

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08933

研究課題名(和文) 臍帯血分析による胆道閉鎖症の免疫学的病因解明と発症予防へ向けた多施設共同研究

研究課題名(英文) A Multicenter Prospective Case-Control Study on Etiopathogenetic Role of Maternal Cells in Biliary Atresia on Disease Control using Cord-Blood Analysis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症(BA)は新生児、乳児期に見られる予後不良で原因不明の疾患である。本症の肝臓には母親の細胞が多く迷入している。9例において母児間混合リンパ球培養では相互に強い免疫反応を示した。12例の末梢血に存在する母親由来細胞を定量したところ、7例に106個のリンパ球中平均328個の母親由来細胞が存在し、予後と有意に相関した。すなわち、母児間免疫異常が本症の病態に何らかの関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本疾患を有する患児の肝臓に母親由来細胞が多く存在することと本疾患メカニズムとの関連が明らかになれば、発症の予測が可能となり、胎生期からの診断さらには予防方法の開拓また新たな治療の開発、すなわち臓器提供者を必要とする肝移植に依らない自己肝で生存できる可能性も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Biliary atresia (BA) is an immune-mediated inflammatory bile duct disease of unknown etiology in newborns and infants, ultimately requiring liver transplantation in half of the patients. As maternal cells are found in the significant number in the liver of patients with BA, we proceeded our research based on the hypothesis that materno-fetal immune dysregulation causes bile duct damage. Mixed lymphocyte reaction between the 9 patients with BA and their mothers disclosed upregulation of immune-interaction in all. Among 12 patients with BA, 328 maternal cells out of 1,000,000 host cells in average were detected in the peripheral blood of 7 patients during their follow-up, of whom five patients showed poor prognosis. This suggests that circulating maternal chimeric lymphocytes might have some role in its etiopathogenesis.

研究分野：医学

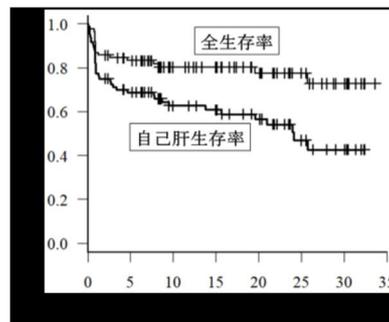
キーワード：胆道閉鎖症 母親マイクロキメリズム 混合リンパ球培養

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道閉鎖症(Biliary Atresia : BA)とは、新生児期から乳児早期の肝内外胆管の閉塞を伴う肝障害を主症状として発症する原因不明の疾患である。我が国では10000出生に1人で年間約80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ものの、早期から門脈圧亢進症を併発し肝線維化が進行することが多く、病状制圧効果は限定的で思春期までに約半数が肝移植を必要とする難病である(図1)。肝移植は終生免疫抑制剤を必要とするなど医療経済に与える影響も大きく、国際的にもその疾患メカニズムの究明が求められている。



図(1)

(2) Maternal Microchimerismとは、母親細胞が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であり、一般的に母児間では寛容が成立しており稀ではない現象である。一方で、寛容の誘導に不全がおこれば、母親エフェクターリンパ球は免疫学的に胎児を攻撃する病態(Graft-versus-Host Disease : GvHD)を引き起こす可能性がある。若年性皮膚筋炎はこれが原因とされている(文献1)。研究代表者は、BAの男児の肝生検組織で母親由来細胞の存在を報告した(文献2)。Maternal Microchimerismにおける寛容の誘導不全によりGvHD様メカニズムが胆管や門脈に傷害を与え、BAが発症する可能性を示唆していると考え、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

BAの病因論におけるMaternal Microchimerismの役割を明らかにすることを目的とする。症例数は限られているので、全国多施設共同研究とした。病因論が明らかになれば胎生期からの診断と予防方法の確立も期待できる。

