

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18059

研究課題名(和文)肝疾患に対する新規治療開発のための肝臓におけるSOX9の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of SOX9 function in a liver for the development of novel therapies for liver diseases

研究代表者

吉井 大貴(Yoshii, Daiki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・学術研究員

研究者番号：00792582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、胆道閉鎖症をはじめとした慢性肝疾患にみられる細胆管反応(ductular reaction, DR)のメカニズムの解明により、肝疾患に対する新たな治療戦略の基盤構築を目的としている。

DRのメカニズムを解明するにあたり、胆管の発生や形態形成におけるSOX9の機能的役割について解析を行った。胎生期中は、Sox9コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの胆管の形態形成に大きな変化は見いだせなかった。一方、Sox9cKO成体マウスでは、門脈領域に明らかな胆管表現型の違いが認められた。次に、胆管の形態形成の評価のために、肝臓の透明化を行い胆管の可視化を行い成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までの我々の研究成果により、SOX9が肝傷害時のDRの進展に寄与している可能性が明らかとなってきた。本研究ではさらに、今まで報告されてきた研究では重要視されていない、胆管発生や形態形成にも関与している可能性があることが分かった。これは、胆管発生のメカニズムを考える上で新たな知見となる重要な結果である。また、胆管の形態形成を視覚化する新たな方法が確立できた。DRの進展メカニズムを考える上で胆管発生のメカニズムは知っておくべきことであり、これらの結果は、DRを伴う慢性肝疾患において、病態の進行を抑制するため、SOX9やその上流シグナル経路をターゲットとした治療の基盤となる結果である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of ductular reaction (DR) seen in chronic liver diseases, such as biliary atresia, and to build the basis of a new therapeutic strategy for liver diseases.

In order to elucidate the mechanism of DR, we have analyzed the functional role of SOX9 in the development and morphogenesis of the bile duct. During the embryonic period, no significant changes were found in the development of the bile duct between in the Sox9 conditional knockout (cKO) mice and control mice. The low efficiency of Cre, a DNA recombinase, in the Cre driver mice was suggested to affect the result during the embryonic period. On the other hand, a clear difference in the bile duct morphogenesis was observed between in the adult Sox9 cKO mice and control mice. Next, in order to evaluate the morphogenesis of the bile duct, the whole liver tissue-clearing was performed, and the bile duct was visualized successfully.

研究分野：肝臓

キーワード：SOX9 細胆管反応 肝傷害 胆管発生 Sox9ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症を始めとした胆汁うっ滞性肝疾患は、将来的に不可逆的な肝硬変に進展することも多く、救命のためには肝移植を余儀なくされることがある疾患群である。それら肝疾患の特徴的な肝病理組織所見として細胆管反応(ductular reaction, DR)が挙げられる。DRでは、炎症細胞浸潤などを伴い胆管表現型を持つ細胞の異常な増殖がみられるが、肝疾患の病態進行や線維化の進行に関わっているとされる。しかしながら、そのDRのメカニズムの解明は、いまだ十分には行われていない。

今までの我々の研究によりDRの進展にSOX9が関与していることが分かってきた。そのSOX9は、胆管の発生において胎生期の胆管の成熟化という機能を有していることが報告されているが、最終的な胆管の形態形成においては重要視されていなかった。

そこで、DRのメカニズムを探るにあたり、肝障害時のSOX9の上流シグナル経路の解析やSOX9コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを用いての胆管発生におけるSOX9の意義について解析することにした。

2. 研究の目的

本課題では、DRのメカニズムを解明することで、肝疾患に対する新たな治療戦略の構築へとつなげることを目的としている。DRのメカニズムを解明するにあたり、SOX9およびその上流シグナル経路をターゲットとして、マウスを用いた解析を行った。

3. 研究の方法

【使用したマウスライン】

- ・ Sox9-floxed : Sox9 遺伝子が loxP 配列で挟まれたマウス
- ・ Alb(アルブミン)-Cre : 胎生期においては Alb が発現した細胞(肝芽細胞)において Cre(DNA 組み換え酵素)が活性化されるマウス

