

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21581

研究課題名(和文)Liquid Biopsyによる胆道閉鎖症の出生前診断と胎児治療の可能性探索

研究課題名(英文)Exploration of antenatal diagnosis and fetal therapy for biliary atresia by liquid biopsy

研究代表者

家入 里志 (IEIRI, Satoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：00363359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間内に研究施設での肝門部嚢胞病変胎児の症例はなく、自施設での研究遂行ができなかった、しかしながら2022年に二卵性双胎児のうち一方がBAとして出生前診断された症例で、BAを発症した側の胎盤にのみVillitis of unknown etiology(以下VUE)が見られたことを分担研究者の連らが報告した。VUEは末梢絨毛を中心に慢性炎症細胞が浸潤する病態で、35週以降に2-34%の頻度で生じ、子宮内胎児発育遅延や流産に随伴する所見とされている。VUEの成因は明らかにされていないが、最近では拒絶反応あるいはGvHD様の免疫学的反応の関与が指摘されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在本研究課題に関して全国規模の多施設共同研究「出生前診断された胆道閉鎖症患児の胎盤病理および臍帯血中の母親由来細胞に関する多施設共同前向きケース・コントロール研究」を立案し、全国30の周産母子センターが併設された小児外科施設で症例を集積し、解析を行う予定である。また分娩時に得られる臍帯血に含まれる母親由来細胞のDNA(non-inherited maternal antigen, NIMAのDNA)をrtPCR法により定量してBA患児と非BA児とで比較することで、迷入する母親由来細胞の量がBA発症に及ぼす影響を評価することが出来ると想定している。

研究成果の概要(英文)：Biliary atresia (BA) is a fibroinflammatory cholangiopathy and portal venopathy. It is of unknown etiology and is associated with systemic immune dysregulation, in which the first insult begins before birth. Maternal microchimerism is a naturally occurring phenomenon during fetal life in which maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T-cells in utero. However, maternal cells may alter the fetus's response to self-antigens and trigger an autoimmune response under certain histocompatibility combinations between the mother and the fetus. A recent report on a set of dizygotic discordant twins with BA, one of whose placentae showed villitis of unknown etiology, implies a certain immune-mediated conflict between the fetus with BA and the mother. Maternal chimeric cells persist postnatally for various time spans and can cause cholangitis, which ultimately leads to liver failure.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 出生前診断 肝門部嚢胞 臍帯血 Liquid biopsy 胎児治療

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する研究グループではこれまで胆道閉鎖症に対する基礎および臨床研究を多角的に行ってきた。発症原因が明らかになっていない本疾患に対して様々なアプローチによって病態を解明し、臨床応用に向けた多角的研究を行い、その成果を報告している(図1)。胆道閉鎖症の減黄率そのものは飛躍的に改善したが、依然肝移植を必要とする患者は多い。肝移植を行うことでの生命予後の改善は得られるようになってきたが、さらに自己肝での生存率の改善についても考慮した術前・術後管理方法、さらには早期診断および治療介入方法の開発が重要であると考えている。その中でも我々が着目した Maternal Microchimerism と胆道閉鎖症の発症メカニズムとの関連を明らかにし、母親細胞との免疫と寛容のバランスを検索・評価し、胎生期からの診断と予防方法の解明することで胆道閉鎖症患者の自己肝生存とその予後の改善に結びつく可能性があると考えている。さらには胎児治療まで結びつけることは極めて散策性の強い研究となるが、本研究はその基礎的裏付けとして大きな意味を持ち、BA の予後改善・克服へ向けて重要な第一歩となる。

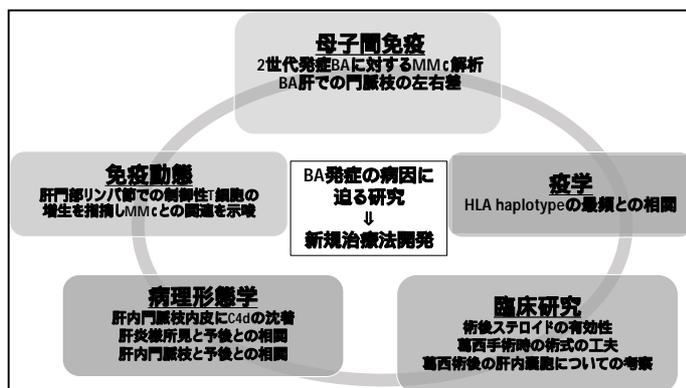


図1：当グループの胆道閉鎖症に対する多角的病因究明

その中でも我々が着目した Maternal Microchimerism と胆道閉鎖症の発症メカニズムとの関連を明らかにし、母親細胞との免疫と寛容のバランスを検索・評価し、胎生期からの診断と予防方法の解明することで胆道閉鎖症患者の自己肝生存とその予後の改善に結びつく可能性があると考えている。さらには胎児治療まで結びつけることは極めて散策性の強い研究となるが、本研究はその基礎的裏付けとして大きな意味を持ち、BA の予後改善・克服へ向けて重要な第一歩となる。

