

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07411

研究課題名（和文）肝細胞における免疫反応と毛細胆管破壊との関連の解明、移植後肝生検への応用

研究課題名（英文）Clarification of the relationship between immune response and bile canaliculi destruction in hepatocytes, and its application to post-transplant liver biopsy

研究代表者

宮川一林野 文（Miyagawa-Hayashino, Aya）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：90432385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胆管消失症候群VBDSは免疫反応により胆管が消失する現象で進行例では肝不全に至る。我々はVBDSとして顕性化する前から毛細胆管レベルですでにキナーゼの減少が生じ小葉間胆管の消失が続くことを示してきた。本研究ではS1P2受容体に着目し免疫細胞と毛細胆管の構造変化からVBDSの病態解明を試みた。肝細胞の3次元培養により毛細胆管を形成させ阻害剤を用いて毛細胆管やS1P2受容体下流分子の変化を観察した。VBDS患者肝臓ではマクロファージのS1P2受容体発現は亢進しその阻害によりマクロファージ活性は低下した。マクロファージと肝細胞のS1P2受容体間の伝達から毛細胆管の拡張破壊を誘発する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫反応により肝内胆管が消失する現象は胆管消失症候群と総称され、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病や肝移植後の慢性拒絶反応、薬剤性など原因は様々である。不可逆で進行すると肝不全に至るため、より早期に発見し、早期の治療介入が望まれる。本研究では、胆汁酸をリガンドとするS1P2受容体に着目し、肝内に浸潤するマクロファージと毛細胆管の構造変化からS1P2受容体を介してのVBDSの病態解明を試みた。

研究成果の概要（英文）：VBDS is a phenomenon in which interlobular bile ducts disappear due to an immune response, leading to liver failure in advanced cases. We have previously shown that the loss of interlobular bile ducts is followed by decrease and loss of serine-threonine kinase STK17A at bile canaliculi, even before it is manifested as VBDS. In this study, we attempted to elucidate the pathogenesis of VBDS by focusing on S1P2 receptor, for which bile acids are ligands, and by studying immune cells and structural changes in bile canaliculi. S1P2 receptor expression in macrophages was increased and its inhibition decreased macrophage activity. The S1P2 receptor may interplay between macrophages and hepatocytes and induce the dilation and destruction of bile canaliculi through the RhoA/ROCK1 pathway in hepatocytes.

研究分野：人体病理学

キーワード：胆管消失症候群 肝免疫反応 S1P2受容体 毛細胆管

## 1. 研究開始当初の背景

免疫反応により胆管が消失する現象は胆管消失症候群 vanishing bile duct syndrome (VBDS)と総称され、その原因は様々である。胆管消失まで至ると不可逆であり、その病態解明、早期の介入が望まれる病態である。造血幹細胞移植後や肝移植後には、他者を認識して肝臓に免疫反応が起こる。前者はドナー由来の免疫細胞が宿主の臓器を異物と認識して攻撃する移植片対宿主病、後者はドナーの肝を宿主由来の免疫細胞が攻撃する拒絶反応と呼ばれ、いずれも臨床的に胆汁うっ滞がみられ、組織学的には、小葉間胆管が変性し、やがては消失する VBDS を示す。移植例の 30-40% にみられ、進行例では肝不全に陥る。我々は、セリンスレオニンキナーゼ STK17A が肝細胞の頂端側に局在すること、肝移植後慢性拒絶反応として小葉間胆管の消失といった形態的变化をきたす前に、毛細胆管レベルで STK17A の減少・消失があり、小葉間胆管の形態学的変化につながることを初めて明らかにした [Ozeki et al. PLoS One 2015]。

肝細胞は隣接する細胞間で密着結合を形成し、数個の肝細胞で囲まれる胆汁の通路である毛細胆管を形成する。肝細胞で作られた胆汁は、頂端側から毛細胆管内に排出され、グリソン鞘内の小葉間胆管に集まり、太い肝内胆管へ流れ、肝外胆道へ到達する。上記の移植後の胆管変性・消失は小葉間胆管レベルで定義されているが [造血幹細胞移植ガイドライン 2018][Demetris et al. Am J Transpl 2016]、類洞側から侵入した免疫担当細胞が肝細胞頂端側である胆管の破壊にどのように結びつくのか明らかにされていない。要するに、移植免疫における毛細胆管の消失は、免疫学的なアタックやサイトカインの影響による細胞死によるものか、胆管形成のシグナル系の攪乱による消滅なのか不明である。肝あるいは骨髄移植後生検の経時的な形態観察では毛細胆管は早期に消失するが肝細胞は保たれるので、肝細胞死による毛細胆管消滅は考えにくい。