両マウスラインを交配させ、Alb-cre^{+/+};Sox9-floxed^{+/+}【SOX9 コンディショナルノックアウト(cKO)】マウスを作製した。胆管細胞を供給する肝芽細胞は Alb を発現しているので、肝臓特異的に SOX9 を KO できる。

SOX9の上流のシグナル経路(Notch signaling, TGF- signalingなど)は、いずれも胆管発生に重要なシグナル経路である。肝傷害でみられるDRが進展する過程で、SOX9の上流シグナル経路の推移を遺伝子学的に解析した。胆汁うっ滞性肝傷害モデルとして総胆管結紮を行い、肝細胞性肝傷害モデルとして四塩化炭素の腹腔内投与を行った。

肝臓におけるSOX9の有無がどの様に胆管形成に関わるか、野生型マウス(C57BL/6Jマウス)と Sox9cKOマウスを用いて、胎生期および成体マウス肝臓で免疫組織学的に解析した。

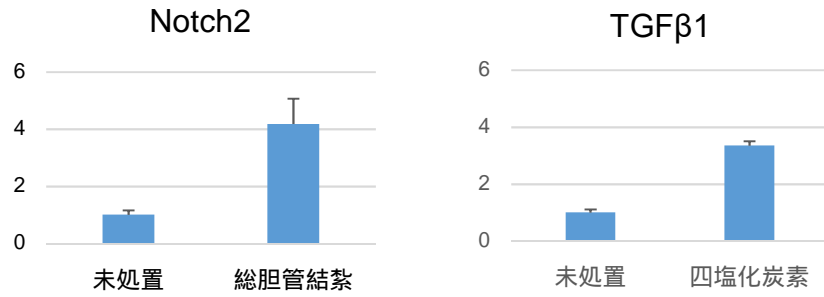
マウスの肝内肝外胆管樹の走行や構造を3次元的に解析するために胆管を可視化した。

4. 研究成果

肝傷害モデルを用いた SOX9 上流シグナル経路の解析

胆汁うっ滞性肝障害モデルとして総胆管結紮を行い、肝細胞性肝傷害モデルとして四塩化炭素の腹腔内投与を行った。解析ポイントとして、総胆管結紮術の2週間後および四塩化炭素の腹腔内投与(週3回)の計10週間投与後に設定した。

