

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462776

研究課題名(和文)胆道閉鎖症の病因・病態におけるSox9遺伝子の関与に関する検討

研究課題名(英文)SOX9 positive biphenotypic cell mediate ductular reaction with Notch signaling in Biliary atresia

研究代表者

猪股 裕紀洋(Inomata, Yukihiro)

熊本大学・その他の研究科・教授

研究者番号：50193628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症では、細胆管反応という細胆管が増生する特異な病理像が見られることが多く、その病態における意義はまだ不明な点が多い。自施設での先行研究で示唆されたごとく、SOX9遺伝子が細胆管反応に関与する可能性を、多数症例の病理解析によって実証し、胆道閉鎖症の予後への関連も検討することを研究目的とした。園結果、葛西根治術後も黄疸が遷延する症例では、胆管細胞と肝細胞の両性を発現する細胞が減少して胆管細胞が増加し、減黄する症例(=細胆管反応は軽減)では逆の現象がみられた。この結果は、SOX9油性細胞が細胆管反応の形成に関与し、肝組織におけるその発現は予後の推定にも役立つ可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of ductular reaction (DR) seen in liver diseases including biliary atresia (BA) has been still controversial. Notch signaling has been reported to involve in biliary development and differentiation in vivo. The aim was to elucidate the role of SOX9+ biphenotypic cells in DR and the association between Notch signaling and development of DR. Formalin fixed paraffin embedded liver sections from 47 liver specimens with BA were used. Image processing was performed by Image J 1.46 software after immunofluorescence staining. Sustained or progressive cholestasis led to decreasing of SOX9+HepPar1+ ratio and increasing CK19+ ratio, whereas reduction of jaundice led to increasing of SOX9+HepPar1+ ratio and decreasing CK19+ ratio. SOX9+HepPar1+ ratio had significant negative correlation with CK19+ ratio ( $r = -0.6$ ,  $p = 0.002$ ). In conclusion, DR in BA is mediated by SOX9+ biphenotypic cells, and Notch signaling is presumably required for development of DR.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 SOX9遺伝子 細胆管反応 葛西手術 胆汁うったい

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)胆道閉鎖症と細胆管反応

胆道閉鎖症は、胎生期もしくは生後早期に肝内・肝外胆管が炎症や線維化により閉塞する疾患で、日本では約10000人に1人に発症すると言われている。もし手術を行わなければ、1歳までに胆汁性肝硬変へ進展し、死に至る。生後、葛西手術と言われる胆汁排泄手術を行ってもなお肝の線維化が進行し、肝移植を行わなければ死に至る事もある重篤な疾患であるが、病因は未だ不明である。胆道閉鎖症肝組織にみられる一つの特徴的な所見として細胆管反応がある。細胆管反応とは、胆道閉鎖症をはじめとした慢性肝疾患や劇症肝炎などのように、肝細胞の自己複製能が障害を受けると誘導される現象で、Cytokerain19 (CK19)陽性の増生細胆管細胞の様な胆管表現型を有する細胞の異常な増殖が起こる。しかしながら、細胆管反応の細胞源として、既存の胆管細胞、肝幹/前駆細胞、肝細胞の3つの可能性が提唱されているが、その真の起源は未だ同定されていない。

### (2)SOX9遺伝子

SOX9 遺伝子は、第 17 番染色体に位置する転写因子で、1994 年に Campomelic dysplasia の原因遺伝子として同定された。様々な細胞や臓器(神経堤、心臓、腸管、精巣、膵臓など)の発生に重要な転写因子として報告されている。肝臓においては、胎生期では胆管発生の制御や、成体では肝細胞や胆管細胞の持続的な供給に関与しているとする報告もあり、肝臓の発生や再生における SOX9 遺伝子の機能は重要であると考えられている。

### (3)胆道閉鎖症とSOX9遺伝子

我々が以前、胆道閉鎖症肝臓とSOX9遺伝子の関連について免疫染色法により解析した研究では、SOX9は胆管細胞マーカーであるが、増生細胆管にSOX9の発現を確認しただけでなく、

