

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08987

研究課題名(和文)胆道閉鎖症の肝外胆管における異常免疫とその増強因子の解析

研究課題名(英文)Analyses of immune abnormality at the extrahepatic bile ducts of biliary atresia patients

研究代表者

東 真弓(Higashi, Mayumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10380453

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、肝外胆管、胆嚢における免疫学的反応を明確にすることおよびこれらの研究のための有用な材料としての、胆道閉鎖症由来の肝外胆管、胆嚢上皮細胞の安定細胞株の樹立を行うことを目的とした。手術時の切除標本を用いた解析において、肝外胆管におけるIL13および炎症細胞の集積の関連性を確認しており、また、肝外胆管、胆嚢における線維化に関わる因子であるperiostinの発現、分布の解析を行い、IL13がperiostinの発現を増強しており、胆道閉鎖症における組織線維化に関与していることを確認した。また、手術時に得られた胆嚢、胆管上皮細胞の安定した培養法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症の原因ははまだ判明しておらず、肝硬変の進行を阻止する治療法なども確立されていない。本研究では、胆道閉鎖症の病勢の進行、線維化等に関わる免疫学的な因子の解析を行い、病態の解明、肝硬変進行に対する治療を探索するうえで、IL13 - periostin が手がかりとなり得ると考えられる。また、in vitro解析のため、手術時検体からの胆管細胞の安定した培養法を確立しており、これらの因子の胆管上皮への影響を解析するうえで有用である。

研究成果の概要(英文):The aims of this study were to analyze the abnormal immune reaction at the extrahepatic bile ducts of biliary atresia (BA) patients, and also establishing the stable cell culture methods of bile duct epitheliums from BA patients for the analyses.

We performed the histological analyses of surgically resected tissues from BA patients. We found that the locations of CD45+ inflammatory cells and IL13 are related, and also periostin, a protein produced from fibroblast, is also abundant around the damaged bile ducts. The cultured fibroblasts from the portal area of liver produced periostin by IL13 stimulation. This indicated that IL13 is related to the inflammation and fibrogenesis at the extrahepatic bile ducts of BA patients.

We also established the stable culture methods of cholangiocytes from the gall bladders or hepatic portal area of BA patients. The cells were immortalized by inducing SV40T and hTERT genes, and cultured in our original conditioned medium in 2D or 3D culture methods.

研究分野：小児 胆道閉鎖症

キーワード：胆道閉鎖症 免疫反応 IL13

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は、胆道系組織の形成後に肝外胆管の炎症性変性による閉塞から胆汁うっ滞性肝障害をきたすと考えられているが、その原因は現在でも解明されていない。周産期のウイルス感染、自己免疫等が原因となるという考え方が主流であるが、長年の研究にも関わらず原因は明確にされておらず、従来と異なったアプローチが必要と考えられる。

胆道閉鎖症研究においては、肝生検組織の解析が良く行われているが、我々は胆道閉鎖症臨床検体の残存肝外胆管、胆嚢上皮に着目した免疫学的所見の解析を行っている。この結果、胆道閉鎖症の残存胆嚢上皮において、IL13 の免疫染色にて局所的な陽性所見を認めており、この部位は胆嚢上皮細胞の増殖部位と一致する。IL13 は好酸球、肥満細胞、IL33 等と共に、消化管のアレルギー、自己免疫に関与することが知られている。IL33 の胆嚢上皮の増殖への関与や、胆道閉鎖症の胆道上皮における増加は報告されている(Li J. J ClinInvest.2014)。また、ヒト胆道閉鎖症の肝生検検体において肥満細胞の数は重症度と相関しており、同様に、好酸球の増加が確認される。未熟な出生直後の胆管上皮におけるこれらの免疫反応が上皮細胞増生、脱落、線維化を引き起こす可能性が考えられる。

また、胆道閉鎖症における IL33、IL13 の亢進はロタウイルスによる胆道閉鎖症モデルにおいて腺構造増生に関与することが報告されている。我々は、胆道閉鎖症の胆嚢上皮には幽門腺化生として病理診断されている腺構造が胆道拡張症や他の疾患と比較して遥かに高い頻度で認められることを確認している。これは慢性炎症によるものと考えられているが、構造上は腸粘膜、気道粘膜におけるアレルギーや自己免疫反応による粘液腺構造の増加にも類似している。これらの腺構造の部位は IL13 が陽性であり、異常免疫による分泌細胞の増殖の結果である可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、胆道閉鎖症において肝外胆管における異常免疫反応(アレルギー、自己免疫)の所見を明らかにするとともに、これらの免疫反応を増強させる可能性のある内分泌的因子の作用を解析することで、根治術後の自己肝における病態進行の抑制につながる機序を解明する。また、同時に、これらの研究を継続的に進めるためのツールとして胆道閉鎖症の残存肝外胆管の上皮細胞の安定株の樹立をおこなう。

胆道閉鎖症の臨床検体の解析にて、肝外胆管、胆嚢における免疫学的反応を明確にすること、胆道上皮障害をきたす異常免疫を増強させる内分泌的因子の同定、作用の解明を目的とし、これらの研究のための有用な材料としての胆道閉鎖症由来の肝外胆管、胆嚢上皮細胞の安定細胞株の樹立を行う。

3. 研究の方法

1) ヒト胆道閉鎖症検体の胆道系の組織学的解析：当研究室における過去の胆道閉鎖症手術検体から、研究における解析の同意を得ており、胆道系の評価が可能なものを選択し、免疫染色等による組織学的解析を行う。胆道閉鎖症における各因子の局在の比較を行い、関連性を統計学的に有意性の解析を行う。