他方、S1P2 型受容体は肝臓、腎臓、脳に特異的に発現し、S1P 産生酵素で肝臓にほぼ特異的に発現する SphK2(スフィンゴシンキナーゼ 2 型)を活性化し、脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)を産生する。最近、肝臓に発現する S1P2 受容体は、胆汁酸を直接のリガンドとする特異的受容体の一つであることが報告され [Nagahashi. Hepatology 2015]、肝臓において胆汁酸による S1P2 受容体から SphK2 を介した S1P シグナル伝達系が脂質代謝などにかかわることが報告されたが、肝における局在や働きなどの詳細は分かっていない。興味深いことに、S1P2 受容体は単球やマクロファージの細胞膜上にも発現しており、リガンドである胆汁酸のみならず、S1P との結合によりマクロファージは活性化し、肝の免疫反応に関わる可能性がある [永橋ら 胆道 2016]。また胆管癌細胞株の実験系で、胆汁酸は S1P2 型受容体に作用し、ERK/AKT-NF B シグナル伝達経路を介して COX2 発現にかかわり、炎症反応を惹起することが示された [Liu et al. J Biol Chem 2015]。小腸移植ラットモデルでの検討では拒絶反応に S1P 受容体が関与しているとの報告もある [Song et al. Transpl Immunol 2012]。これらの報告を総合し、胆汁酸ないし免疫細胞を介した S1P2 受容体シグナル経路と、肝細胞に於いて胆管形成・維持の経路に関連すると考えられる RhoA/ROCK などを経路の相互関係に着目することで、肝細胞の免疫反応でおこる胆管消失の現象を説明することができるのではないかと考えた。

## 2 . 研究の目的

本研究では、特に肝臓に特異的に発現し、胆汁酸を特異的リガンドとすることが示されかつ免疫細胞上にも存在する S1P2 受容体に着目し、免疫細胞上の S1P2 受容体との相互作用を通して、肝細胞における S1P2 受容体を介した毛細胆管構造の制御機構を検討することで VBDS の経過のなかで早期の変化と考えられる毛細胆管の拡張や破壊の機序の解明を試みた。

## 3 . 研究の方法

VBDS の患者肝生検に多重免疫組織化学法を適用し、肝内に浸潤するマクロファージの S1P2 受容体の発現を正常肝と比較検討した。S1P2 アゴニストや LPS で刺激した培養マクロファージ (THP-1) においてその S1P2 受容体遺伝子をノックダウンし、炎症性サイトカインの増減をリアルタイム PCR 法および培養液中のサイトカイン量を ELISA 法で確認した。農業・食品産業技術総合研究機構の竹澤との共同研究を通してコラーゲンビトリゲル膜チャンパーを利用した HepG2-NIAS 細胞の酸素供給 3 次元培養を導入し、毛細胆管の構造を形成させ、S1P2 アゴニスト、S1P2 受容体リガンドである胆汁酸を添加し、毛細胆管の形態変化を指標とした。S1P2 受容体阻害剤や ROCK 阻害剤を用いてリアルタイム PCR、ウエスタンブロットング法により肝細胞の S1P2 受容体、RhoA、ROCK1 等の変化を確認した。

