

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08622

研究課題名（和文）胆管発生と胆汁うっ滞性障害肝の病態進展におけるSOX9関連シグナル経路の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of SOX9-related signaling pathways in bile duct development and pathological condition of cholestatic liver injury

研究代表者

吉井 大貴（Yoshii, Daiki）

熊本大学・病院・診療助手

研究者番号：00792582

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）：予備実験により、SOX9が胆管の正常な発生に重要な役割を担っている可能性が示唆されたことから、Sox9コンディショナルノックアウト（cK0）マウスを用いた実験を行った。胆管の可視化により、5週齢時、胆管の密度がSox9 cK0マウスで有意に少なく、特に、毛細胆管の描出が乏しいことが分かった。肝壊死巣が散見され、肝酵素の有意な上昇や線維化がみられた。中枢ではCK19陽性胆管の発達に乏しい一方で、末梢では不整形な細胆管の増生が認められた。原因として毛細胆管と細胆管とのネットワーク形成に問題があると考えられ、SOX9が胆管発生に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前研究で行われた細胆管反応の進展メカニズムとSOX9との関連性に関する研究に加えて、本研究では胆管の正常発生にSOX9が関わっている可能性が示された。SOX9はアラジール症候群の原因遺伝子であるNotch2やJagged1が関わるNotchシグナル経路と密接なかかわりのある転写因子である。そのSOX9が持つ役割について新たな知見を見出すことができたことから、胆管発生の複雑なメカニズムの解明に貢献でき、かつ、先天的な胆管発生異常の解明の一助となる研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our preliminary experiments indicated that SOX9 may play a critical role in the normal development of the bile ducts. Therefore, this study was conducted using Sox9 conditional knockout (cK0) mice. Visualization of the bile ducts by clearing the liver revealed that at five weeks of age, the density of the bile ducts was significantly reduced in Sox9 cK0 mice, and in particular, the capillary bile ducts were poorly visualized. Focal hepatic necrosis was observed and the liver enzyme ALT was significantly elevated. In the central region, there was poor development of CK19-positive bile ducts, while in the peripheral region there was an increase in the number of irregular small bile ducts. Periportal fibrosis was also observed. These findings suggested that there may be a problem with the formation of a network between the capillary and small bile ducts. We concluded that SOX9 may contribute to bile duct development.

研究分野：肝臓

キーワード：SOX9 細胆管反応 胆管発生 透明化 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

胆汁うっ滞性肝疾患は、線維化の進展を伴い将来的に不可逆的な肝硬変に進展することがあるだけでなく、救命のために肝移植が行われることもある。胆汁うっ滞性肝疾患の特徴的な病理所見として細胆管反応(ductular reaction, DR)があげられる。DRは、病態の進行に関わっているとされているが、DRのメカニズムは不明確な部分が多い。DR進展メカニズムの解析により、申請者らはSOX9がDRの進展の一部に関与していることを発見している。さらに、SOX9は、現在までに胎生期の胆管成熟化の役割を有していることが明らかになっているが、胆管形態形成には重要ではないとされていた。しかしながら、申請者らは、*Sox9* コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの胆管に異常な表現型を確認した。これは *Sox9* 遺伝子が胆管発生に必須である可能性を示唆する所見であり、胆管発生や肝傷害においても、SOX9やSOX9が関連するシグナル経路について改めて解析する必要があることを意味する。本課題では、主に胆管発生とSOX9との関連について解析し、胆管発生の複雑なメカニズムの解明を目的としている。

2. 研究の目的

本課題では、胆管発生のメカニズムを解明することで、DRがおこる肝傷害に対する新たな治療戦略の構築へとつなげることを目的としている。胆管発生のメカニズムを解明するにあたり、SOX9およびその上流シグナル経路をターゲットとして、マウスを用いた解析を行った。

3. 研究の方法

【使用したマウスライン】

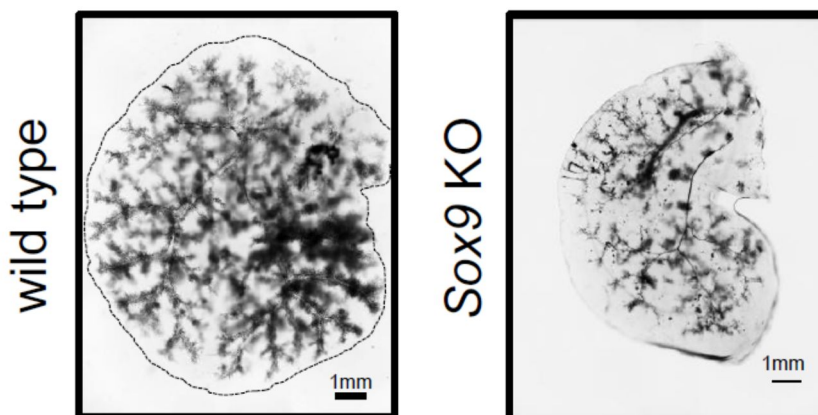
- ・ *Sox9*-floxed マウス: *Sox9* 遺伝子が loxP 配列で挟まれたマウス
 - ・ Alb(アルブミン)-Cre ドライバーマウス: 胎生期においては Alb が発現した細胞(肝芽細胞)において Cre(DNA 組み換え酵素)が活性化されるマウス
- 両マウスラインを交配させ、Alb-cre^{+/+}; *Sox9*-floxed^{+/+} (*SOX9* cKO) マウスを作製した。胆管細胞を供給する肝芽細胞は Alb を発現しているため、肝臓特異的に *Sox9* を KO できる。

