

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791295  
 研究課題名（和文） 胆道閉鎖症の肝内胆管細胞における遺伝子発現プロファイルの検索  
 研究課題名（英文） Profiling of mRNA expression in intra-hepatic bile duct of biliary atresia  
 研究代表者 佐々木 英之 (Hideyuki Sasaki)  
 東北大学・病院・講師  
 研究者番号：40438461

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では胆道閉鎖症のモデルとして胆管結紮マウスおよびpoly (I:C)腹腔内投与による胆汁鬱滞マウスを作成した。モデルの肝生検組織よりmRNAを抽出し、cDNA microarrayを行った。25395の遺伝子発現のプロファイルを行ったところ、胆管結紮マウスとpoly (I:C)腹腔内投与による胆汁鬱滞マウスとの比較で発現が亢進していた遺伝子が炎症やアポトーシスに関連する遺伝子を中心に1227種存在した。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, animal model of biliary atresia was established by extrahepatic bile duct ligation, poly I:C intra-peritoneal injection. Liver specimens from these models were applied for cDNA microarray. Interestingly, increasing mRNA expression were detected 1227 genes, including inflammation related gene and apoptosis related genes,

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科

キーワード：胆道閉鎖症・肝内胆管・cDNA microarray

## 1. 研究開始当初の背景

乳児期に原因不明で発症し、予後不良な疾患である胆道閉鎖症の病因・病態解明が待

望されるなかで、未だその糸口をつかめていない状況で、cDNA microarrayによる遺伝子発現プロファイルを行うことが必要で

あった。

## 2. 研究の目的

本研究では本症の病態に類似したマウスモデルを用いて、その肝内胆管組織における mRNA の発現の状態を評価し、本症の病因および病態進展に関連する因子を同定することが目的であった。

## 3. 研究の方法

(1)モデルとして胆管結紮マウスおよび poly (I:C)腹腔内投与による胆汁鬱滞マウスを作成

(2) laser capture microdissection により採取した肝内胆管/または全肝から mRNA を抽出し、cDNA microarray 施行。

(3) 人での肝内の炎症の状態のさらなる把握を行うために、CD86 に注目して検討

## 4. 研究成果

モデルとして胆管結紮マウスおよび poly (I:C)腹腔内投与による胆汁鬱滞マウスを作成した。このモデルにより肝内胆汁鬱滞のモデルを作成することができた。実際にモデル動物は処置後 1 日目、3 日目、7 日目、10 日目、14 日目に犠死させた。サンプルとして、血清と肝臓、脾臓の採取を行った。

胆管結紮モデルでは処置後 3 日目より徐々に黄疸を呈するようになり、7 日目を過ぎると、体重減少を呈した。

これとは異なり Poly(I:C)投与モデルでは明らかな黄疸を 14 日目まで呈することはなかった。

採取した血清サンプルの検討では、胆管結紮モデルでは経時的にビリルビン、AST、ALT の上昇を認めた。Poly(I:C)モデルでも投与量の増加に伴い、検査データの異常を認める結果となった。

採取した肝臓の組織学的な検討では、胆管結紮モデルでは著明な肝内胆汁鬱滞、偽胆

管の増生、門脈域の繊維性拡大が認められた。

Poly(I:C)投与モデルでも、胆管結紮モデルほどではないものの、偽胆管の増勢や門脈域の繊維性拡大を認めた。

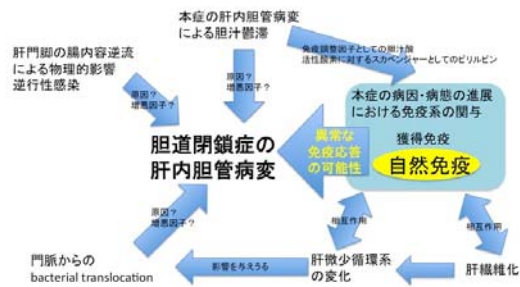
これらのモデルから採取した肝組織より laser capture microdissection により肝内胆管のみを採取した。そして採取した組織より mRNA を抽出した。また比較検討の目的に全肝からも mRNA を抽出した。これらの RNA を用いて、cDNA microarray をおこない、発現の違いを検討するという実験を行った。

