

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17588

研究課題名（和文）母親由来キメラ細胞の定量的解析による胆道閉鎖症の病因究明と予後予測研究

研究課題名（英文）Etiological and Prognostic Studies of Biliary Atresia by Quantitative Analysis of Maternal Chimeric Cells

研究代表者

榎屋 隆太（Masuya, Ryuta）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90448572

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：胆道閉鎖症（BA）の病因は不明であるが母体-胎児間の免疫相互作用がBAの病因として提唱されている。しかし母体キメラ（MC）細胞が末梢血中を循環しているかどうか、またBAの病因におけるMC細胞の役割についてはまだ明らかにされていない。我々はBAの術後患者を予後良好群と不良群とに分類し、患者末梢血中（末梢血単核球および血漿）に含まれるMC細胞のDNAをqPCRを用いて定量比較した。結果、予後不良群の末梢血単核球には有意に多くのMC細胞が検出され、末梢血単核球中への母親由来細胞検出は予後不良と有意に関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から胎児期に胎盤を介して胎児血液中に流入した母親由来細胞が胆道閉鎖症患者の末梢血に残留し、胆道閉鎖症の予後に影響を与えることが明らかになった。胆道閉鎖症は成人期までに反芻が肝移植に至る予後不良かつ原因不明の難病で、本邦では1万出生に1人の割合で発症する。胆道閉鎖症の発症及び病状進行における母親由来細胞の役割を今後更に究明していくことによって、発症や病状進行を予防する治療法を開発することができる。

研究成果の概要（英文）：The etiology of biliary atresia (BA) is unknown, but maternal-fetal immune interactions have been proposed as a possible etiology of BA. However, whether maternal chimeric (MC) cells circulate in the peripheral blood and the role of MC cells in the etiology of BA remain unclear. We have classified postoperative patients with BA into good and poor prognosis groups and quantified the DNA of maternal chimeric cells in the peripheral blood using qPCR. We found that significantly more MC cells were detected in the peripheral blood mononuclear cells of the poor prognosis group, and the detection of maternal-derived cells in the peripheral blood mononuclear cells was significantly associated with poor prognosis.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 母親由来キメラ細胞 移植片対宿主病

## 1. 研究開始当初の背景

### ・胆道閉鎖症 (Biliary Atresia : BA) について

胆道閉鎖症(BA)は新生児期から乳児期早期にかけて肝内外胆管の不可逆的な閉塞に伴う黄疸、灰白色便、胆汁うっ滞性肝障害を主症状とし、わが国では10,000出生に1人が発症する原因不明の疾患である。治療法は肝門部肝空腸吻合術(葛西手術)が標準術式として確立されているが、減黄不良に伴う肝不全や、減黄後も進行する肝線維化、あるいは反復する胆管炎のため、思春期までに約半数が肝移植を必要とする難病である。また肝移植の導入により生命予後は改善しているものの、長期にわたり免疫抑制剤投与を必要とするなど患者・家族の負担が非常に大きい。申請者らの35年にわたる自験例の解析でも自己肝生存率は全国調査と同程度の45%となっており、自己肝生存率向上が重要な課題である。本症の発症メカニズムは未だ解明されておらず、病因解明は国際的な急務の課題である。

### ・BAに対するMaternal microchimerism (MMc)の関与について

一般的に母親細胞が妊娠中に経胎盤的に胎児に迷入して各組織に生着することは稀ではない。この母児細胞の共存をMaternal microchimerism (MMc)と呼び、胎児が母親細胞に対し寛容となる仕組みと認識されているが、一方で免疫学的なバランスが崩れれば母親細胞が免疫学的に胎児を攻撃する病態(Graft-versus-Host Disease : GVHD)も起こりうる。小児の代表的な自己免疫疾患である若年性皮膚筋炎で末梢血及び筋肉内で母親由来T細胞が特異的にmemory responseを起こすことが報告された。申請者らはBAにおいてMMcがGVHD様反応を介して発症に関与すると仮説を立てて研究を行い、BAの肝組織に母親細胞が存在する例があることを明らかにした。また葛西手術時に採取したBA肝生検検体にて門脈枝狭小化や肝動脈枝の壁肥厚など免疫学的異常に起因すると思われる形態変化を認め、予後と関連することを解明した。さらにIL-6の刺激で産生されるCRP高値の遷延がBAの予後不良と関連することを解明した。Maternal microchimerismは普遍的な現象であるとされているものの、研究開始時点ではBA患者を対象として多数の検体で定量的な比較を行った研究は無かった。BAの予後と児の血中の母親由来キメラ細胞との相関について明らかにした研究は研究開始時点では無かった。

## 2. 研究の目的

BA患者末梢血中の母親由来キメラ細胞のDNA(MC-DNA)を定量し、BA患者の予後との相関を検討した。

## 3. 研究の方法

BA患者12名を対象とした。すべての患者は本解析の2年以上前に葛西手術(KPE)を受けている。胆汁流出がなく黄疸が進行し肝移植が必要となった患者、または肝線維化および門脈圧亢進

が進行した患者を不良群に分類した。胆汁の流れが十分で、2年以上経過しても肝機能が正常であった者を良好群に分類した。ヘパリン採血した患者末梢血から末梢血単核細胞(パフィーコート)および血漿を遠心分離した。各サンプルからDNAを抽出した。パフィーコートサンプルと血漿サンプルとでそれぞれ母親から児に遺伝していないHLAのDNAをターゲットにしてqPCRを実施した。

#### 4. 研究成果

患者背景には、両群間で有意な差はなかった。性別構成は、良好群では男性2名、女性5名、不良群では男性2名、女性3名であった( $p=1$ )。現在の年齢は、良好群で平均 $7.1\pm 3.1$ 歳、不良群で平均 $7.6\pm 6.1$ 歳( $p=0.87$ )であった。KPE時の年齢は、良好群で平均 $67.4\pm 20.3$ 日、不良群で平均 $59.2\pm 9.0$ 日( $p=0.42$ )であった。サンプリング時の年齢は、中央値で良好群4年(98日-11年)、不良群4年(73日-14年)であった( $p=1$ )。

12名中7人の患者でパフィーコート中にMC-DNAが存在した。5人の患者で血漿中にMC-DNAが観察された。パフィーコート中のMC-DNA量は予後不良群で有意に多かった( $p=0.018$ )。血漿中のMC-DNA量には有意な差は見られなかった。パフィーコート中のMC-DNAは予後と有意に関連していた( $p=0.028$ )。血漿中のMC-DNAは予後に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、BA患児の予後は末梢血中に循環している母親由来キメラ細胞の存在の有無と有意に関連していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuya Ryuta, Muraji Toshihiro, Harumatsu Toshio, Muto Mitsuru, Nakame Kazuhiko, Nanashima Atsushi, Ieiri Satoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Biliary atresia: graft-versus-host disease with maternal microchimerism as an etiopathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103410 ~ 103410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transci.2022.103410	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎屋隆太、連利博、春松敏夫、中目和彦、家入里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症の病因論としての母親キメラリズム関連GvHD仮説 臍帯血および胎盤病理に関する共同研究の提案
3. 学会等名 第57回日本周産期・新生児医学会
4. 発表年 2021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
---------	---------