## 4 . 研究成果

VBDS 病態下の患者肝生検で肝内に浸潤するマクロファージにおける S1P2 受容体の蛋白発現を確認したところ、正常肝に比較して VBDS においてその発現は亢進していた。LPS 刺激培養マクロファージにおいて S1P2 受容体の阻害によりマクロファージの炎症性サイトカイン産生は大きく低下した。HepG2-NIAS 細胞の酸素供給 3 次元培養により明瞭に毛細胆管を形成させることができた。S1P2 受容体阻害剤やノックダウンなどの手法を用いて毛細胆管の形態や S1P2 受容体の下流分子の変化を観察したところ、胆汁酸や S1P2 により毛細胆管は拡張し、S1P2 受容体アンタゴニスト添加によりその径は回復し、ROCK 阻害剤添加によりさらに拡張した。胆汁酸は肝細胞に発現する S1P2 受容体を介し ROCK1 に作用することで毛細胆管の形態を変化させていることが示唆された。以上よりマクロファージと肝細胞間の S1P2 受容体を介するシグナル伝達が毛細胆管の収縮・拡張を制御する RhoA/ROCK1 経路を通じて毛細胆管の拡張、破壊を誘発することにより胆汁うっ滞性肝障害を引き起こす可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nagayabu K, Fumino S, Shimamura A, Sengoku Y, Higashi M, Iguchi M, Aoi S, Saya S, Hirai M, Ogi H, Miyagawa-Hayashino A, Konishi E, Itoh K, Tajiri T, Ono S	4. 巻 12
2. 論文標題 The clinical impact of macrophage polarity after Kasai portoenterostomy in biliary atresia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 1338131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2024.1338131	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 Morimoto H, Tsujikawa T, Miyagawa-Hayashino A, Kimura A, Saburi S, Murakami N, Kitamoto K, Mukudai S, Nagao H, Saya S, Ogi H, Konishi E, Itoh K, Hirano S	4. 巻 -
2. 論文標題 Neutrophil to lymphocyte ratio associates with nutritional parameters, intratumoral immune profiles, and clinical outcomes of pembrolizumab in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Head & Neck	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) 10.1002/hed.27671	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 Takeda-Miyata N, Miyagawa-Hayashino A, Hamada S, Nagamine M, Fujii T, Imura T, Tsunozuka H, Shimomura M, Yamaguchi T, Yanada M, Inoue M, Konishi E	4. 巻 72
2. 論文標題 A clinicopathologic and molecular analysis of five cases of bronchiolar adenoma with rare mutations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 273-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13213	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 Kataoka S, Moriguchi M, Okishio S, Takahashi A, Okuda K, Seko Y, Umemura A, Yamaguchi K, Miyagawa-Hayashino A, Itoh Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Re-administration of nivolumab after immune checkpoint inhibitor-induced cholangitis: the first reported case	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 467-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-022-01590-z	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 Saburi S, Tsujikawa T, Miyagawa-Hayashino A, Mitsuda J, Yoshimura K, Kimura A, Morimoto H, Ohmura G, Arai A, Ogi H, Konishi E, Itoh K, Sugino K, Hirano S	4. 巻 35
2. 論文標題 Spatially resolved immune microenvironmental profiling for follicular thyroid carcinoma with minimal capsular invasion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mod Pathol	6. 最初と最後の頁 721-727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-021-00993-6	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 Yoshimura K, Tsujikawa T, Mitsuda J, Ogi H, Saburi S, Ohmura G, Arai A, Shibata S, Thibault G, Chang YH, Clayburgh DR, Yasukawa S, Miyagawa-Hayashino A, Konishi E, Itoh K, Coussens LM, Hirano S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Spatial Profiles of Intratumoral PD-1+ Helper T Cells Predict Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 769534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.769534.	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 該当する

1. 著者名 Miyagawa-Hayashino A	4. 巻 4
2. 論文標題 Liver Transplantation Alone for Common Variable Immunodeficiency-Related Liver Diseases: A Controversial Issue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Liver Transplantation	6. 最初と最後の頁 100049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.liver.2021.100049	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 Miyagawa-Hayashino A, Okada S, Takeda-Miyata N, Takashima Y, Yamada Y, Takemura Y, Uchino J, Inoue M, Takayama K, Konishi E	4. 巻 29
2. 論文標題 TTF-1- and c-MYC-defined phenotypes of large cell neuroendocrine carcinoma and delta-like protein 3 expression for treatment selection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 313-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAI.0000000000000875	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 Kanai R, Miyagawa-Hayashino A, Shishido-Hara Y, Nakamura N, Omatsu I, Morinaga Y, Shimura Y, Kuroda J, Imura T, Itoh K, Konishi E.	4. 巻 71
2. 論文標題 Mantle cell lymphoma with EBV-positive Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in a patient after autologous PBSCT: Phenotypically distinct but genetically related tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 96-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13038	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 Tsujikawa T, Mitsuda J, Ogi H, Miyagawa-Hayashino A, Konishi E, Itoh K, Hirano S	4. 巻 111
2. 論文標題 Prognostic significance of spatial immune profiles in human solid cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3426-3434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14591	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 宮川 (林野) 文	4. 巻 -
2. 論文標題 病理組織診断と検体を用いた検査－診断確定から治療薬選択へ－	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞組織化学2020	6. 最初と最後の頁 233-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮川(林野) 文
2. 発表標題 病理組織診断と検体を用いた検査 診断確定から治療薬選択へ－
3. 学会等名 第45回組織細胞化学講習会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮川(林野)文、竹澤俊明、辻川敬裕、井村徹也、小西英一
2. 発表標題 S1P2受容体とマクロファージの相互作用を介した胆管消失症候群の病態形成機構の解明
3. 学会等名 第69回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	竹澤 俊明  (Takezawa Toshiaki)		

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
---------	---------