

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461609

研究課題名(和文)胆道閉鎖症の発症および肝内病変の進行における腸内細菌の役割の検討

研究課題名(英文)The role of intestinal flora in the pathogenesis of biliary atresia

研究代表者

別所 一彦 (Bessho, Kazuhiko)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80423169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症の葛西術時の肝臓では、疾患・正常コントロールと比べ、グラム陰性菌の感染に際し宿主の自然免疫系を活性化する抗菌ペプチド、 $\beta$ -defensinの発現が上昇していることを見いだした。 $\beta$ -defensinの受容体であるTLR4は樹状細胞で発現を認めた。一方で胆道閉鎖症モデルマウスでは、繁殖コロニーを抗生剤のST合剤含有の飼料のもとで飼育すると、新生仔マウスでロタウイルス投与後の肝外胆管の閉塞が抑制されることを見いだした。さらにこの新生児モデルマウスの糞便中の細菌叢を解析したところ、通常の食餌下で作成したモデルマウスと比べ、グラム陰性桿菌の一部が減少していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found that in the liver from infants with biliary atresia, the expression level of  $\beta$ -defensin, an antimicrobial peptide which activates innate immunity against gram-negative bacteria was upregulated compared to livers from diseased and normal controls. The expression level of its receptor, TLR4 was identified on hepatic dendritic cells. In the rotavirus-induced murine model of biliary atresia, when we kept the colony under bactrim diet, the incidence of obstruction of extrahepatic bile duct was reduced significantly after injection of rotavirus, and a part of gram negative bacteria was decreased in the stool of mouse from the bactrim-diet colony.

研究分野：小児肝疾患

キーワード：胆道閉鎖症 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

新生児期に肝外胆管が線維性に閉塞する胆道閉鎖症は、小児肝移植の最多適応疾患である。唯一の治療法は肝門部空腸吻合術（葛西術）であるが、胆汁の再ドレナージ後も肝内病変は進行し、現在その機序は不明で、有効な治療法は無い。これに対し葛西術後に経験的にプロバイオティクスや抗生剤の投与が行われてきたが、これまでその効用・効果は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、胆道閉鎖症において肝外胆管の閉塞・葛西術後の肝内病変の進行を駆動する因子として腸内細菌の役割を明らかにする。そしてその成果に基づき、肝線維化に対して効率的な治療を開発し、肝移植を回避するための内科的治療を導くことを目的とする。

3. 研究の方法

今回の研究は、web上に公開されている胆道閉鎖症の肝門部空腸吻合術時に患者から採取された肝組織の遺伝子発現プロファイルから胆道閉鎖症肝に特異的に発現している遺伝子を同定し、そのシグナル伝達経路の肝臓での制御を同定すること。ロタウイルス感染胆道閉鎖症モデルにおいて抗生剤投与による形質の変化を観察すること、また胆道閉鎖症発症時の腸内細菌叢の特徴を明らかにすることで、胆道閉鎖症の発症および肝内病変の進行に対する腸内細菌叢の役割を明らかにすることを計画した。

4. 研究成果

申請者は患者肝組織を用い、胆汁うっ滞性疾患コントロール・正常コントロールと比べて胆道閉鎖症の葛西術時（診断時）に特異的に発現が制御されている15遺伝子を同定し発表したが、そのうち7遺伝子がNF- $\kappa$ BもしくはRelAによる発現制御を受け得る事が判明した。さらに微生物の粘膜への感染に応答して産生され、TLR-4を介して宿主の自然免疫系を活性化することが知られる抗菌ペプチド、 $\alpha$ -defensinの発現が葛西術時の患者肝組織で上昇し、移植時摘出肝においても発現上昇が持続していることを見いだした。 $\alpha$ -defensinの受容体であるTLR4は樹状細胞で発現を認めた。一方で胆道閉鎖症モデルマウスでは、繁殖コロニーを抗生剤の一種であるST合剤含有の飼料のもとで飼育すると、新生仔マウスでロタウイルス投与後の肝外胆管の炎症とともに閉塞が抑制され、マウスの死亡率が半分に抑制されることを見いだした。さらに Cincinnati Children's Hospital Medical Centerとの共同研究に於いて、ST合剤食餌下で作成した胆道閉鎖症モデルの新生仔マウスの糞便中の細菌叢を16S DNAプローブを用いて網羅的に解析したところ、通常の食餌下で作

成した胆道閉鎖症新生仔マウスと比べて、グラム陰性桿菌の一部が減少していることが明らかとなった。これらのデータは胆道閉鎖症患児およびモデルマウスにおいて腸内細菌が疾患の発症に関与していることを示唆すると考えられた。