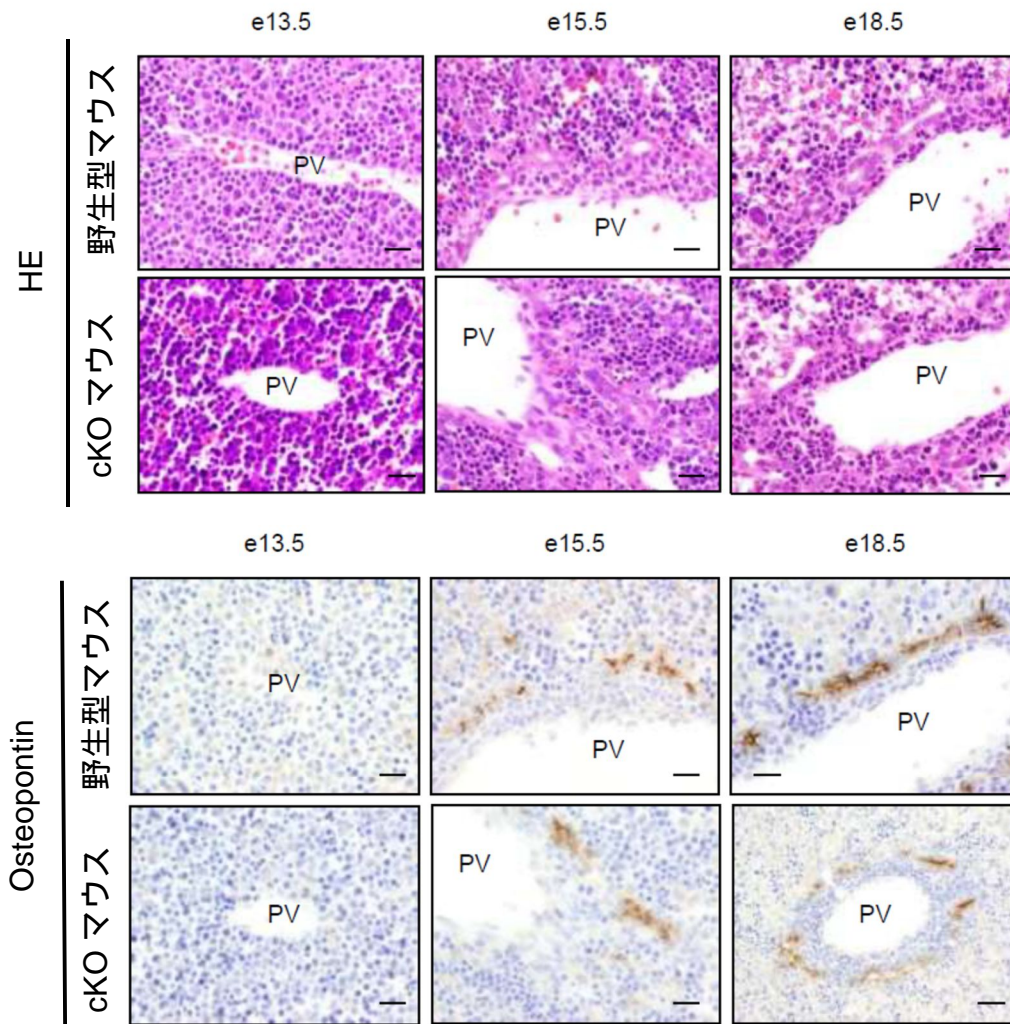
肝サンプルを用いたりアルタイム定量 PCR による遺伝子発現量の解析を行った。総胆管結紮モデルでは未処置群と比較して、Notch2 の有意な活性化が認められた ($p < 0.001$)。Jagged1 や Hes1 などには有意差は認められなかった。四塩化炭素腹腔内投与モデルでは未処置群と比較して、Tgf 1 の有意な活性化が認められた ($p < 0.001$)。胆汁うっ滞性肝傷害に伴う DR の進展において、SOX9 の上流シグナル経路の中でも、Notch シグナル経路の構成因子である Notch2 の関与が示唆された。四塩化炭素による肝細胞性障害でも中心静脈を主体として DR が起こることが分かったが、Tgf シグナル経路の構成因子である Tgf 1 が有意に活性化していた。DR の起こる病態毎で活性化するシグナル経路に違いがある可能性が示唆された。



SOX9cKO マウスを用いた胆管発生についての解析

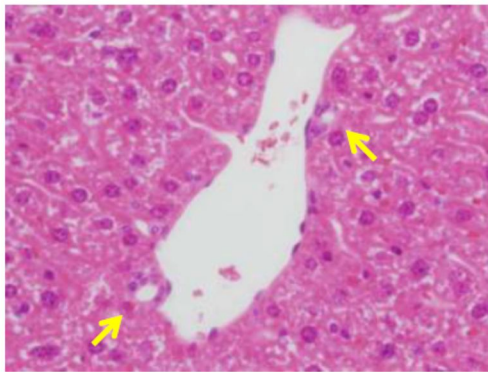
肝臓における SOX9 の有無がどのように胆管形成に関わっているか、野生型マウス(C57BL/6J マウス)と SOX9cKO マウスを用いて、胎生期および成体マウス肝臓で免疫組織学的・遺伝学的に解析を行った。胎生期については、e13.5、e15.5、e18.5 において解析を行った。成体マウスについては、10 週齢で解析を行った。

胎生期に行った解析では、いずれの解析ポイントにおいても、明らかな胆管表現型の違いは確認できなかった。それについての理由としては、使っている Alb-Cre ドライバーマウスの Cre (DNA 組み換え酵素) の発現効率が、出生直後において、約 40%にしか行われていないことが原因と推察された。PV : portal vein、スケールバー : 20 μm

