

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791307

研究課題名（和文）胆道閉鎖症における肝胆道組織の初代培養と不死化細胞株の樹立

研究課題名（英文）Establishment of immortalized cells from patients with biliary atresia.

研究代表者

氏名（ローマ字）：齋藤 武（TAKESHI SAITO）

所属機関・部局・職：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：

胆道閉鎖症 (Biliary Atresia; BA) 患児から手術時に採集した肝胆道組織を用い、初代培養を試みた。初代培養細胞にヒトパピローマウイルスの E6・E7 遺伝子を導入し、不死化細胞株を樹立した。細胞株の characterization を行うと、その起源は胆管上皮細胞であった。また病因への自然免疫の関与を検討する目的で、BA の肝組織における Toll-like receptor の発現を解析をした。その発症機転には自然免疫システムの異常が関与する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

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：細胞・組織、核酸、自然免疫、不死化

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の BA の病因研究は、採取検体(主として肝胆道)における遺伝子(ウイルス、炎症性サイトカインや転写因子)発現の多寡をみたり、肝胆道組織に免疫染色を試みたりするものであった。しかしその結果は、多種多様な細胞からなる肝全般の示す事象である。BA の病態の主体は肝内外胆管にあり、それらに限定した検討が理想である。つまり病因解明には、病像の首座である肝胆道組織から、単一クローンからなる胆管上皮細胞群を選別

純化し、その特徴を研究する必要がある。

(2) BA 患児の免疫システムについて獲得免疫の観点から検討した報告はあるが、自然免疫の関与を指摘した報告はほとんどない。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、獲得免疫システム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。Toll-like receptor (TLR) は代表的な自然免疫系に属する receptor であり、リガンドに特異的に結

合することで下流の炎症性サイトカインを活性化し炎症を惹起する。

2. 研究の目的

(1) 手術時に採取した BA 患児の肝胆道組織から初代培養を試み、これを不死化する。樹立された不死化細胞株を用い、細胞株の characterization を行う。

(2) 自然免疫系における代表的 pathogen recognition receptor として TLR が知られる。BA 患児の肝組織を用い TLR の発現を解析し、発症への自然免疫の関与を検証する。

3. 研究の方法

(1) ①BA を含む肝胆道疾患(先天性胆道拡張症、その他)患者の肝組織を手術時に採取、直ちに無血清培地に浸し搬送する。組織を細片化した後トリプシンで処理し一晩低温下に置く。遊離した細胞を feeder layer 上に撒き、初代培養を試みる。feeder layer 法は、シャーレに線維芽細胞(NIH3T3 cell)を 50~60%confluence で敷き詰め、マイトマイシン処理を行なって増殖能を抑制し、その上に細胞を植える方法である。

②立ち上がってきた種々の細胞にアデノウイルスを感染させ、ヒトパピローマウイルス(human papillomavirus: HPV)の E6・E7 遺伝子を導入、細胞の不死化を試みる。

③培養と不死化の効率を最大にする至適諸条件を見つけ出す。

④不死化細胞群から肝の構成細胞をクローニングし、各細胞群の characterization を行う。細胞形態・微細構造を顕微鏡下に観察する。また、特異抗体を用いた免疫組織染色を行って、細胞の種類や起源を同定する。用いる特異抗体は、肝細胞にはアルブミン・サイトケラチン 8、胆管上皮細胞にはサイトケラチン 7・19・ γ -glutamyltransferase、樹状細胞には BDCA-1 である。

(2) BA を含む肝胆道疾患患者の肝組織から RNA を抽出し cDNA を作成後、real time PCR を行って TLR の messenger RNA (mRNA) の発現量を調べた。対象は、当科で手術を施行し肝組織を採取した症例で、BA19 例・先天性胆道拡張症(congenital dilatation of the bile duct: CBD)21 例・その他 9 例であった。各々の年齢は BA24 日~3 歳 9 カ月(中央値 83 日)、

CBD69 日~13 歳 7 カ月(同 3 歳 6 カ月)、その他 57 日~10 歳 4 カ月(同 1 歳 6 カ月)。BA の 6 例ではその後肝移植が施行された。また BA 群では、初回手術時に検体を採取した early 群と、再手術時などに検体を採取した late 群に分類した。検討する TLR は、エンドソーム内に存在する TLR3, 7, 8、細胞膜上に存在する TLR2, 4 である。検討項目は、疾患ごとの発現量の相違、BA 検体における採取時期による発現量の相違、BA 群における経過良好群(non LT 群)と肝移植群(LT 群)との発現量の相違である。

4. 研究成果

(1) ①胆道閉鎖症(BA)5 例、先天性胆道拡張症 7 例の肝胆道組織を用い、初代培養を試みた。feeder layer 上に破碎した組織片を撒くと、implant 後 5 日で上皮細胞様の組織が立ち上がった。その培養効率は培養液の種類により異なり、培養 4 日目まで keratinocyte growth medium、以後 Dalbecco's medium に変更すると良好であった。FCS 濃度は 5%とし、継代は培養 7 日に 1 回のみ可能であった。

②初代培養開始後 3 日目の medium 交換時からアデノウイルスを用いて HPV E6・E7 遺伝子を導入し不死化を試みたところ、3 種類の不死化細胞株が樹立された。

