

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592273

研究課題名（和文）胆道閉鎖症におけるサイトカイン環境の解析

研究課題名（英文）Cytokine profile in biliary atresia patients.

研究代表者

齋藤 武 (SAITO TAKESHI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20406044

研究成果の概要（和文）：胆道閉鎖症患児の血液・肝胆道組織を用い、全身・局所におけるサイトカインプロファイル^①を網羅的・包括的に行った。結果、胆道閉鎖症患児の免疫環境は全身と局所とで異なっており、全身のそれは Th1 と Th2 の極端なアンバランスを生じていない一方で、局所環境においては Th1 優位の免疫環境を構築していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using the serum and liver specimens taken from biliary atresia (BA) patients around the operation, we investigated both the systemic and local immunological environment of BA. It was suggested the significant difference between Th1 and Th2 cytokines expression levels has not been found in the systemic immunity. However, the representative local environment in the liver showed Th1 polarization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：先天性消化器疾患学・胆道閉鎖症・サイトカイン・サイトカインネットワーク・自然免疫

1. 研究開始当初の背景

肝は 'lymphoid liver' と呼ばれ免疫担当細胞が豊富である。門脈・胆道から侵入する外来抗原や微生物は、これらに捕捉され種々のサイトカインが産生されるが、このサイトカインの広範

なネットワークを介して最終的な免疫応答と免疫寛容が決定される。BA の発症時期は生後 2 カ月頃までの極めて限定された時期であり、獲得免疫系統は未熟な状態と考えられ、その防御機構は自然免疫に依存するところが大き

い、と推測される。外来異物が自然免疫担当細胞の pathogen-recognition receptor に捕捉され、特定のサイトカインカスケードが過剰に活性化してネットワークの破綻が生じ、胆道の炎症が生じている可能性がある。従来の報告では、幾つかの炎症性サイトカイン(IL-2, TNF- α , IL-8 など)の発現を血清や肝を試料として散発的に調べているが、包括的検討とは言い難い。また自然免疫との関連を検討した報告も、ウイルス感染を前提としたもので、特定のシグナル伝達を調べたものである。さらに rotavirus 接種により作成した BA モデルマウスを用い、サイトカインプロファイルを調べそこでみられる炎症が Th1 優位であるとする報告はあるものの、これらは本モデルマウスの病態が BA のそれに合致するかという根本的な問題を内在している。

2. 研究の目的

本研究では、BA における炎症の全体像を把握するという観点から、主として臨床検体を用い、BA 患児における全身と局所のサイトカイン環境を洞察することを目的とした。全身もしくは局所のサイトカインバランスに不均衡があるか、門脈域にサイトカインの偏向が存在するか(分布する helper T cell は Th1 と Th2 のどちらが優位か)、を検討した。さらに、門脈域において炎症を惹起する主たるカスケードを明らかにし、それへの自然免疫の関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) BA とコントロール群(先天性胆道拡張症(CBD), その他)の手術前後に経時的に採取された血液検体を用い、flowcytometry 法でサイトカイン濃度を測定した。コントロール群は正常 control 群(normal control; NC)、胆汁鬱滞性 control 群(cholestatic control; CC)に分類し、胆汁鬱滞がサイトカイン発現に与える影響を把握できるよう留意した。また手術施行患児においては、術前に検体を採取することとし、炎症が成立しつつある時点でのサイトカイン環境を捉えることに努めた。一方、手術未施行例では、検体採取時期を BA 群とそろえることに留意した。BA の術前検体は、発症初期段階における全身のサイトカインバランスを反映している可能性があり、②で用いる術時検体(肝組織)では窺えない事象が隠れている可能性がある。検索したサイトカインは、Th1 (IL-2, IFN γ , IL-12p70, TNF- β)、Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)、Th17 (IL-17A)、炎症性 cytokine (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8)、chemokine (MCP-1, sCD40L)、細胞接着分子(sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1)、IFN (IFN- α)など 20 種類である。最近関節リウマチなどでその重要性が指摘されている IL-17 も選択した。ウイルスが胆道炎症を惹起する