### 3. 研究の方法

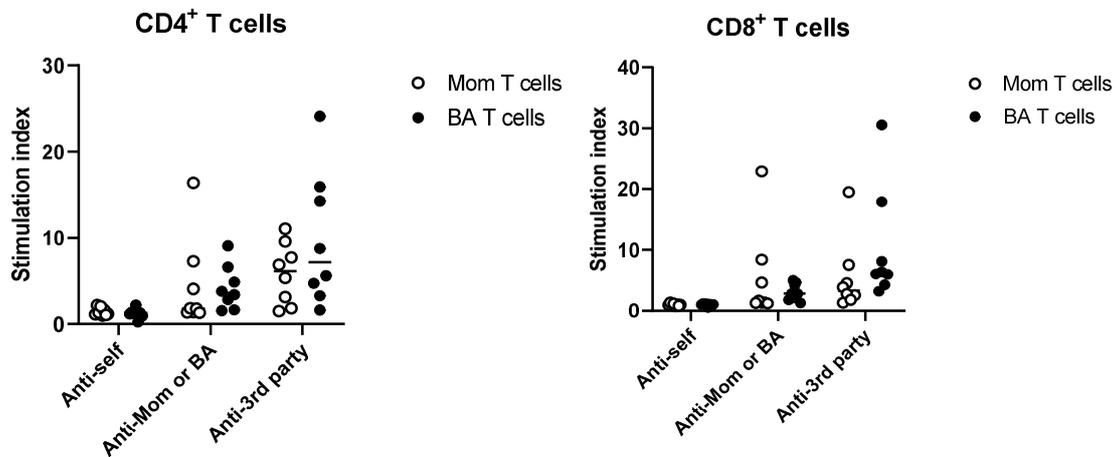
- (1) 母児間で混合リンパ球培養によりIFN- $\gamma$ の産生を見るElispot testを当初計画したが、最近注目されているCFSE-MLR法に切り替え、母児間の抗原刺激で増殖するT細胞のフェノタイプを同定することにし、広島大学移植外科に指導を仰いだ(文献3)。
- (2) BA患者の末梢血の母親由来キメラ細胞を非遺伝性のHLAをプローブにして定量し、その存在と予後との関連を検索した。これは米国シアトルのJ Lee Nelson, Fred Hutchinson Cancer Research Centerに分析依頼した(文献4)。
- (3) 臍帯血には母親細胞が多く存在することが報告されており(文献5)、出生前診断でBAが疑われた場合臍帯血を採取すれば多数例での母児間リンパ球混合試験が可能となると考え、当初、富山大学産婦人科学教室との協力を得て、特に制御性T細胞の関与を検討する計画であったが、コロナ禍の影響もあり、全国多施設共同研究の実施まで進めなかった。遅ればせながら、2023年の1月より公募開始し、準備が整っている。

### 4. 研究成果

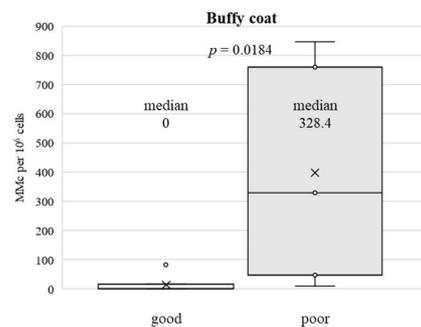
#### (1) CFSE-MLR

外来フォロー中の10例において母児間の抗原刺激をthird party刺激と比較した。1例においてリンパ球数が不十分だったので、9例で分析した。結果として、CD4, CD8双方にthird-

party 刺激に匹敵するほどの高い免疫応答が認められた(図2)。母児間のHLAはhaplo-matched であるにもかかわらず強い反応を示したと言える。今後 Treg 分画で検討する計画である。



(2) 外来フォロー中の12例の末梢血中存在する母親由来キメラ細胞を定量分析したところ、7例に Buffy coat 中に単核細胞  $10^6$  中平均 328 個の母親由来細胞が存在し、これら7例中5例は予後不良で、有意に予後と相関した(図3)。すなわち、術後年月を経ても母親細胞が末梢血中存在することは予後を左右する病態と関連していることが分かった。



