

令和元年6月12日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11349

研究課題名(和文)胆道閉鎖症の細胆管化生とSOX9の研究から展開される肝疾患治療のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for novel approaches to liver diseases, derived from studies on ductular reaction and SOX9 in biliary atresia

研究代表者

猪股 裕紀洋 (Inomata, Yukihiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50193628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胆管反応(DR)は、肝再生や肝線維化の進行に関わる重要な現象であるが、そのメカニズムは明らかではない。これまでの我々の研究により、SOX9が重要な因子であると考えて、SOX9ノックアウト(KO)マウスを用いた肝障害実験や、ヒトやマウス肝臓の免疫組織化学染色を行いDRとSOX9との関係性について調べた。マウス実験では、SOX9をKOすると特に胆汁うっ滞性肝障害でDRの進展が抑制され、線維化の進展も抑制された。DRを伴う様々なヒト障害肝の中でも、原発性胆汁性胆管炎ではSOX9発現の局在が他と異なっていた。SOX9の核移行メカニズムが障害された結果、病態の違いとして現れている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、SOX9が、マウスでみられるDRの進展だけでなく、それに付随して見られる肝線維化の進展にも重要である可能性があることが分かった。これは、細胆管反応を伴う様々な慢性肝疾患において、病態の進行を抑制する目的として、SOX9をターゲットとした治療の足がかりとなる結果と考える。また、未だ病因が不明な肝疾患が多い中、SOX9の局在が特徴的な肝疾患では、SOX9発現のさらなる解析によって、病因の特定につながる可能性もあると考える。

研究成果の概要(英文)：Ductular reaction (DR) has been thought that it has crucial roles in liver regeneration and the etiology of liver fibrosis, however, the exact mechanism of DR is still unknown. We hypothesized on the basis of our previous studies that SOX9 may be an important factor in the development of DR. Then, we analyzed the association between DR and SOX9 by experimental liver injury using SOX9 knockout mice and immunohistological staining using human and mouse liver specimens. In mouse experiments, we found that the development of DR was more inhibited especially in cholestatic injury of SOX9 KO mouse than the wild type mouse, and the development of fibrosis was also inhibited. In human specimens with DR, SOX9 localization of liver specimens with primary biliary cholangitis was different from liver specimens with other liver diseases. Some kind of mechanisms of injured nuclear localization of SOX9 might result in the difference of pathological conditions between liver diseases.

研究分野：小児外科学

キーワード：SOX9 細胆管反応 胆道閉鎖症 慢性肝疾患 TROP2 胆汁うっ滞 葛西手術

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、肝細胞の自己複製能力によりホメオスタシスを維持しているが、慢性肝疾患や劇症肝炎などの肝障害により肝細胞の自己複製能力が障害を受けると、胆管表現型を持つ細胞の異常な増殖がみられる。この現象は、細胆管反応(ductular reaction、以下 DR)と呼ばれ、1957年に Popper らに提唱されている。DR は、肝修復が目的であるとする報告がある一方で、肝線維化の成因とも言われており、肝臓の病態に関わる重要な現象の一つである。しかしながら、DR のメカニズムはよく分かっておらず、また DR を構成する細胞の由来は、いまだ議論が分かれている。DR の由来やそのメカニズムについて理解を深めることは、肝疾患を治療していく上で重要である。

SOX9 遺伝子は、ヒトハプロ不全疾患であるカンボメリック症候群(OMIM#114290)の原因遺伝子として同定された。肝臓においては、胎生期に最も早く発現する胆管マーカーの一つで、かつ、胆管の成熟を調節する因子である。近年、SOX9 陽性肝前駆細胞領域より肝細胞の持続的な供給が行われていると報告された(1)。それゆえ、SOX9 は胆管発生や肝再生において重要な機能を有していると考えられる。