門脈域近傍の肝細胞におけるSOX9の異所性発現を確認した。

### (4)アラジール症候群とNotch signaling

アラジール症候群は、肝臓においては小葉間胆管減少による慢性胆汁鬱滞を呈する疾患である。本疾患は常染色体優性遺伝性疾患であり、特徴的な肝外症状(心血管奇形、椎体異常、眼球異常、特徴的顔貌)を伴う。本疾患の原因遺伝子の探索が行われ、本疾患の患者のゲノムにおいて1997年にNotchレセプターのリガンドであるJAG1の遺伝子変異が、2006年にNotchレセプターであるNOTCH2の遺伝子変異が発見された。Notch signalingは、胆管発生(胆管上皮細胞の分化や管腔形成)において極めて重要な働きを担っている。また同定されたJAG1やNOTCH2いずれの遺伝子変異も、Notch signalingの伝達異常をきたす。近年、in vivoで、Notch signalingを活性化すると肝細胞から胆管表現型を有する細胞へ転換するという報告や、Sox9はNotchの直接のターゲットであるとする報告もある。

## 2. 研究の目的

このような観察結果に基づいて、胆道閉鎖症でみられる細胆管反応は肝細胞の細胆管化生により生じ、その現象にSOX9が関与しているとの仮説を立てた。本研究ではこの仮説を立証するために、1)胆道閉鎖症肝臓でみられる細胆管反応にSOX9がどのように関与しているのか? 2)細胆管反応におけるSox9-Notch signalingの役割について、明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)対象

2007年1月から2015年5月までに、当院で葛西手術および、もしくは肝移植術を受けた37名の胆道閉鎖症患者より得た49の肝組織を対象とした(図1)。それぞれの肝組織は4つのグループに分類された。グループ

(n=10) : 自己肝生存患者の葛西手術時に得た肝組織、グループ II (n=12) : 肝移植が後に必要となった患者の葛西手術時に得た肝組織、グループ III (n=12) : 当院で葛西手術後に肝移植術が必要となった患者の肝移植術時に得た肝組織、グループ IV (n=10) : 他院で葛西手術後に肝移植術が必要となった患者の肝移植術時に得た肝組織。グループ II とグループ III は、同一患者である。生体肝移植ドナー3名とアラジール症候群患者2名を胆道閉鎖症患者との病理学的な比較のために含めた。アラジール症候群患者は、*JAG1* 変異が同定されている。2例の胆道閉鎖症患者は、組織保存状態が悪かったため除外し、3例は肝移植術前に葛西手術が行われていなかったため除外した。肝組織は、肝臓の末梢側を楔状切除して採取した。ヒト肝組織を用いた研究は、熊本大学医学部附属病院の倫理委員会承認後に行った(ゲノム第240号)。

#### (2)免疫組織化学染色、画像処理

ヒト肝臓は、10%中性緩衝ホルマリン液(130-10047, Wako)に最低72時間室温で固定後、パラフィン包埋(サクラファインテックジャパン, 7810)し、5 $\mu$ mの厚さで薄切してパラフィン包埋切片を作成した。切片は、脱パラフィン後に、10 mM Tris, 1mM EDTA solution, pH 9.0 (eBioscience, 00-4965-58)を用いて電子レンジによる抗原賦活化を5分行った。3%過酸化水素水 / PBS (Wako, 086-07445)で内因性ペルオキシダーゼブロックを37 $^{\circ}$ C 5分行い、PBSTx洗浄後、5%ウシ血清アルブミン / PBSにて37 $^{\circ}$ C 20分ブロッキングを施行した。37 $^{\circ}$ Cで1時間1次抗体反応、PBSTx洗浄後、37 $^{\circ}$ C 1時間2次抗体反応を行った。画像は、OLYMPUS BX51で取得し、Paintshop<sup>®</sup> Pro 12 (COREL<sup>™</sup>)で処理した。その撮影画像をImageJ 1.46 software (National Institutes of Health)により処理・計測した。

## 4. 研究成果

### (1)SOX9+HepPar1+細胞により構成されている胆管様構造

SOX9を発現した肝細胞の有する病理学的な役割を調べるため、葛西手術時と肝移植時に採取された胆道閉鎖症肝臓を用いて、SOX9とHepPar1(肝細胞マーカー)の蛍光2重免疫染色を施行した。SOX9は胆管マーカーであり、そして増生細胆管にも発現している。ほとんどの胆管は、SOX9+HepPar1-細胞により構成されていた。しかしながら、門脈域周囲や肝小葉の末梢において、SOX9+HepPar1+細胞により構成されている胆管様構造を認めた。この所見は、様々な年齢層の胆道閉鎖症患者において確認されたが、成人健常肝には認められなかった。このことは、SOX9+HepPar1+細胞が、胆道閉鎖症肝臓において増生細胆管の出現に関与している可能性が示唆された。