#### <引用文献>

1. Reed, A, et. al. J Immunol 2004;172:5041-46
2. Muraji, T et. al. Pediatrics 2008;121:517-21
3. Tanaka, Y, et. al. Immunol invest 2004;33:309-24
4. Nelson, JL, et.al. Autoimmunity 2003;36:5-9
5. Kanaan, S, et. al. Oncoimmunology 2017;0:e1311436

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Masuya Ryuta, Muraji Toshihiro, Harumatsu Toshio, Muto Mitsuru, Nakame Kazuhiko, Nanashima Atsushi, Ieiri Satoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Biliary atresia: graft-versus-host disease with maternal microchimerism as an etiopathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103410-103410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transci.2022.103410	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, Masuya Ryuta, Harumatsu Toshio, Kawano Takafumi, Muto Mitsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 New insights in understanding biliary atresia from the perspectives on maternal microchimerism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2022.1007987	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, Muraji Toshihiro, Kanaan Sami B., Harumatsu Toshio, Muto Mitsuru, Toma Miki, Yanai Toshihiro, Stevens Anne M., Nelson J. Lee, Nakame Kazuhiko, Nanashima Atsushi, Ieiri Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Circulating maternal chimeric cells have an impact on the outcome of biliary atresia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2022.1007927	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 該当する

1. 著者名 Masuya Ryuta, Muraji Toshihiro, Harumatsu Toshio, Muto Mitsuru, Nakame Kazuhiko, Nanashima Atsushi, Ieiri Satoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Biliary atresia: graft-versus-host disease with maternal microchimerism as an etiopathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103410-103410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transci.2022.103410	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, 家入 里志, 春松 敏夫	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 【新生児消化器疾患】胆道閉鎖症の成因 母親マイクロキメリズム仮説を中心に	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本新生児成育医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11-16
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 無
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 鳥飼 源史, 家入 里志, 松久保 眞, 春松 敏夫, 大西 峻, 山田 耕嗣, 川野 孝文, 義岡 孝子, 連 利博, 加治 建	4. 巻 56
2. 論文標題 肝門部結合織に異所性軟骨組織を認めた胆道閉鎖症の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1133-1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.56.7_1133	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 春松 敏夫, 連 利博, 祁答院 千寛, 長野 綾香, 松井 まゆ, 村上 雅一, 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 大西 峻, 山田 耕嗣, 松久保 眞, 武藤 充, 加治 建, 家入 里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症開腹葛西手術改変による黄疸消失率と自己肝生存率に対する予後因子の検討
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春松 敏夫, 連 利博, 祁答院 千寛, 長野 綾香, 松井 まゆ, 村上 雅一, 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 大西 峻, 山田 耕嗣, 松久保 眞, 武藤 充, 加治 建, 家入 里志
2. 発表標題 症葛西術後にみられる胆管炎の病態 非化膿性胆管炎の潜在性検証
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎屋 隆太, 連 利博, 春松 敏夫, 中目 和彦, 家入 里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症の病因論としての母親キメリズム関連GvHD仮説 臍帯血および胎盤病理に関する共同研究の提案
3. 学会等名 第57回 日本周産期・新生児医学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家入里志、春松敏夫、連利博
2. 発表標題 胆道閉鎖症に対する開腹葛西手術改変による黄疸消失率と自己肝生存率の検討
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 春松敏夫、連利博、杉田光土郎、家入里志
2. 発表標題 双胎例から展開する胆道閉鎖症の病因論
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三藤賢志、連利博
2. 発表標題 胆道閉鎖症における左葉外側区域萎縮の原因
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小坂征太郎、連利博
2. 発表標題 同一HLAの双胎における胎盤絨毛炎を伴ったdiscordant 胆道閉鎖症の1例
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masaki Nio (Ieiri S, Harumatsu T, Muraji T)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 350
3. 書名 Introduction to Biliary Atresia	

〔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	齋藤 滋  (SAITO Shigeru)  (30175351)	富山大学・大学本部・学長   (13201)	
研究分担者	津田 さやか  (TUDA Sayaka)  (60839075)	富山大学・学術研究部医学系・助教   (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	春松 敏夫  (HARUMATSU Toshio)  (70614642)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教     (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Fred Hutchinson Cancer Reseach Center			