trigger として機能している可能性は捨てきれず、IFN- α と β も含め解析した。

(2) BA とコントロール群の手術時に採取した肝組織を用い、核酸抽出・cDNA 作成後 real time PCR を行い、着目したサイトカイン、IFN の mRNA 発現量を解析した。(3)では、より限局した領域である門脈域と肝小葉域でのサイトカインの定量を行うが、BA 肝全般でのサイトカインバランスを観察することは学術的に重要である。

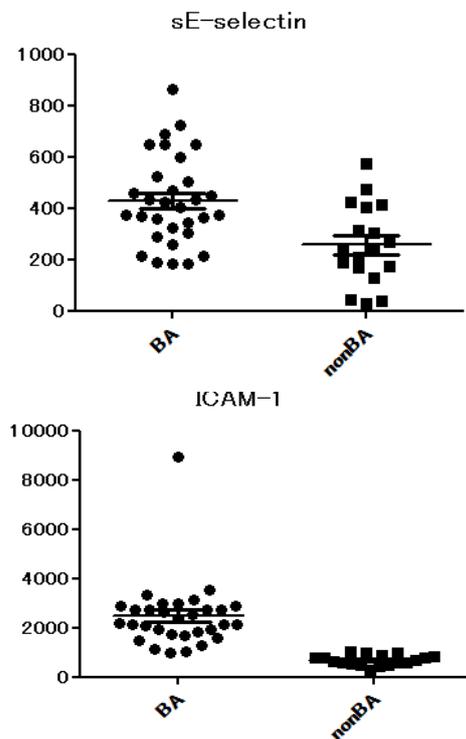
(3) 術時に採取した肝組織より、microdissection 法を用いて、肝の主要構成要素である門脈域と小葉域を切り出した。ここから核酸を抽出し、(2)と同様な方法で微小環境におけるサイトカイン発現レベルを検索した。BA においては主として門脈域が炎症の惹起・展開される領域と推測され、このサイトカインプロファイルを BA 小葉域と、またコントロール群門脈・小葉域と比較検討することで、BA の病態に直結する免疫学的特徴が明らかになる可能性が存在するからである。

(4) (1)から(3)の結果を解析し、BA の病態形成に関与すると推定されるサイトカインカスケード構成因子、TLR さらに自然免疫細胞(樹状細胞、Kupffer 細胞など)を選択し、肝組織を用いて免疫組織化学染色を行った。樹状細胞、Kupffer 細胞の特異的二次抗体としては、CD11 と CD68 を選択した。同時に特異的転写因子の免疫染色も行い、発現量と局在を観察した。TLR シグナル経路の活性化は IRF/NF- κ B の、Th1 への偏向には T-bet の、Th2 への偏向には GATA3 の活性化が関与するとされており、免疫染色にあたっては、同抗体を使用した。これにより各サイトカイン、免疫担当細胞、転写因子の多寡と局在を把握した。

4. 研究成果

(1) 本研究における対象患者は BA16 例、正常 control (NC) 群 12 例、胆汁鬱滞性 control (CC) 群 15 例であった。NC 群は先天性消化管疾患 5 例や非胆汁鬱滞性胆道拡張症 (CBD) 3 例などを、CC 群は胆汁鬱滞性 CBD3 例、肝内胆管減少症や胆汁鬱滞症候群を含む。BA は全例 III 型、脱黄率は 81%、自己肝生存は 69% であった。各群の血液検体採取日齢は BA20~106 (中央値 53)、NC5~199 (同 57)、CC5~152 (同 33)。BA の手術日齢は 24~112 (同 59) で、手術日を day0 とすると検体採取時期は day-40~-1 日 (同-6 日) であった。NC 群、CC 群における肝組織採取時期は各々 35~243 (同 84)、43~167 (同 73) であった。Demographic data に関し検討すると (検体採取日齢、WBC、CRP、AST、ALT、ALP、T-Bil、C-Bil、 γ GTP など)、BA と NC との比較では検体採取日齢以外すべてで有意差を生じたが、CC との比較では CRP、T-Bil、 γ GTP 以外で有意差が生じていた。

