

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08628

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能を軸にみる胆道閉鎖肝組織における酸化ストレスの臨床的意義

研究課題名(英文)Clinical significance of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in liver tissue of biliary atresia

研究代表者

岡崎 任晴 (Okazaki, Tadaharu)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30265988

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)：重症な乳児胆汁うっ滞疾患である胆道閉鎖症(BA)では、肝門部空腸吻合術後に黄疸が消失しない場合、肝移植の適応となる。しかし、ドナー不足などの課題が未解決であり、肝予備能と関連する病態解明と治療戦略開発が必要である。本研究は、BA肝組織のミトコンドリア機能低下が肝予備能と関連するかを検証するものである。肝芽腫などの正常肝部分や他の乳児胆汁うっ滞性疾患と比して、ミトコンドリアマトリックスマーカーのHSP60はBA肝組織で発現が低く、電子顕微鏡観察では封入体やクリステ先端の膨化が顕著であることが示された。かつ、BAの中でもHSP60発現が低い症例では後に肝移植を要し、予備能が低いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、BA肝組織におけるミトコンドリア活性と関連するHSP60の発現が組織ダメージのない肝組織や他の乳児胆汁うっ滞疾患と比してBAで低く、かつBAの中でも経過良好な症例と比して自己肝生存しなかった症例で低いことが示された。同時に、電子顕微鏡下にミトコンドリアにダメージを示唆する所見がBAで特に強いことが見受けられ、肝組織内ミトコンドリアは肝予備能と関連する重要な因子であることが示唆された。今後、BA肝内ミトコンドリアの詳細な機能障害を検証し、かつその治療標的としての可能性を探ることで、臨床的に重要な意義が示し得ると思われる。

研究成果の概要(英文)：Biliary atresia is a devastating infantile cholangiopathy due to obstruction of the intrahepatic bile duct and can be treated with portoenterostomy. However, a liver transplant is required in some patients due to prolonged postoperative jaundice. As there is a shortage of liver transplant donors, the development of new treatments is needed to improve liver function reserve. We investigated whether BA's hepatic functional reserve correlates with hepatocellular impaired mitochondrial function. The expression of HSP60, a mitochondrial matrix marker, was lower in BA compared with normal liver such as in patients with hepatoblastoma and other infantile cholestasis diseases. On electron microscopy, inclusion body and swelling of cristae were remarkably increased in BA. In the BA cohort, HSP60 expression was lower in the patients requiring liver transplants than native liver survivors.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 ミトコンドリア HSP60 自己肝生存 封入体 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症 (BA)は原因不明の重篤な新生児・乳児胆汁うっ滞閉塞性肝疾患であり、肝門部空腸吻合術の成績向上に伴い患児らの肝機能予後は今日に至るまで大幅に改善されてきた。しかし、それでも手術後に黄疸が消失しない症例が存在するため(Muraji et al, Hum Immunol, 2018)、新規治療法開発のためにもこれまでに知られていない病態解明が求められる。

近年、BA 患者予後良好群の肝組織では抗酸化物質であるグルタチオンの代謝が亢進しており、ロタウィルス投与による BA モデルマウスに対してグルタチオン前駆体である NAC 投与が肝機能改善に効果的と示された(Luo et al, Gastroenterology, 2019)。これにより、OS による炎症作用が BA への肝機能予後に影響をもたらす可能性がヒト検体を用いた解析で初めて示された。代表者らはこれまで、末梢血幹細胞移植に伴う移植片対宿主病 (GVHD)での肝病理所見と組織学的に類似した肝細胞慢性炎症が BA の術後肝機能と相関し(Suda et al., Pediatr Int, 2019)、さらに原始胆管板形成異常に伴う肝内門脈周囲炎症が肝機能予後不良因子であると発表した(Arii et al., Pediatr Surg Int, 2011)。以上より、代表者らは BA 患者において様々な事象に起因する慢性炎症を増悪させる機序として OS に着眼点を置いた。

ところで OS は主に細胞小器官であるミトコンドリアが制御しており(Jaeschke et al, J Gastroenterol Hepatol, 2011)、OS の下流エフェクター分子として抑制性転写因子の HIF1・NRF2、炎症関連分子の AP-1・NF- κ B などが活性化されるが(Jiang et al, Signal Transduct Target Ther, 2017; Gentile et al, Nutr Res Rev, 2018)、これらの機能不全や発現変容が BA 肝機能へ作用するかを見出した報告はこれまでにない。以上から申請者は、BA の術後慢性炎症に起因する肝機能障害の原因機序として、OS・その制御を担うミトコンドリアの機能不全・および OS シグナルに活性化される下流遺伝子群がそれぞれ個別あるいは連動して関与していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア機能を軸に BA 肝における OS の臨床意義を解明することを目的とした。