胆道閉鎖症の発症要因については、国内外から、臨床・基礎において多く報告が見られる。BA の成因はいまだ不明であるが、いくつかの説が提唱されている。Ductal plate malformation にみられる「胆管形成異常説」や腸回転異常、内臓逆位、十二指腸前門脈、肝部下大静脈欠損、左右対称肝、肺分葉異常などを合併する Biliary Atresia Splenic Malformation (BSAM)などの「器官発生異常説」。レオウイルス、CMV、口タウイルスによる先天的もしくは後天的感染によって起こる「ウイルス感染説」。CFC1、CD14、MIF、ADD3 遺伝子の変異による「遺伝的素因説」。maternal microchimerism による「母胎間免疫説」。そのほかにも、毒素説、血行障害説、胆汁酸障害説などがあがるが、有力な説はいまだない。臍帯血でのBA患児におけるCD8+ (エフェクターT細胞) およびCD25+ (制御性T細胞) の役割を分析した研究は過去

にない。本研究では、出生後からも病態が緩徐に変化する胆道閉鎖症患児に対し、Maternal microchimerism との関連を明らかにし、母子間で寛容が誘導できないことが発症メカニズムの根幹であると仮説し、胆道閉鎖症の発症論を見据えた新たな治療方法の開発へつなげることが可能(図2)であると考えている。

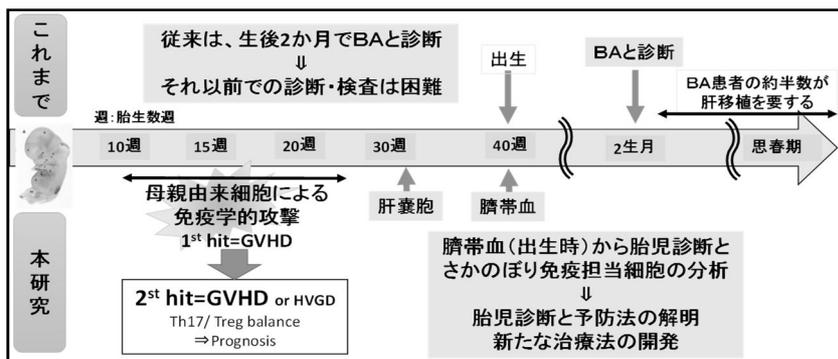


図2：本研究における胆道閉鎖症の病因仮説

2. 研究の目的

胆道閉鎖症(BA)は新生児期から乳児期早期にかけて、肝内外胆管の閉塞に伴う黄疸、灰白色便、胆汁うっ滞に伴う肝障害を主症状として発症する病因不明で予後不良の疾患である。標準術式である葛西手術を行っても成人までには約半数の患者が肝移植を必要とし、生涯にわたる自己肝生存率は30%程度と推測される。我々はBAがMaternal Microchimerism(MMc:母児細胞の共存状態)における寛容の誘導不全によりGraft-versus-Host Disease(GvHD)が胆管に引き起こされることでBAが発症するとして研究を続けてきた。本研究では出生前に肝門部に嚢胞を形成するBAを対象に臍帯血のLiquid biopsyを行うことで胎児期にBAを診断し、母親エフェクターリンパ球を除去もしくは不活化することで胎児治療を行う、つまり究極的な治療としてBAの発症を予防することを目的として立案する。

### 3. 研究の方法

胎児超音波にて肝下面に嚢胞を有する症例、すなわち嚢腫型の BA もしくは胆道拡張症が疑われる症例を対象として、分娩時の臍帯血を responder とし、母体血を stimulator とし臍帯血の CD25+細胞除去リンパ球と除去しないリンパ球で混合リンパ球試験 (MLR) を施行し、胎児に近い環境下での制御性 T 細胞の役割を探索する。有意差があれば、T 細胞のレセプターのレパトア解析を行う。出生後の臨床経過やその後の検査・手術により最終的に BA か胆道拡張症かが判明する。非 BA 患者は対照として比較することが可能となる。