一方で胆道閉鎖症発現時の腸内細菌叢を解析するための腸管内容物は十分な症例が集積ず、解析に至らなかった。

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9件)

1. Fukuoka T, Bessho K, Tachibana M, Satomura Y, Konishi A, Yasuda K, Kimura T, Hasegawa Y, Ueno T, Miyoshi Y, and Ozono K. Total Bile Acid Concentration in duodenal fluid Is a Useful Preoperative Screening Marker to Rule Out Biliary Atresia. *Journal Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2018 (in press)
2. Carey AN, Zhang W, Setchell KD, Simmons JE, Shi T, Lages CS, Mullen M, Carroll K, Karns R, Bessho K, Sheridan R, Zhao X, Weber SN, Miethke AG. Hepatic MDR3 expression impacts lipid homeostasis and susceptibility to inflammatory bile duct obstruction in neonates. *Pediatr Res*, 82(1): 122-132, 2017 doi: 10.1038/pr.2017.78
3. Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Nakacho M, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Saheki T, Yorifuji T, Honda A. Circulating tricarboxylic acid cycle metabolite levels in citrin-deficient children with metabolic adaptation, with and without sodium pyruvate treatment. *Mol Genet Metab*, 120: 207-212, 2017 doi: 10.1016/j.ymgme.2016.12.011.
4. Ueno T, Zenitani M, Yamanaka H, Tanaka N, Uehara S, Tazuke Y, Bessho K, Okuyama H. Impact of Donor-Specific Antibodies on Graft Fibrosis After Pediatric Living Donor Liver Transplantation for Biliary Atresia. *Transplant Proc*, 48: 1095-1099, 2016 doi: 10.1016/j.transproceed.2016.02.011.
5. Bessho K. Complications and Quality of Life in Long-Term Survivors of

- Biliary Atresia with Their Native Livers. *J Pediatr*, 167: 1202-1206, 2015 doi: 10.1016/j.jpeds.2015.08.041.
6. Deguchi K, Ueno T, Matsuura R, Yamanaka H, Nara K, Uehara S, Tazuke Y, Bessho K, Okuyama H. Disseminated Metastatic Tissue Calcification After Orthotopic Liver Transplantation: A Case Report. *Transplant Proc*, 48: 251-254, 2016 doi: 10.1016/j.transproceed.2015.12.033.
  7. Squires JE, Shivakumar P, Mourya R, Bessho K, Walters S, Bezerra JA. Natural killer cells promote long-term hepatobiliary inflammation in a low-dose rotavirus model of experimental biliary atresia. *PLoS One*, 10: 1-15, 2015 doi: 10.1371/journal.pone.0127191.
  8. Mourya R, Bessho K, Shivakumar P, Bezerra JA. Reply: To PMID 24493287. *Hepatology*, 61: 732-733, 2015 doi: 10.1002/hep.27231
  9. Bessho K, Mourya R, Shivakumar P, Walters S, Magee JC, Jegga AG, Rao M and Bezerra JA. Gene expression signature for biliary atresia and a role for Interleukin-8 in pathogenesis of experimental disease. *Hepatology*, 60: 211-223, 2014 doi: 10.1002/hep.27045
- [学会発表](計 18 件)
1. Bessho K. The role of immune response and gene variations in the etiology of biliary atresia. The 54 Annual Congress of the Japanese Society of Pediatric Surgery and the 7th International Sendai Symposium on Biliary Atresia(招待講演)(国際学会), 2017年5月11日-13日, Sendai
  2. 福岡智哉, 橘真紀子, 里村宜紀, 安田紀恵, 長谷川泰浩, 別所一彦, 三善陽子, 大園恵一. 胆道閉鎖症の診断における十二指腸液採取と肝胆道シンチグラフィの有用性に対する検討. 第30回近畿小児科学会: 2017年03月12日. 大阪
  3. 別所一彦. 現在の移植医療の問題点. 第9回日本小児栄養消化器肝臓学会卒後教育セミナー(招待講演): 2017年01月14日, 川崎
  4. 別所一彦. 胆道閉鎖症の遺伝的素因について. BA brain storming(招待講演): 2017年01月09日, 東京
  5. 福岡智哉, 橘真紀子, 里村宜紀, 小西暁子, 安田紀恵, 木村武司, 倉川佳世, 長谷川泰浩, 別所一彦, 三善陽子, 大園恵一. 胆道閉鎖症の診断における十二指腸液採取と肝胆道シンチグラフィの有用性に対する検討. 第43回日本小児栄養消化器肝臓学会: 2016年09月16日~2016年09月18日, つくば
  6. 里村宜紀, 小西暁子, 安田紀恵, 長谷川泰浩, 別所一彦, 三善陽子, 大園恵一. 肝組織像からPFIC3が疑われ、遺伝子検査にて診断確定した2歳男児の1例. 第33回日本小児肝臓研究会: 2016年07月02日, 岐阜
  7. Bessho K, Hasegawa Y, Fukuda H, Hagiwara K, Ueno T, Miyoshi Y, Kondou H, Mushiake S, Okuyama H, Ozono K. Dissociation Between Clinical Evaluation and PELD Score in The Setting of Pediatric Living-Related Liver Transplantation in JAPAN: A 18 Year Single Center Experience. The International Liver Congress 2016(国際学会): 2016年04月16日, Barcelona, Spain
  8. 上野豪久, 田中夏美, 銭谷昌弘, 山中宏晃, 高間勇一, 田附裕子, 別所一彦, 奥山宏臣. 生体肝移植・これからの課題 肝移植後のグラフト線維化と小児生体肝移植後抗ドナー抗体の影響 胆道閉鎖症に対する生体肝移植後の検討. 第116回日本外科学会定期学術集会: 2016年04月14日~2016年04月16日, 大阪
  9. 別所一彦. 大阪大学医学部附属病院における小児肝移植適応決定のプロセス. 第3回小児がん拠点病院放射線技師研修会(招待講演), 2016年02月27日, 大阪
  10. Bessho K. Phenotyping of patients with biliary atresia towards personalized therapy. The second joint meeting of Japan-Taiwan-Korean Pediatric Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (招待講演)(国際学会), 2015年11月28日~2015年11月28日, 東京
  11. 長谷川泰浩, 近藤宏樹, 別所一彦, 川井正信, 安田紀恵, 上野豪久, 里村宜紀, 小西暁子, 木村武司, 倉川佳世, 三善陽子, 道上敏美, 大園恵一. 胆道閉鎖症患