4. 研究成果

胆管の形態形成についての解析

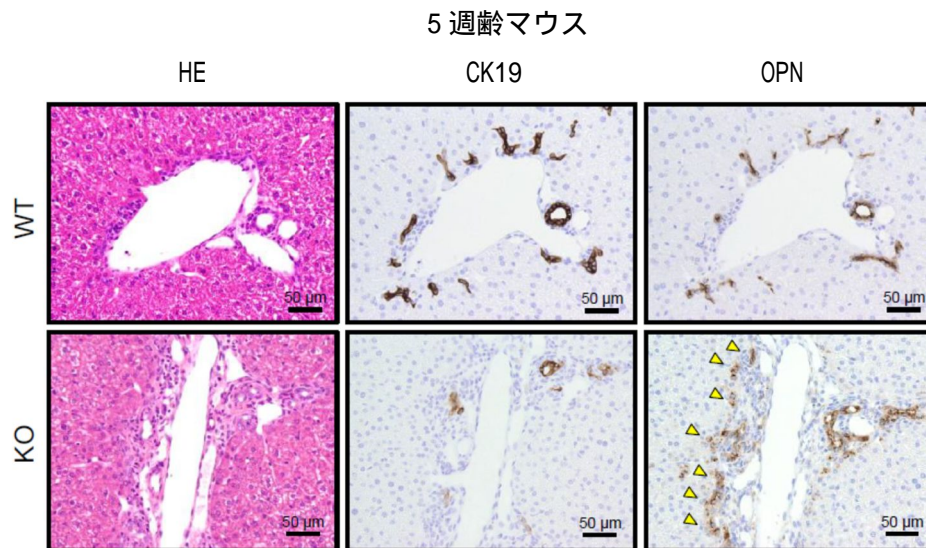
マウスの肝内胆管の形態観察を行うにあたり、透明化試薬を用いた臓器透明化および胆道内へのインク注入を併用して、肝内胆管を可視化した。コントロールマウスと *Sox9* cKO マウスとの比較では、5週齢の時点では、インクで造影された肝内胆管の密度に差が認められ、*Sox9* cKO マウスの特に毛細胆管の描出が不良であった。10週齢の時点では、毛細胆管の描出は増加したが、*Sox9* cKO マウスの描出される肝内胆管の密度は依然として少なかった。

5週齢マウスの透明化した肝組織



胆管の免疫組織化学的な検討

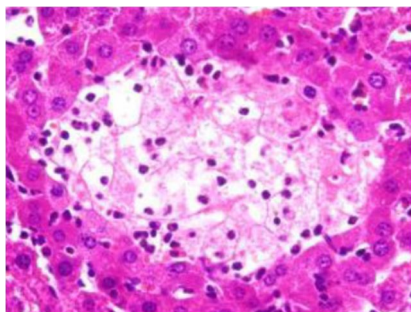
5週齢および10週齢 *Sox9* cK0 マウスの可視化された胆管床に差があったため、免疫組織化学的な検討を加えた。*Sox9* cK0 マウスでは、中枢のCK19陽性胆管が少なく、さらに共焦点顕微鏡を用いた検討においても、門脈周囲のCK19陽性胆管ネットワークが減少していた。門脈域周囲ではOsteopontin(OPN)陽性の肝細胞様細胞が確認された(矢頭)。また、門脈域ではIba1陽性マクロファージの集簇が認められ、picrocirius red染色では、門脈域の線維性拡大が確認された。



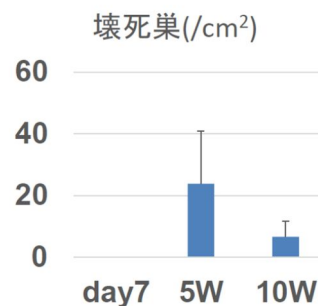
肝傷害についての臨床病理学的検討

Sox9 cK0 マウス肝臓のzone2の周辺では肝壊死巣が散見され、5週齢では血清学的に肝酵素の有意な上昇が確認された。ビリルビン値の増加は認められなかった。二重免疫組織化学では毛細胆管とCK19陽性の細胆管あるいは小葉間胆管との合流する箇所が不明瞭であったことや、インクの逆行性造影で造影される胆管床が少なかったことから、*Sox9* cK0マウスでは、胆管発生の過程で、毛細胆管と細胆管あるいは小葉間胆管との接続に異常がある可能性が示唆された。10週齢になると、肝傷害は軽快し、壊死巣も減少していた。