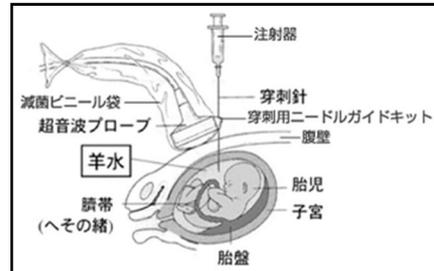


図 3: 臍帯穿刺による Liquid Biopsy 図説産婦人科より引用

胎児治療へ向けた標的分子の検出: 肝門部嚢胞新生児の臍帯血中の母親由来細胞の定量および母親末梢血からリンパ球を採取、 $5 \times 10^5$  個に調製し、肝門部嚢胞新生児の臍帯血単核細胞に放射線照射したもの(以下、照射 PBMC)を stimulator として培養する。ELISPOT 法により IFN- $\gamma$  を測定し、非肝門部嚢胞新生児の照射 PBMC への反応と定量的に比較する。

ELISPOT 法とは: ELISA プレート上で免疫細胞が産生する抗体分子やサイトカインを染色、細胞レベルで検出する技術で、100,000 個中 1 個の細胞という低レベルで分泌されたサイトカインを検出できる高感度な方法の一つである。検出された分子が胎児治療の標的となる。

( ) 臍帯血中の CD25+リンパ球除去と除去しない場合の母親抗原との MLR

( ) 臍帯血中の制御性 T 細胞のレパトア解析

2021 年度: 肝門部嚢胞病変胎児の臍帯血 Liquid Biopsy による BA の出生前診断の確立

胎生期に肝門部嚢胞性病変をもつ胎児患者の臍帯血 Liquid Biopsy (臍帯血採取) を産婦人科の協力を得て十分なインフォームド・コンセントを得て行う(図 3)。前年の実験結果を踏まえて混合リンパ球試験 (MLR)、T 細胞のレセプターのレパトア解析により、臍帯血での BA 発症を予測する。出生後の臍帯血も同様の解析を行いその変化を検証、その後臨床経過や検査・手術により最終的に BA か胆道拡張症の診断を行い、出生前診断の予測結果との整合性を検証する。

2022 年度: 臍帯を介した母親エフェクターリンパ球除去/分子標的による BA 胎児治療

2020-2021 年で確立した臍帯血を用いた出生前診断方法に基づき、胎児患者を対象とした BA 発症予防としての胎児治療を行う。この際にエフェクターリンパ球除去/分子標的治療(武井/加治/家入)を行うこととなるが、臨床試験としての申請を行い施設の許可および患者の十分な同意が得られた上で行う。

### 4. 研究成果

研究期間内に研究施設での肝門部嚢胞病変胎児の症例はなく、自施設での研究遂行ができなかった、しかしながら 2022 年に二卵性双胎児のうち一方が BA として出生前診断された症例で、BA を発症した側の胎盤にのみ Villitis of unknown etiology (以下 VUE) が見られたことを分担研究者の連らが報告した(図 4)。

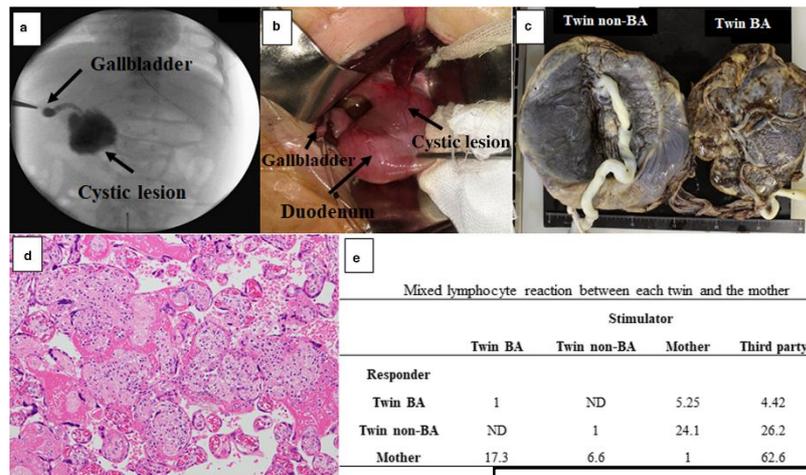


図 4: 文献 1 より引用

VUE は末梢絨毛を中心に慢性炎症細胞が浸潤する病態で、35 週以降に 2~34% の頻度で生じ、子宮内胎児発育遅延や流産に随伴する所見とされている。VUE の成因は明らかにされていないが、最近では拒絶反応あるいは GvHD 様の免疫学的反応の関与が指摘されている。これを受けて現在本研究課題に関して全国規模の多施設共同研究「出生前診断された胆道閉鎖症患児の胎盤病理および臍帯血中の母親由来細胞に関する多施設共同前向きケース・コントロール研究」を立案し、全国 30 の周産母子センターが併設された小児外科施設で症例を集積し、解析を行う予定である。