- 者の肝臓では胆汁酸合成律速酵素 CYP7A1の抑制機構の破綻が起きている。第42回日本小児栄養消化器肝臓学会。2015年10月16日～2015年10月18日，広島
12. 別所一彦. 胆道閉鎖症の動物モデル &#8211;その有用性と限界点-. 第42回日本小児栄養消化器肝臓学会(招待講演).2015年10月16日～2015年10月18日，広島
13. 別所一彦. Gene Expression Signature for Biliary Atresia and a Role for IL-8 in the Pathogenesis of Experimental Disease. 第32回小児肝臓研究会(招待講演) 2015年07月25日～2015年07月26日，鳥取
14. 長谷川泰浩, 近藤宏樹, 別所一彦, 川井正信, 安田紀恵, 上野豪久, 里村宜紀, 小西暁子, 木村武司, 倉川佳世, 三善陽子, 道上敏美, 大園恵一. 胆道閉鎖症患者の肝臓では胆汁酸合成律速酵素 CYP7A1の抑制機構の破綻が起きている。第32回日本小児肝臓研究会, 2015年07月25日～2015年07月26日，鳥取
15. Zenitani S, Bessho K, Kondou H, Hasegawa Y, Yasuda K, Konishi A, Satomura Y, Miyoshi Y, Ueno T, Ozono K. A case of chronic rejection after liver transplantation for acute liver failure. 11th Asian Society for Pediatric Research(国際学会), 2015年04月15日～2015年04月18日，大阪
16. Hasegawa Y, Kondou H, Bessho K, Kawai M, Nakao K, Ueno T, Satomura Y, Konishi A, Kimura T, Ikeda K, Tachibana M, Miyoshi Y, Michigami T, Ozono K. Dysregulation of Cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) is involved in the abnormal bile acid synthesis in livers from biliary atresia (BA) children. The Liver Meeting 2014, 2014年11月10日, Boston (USA)
17. Bessho K, Mourya R, Shivakumar P, Walters S, Magee JC, Jegga AG, Rao M and Bezerra JA. Gene Expression Signature for Biliary Atresia and a Role for IL-8 in the Pathogenesis of Experimental Disease. BARD-Berlin 2014年10月16日, Berlin (Germany)
18. Bessho K. Introduction, Recent progresss in biliary atresia in the world.2014 PAS/ASPR Joint Meeting, 2014年05月04日, Vancouver
- (Canada)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：
- 〔その他〕  
ホームページ等
- 6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
別所 一彦 (BESSHO, Kazuhiko)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80423169
- (2)研究分担者  
近藤 宏樹 (KONDOU Hiroki)  
大阪大学・医学系研究科・招へい教員  
研究者番号：10373515
- (3)連携研究者  
( )  
研究者番号：
- (4)研究協力者  
( )