肝壊死巣 (HE)



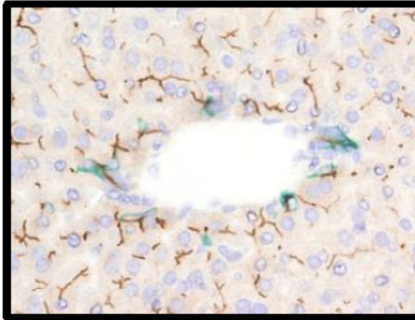
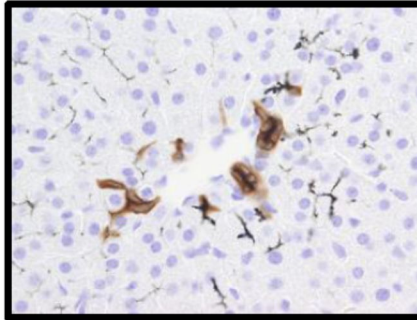
肝壊死巣の個数



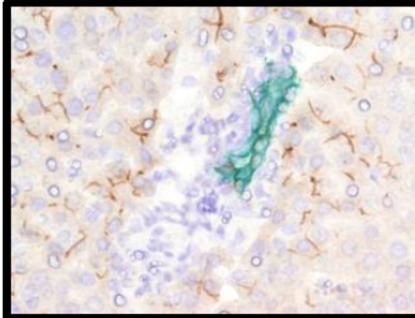
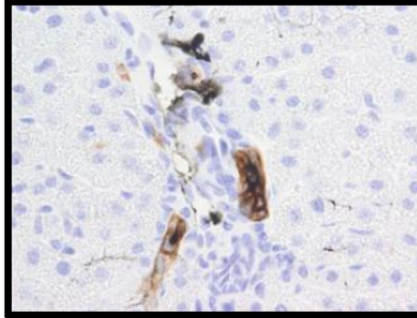
Ink / CK19

CD10 / CK19

コントロール



Sox9 cKO



(左) Ink が充填された細胆管と毛細胆管を示す。Sox9 cKO マウスでは造影される毛細胆管が少ない

(右) CD10 陽性の毛細胆管と CK19 陽性の細胆管との合流が乏しい

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6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 Yoshii Daiki, Shimata Keita, Yokouchi Yuji, Komohara Yoshihiro, Suda Hiroko, Honda Masaki, Yamamura Kenichi, Hibi Taizo, Inomata Yukihiko	4. 巻 35
2. 論文標題 SOX9 contributes to the progression of ductular reaction for the protection from chronic liver injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 721 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-022-00683-8	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 Irie Tomoaki, Yoshii Daiki, Komohara Yoshihiro, Fujiwara Yukio, Kadohisa Masashi, Honda Masaki, Suzu Shinya, Matsuura Toshiharu, Kohashi Kenichi, Oda Yoshinao, Hibi Taizo	4. 巻 11
2. 論文標題 IL 34 in hepatoblastoma cells potentially promote tumor progression via autocrine and paracrine mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1441 ~ 1453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4537	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 Yoshii Daiki, Nakagawa Takenobu, Komohara Yoshihiro, Kawaguchi Hiroaki, Yamada Sohsuke, Tanimoto Akihiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Phenotypic Changes in Macrophage Activation in a Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease using Microminipigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 844 ~ 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.57703	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 Honda Masaki, Kadohisa Masashi, Yoshii Daiki, Komohara Yoshihiro, Hibi Taizo	4. 巻 12
2. 論文標題 Directly recruited GATA6+ peritoneal cavity macrophages contribute to the repair of intestinal serosal injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27614-9	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉井大貴、菰原義弘、三上芳喜
2. 発表標題 SOX9 は正常な肝内胆管の形成過程において鍵となる要素である
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 入江友章、吉井大貴、菰原義弘、松浦俊治、孝橋賢一、小田義直、日比泰造
2. 発表標題 IL-34を介した肝芽腫の腫瘍増殖
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉井大貴、川上史、宮本英明、神力悟、三上芳喜
2. 発表標題 FGFR2 遺伝子異常を有する肝内胆管癌 6 例の後方視的検討
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
研究分担者	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	横内 裕二 (Yokouchi Yuji) (60252227)	熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員 (17401)	
研究 分担者	本田 正樹 (Honda Masaki) (80573609)	熊本大学・病院・助教 (17401)	

	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	平尾 洸樹 (Hirao Hiroki)		

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