2) ヒト胆道閉鎖症の肝外胆管上皮の培養、安定株樹立：手術検体の研究への使用に関してはあらかじめ同意を得る。手術時に切除された肝外胆管、胆嚢より上皮細胞を採取し、専用培地にて初代培養を行う。細胞が安定したところで、不死化遺伝子の導入を行う。培養細胞の胆管上皮マーカーを用いた免疫染色にて、確認を行う。

4. 研究成果

1) 臨床検体の組織学的解析では、IL13 は炎症細胞マーカーCD45 陽性の細胞浸潤部に相関して染色され、Periostin は α -SMA 陽性の活動性線維化部位に一致して染色性が認められた。また、IL13 は胆管上皮にも染色され、IL13 陽性症例は陰性症例と比較して胆管の個数が多く、特に小胆管が有意に認められた。IL13 で刺激した肝門部組織由来線維芽細胞の periostin mRNA の発現は IL13 の濃度依存的に亢進が認められ、蛋白のレベルでの上昇も認められた。臨床像との比較では、IL13+ および periostin+ 症例群は術前 D-bil 値が低く、術後の減黄日数も有意に低かった。しかし、periostin+ 群は明らかな有意差はなかったものの自己肝生存率が低い傾向にあった。

以上から、IL13 は小胆管の増生に関与し、下流の Periostin を介して活動性の炎症性線維化を誘導することが示唆された。これらの陽性群では術後早期の減黄を示すものの、長期的には Periostin 陽性群の自己肝生存率は低い傾向にあった。これより、IL13、Periostin は手術時点のみでなく、術後の胆管周囲の炎症性線維化の病勢を反映し、バイオマーカー、治療ターゲットとして有用である可能性があると考えられた。

これらの内容は論文発表されている(DOI 10.1007/s00383-022-05238-4)。

2) 胆道閉鎖症患者から得られた細胞は独自の組成の培地で安定した培養が得られ、不死化遺伝子 SV40T、hTERT を導入し、継続した培養が可能であった。これらの細胞は、CK19 および Sox9 陽性が確認された。また、2 つの異なる 3D 培養法を行い、いずれも導管様の構造の構築および Rhodamine の取り込み、管内への排泄が認められ、機能的にも胆管様の現象が認められた。

これらの内容は論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Uemura Mami, Higashi Mayumi, Pattarapanawan Montri, Takami Shohei, Ichikawa Naoki, Higashiyama Hiroki, Furukawa Taizo, Fujishiro Jun, Fukumura Yuki, Yao Takashi, Tajiri Tatsuro, Kanai-Azuma Masami, Kanai Yoshiakira	4. 巻 13
2. 論文標題 Gallbladder wall abnormality in biliary atresia of mouse Sox17+/? neonates and human infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 042119 ~ 042119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.042119	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 Tando So, Sakai Kohei, Takayama Shohei, Fukunaga Kenji, Higashi Mayumi, Fumino Shigehisa, Aoi Shigeyoshi, Furukawa Taizo, Tajiri Tatsuro, Ogi Hiroshi, Itoh Kyoko	4. 巻 55
2. 論文標題 Maldevelopment of intrapulmonary bronchial cartilage in congenital diaphragmatic hernia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Pulmonology	6. 最初と最後の頁 1771 ~ 1780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppul.24799	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 Tanaka Tomoko, Togashi Yuichi, Takeuchi Yuki, Higashi Mayumi, Fumino Shigehisa, Tajiri Tatsuro	4. 巻 37
2. 論文標題 Immunohistochemical staining of phosphorylated-ERK in post-chemotherapeutic samples is a potential predictor of the prognosis of neuroblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 287 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-020-04806-w	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 瀧本 篤朗, 井口 雅史, 坂井 宏平, 東 真弓, 文野 誠久, 青井 重善, 古川 泰三, 田尻 達郎	4. 巻 56
2. 論文標題 臍動脈索からの炎症波及が疑われた二次性虫垂炎の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 210 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.56.2_210	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 Tanaka Tomoko, Amano Hizuru, Tanaka Yujiro, Takahashi Yoshiyuki, Tajiri Tatsuro, Tainaka Takahisa, Shirota Chiyo, Sumida Wataru, Yokota Kazuki, Makita Satoshi, Tani Yukiko, Hinoki Akinari, Uchida Hiroo	4. 巻 20
2. 論文標題 Safe diagnostic management of malignant mediastinal tumors in the presence of respiratory distress: a 10-year experience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pediatrics	6. 最初と最後の頁 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-020-02183-w	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 三村 和哉、青井 重善、竹内 雄毅、坂井 宏平、東 真弓、文野 誠久、古川 泰三、田尻 達郎	4. 巻 56
2. 論文標題 診断に苦慮した腸間膜内ヘルニアの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 1088 ~ 1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.56.7_1088	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 鈴木 健斗、文野 誠久、古川 泰三、竹内 雄毅、竹本 正和、坂井 宏平、東 真弓、青井 重善、田尻 達郎	4. 巻 56
2. 論文標題 Tension gastrothoraxをきたした遅発性横隔膜ヘルニア3例の検討	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 1123 ~ 1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.56.7_1123	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 仙石由貴, 東 真弓, 永藪和也, 古川泰三, 高山勝平, 金 聖和, 文野誠久, 青井重善, 田尻達郎
2. 発表標題 胆道閉鎖症におけるIL-13およびPeriostinの肝門部線維化への関与.
3. 学会等名 第48回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	文野 誠久 (Fumino Shigehisa) (40405254)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究 分担者	田尻 達郎 (Tajiri Tatsuro) (80304806)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究 分担者	青井 重善 (Aoi Shigeyoshi) (90308669)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

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
---------	---------