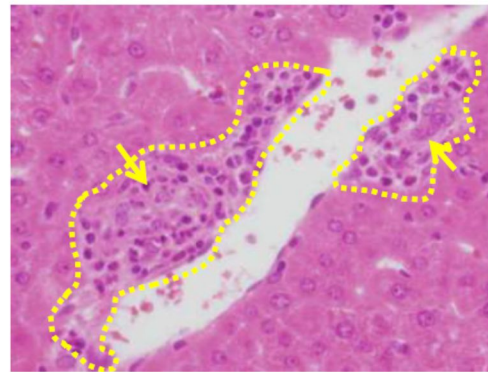


一方、10週齢に行った解析では、正常な胆管構造（胆管細胞で裏打ちされた明瞭な管腔構造）に乏しく、炎症細胞浸潤および線維化形成を伴った異常な門脈領域が散見された。また、肝実質において肝細胞壊死巣が認められ、血清学的解析では、SOX9 cKO マウスでは、ALT の有意な上昇が認められた。過去の Alb/ -fetoprotein-Cre ドライバーマウスを用いた胆管発生に関する解析(Antoniou, et al. Gastroenterology 2009 136(7): 2325–2333. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.051.)では、胆管の成熟が遅延するのみで、胆管の表現型に違いは見られなかった。我々が見出した結果は、SOX9 の胆管発生における新たな知見と考えられる。矢印：胆管構造、点線：異常な胆管構造を含む細胆管反応

野生型マウス

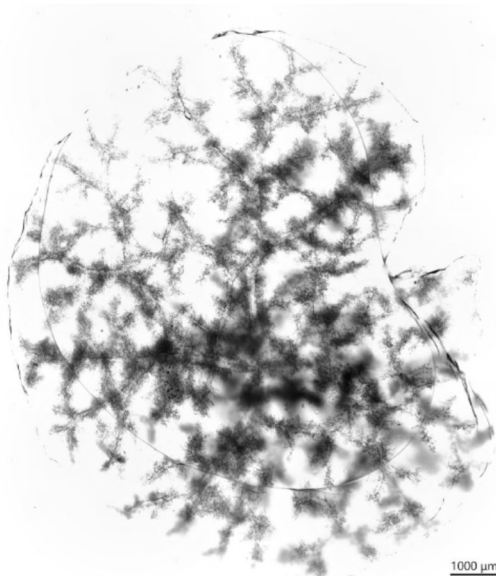


Sox9cKO マウス



マウスの肝内肝外胆管樹の走行や構造の可視化

マウス胆管の形態観察を行うにあたり、胆管の可視化を試みた。当初、樹脂注入を検討していたが、臓器透明化が手軽に行えることが分かり、BABB 法（ベンジルアルコールと安息香酸ベンジル混合液に採取臓器を浸透させる方法）および市販されている透明化試薬を用いた臓器透明化および胆管内へのインク注入を併用することで、胆管の可視化に成功した。



門脈の周囲に小葉間胆管と毛細胆管とで構築される胆管ネットワークが観察できる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshii D, Inomata Y, Yamamoto H, Irie T, Kadohisa M, Okumura K, Isono K, Honda M, Hayashida S, Oya Y, Hibi T.	4. 巻 50
2. 論文標題 The duodenal tube test is more specific than hepatobiliary scintigraphy for identifying bile excretion in the differential diagnosis of biliary atresia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Today.	6. 最初と最後の頁 1232 ~ 1239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02010-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshii D, Inomata Y, Komohara Y, Shimata K, Honda M, Hayashida S, Oya Y, Yamamoto H, Yamamoto H, Sugawara Y, Hibi T	4. 巻 4
2. 論文標題 Ki67 expression at Kasai portoenterostomy as a prognostic factor in patients with biliary atresia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJS Open	6. 最初と最後の頁 873 ~ 883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs5.50308	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 Yoshii D, Nakagawa T, Komohara Y, Kawaguchi H, Yamada S, Tanimoto H	4. 巻 -
2. 論文標題 Phenotypic Changes in Macrophage Activation in a Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease using Microminipigs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.57703.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉井 大貴、横内 裕二、孤原 義弘、猪股 裕紀洋、日比 泰造
2. 発表標題 SOX9は肝内胆管発生において重要な役割を担う
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉井 大貴、猪股 裕紀洋、入江 友章、三本松 譲、門久 政司、嶋田 圭太、磯野 香織、本田 正樹、中野 美和子、日比 泰造
2. 発表標題 胆道閉鎖症の診断アプローチに十二指腸液検査は有用である
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入江 友章、菰原 義弘、吉井 大貴、日比 泰造
2. 発表標題 肝芽腫におけるTAMの解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020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

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