### 参考文献

1. Kosaka S, Muraji T, Ohtani H, Toma M, Miura K. Placental chronic villitis in biliary atresia in dizygotic twins: A case report. *Pediatr Int.* 2022 Jan;64(1):e15101. doi: 10.1111/ped.15101.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 4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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muraji Toshihiro, Masuya Ryuta, Harumatsu Toshio, Kawano Takafumi, Muto Mitsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 New insights in understanding biliary atresia from the perspectives on maternal microchimerism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	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) 10.3389/fped.2022.1007987	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 Masuya Ryuta, Muraji Toshihiro, Kanaan Sami B., Harumatsu Toshio, Muto Mitsuru, Toma Miki, Yanai Toshihiro, Stevens Anne M., Nelson J. Lee, Nakame Kazuhiko, Nanashima Atsushi, Ieiri Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Circulating maternal chimeric cells have an impact on the outcome of biliary atresia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	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) 10.3389/fped.2022.1007927	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 連 利博, 家入 里志, 春松 敏夫	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 【新生児消化器疾患】胆道閉鎖症の成因 母親マイクロキメリズム仮説を中心に	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本新生児成育医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11 ~ 16
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 -

1. 著者名 家入 里志, 長野 綾香, 松井 まゆ, 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 大西 峻, 春松 敏夫, 山田 耕嗣, 山田 和歌, 松久保 眞, 武藤 充, 加治 建	4. 巻 52(7)
2. 論文標題 【小児外科臨床研究の基本と展望】C01	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 698 ~ 703
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 -

1. 著者名 鳥飼 源史, 家入 里志, 松久保 眞, 春松 敏夫, 大西 峻, 山田 耕嗣, 川野 孝文, 義岡 孝子, 連 利博, 加治 建	4. 巻 56
2. 論文標題 肝門部結合織に異所性軟骨組織を認めた胆道閉鎖症の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1133 ~ 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.56.7_1133	査読の有無 無
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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Toshio Harumatsu, Toshihiro Muraji, Koshiro Sugita, Masajazy Murakami, Keisuke Yano, Shun Onishi, Koji Yamada, Waka Yamada, Makoto Matsukubo, Mitsuru Muto, Tatsuru Kaji, Satoshi Ieiri
2. 発表標題 Latent non-suppurative cholangitis after Kasai operation for biliary atresia: clinical implications of ubiquitous markers of inflammation
3. 学会等名 ISPSR
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春松 敏夫, 連 利博, 祁答院 千寛, 長野 綾香, 松井 まゆ, 村上 雅一, 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 大西 峻, 山田 耕嗣, 松久保 眞, 武藤 充, 加治 建, 家入 里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症開腹葛西手術改変による黄疸消失率と自己肝生存率に対する予後因子の検討
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春松 敏夫, 連 利博, 祁答院 千寛, 長野 綾香, 松井 まゆ, 村上 雅一, 杉田 光士郎, 矢野 圭輔, 大西 峻, 山田 耕嗣, 松久保 眞, 武藤 充, 加治 建, 家入 里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症葛西術後にみられる胆管炎の病態 非化膿性胆管炎の潜在性検証
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

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 臨床研究 胆道閉鎖症の病因論としての母親決めリズム関連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 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 家入里志、春松敏夫、連利博
2. 発表標題 胆道閉鎖症に対する開腹葛西手術改変による黄疸消失率と自己肝生存率の検討
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 春松敏夫、連利博、杉田光士郎、家入里志
2. 発表標題 双胎例から展開する胆道閉鎖症の病因論
3. 学会等名 第47回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masaki Nio (Ieiri S, Harumatsu T, Muraji T)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 350
3. 書名 Introduction to Biliary Atresia	

〔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
研究分担者	連 利博 (MURAJI Toshihiro) (20140444)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (17701)	
研究分担者	山田 和歌 (YAMADA Waka) (20457659)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (17701)	
研究分担者	加治 建 (KAJI Tatsuru) (50315420)	久留米大学・医学部・教授  (37104)	
研究分担者	春松 敏夫 (HARUMATSU Toshio) (70614642)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教  (17701)	
研究分担者	武藤 充 (MUTO Mitsuru) (70404522)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師  (17701)	

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