphosis of a Japanese Lamprey, *Lethenteron reissneri* 査読有 Published Online: Apr 12 2010

② 森井真也子、目崎喜弘、吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、妹尾春樹 薬物起因性肝内胆管消失症候群 日本臨床、査読なし、in press

[学会発表] (計5件)

①第113回日本解剖学会 2008.3.28.大分 変態期ヤツメウナギにおける胆管形態変化 森井真也子、他吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、山口典子、吉川究、目崎喜弘、今井克之、三浦光隆、妹尾春樹

②第56回日本小児外科学会 2008.5.28. つくば

肝外胆管消失機序の解明ー変態期ヤツメウナギにおける胆管形態変化からー 森井真也子、吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、山口典子、吉川究、目崎喜弘、今井克之、三浦光隆、妹尾春樹

③第35回日本胆道閉鎖研究会 2008.12.6. 東京

胆道閉鎖症におけるアポトーシスの関与について

森井真也子、吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、

山口典子、吉川究、目崎喜弘、今井克之、三浦光隆、妹尾春樹

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009.3.29. 岡山 変態期ヤツメウナギ肝臓における形態変化

森井真也子、吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、山口典子、吉川究、目崎喜弘、今井克幸、三浦光隆、妹尾春樹

④第16回肝細胞研究会、2009.6.26. 山形

変態期ヤツメウナギにおける胆道消失機序

森井真也子、吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、目崎喜弘、山口典子、吉川究、今井克之、三浦光隆、妹尾春樹

⑤第36回日本胆道閉鎖研究会 2009.12.12. 横浜

胆道閉鎖症におけるアポトーシスの関与について

森井真也子、吉野裕顕、蛇口琢、蛇口達造、山口典子、吉川究、目崎喜弘、今井克之、三浦光隆、妹尾春樹

[図書] (計1件)

①Morii M et. al. Involvement of apoptosis in biliary atresia. BILIARY ATRESIA, Proceedings of the 35th Conference of the Japanese Biliary Atresia Society, Editor Akira Matsui, M.D., Kodansha Shuppan Service Center, Tokyo, 2009, 19-21

6. 研究組織

(1)研究代表者

森井 真也子 (MAYAKO MORII)

秋田大学 医学部 医員

研究者番号：10375280

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：