### (2)葛西手術後に胆汁うっ滞性肝障害が進展すると、細胆管反応の進展よりも先にSOX9異所性発現が広がる

胆道閉鎖症肝臓においてCK19+細胞の増加に先立ちSOX9異所性発現が起こるかどうかが確認するために、グループII(n=12、葛西手術時)とグループIII(n=12、肝移植術時)を用いて免疫蛍光染色を行い経時的な比較を行った。この2群は同一患者である。組織学的解析の前に、患者の臨床データを後方視的に確認した(表1)。本研究期間中、我々の施設で葛西手術が施行され肝移植術が必要となった患者は、全員1歳未満であった。肝移植術時の肝機能(T-Bil、ALT、 $\gamma$ -GTP)は、葛西手術後に改善は認められなかった。さらに、ChE、PT-INR、F stagingは、肝移植術時に有意に悪化していた(それぞれ、 $p=0.002$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.007$ )。これらのデータは、グループIIIの胆道閉鎖症患者は、葛西手術後に胆汁うっ滞性肝障害が進行していることを

示唆する。

表 1. 葛西術時(グループ II)と肝移植術時(グループ III)の胆道閉鎖症患者の臨床データ

|                            | グループ II<br>(n=12)     | グループ III<br>(n=12)    | p 値     |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| 葛西手術時年齢                    | 70.5 (29-143)         | 左に同じ                  | /       |
| 肝移植術時年齢                    | 該当なし                  | 0.5 (0.3-0.7)         | /       |
| T-Bil (mg/dL)              | 9.2 (4.8-10.3)        | 12.0 (3.1-42.7)       | 0.16*   |
| ALT (U/L)                  | 89.5 (26-272)         | 132 (30-714)          | 0.27*   |
| -GTP (U/L)                 | 367 (110-1025)        | 180 (24-513)          | 0.06*   |
| TP (g/dL)                  | 5.8 (5.1-6.9)         | 5.85 (4.2-7.4)        | 0.88*   |
| ChE (U/L)                  | 292 (201-397)         | 115 (61-212)          | 0.002*  |
| WBC (/μL)                  | 12600<br>(8100-19200) | 11500<br>(5400-18400) | 0.33*   |
| Plt (x10 <sup>3</sup> /μL) | 340 (171-721)         | 167 (115-354)         | 0.004*  |
| PT-INR                     | 1.0 (0.9-1.4)         | 1.4 (1.1-1.8)         | 0.003*  |
| F staging                  | 3 (1-4)               | 4 (3-4)               | 0.007** |

データは、中央値(範囲)で示している。

\*Wilcoxon signed-rank test、\*\*Fisher's exact test

これらの群の中の代表的な免疫蛍光染色画像を、成人健常肝(肝移植ドナー)の染色画像とともに示す(図 2)。葛西手術時の方が肝移植術時より、多くの SOX9+HepPar1+細胞を確認した。一方、肝移植術時の方が葛西手術時より、多くの CK19+細胞や SOX9+HepPar1-細胞を確認した。成人健常肝では、SOX9+HepPar1+細胞はほとんど認められなかった。

グループ II とグループ III の Wilcoxon signed-rank test による 2 群間の比較では、葛西手術時に比べて肝移植術時は SOX9+HepPar1+率が有意に減少し(葛西手術時 vs 肝移植術時 = 5.24% vs 1.90%, p=0.02)、CK19+率と SOX9+HepPar1-率は有意に増加した(それぞれ、p=0.002, p=0.03)。

(3) 肝移植術時において SOX9 異所性発現は細胆管反応の進展に関連をもつ

葛西手術後の臨床的な胆汁うっ滞の程度と、SOX9+HepPar1+細胞数、SOX9+HepPar1-細胞数、そして CK19+細胞数との間の関連を確認するために、肝移植時サンプル(グループ III とグループ IV)を用いて算出した画像解析結果と T-Bil との統計学的な相関を分析した。SOX9+HepPar1+率は T-Bil の程度と有意な相関は認めなかったが(r=-0.3, p=0.23)、SOX9+HepPar1-率と CK19+率は、有意な正の相関関係を認めた(それぞれ、r=0.7, p=0.001、r=0.5, p=0.009)(図 4)。SOX9+HepPar1-率、CK19 率と T-Bil の程度との正の相関関係は、胆管表現型を有する細胞の増殖が胆汁うっ滞の重症度に関与している可能性を示唆する。