その実験の過程で、laser capture microdissection からの RNA の収率が確保できずに様々な条件設定を行うことに多くの時間や試料を費やす結果となったが、最終的には十分な RNA を調整することが困難であり、全肝のみの検討となった。

以上の状況で全肝から抽出した RNA をもとに、25395 の遺伝子発現のプロファイルを行った。その結果、胆管結紮マウスと poly (I:C)腹腔内投与による胆汁鬱滞マウスとの比較で、poly(I:C)モデルにおいて mRNA の発現が亢進していた遺伝子が 1227 種存在した。そのうち 8 倍以上の発現亢進が 21 種類で認められた。この中にはケモカインレセプターである Ccl2 やエンドトキシンレセプターである CD14 などの炎症に関連する因子やサイトケラチンなどの細胞骨格関連、カドヘリンなどの細胞接着関連遺伝子が含まれていた。これらはこれまで当科で過去に胆道閉鎖症より得られた肝生検を用いた病理組織学的な検討でも有意な差が見られていた。すなわち、ヒトの胆道閉鎖症の肝内胆管ではアポトーシスに陥っている細胞がコントロールに比して有意に多く存在しており、それに伴い、

細胞増殖が異常に亢進している。またこの様な異常な細胞動態を来している胆道閉鎖症の肝内胆管細胞ではカドヘリンやサイトケラチンの発現パターンがコントロールとは異なったパターンを示していることを我々は過去に示している。その様な基礎的な背景を考慮すると今回の検討で、poly(I:C)腹腔内投与モデルを作製して、胆管結紮により胆汁鬱滞モデルとの比較検討するというスタディーデザインは妥当であったことが示唆された。また4倍以上の発現亢進が、ケモカインレセプターCcr2などの炎症関連因子、Annexin A4などのアポトーシス関連因子、肝内胆管減少症に関連する遺伝子である Jagged1 など興味深い因子が196個認められた。

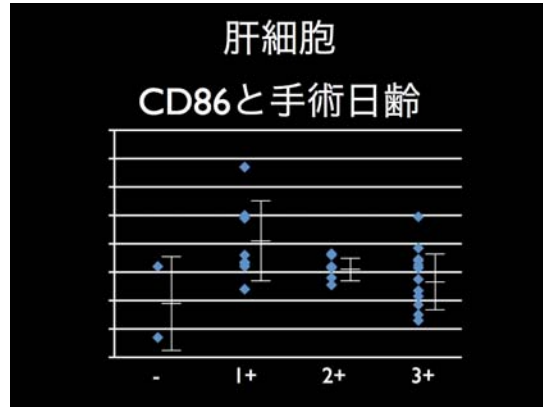
Poly(I:C)は自然免疫の受容体ファミリーであるToll様受容体の一つであるTLR3のリガンドであり、これの投与で自然免疫の活性化から一連の反応が惹起されることは想定される。その結果として前述の様に肝線維化、肝内胆汁鬱滞を来したことは意義が大きい事であるこの様な現象を来す背景に図のような可能性があり、今後の検討を行うにあたり本研究は大きな第一歩である。



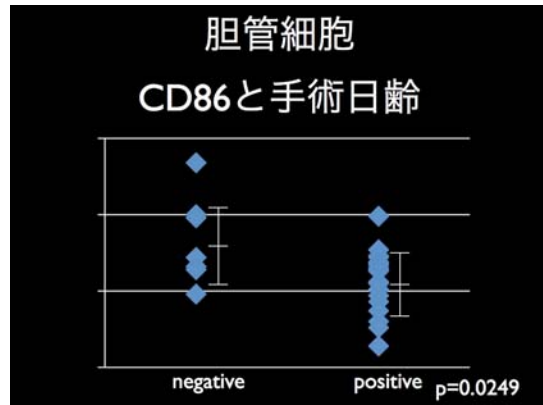
一方でチトクローム関連遺伝子など27個が8倍以上の減少、Insulin-like growth factor binding protein 1などの増殖関連因子など86個の遺伝子が4倍以上の減少を