胆道閉鎖症(biliary atresia、以下 BA)は、未だ原因不明の乳児期の胆汁うっ滞性肝疾患で、出生後早期に葛西手術(肝門部空腸吻合術)が行われなければ、1歳未満で死に至る重篤な疾患である。また、葛西手術により良好な減黄が得られなければ、救命のために肝移植術が必要となる。申請者は、BA の病態と SOX9 遺伝子との関係を調べる研究(2)において、胆管マーカーであるはずの SOX9 が肝細胞に異所性に発現している所見を確認した。その発現は門脈域周囲(増生細胆管周囲)に多く見られたため、BA における SOX9 の異所性発現と DR との関連について更なる検討を行った所、SOX9 陽性肝細胞(SOX9+/HepPar1+)が DR を仲介していることが示唆され、DR には肝細胞由来の細胞が寄与していると考えられたが、SOX9 陽性肝細胞はどのような特徴を持つ細胞なのか、現時点ではまだ明らかではない。近年、3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrochollidine (DDC)によるマウス肝障害モデルにおいて、肝前駆細胞と考えられているオーバル細胞が誘導されることが分かった。さらに、今までは、オーバル細胞と胆管細胞との区別化がマーカーでは困難とされてきたが、オーバル細胞のみを発現する TROP2 というマーカーが存在することが報告された(3)。過去の *in vivo* の報告より、SOX9 陽性肝細胞は肝前駆細胞である可能性が高いことから、この TROP2 という肝前駆細胞マーカーを用いて、SOX9 陽性肝細胞の特徴について解析できる可能性が考えられた。

以上より、DR のメカニズムに SOX9 が強く関わっている可能性があり、それを追究することが、ヒト肝疾患の病態の解明や新規治療開発につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

SOX9 は DR に寄与している重要因子と考えた。DR における SOX9 の重要性を明らかにするために、SOX9 コンディショナルノックアウト(CKO)マウスを用いた肝障害実験を行い、SOX9 の発現が、BA の様な障害肝の修復や胆汁うっ滞の改善に有利に働くのか否かを調べることを目的とした。また、BA に限らず DR を起こしうる肝疾患やその病態に対象を拡大し、SOX9 陽性肝細胞の存在意義について調べることを目的とした。その中で SOX9 陽性肝細胞の新規パイオマーカーとなりうる TROP2 について解析し、SOX9 陽性肝細胞と TROP2 細胞の異同を確認することにより、DR における肝前駆細胞群の寄与を明らかにすることを目的とした。以上により、SOX9 や TROP2 の修飾による治療応用を模索するための基盤となることを最終目標としている。

## 3. 研究の方法

DR と SOX9 との関係性、そして DR に SOX9 陽性肝細胞と TROP2 陽性細胞がどのように寄与しているのかを調べるために、本研究計画では以下の研究を行った。

(1)DR における Sox9 の役割を、Sox9 CKO 肝障害モデルを用いて明らかにする。

Alb-cre ドライバーマウスと SOX9-floxed マウスを交配させて、Alb-cre+/-; Sox9-floxed+/-マウス(SOX9CKO マウス)を作製した。マウスに肝障害を加えて、血液生化学的解析、免疫組織学的解析や遺伝学的解析を行った。

(2)ヒト肝臓における DR と SOX9 異所性発現との関連を調べるために、免疫組織化学解析を行った。また、TROP2 発現についても解析した。

(3)SOX9 の異所性発現と肝疾患の病態や長期成績との関連について統計学的検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス肝障害モデルを用いた DR と SOX9 との関連

障害肝でみられる DR に SOX9 がどのように関連しているかを明らかにするために、野生型マウス (C57BL/6J マウス) と SOX9CKO マウスとに、四塩化炭素 (CCL4) の腹腔内投与、DDC の経口摂取、総胆管結紮による肝障害を加えて、比較解析を行った。CCL4 による肝障害では、SOX9CKO マウスにおいて投与 10 週目の血清 ALT 値の有意な増悪を認めた。しかしながら、リアルタイム PCR による遺伝学的解析では、CK19 やオステオポンチン (OPN) の発現量に差は認められなかった。DDC による肝障害では、この 2 群の血清総ビリルビン値や ALT 値に有意な差は認められなかった。一方、総胆管結紮による肝障害では、SOX9CKO マウスにおいて総ビリルビン値の有意な低下を認めた。また、リアルタイム PCR では、術後 14 日目の SOX9CKO マウスの CK19 と OPN の発現量が野生型マウスに比べて有意に低下していることが分かった。(図 1) また、いずれの肝障害モデルでも、線維化のマーカーである Col1A2 の増加率が、SOX9CKO マウスにおいて低下していることが分かった。胆汁うっ滞性の肝障害では、SOX9 の抑制が DR の進展を抑制し、病態抑制に寄与する可能性が示唆された。