③3 種類の樹立された培養株は、いずれも senescence が延長し 150 population doublings (PDLs)に達した。また telomerase 活性が上昇し、無血清培地に対する抵抗性が獲得されており、不死化が確認された。

④3 種類の不死化培養株のうち一つは、光学・電子顕微鏡所見上 上皮細胞用外観と細胞構造を有しており、cytokeratin (CK)-7 と 19 による免疫組織化学染色で陽性であった。また Matrigel assay を行うと、培養開始 5 日頃より管腔構造を呈した。肝細胞に特異的なアルブミンの発現は認められなかったが、 γ -glutamyltransferase の発現が確認され、不死化細胞の一つが胆管上皮細胞である可能性が強く示唆された。

⑤3 種類の不死化細胞株を各々 severe combined immunodeficiency (SCID) マウスに接種したが腫瘍形成は認められず、腫瘍原性は否定された。

(2) 肝組織における TLR 発現量

①疾患ごとの発現量の比較 TLR2, 3, 4, 7 では、BA 群、CBD 群、その他の 3 群間で有意

差を認めなかった。TLR8 は BA 群で発現が高く、3 群間、および BA と CBD、BA と control 群との 2 群間で各々有意差を認めた。TLR8 の ligand は一本鎖 RNA とされており、これが何らかの形で BA の病態形成に関わっている可能性が示唆された。

②採取時期による TLR 発現量の相違 early 群では late 群に比し TLR2、TLR8 が有意に高発現であり、さらに TLR3 で発現が高い傾向がみられた。early 群は初回手術時に採取した肝組織であり、その TLR の高発現は病態形成時期における異常な自然免疫応答と、TLR をコンポーネントとする特定のサイトカインカスケードの活性化を示唆している可能性がある。

③初回手術時の TLR 発現量と予後 LT 群では初回手術時、non LT 群に比し、TLR3 と 7 が有意に高発現であった。移植に至る症例では、初回手術時すでに特定のサイトカインが過剰に活性化され、target である肝内外胆管が荒廃している可能性が示唆された。

④以上より、BA の発症と病態の進展に、TLR を含む自然免疫の異常反応が関与している可能性がある。

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 6 件)

1. Saito T, Mizuta K, Hishikawa S, Kawano Y, Sanada Y, Fujiwara T, Yasuda Y, Sugimoto K, Sakamoto K, Kawarasaki H. (2009) Lymphocytotoxic crossmatch in pediatric living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 13, 194-199. 査読有
2. Terui K, Yoshida H, Kouchi K, Hishiki T, Saito T, Mitsunaga T, Takenouchi A, Tsuyuguchi T, Yamaguchi T, Ohnuma N. (2008) Endoscopic sphincterotomy is a useful preoperative management for refractory pancreatitis associated with pancreaticobiliary maljunction. *J Pediatr Surg.* 43, 495-9. 査読有
3. 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 佐藤嘉治, 中田光政, 小松秀吾, 八幡江里子, 大野幸恵, 梁川範幸, 佐藤広崇, 吉田英生 (2008) 先天性胆道拡張症に対する 3

次元構築画像と仮想化内視鏡の有用性について. 胆と膵 29, 895-902. 査読有

4. 齋藤 武, 幡野雅彦, 菱木知郎, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 松浦 玄, 小松秀吾, 八幡江里子, 吉田英生 (2008) 胆道閉鎖症の発生と自然免疫. *小児外科* 40, 45-49. 査読有
5. 東本恭幸, 齋藤 武, 金田英秀, 古屋武史, 佐藤かおり, 岩井 潤, 星野 直 (2008) EBM に基づいた胆管炎の抗菌薬治療. *小児外科* 40, 93-101. 査読有
6. Saito T, Mizuta K, Hishikawa S, Kawano Y, Sanada Y, Fujiwara T, Yasuda Y, Sugimoto K, Sakamoto K, Kawarasaki H. (2007) Growth curves of pediatric patients with biliary atresia following living donor liver transplantation: factors that influence post-transplantation growth. *Pediatr Transplant.* 11, 764-70. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 佐藤嘉治, 中田光政, 小松秀吾, 八幡江里子, 大野幸恵, 吉田英生 (2008) BA 発症への自然免疫関与の可能性. 第 35 回日本胆道閉鎖症研究会 2008/12/6 東京
2. 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 松浦 玄, 小松秀吾, 八幡江里子, 吉田英生 (2008) 胆道閉鎖症術後フォローにおける multi detector-row CT (MDCT) の有用性. 第 45 回日本小児外科学会総会. 2008/5/28 筑波
3. 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 光永哲也, 中田光政, 松浦 玄, 吉田英生 (2007) 胆道閉鎖症肝組織における Toll-like Receptor の発現解析. 第 23 回日本小児外科学会秋季シンポジウム. 2007/11/10 宇都宮
4. 齋藤 武, 吉田英生, 菱木知郎, 照井慶太, 光永哲也, 武之内史子, 大沼直躬 (2007) 胆道閉鎖症肝組織における Toll-like Receptor の発現解析. 第 44 回日本小児外科学会総会. 2007/6/2 東京

○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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし