

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592089

研究課題名(和文) 胆道閉鎖症の成因における maternal microchimerism の関連

研究課題名(英文) The evidence of maternal microchimerism in biliary atresia using fluorescent in situ hybridization

研究代表者

林田 真 (HAYASHIDA MAKOTO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70452761

研究成果の概要(和文):

胆道閉鎖症は現在においても解決すべき問題が多く残された疾患であり、病因として様々な仮説が提唱されてきたが、いずれも胆道閉鎖症の発生を十分に説明するにはいたっていないのが現状である。GVHDと胆道閉鎖症との類似性より、母体より移入した母親由来の細胞がGVHD様反応を引き起こし、形成されていた胆管を傷害し胆管が閉鎖するという仮説とし、児の肝における母親由来の細胞(maternal microchimerism)を検索する。胆道閉鎖症の成因とmaternal microchimerismの関連を検討するため、胆道閉鎖症初回手術時に得られる肝生検標本と肝門部肝管・胆嚢・総胆管標本を使用しmicrochimerismの証明を行った。パラフィン包埋肝生検標本を用いFluorescent in situ hybridization (FISH)を用いたchimera細胞の検出を確立し、新規胆道閉鎖症症例の標本保存とスライド作成を行いFISHにてmicrochimerismの検索し、コントロールに比べ高頻度で存在することを証明した。また、自治医科大学には生体肝移植症例(胆道閉鎖症、非胆道閉鎖症)約50例の摘出肝標本の収集と標本作製を行った。

研究成果の概要(英文):

Biliary atresia (BA) is a cholestatic disease of unknown etiology. It has recently been suggested that GVHD caused by microchimerism is an etiology in the development of autoimmune disease. Moreover, the liver is a frequent target organ of GVHD. The aim of this study is to identify the presence and extent of maternal microchimerism and to determine whether it play a role in the etiology of BA. The liver biopsy specimens of 6 male BA patients (BA group) and 6 males with other liver diseases (non-BA group) were assayed for X- and Y-chromosome using fluorescent in situ hybridization (FISH). The cells with two sex chromosomes in the nuclei were counted. Cells with one X- and one Y-chromosomes were considered to be host cells and those with two X-chromosome were considered to be of maternal origin. The frequency of cells with XX chromosomes per 1,000 host cells in the BA group and the non-BA group were 3.00 ± 0.75 and 0.99 ± 0.50 , respectively. ($P=0.005$). The presence of female cells in the liver of male BA patients was significantly higher than in males with other liver disease. Maternal microchimerism is therefore suggested to contribute to the pathogenesis of BA.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |

研究分野：医師薬学

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：胆道閉鎖症、成因、マイクロキメリズム

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は、進行性で肝移植を余儀なくされることも多く、現在においても解決すべき問題が残されている。胆道閉鎖症の病因として様々な仮説が提唱されてきたが、いずれも胆道閉鎖症の発生を十分に説明するにはいたっていないのが現状である。

最近、免疫学的機序の関与が示唆されるものが報告され、また、胆道閉鎖症と GVHD の間にはいくつかの病理学的な類似点があるとされている。肝臓は GVHD において target organ の一つであり胆管の破壊と T 細胞優位のリンパ球浸潤が特徴であるが、これも胆道閉鎖症との類似点である。

以前より自己免疫疾患と chronic GVHD との臨床および病理組織学上の類似点が指摘されている。さらに近年胎児母体間での両方向性の細胞の移動が報告されるようになり、母親から胎児へ移動した細胞 (Maternal microchimerism) が長期間存続することが示されている。以上のことから体内に移入した胎児・母体細胞により GVHD 様反応が引き起こされ、自己免疫疾患が発症するという仮説が提唱されている。

2. 研究の目的

GVHD と胆道閉鎖症との類似性より、母体より移入した母親由来の細胞が GVHD 様反応を引き起こし、形成されていた胆管を傷害し胆管が閉鎖するという仮説とし、その関連について証明することを目的とした。

3. 研究の方法

胆道閉鎖症の成因と maternal microchimerism の関連を検討するため、胆道閉鎖症初回手術時に得られる肝生検標本と肝門部肝管・胆嚢・総胆管標本を使用し microchimerism の証明、分布について以下の方法により検討する。対照群として他の肝疾患肝生検標本を使用する。(他肝疾患：胆道拡張症、濃縮胆汁症候群、肝腫瘍正常肝部分など)

胆道閉鎖症群：男児胆道閉鎖症症例の初回葛西手術時の肝生検標本

他肝疾患群：他肝疾患症例の手術時の肝生検標本または肝腫瘍摘出標本の正常肝部分

肝内の microchimerism の存在の証明 (Fluorescent in situ hybridization (FISH) を用いた chimera 細胞の検出)

対象

胆道閉鎖症群：男児胆道閉鎖症症

例の初回葛西手術時の肝生検標本

他肝疾患群：他肝疾患症例の手術時の肝生検標本または肝腫瘍摘出標本の正常肝部分

肝組織凍結標本とパラフィン包埋肝生検標本を 5 μm に薄切後、脱パラフィン、酵素処理を行ったあと FISH を行う。X 染色体プローブをオレンジ、Y 染色体プローブを緑の蛍光色素でラベルした CEP X/Y プローブを用い、ハイブリダイゼーションを行い蛍光顕微鏡で観察。男児肝細胞 (XY) 中の XX 細胞数を検索する。

4. 研究成果

・ BA 群 (n=6) 手術時年齢 84.8 ± 57.3 生日
・ non-BA 群 (n=6)

手術時年齢 229 ± 171 生日

年齢、肝機能 (AST, ALT, T-Bil, D-Bil) は BA 群、non-BA 群において

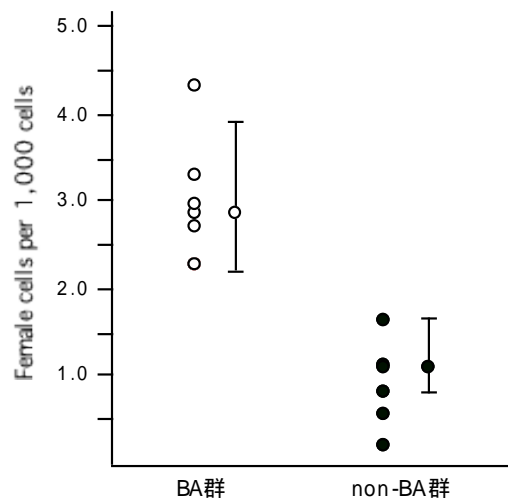
統計学的有意差を認めなかった。

細胞 1,000 中の chimerism 率は

BA 群 3.00 ± 0.75, non-BA 群 1.00 ± 0.50 と有意に BA 群が高い結果となった (P=0.005)。

また、14 歳、22 歳の症例においても XX 細胞を認め、chimerism が長期間存続し続けることが示された。

BA 群の chimerism は年齢と関係なく高値を示した。また、non-BA 群においても年齢と関係なく chimerism の存在を認めるが、一貫して non-BA 群の方が低値である。



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 10 件)

Hayashida M, Matsuura T, Saeki I, Taguchi T (他 8 名)、Association of lymphocyte crossmatch and the outcome of intestinal transplantation in swine *Pediatric Surgery International*、*Pediatr Surg Int*、査読有、27(3)、2011、279-81

林田 真、荻田桂子、松浦俊治、高橋由紀子、西本祐子、副島雄二、武富紹信、前原喜彦、田口智章、生体肝移植後、診断および治療に難渋した小腸型 PTLD の一小児例、臨床と研究

林田 真、松浦俊治、水田耕一、佐伯 勇、田口智章 (他 8 名)、小児生体肝移植術後に reversible posterior leukoencephalopathy syndrome (RPLS) を発症した三例、臨床と研究

Matsuura T, Hayashida M, Saeki I, Taguchi T、The risk factors of persistent thrombocytopenia and splenomegaly after liver transplantation、*Pediatr Surg Int*、査読有、26(10)、2010、1007-1010

Sanada Y, Kawano Y, Mizuta K, Egami S, Hayashida M, (他 7 名) Strategy to prevent recurrent portal vein stenosis following interventional radiology in pediatric liver transplantation、*Liver Transpl*、査読有、16(3)、2010、332-339

Takahashi Y, Nishimoto Y, Matsuura T, Hayashida M, Tajiri T, Soejima Y, Taketomi A, Maehara Y, Taguchi T、Surgical complication after living donor liver transplantation in patients with biliary atresia: a relatively high incidence of portal vein complications、*Pediatr Surg Int*、査読有、25(9)、2009、745-751

Sanada Y, Mizuta K, Kawano Y, Egami S, Hayashida M (他 10 名) Living donor liver transplantation for congenital absence of the portal vein、*Transplant Proc*、査読有、41(10)、2009、4214-4219

Sanada Y, Mizuta K, Kawano Y, Egami S, Hayashida M, Hishikawa S, Kawarasaki H、Paralysis in the left phrenic nerve after living-donor liver transplantation for biliary atresia with situs inversus、*Liver*

Transplantation、査読有、14 巻、2008、1659-63

林田真、西本祐子、高橋由紀子、佐伯勇、田口智章、【胆道閉鎖症 診断・治療・研究の最先端】胆道閉鎖症における microchimerism、*小児外科*、査読有、40 巻、2008、50-55

Hayashida M, Nishimoto Y, Matsuura T, Takahashi Y, Taguchi T (他 2 名)、The evidence of maternal microchimerism in biliary atresia using fluorescent in situ hybridization、*J Pediatr Surg*、査読有、42 巻、2007、2097-101

[学会発表](計 17 件)

林田 真、胆道閉鎖症術後における肺血流異常の検討、第 37 回日本胆道閉鎖症研究会、2010 年 12 月 10 - 11 日、大阪

林田 真、重症心身障害児に対する小児外科の関わり～当院にて手術を行った重症心身障害児の検討～、第 26 回小児外科秋季シンポジウム、2010 年 11 月 21 - 23 日、横浜

林田 真、当院における小児劇症肝不全 / 急性肝不全症例の検討、第 46 回日本移植学会総会、2010 年 10 月 20 日 - 22 日、京都

林田 真、原発性硬化性胆管炎と自己免疫肝炎の overlap syndrome の一小児例、第 37 回日本小児栄養消化器肝臓学会、2010 年 10 月 9 - 10 日、高松

林田 真、肝移植に至らなかった新生児ヘモクロマトーシスの一例、第 37 回日本小児栄養消化器肝臓学会、2010 年 10 月 9 - 10 日、高松

林田 真、Association of lymphocyte crossmatch and outcome of intestinal transplantation in swine、XXIII International Symposium on Paediatric Surgical Research、2010 年 9 月 12 - 14 日、東京

林田 真、小児肝移植後長期経過例の問題点、第 110 回 日本外科学会、2010 年 4 月 8 日、名古屋

林田 真、当科における短腸症候群管理の strategy、第 22 回日本小腸移植研究会、2010 年 3 月 5 - 6 日、東京

林田 真、成人胆道閉鎖症症例に対する生体肝移植の検討、第 36 回日本胆道閉鎖症研究会、2009 年 12 月 12 日、横浜

林田 真、小児生体肝移植術後に reversible posterior leukoencephalopathy syndrome (RPLS)を発症した三例、第 27 回日本肝移植研究会、2009年7月10 - 11日、静岡

林田 真、胆道閉鎖症年長児例における生体肝移植 -術中、術後およびドナー因子に関する検討-、第 46 回日本小児外科学会、2009年6月1 - 3日、大阪

林田 真、The prevalence and clinical significance of autoantibodies following living donor liver transplantation in children、PAPS、2009年5月10日 - 14日、香港

林田 真、小児生体肝移植後、自己抗体の変動に関する検討、第 44 回日本肝移植学会、2008年9月19 - 21日、大阪

林田 真、The evidence of maternal microchimerism in biliary atresia using fluorescent insitu hybridization、FISPM、2008年9月6日、福岡

林田 真、胆道閉鎖症術後における肺血流異常と移植至適時期、第 7 回自治医科大学シンポジウム、2008年8月30日、栃木

林田 真、小児非自己免疫性肝疾患に対する生体肝移植後の慢性肝炎に対する治療、第 45 回日本小児外科学会、5月28 - 30日、筑波

林田 真、胆道閉鎖症における maternal microchimerism の関連、第 108 回日本外科学会、2008年5月15 - 17日、長崎

〔図書〕(計1件)

「小児肝移植マニュアル」 日本医学館

3. レシピエント

B)術前管理 術前検査・準備 p 45-46

E)術後管理 術後抗凝固療法 p 123

F)術後合併症 De-novo 自己免疫性肝炎 p166-167

F)術後合併症 神経合併症 p 175-176

H)外来管理 移植ドック p 223-224

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

林田 真 (HAYASHIDA MAKOTO)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：70452761

(2)研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI TOMOAKI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20197247

松浦 俊治 (MATSUURA TOSHIHARU)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80380442

(3)連携研究者

()

研究者番号：