##### (2) 障害肝における SOX9 の発現の違い

ヒトにおいて、DR は、BA だけでなく、原発性硬化性胆管炎 (PSC)、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) や C 型肝硬変 (HCV-LC) でも確認した。いずれも、肝細胞における SOX9 の異所性発現を認めた。局在に注目すると、HCV-LC では SOX9 を肝細胞の核にのみ認めたが、PSC や PBC では核や細胞質にも認めた。特に PBC では細胞質における SOX9 の発現がほとんどであり、SOX9 の核移行が障害されている可能性があり、それが疾患の表現型に違いを与えている可能性が考えられた。(図 2A, B)

一方、マウスでは、胆汁うっ滞性肝障害である総胆管結紮や 0.1%DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrochloridide) 投与では SOX9 の異所性発現を多く認め、肝細胞性障害である四塩化炭素では少ない傾向がみられ、胆汁うっ滞性肝障害では肝細胞由来の DR も寄与している可能性が示唆された。以上より、SOX9 異所性発現の局在や数は障害肝の病態を反映している可能性が示唆された。

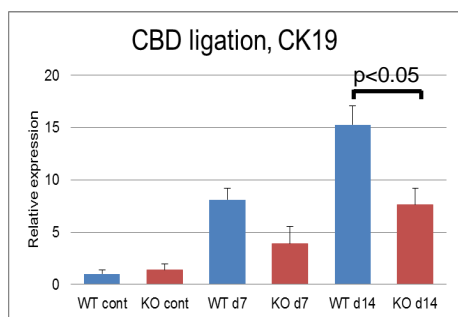
##### (3) 肝臓における TROP2 の発現

マウスにおいて肝前駆細胞と考えられているオーバル細胞と胆管細胞との区別化がマーカーでは困難とされてきたが、オーバル細胞のみに発現する TROP2 というマーカーが存在することが報告された。SOX9 を発現した肝細胞は肝前駆細胞とも言われており、ヒト肝臓において TROP2 の局在を調べることで、DR の由来の解明につながると考えた。TROP2 は、BA の胆管に発現を認めたが、ヒト正常肝臓 (ドナー肝臓) の胆管にも普遍的に発現を認め、肝障害で誘導された細胞 (肝前駆細胞) にだけ発現するマーカーという証拠は得られなかった。

##### (4) SOX9 異所性発現と BA の葛西手術後の予後との関連

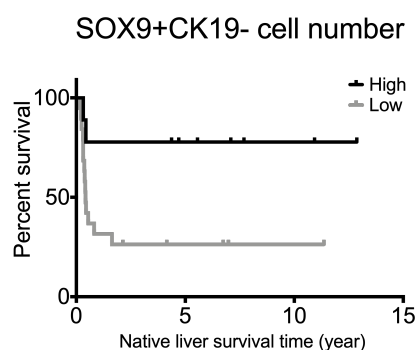
肝前駆細胞は肝再生に寄与することから、SOX9 の異所性発現と BA の葛西手術後の予後との関連について解析するために、葛西手術時の肝組織における SOX9+CK19- (陰性) 細胞数を調べたところ、自己肝生存群において有意に細胞数が多かった (NLS vs non-NLS: 61 vs 43 個/HPF,  $P = 0.01$ )。また、Youden index を用いて ROC 曲線からカットオフ値を算出し、High 群と Low 群の 2 群に分けて生存曲線を作成したところ、High 群が有意に自己肝生存期間が長いことが分かった (Log-rank test:  $P = 0.02$ )。SOX9 異所性発現の程度を葛西手術後の自己肝生存に関する予後予測に用いることができる可能性が示唆された。(図 3)

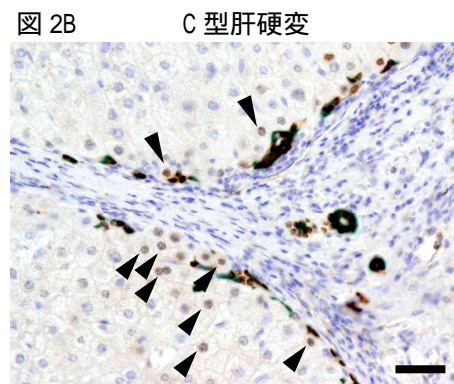
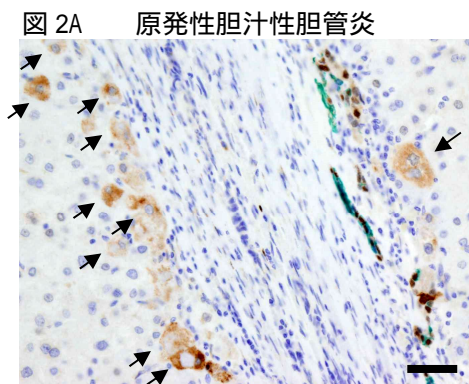
図 1