次に、SOX9 の異所性発現が細胆管反応の進展に関与しているかどうか調べるために、移植時の異所性 SOX9 発現と胆管増生との間の病理学的な関連について調べた。ここでは、SOX9+HepPar1+率、SOX9+HepPar1-率、CK19+率間の統計学的な相関について評価した。SOX9+HepPar1+率は SOX9+HepPar1-率との間に有意な負の相関を有し(r=-0.5, p=0.03)、CK19+率との間にも有意な負の相関があった(r=-0.6, p=0.02)。これらの負の相関関係は、SOX9+HepPar1+率は細胆管反応の進展に関与する可能性があることを示唆する。

(4) Notch signaling は SOX9 陽性肝細胞が仲介する細胆管反応の進展に必要である

細胆管反応の進展に Notch signaling が関与しているかどうか調べるため、我々は、アラジール症候群患者の移植時摘出肝組織ホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫蛍光染色を行った。高度な胆汁うっ滞が続いているにも関わらず、CK19+細胞数や CK19+細胞からなる胆管の数は少なかった(図 5)。驚くべきことに、肝小葉中に SOX9+HepPar1+細胞が著明に広がっている所見を認め、SOX9 の発

現は主に門脈域中心であった。これらの所見は、高度な胆汁うっ滞が存在するにも関わらず、Notch signaling の伝達異常が、SOX9+HepPar1+細胞の蓄積とCK19 陽性細胞数の減少を誘導する可能性を示している。このことは、Notch signaling が SOX9+肝細胞が関わる細胆管反応の進展に必要である可能性を示唆する。

#### (5) まとめ

本研究では、胆道閉鎖症肝臓でみられる細胆管反応には SOX9+HepPar1+細胞が関与していることについて言及した最初の報告である。また、細胆管反応の進展には、Notch signaling が寄与している可能性も示唆された。細胆管反応のメカニズムのさらなる解明が、肝再生の促進や肝疾患の病態進展の抑制等の新たな治療法の開発につながると考えられる。本研究は、Notch signaling やその下流に存在する SOX9 をターゲットとする肝疾患治療への足掛かりとなる研究であり、新規治療開発につながるように、さらなる解析を進めるべきである。

#### 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)

Suda H, Yoshii D, Yamamura K, Yokouchi Y, Inomata Y, New insight into reactive ductular cells of biliary atresia provided by pathological assessment of SOX9, *Pediatr Surg Int*, 査読有, 30, 2014, 481-492, DOI:10.1007/s00383-014-3497-7

Daiki Yoshii, Yuji Yokouchi, Hiroko Suda, Yukihiro Inomata, SOX9-positive hepatocytes mediate the progression of ductular reaction in biliary atresia, *Int*

*J Clin Exp Pathol*, 査読有, 9, 2016, [in press]

[学会発表](計4件)

吉井大貴、横内裕二、須田博子、猪股裕紀 洋、胆道閉鎖症における肝細胞の胆管細胞化生、肝線維化に対する SOX9 遺伝子の関与についての検討、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 4 日、国立京都国際会館(京都府)

Daiki Yoshii, Yuji Yokouchi, Hiroko Suda, Yukihiro Inomata, Significance of SOX9 gene for trans-differentiation of hepatocyte in liver, 熊本医学・生物科学国際シンポジウム、2014 年 9 月 4 日、熊本市医師会館(熊本県熊本市)

吉井大貴、横内裕二、須田博子、猪股裕紀 洋、胆道閉鎖症における肝細胞の細胆管化生と線維化に対する SOX9 の関与、第 52 回日本小児外科学会、2015 年 5 月 28 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

吉井大貴、猪股裕紀 洋、胆道閉鎖症とアラジール症候群の免疫染色像の違いから見る細胆管増生のメカニズムについて、第 42 回日本胆道閉鎖症研究会、2015 年 11 月 7 日、東京大学

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

猪股 裕紀洋 (INOMATA YUKIHIRO)  
熊本大学・生命科学研究部・教授  
研究者番号：50193628

##### (2)研究分担者

須田 博子 (SUDA HIROKO)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：40632659

横内 裕二 (YOKOUCHI YUJI)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60252227

坂本靖介 (SAKAMOTO SEISUKE)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医  
師  
研究者番号：00378689

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
吉井 大貴 (YOSHII DAIKI)  
熊本大学・医学部附属病院・大学院生  
研究者番号：なし