(2) 血清サイトカイン濃度の比較では、BA 群と NC も群間で有意差が生じたのは IL-1 β 、IL-8、TNF- β と E-selectin、ICAM-1 の細胞接着分子であった。一方 Th1 系サイトカインである IFN γ ・IL-2・IL-12(p30)、Th2 系サイトカインである IL-4・IL-5・IL-10、炎症性サイトカインである TNF- α ・IL-6 などでは有意差はみられなかった。有意差を生じた 3 サイトカインと 2 細胞接着分子の各測定値をプロットし極端な値をとる症例を排除してみると、群間で有意差を生じていたのは E-selectin と ICAM-1 であった。



同様に BA 群と CC 群間での検討を行った。有意差が生じたのは IL-1 β 、IL-8 と細胞接着分子である MCP-1、E-selectin、ICAM-1 であった。一方 Th1 系、Th2 系、炎症性の各サイトカインでは有意差はみられなかった。有意差を生じた 2 サイトカインと 3 細胞接着分子の各測定値をプロットし極端な値をとる症例を排除してみると、群間で有意差を生じていたのは MCP-1、E-selectin と ICAM-1 の細胞接着分子であった。

(3) 肝組織中のサイトカイン mRNA 発現レベルを real-time PCR で調べてみると、BA 群では NC 群・CC 群に比し、Th1 系サイトカインである IL-2、IFN γ 、および細胞接着分子である E-selectin、ICAM-1 が有意に高発現していた。一方 Th2 系サイトカインである IL-4 と IL-10 では、BA 群と他群間で有意差は認められなかった。また、炎症性サイトカインである IL-6、IL-8 については、BA 群で有意に発現レベルが高かった。

(4) 同一症例の門脈域・小葉域を microdissection で切り出し、各々 3-6 領域をまとめ、その症例における門脈域・小葉域検体とした。このサンプルより RNA を抽出し局所におけるサイトカイン発現レベルを検索した。同部から採取できる検体量はごく少量であったため、代表的サイトカインのみ検討した。門脈域の検討では、(3) と同様、Th1 系である IL-2・IFN γ および細胞接着分子の発現が BA で有意に高く、Th2 系である IL-4・IL-10 の発現には BA 群と他群との間に有意差を認めなかった。一方、小葉域に関してみると、Th1 系、Th2 系、炎症性のいずれのサイトカインでも有意差がみられなかった。ただし、小葉域でも E-selectin と ICAM-1、MCP-1 の発現量は、BA 群で高い傾向がみられた。

(5) 門脈域・小葉域における免疫担当細胞と代表的サイトカインの局在と多寡、さらに Th1/Th2 のマスター転写因子の局在を組み合わせで調べた。BA の門脈域では、CD11⁺CD68⁺である樹状細胞と Kupffer 細胞が集簇し、その近傍にはヘルパー CD4⁺T 細胞や細胞障害性 CD8⁺T 細胞が散見された。このうちヘルパー CD4⁺T 細胞の過半数において、Th1 への分化を決定づけるマスター転写因子 T-bet の発現が認められた。代表的サイトカイン mRNA の局在を調べると、IL-2、IFN γ は主に樹状細胞と CD4⁺T 細胞での発現が顕著であり、ICAM-1 の発現は Kupffer 細胞で強い傾向がみられた。上記は小葉域では明らかでなく、そのパターンは門脈域から小葉域にかけて同心円状に減弱してゆく傾向が認められた。一方、Th2 系のマスター転写因子である GATA3 を発現したヘルパー CD4⁺T 細胞は肝内にわずかに認め