CBD, common bile duct; WT, wild type; KO, knockout; d, day

図 3





SOX9(茶色)とCK19(緑)の2重免疫染色画像。矢印がSOX9が細胞質で染色されている細胞を、矢頭がSOX9が核で染色されている細胞を示している。スケールバー: 50 $\mu$ m。

#### <引用文献>

1. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine., *Nat Genetics*, 43, 34-41, 2011.
2. Suda H, Yoshii D (5名中2番目), Inomata Y (5名中5番目), et al. New insight into reactive ductular cells of biliary atresia provided by pathological assessment of SOX9., *Pediatric Surgery International*, 30, 481-492, 2014.
3. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver., *Development*, 136, 1951-1960, 2009.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 25 件)

1. Honda Masaki, Sugawara Yasuhiko, Inomata Yukihiro (13名中12番目), et al. Long-term Outcomes of ABO-incompatible Pediatric Living Donor Liver Transplantation, *Transplantation*, 査読あり, 102, 2018, 1702-1709  
DOI: 10.1097/TP.0000000000002197
2. Honda Masaki, Sugawara Yasuhiko, Inomata Yukihiro (15名中15番目), et al. Outcomes of treatment with daclatasvir and asunaprevir for recurrent hepatitis C after liver transplantation, *Hepatology Research*, 査読あり, 47, 2017, 1147-1154.  
DOI: 10.1111/hepr.12853
3. Uto Keiichi, Sakamoto Seisuke, Inomata Yukihiro (13名中12番目), et al. Hydrogen-rich solution attenuates cold ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation. *BMC Gastroenterology*, 査読あり, 19, 2019  
DOI: 10.1186/s12876-019-0939-7
4. 猪股裕紀洋, Organ transplantation for pediatric cancer: discussion towards consensus 小児肝悪性腫瘍に対する肝移植の役割と課題, *日本小児血液・がん学会雑誌*, 査読なし, 54, 2017  
DOI: 10.11412/jspho.54.2195.
5. Yoshii Daiki, Yokouchi Yuji, Suda Hiroko, Inomata Yukihiro, SOX9-positive hepatocytes mediate the progression of ductular reaction in biliary atresia, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 査読あり, 9, 2016, 5077-5086

##### 〔学会発表〕(計 8 件)

1. 吉井大貴, 猪股裕紀洋, 本田正樹, Ki67(MIB-1) index による胆道閉鎖症の葛西手術後の予後予測, 第45回日本胆道閉鎖症研究会, 2018
3. 林田信太郎, 吉井大貴, 猪股裕紀洋, 低出生体重で出生した胆道閉鎖症児に対する治療戦略, 第117回日本外科学会定期学術集会, 2017
2. 吉井大貴, 本田正樹, 猪股裕紀洋, 葛西術後胆道閉鎖症患者の予後および自己肝生存期間についての検討, 第116回日本外科学会定期学術集会, 2016
3. 橋本晋太郎, 吉井大貴, 猪股裕紀洋, 当院における胆道閉鎖症に対する生体肝移植術の成績-移植時年齢の影響について-, 第53回日本小児外科学会学術集会, 2016

##### 〔図書〕(計 2 件)

1. 安藤久寛, 猪股裕紀洋 (ガイドライン統括委員会の7名中2番目), へるす出版, 胆道閉鎖症診療ガイドライン, 2018, 121ページ
1. 猪股裕紀洋, 林田信太郎 (田口智章, 黒田達夫編集). *MEDICAL VIEW*, スタンダード小児が

ん手術, 2017, 313 ページ, 担当: P40-46

〔その他〕

ホームページ: <http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ishoku/research/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 本田正樹

ローマ字氏名: Honda Masaki

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 大学院生命科学研究部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80573609

研究分担者氏名: 吉井大貴

ローマ字氏名: Yoshii Daiki

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 病院

職名: 非常勤診療医師

研究者番号(8桁): 00792582

研究分担者氏名: 磯野香織(2016年度のみ)

ローマ字氏名: Isono Kaori

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 10756258

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 嶋田圭太

ローマ字氏名: Shimata Keita

研究協力者氏名: 門久政司

ローマ字氏名: Kadohisa Masashi