来していた。

また同時に人での肝内の炎症の状態のさらなる把握を行うために、CD86に注目して検討を行った。免疫染色での結果、肝細胞においてはCD86は手術時日齢が早いほど高発現であった。



肝内胆管細胞ではCD86陽性所見をみとめた症例では手術時の日齢が早く、肝門部空腸吻合術の術後に黄疸消失率が高かった。

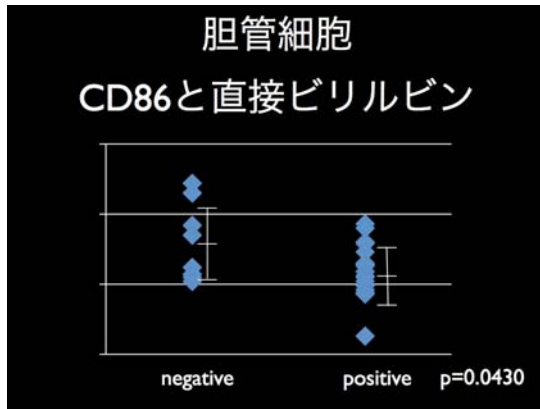


胆管細胞  
CD86と黄疸消失

	CD86陰性	CD86陽性
黄疸消失	2	16
黄疸非消失	6	5

p=0.0281

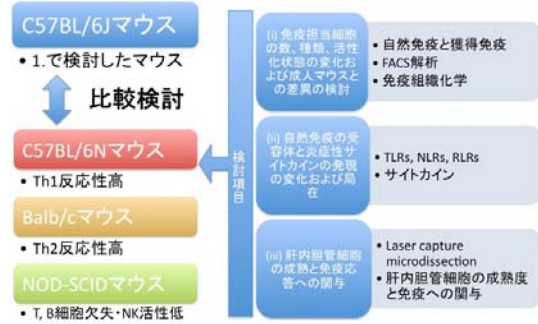
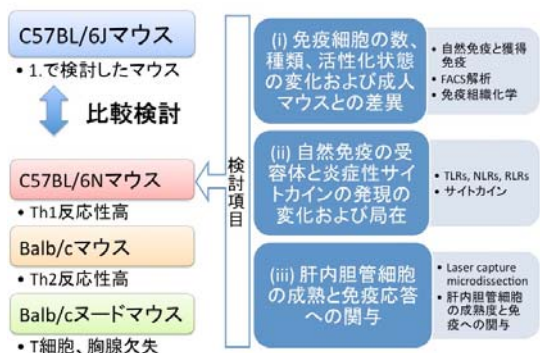
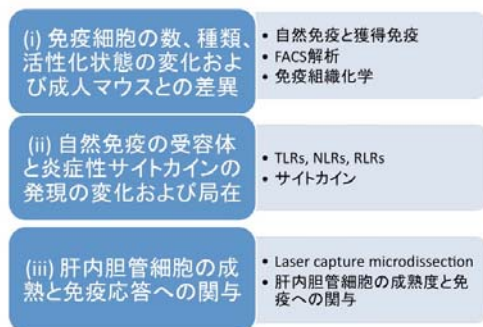
また術前の検査データも良好であった。



つまり胆道閉鎖症の肝内胆管におけるCD86の発現の強度は、その発症から手術まで時間経過が短いことが示唆させる所見であった。

今後は今回ピックアップされた遺伝子について有意なものについて個別にさらに詳細な検討を行う予定である。

具体的には図に示すようなプランを考慮して現在準備中である。



## 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)

[学会発表] (計1件)

### ① 佐々木 英之

胆道閉鎖症の肝内胆管におけるCD86発現の意義 日本胆道閉鎖症研究会

2009年12月12日 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 英之 (Hideyuki Sasaki)

東北大学・病院・講師

研究者番号：40438461