られるにすぎず、その分布傾向も門脈域と小葉域で有意差はみられなかった。さらに Th2 系サイトカインの一つである IL-4 の mRNA は散発的に小葉域の Kupffer 細胞でみられたが、いずれも発現レベルは微弱であった。

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 5 件)

① Terui K, Saito T, Hishiki T, Sato Y, Mitsunaga T, Yoshida H. Hepatic expression of multidrug resistance protein 2 in biliary atresia. *Comp Hepatol*. 2011 ;10:6. 査読有

② Saito T, Hishiki T, Terui K, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Nakata M, Takenouchi A, Matsuura G, Yahata E, Ohno S, Sato H, Yanagawa N, Masuda Y, Yoshida H. Use of preoperative, 3-dimensional magnetic resonance cholangiopancreatography in pediatric choledochal cysts. *Surgery*. 2011;149:569-75. DOI:10.1097/MPG.0b013e3182307c9c 査読有

③ Saito T, Hishiki T, Terui K, Mitsunaga T, Terui E, Nakata M, Yoshida H. Toll-like receptor mRNA expression in liver tissue from biliary atresia patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;53:620-6. doi:10.1016/j.surg.2010.11.004 査読有

④ Mizuta K, Sanada Y, Saito T, Kawarasaki H, 他 29 名 10 番目. Living-donor liver transplantation in 126 patients with biliary atresia: single-center experience. *Transplant Proc*. 2010;42:4127-31. 査読有

⑤ Saito T, Hishiki T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Yoshida H. Expression level of Toll-like receptor mRNA in liver tissue from patients with biliary atresia. In: Matsui A, editor. *Biliary Atresia*. 1st ed. Tokyo: Tokyoinshokan; 2009. P22-25. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Saito T, Hishiki T, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Saito E, Yoshida H. Toll-like receptor mRNA expression in liver tissue from biliary atresia patients. *International Surgical week/ISW 2011* (2011 年 8 月 31 日 横浜)

② 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 佐藤嘉治, 光永哲也, 松浦 玄, 八幡江里子, 三瀬直子, 柴田涼平, 坂本明美, 幡野雅彦, 岩井 潤, 東本恭幸, 吉田英生. 胆道閉鎖症における血

中サイトカイン解析の意義. 第 37 回日本胆道閉鎖症研究会 (2010 年 12 月 11 日 東京)

③ 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 佐藤嘉治, 武之内史子, 八幡江里子, 大野幸恵, 三瀬直子, 吉田英生, 坂本明美, 幡野雅彦, 岩井 潤, 東本恭幸, 光永哲也. 胆道閉鎖症における血中サイトカイン解析の意義. 第 47 回日本小児外科学会総会 (2010 年 6 月 17 日 名古屋 日小外会誌 46, 509, 2010)

④ 齋藤 武, 菱木知郎, 佐藤嘉治, 光永哲也, 照井エレナ, 松浦 玄, 柴田涼平, 吉田英生. 生後 40 日以内に根治術を施行された胆道閉鎖症の転帰. 第 106 回東京小児外科 (2010 年 6 月 1 日 東京 日小外会誌 46, 822, 2010)

[図書] (計 1 件)

① 齋藤 武 (2010) 成長障害. 小児生体肝移植 第 1 版 東京. 河原崎秀雄 編 pp220-222.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 武 (SAITO TAKESHI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20406044

(2) 研究分担者

吉田 英生 (YOSHIDA HIDEO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：60210712

菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：00375776

光永 哲也 (MITUNAGA TETSUYA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80375774

中田 光政 (NAKATA MITUYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90375775
(H23)

佐藤 嘉治 (SATO YOSHIHARU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60375772
(H21, 22)

照井 慶太 (TERUI KEITA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70375773
(H21)