目標(1) : BA における OS と臨床パラメータの相関性を検討する。

BA 患者の手術時肝組織を一部生検採取し、OS 因子発現を免疫染色や qPCR で評価し、患者長期予後・血液学的肝機能値との相関性を調べることにした。さらに、胆道拡張症や非 BA 胆汁うっ滞疾患などの非 BA 症例からも肝組織を一部生検採取し、同様に OS 因子の発現を評価して、BA における OS 因子がより高発現であるかを比較する予定とし、OS は BA に対して特異的に慢性炎症を作用させる予後不良因子である可能性を示すことを目標とした。

目標(2) : ミトコンドリア機能・ROS 産生能の評価及び BA との予後相関観察

OS 発生機序を制御するミトコンドリア機能が BA 肝組織において障害を受けている可能性を追求することとした。評価項目として、ミトコンドリア代謝の解析・ATP と ROS 産生能分析・ミトコンドリア膜電位測定・ミトコンドリア DNA コピー数解析を行う予定とし、これら評価項目で得られた値と BA 患者の長期予後・血液学的肝機能値との相関性を調べ、さらに、非 BA 症例肝組織における同項目を評価し BA の結果と比較することとした。これらにより、BA の術後慢性炎症を遷延させる OS の発生機序としてミトコンドリア機能不全が中軸となっている可能性を示すことを目標とした。

目標(3) : OS 下流分子の変容評価・バルク RNA-Seq 解析による新規標的分子の発見

目標(1)(2)を以て、ミトコンドリア機能を軸とした BA における OS 発生の臨床意義が解明されれば、それらシグナル経路で活性化される遺伝子群の発現に変容があるか網羅的に評価することとした。すなわち、OS 由来アポトーシス促進因子である mTOR 複合体関連分子・OS 抑制性転写因子・炎症関連分子・炎症誘発因子の発現を定量 PCR で評価する予定とした。また未報告の OS およびミトコンドリア機能関連因子や、BA の慢性炎症像を説明し得るシグナル経路を模索するために、研究分担者である須田がこれまでに取得した RNA-Seq 解析方法で解析することとし、BA の肝機能予後と相関する遺伝子群やシグナル経路を特定しさらに、非 BA 症例肝組織における RNA-Seq 解析もおこない、BA の結果と比較することを目標とした。

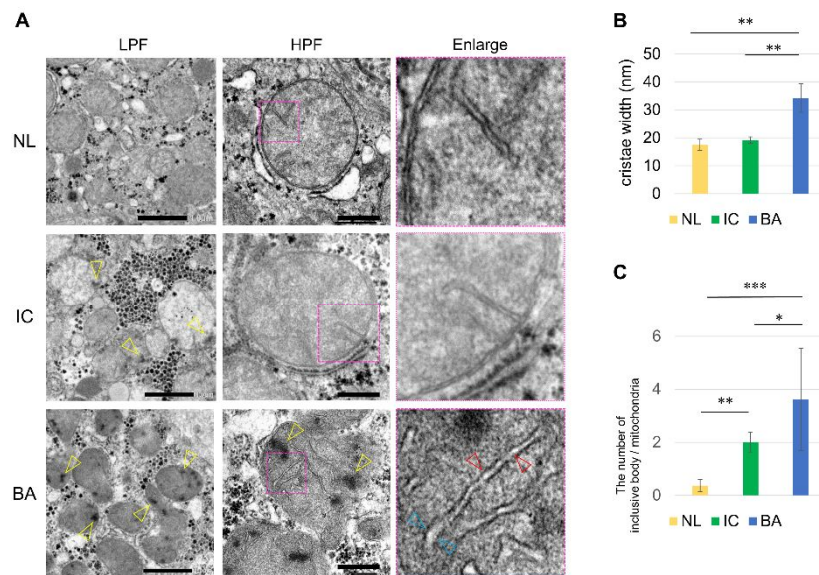
3. 研究の方法

BA と診断された症例の手術時肝組織を用いて、電子顕微鏡による観察と RNA-seq 解析を行い、肝芽腫の正常肝部分や先天性胆道拡張症肝・肝内胆管減少症・Alagille 症候群など胆汁うっ滞疾患と比較した。1981 年 1 月以降の保存肝組織も用いて HSP60 (ミトコンドリアマトリックスマーカー) と ALB (肝細胞マーカー) に対する蛍光免疫染色を行い (各群: 25、15、4 例)、ImageJ で HSP60/ALB の染色範囲を定量化した。HSP60/ALB の発現量 (<1.0) については BA と各群との比較及び BA 群の中でも減黄の有無や自己肝生存の有無による予後との相関性を検討した。

4. 研究成果

本研究では、BA 肝組織におけるミトコンドリア活性と相関する HSP60 の発現が組織ダメージのない肝組織や他の乳児胆汁うっ滞疾患と比して BA で低く、かつ BA の中でも経過良好な症例と比して自己肝生存しなかった症例で低いことが示された。同時に、電子顕微鏡下にミトコンドリアにダメージを示唆する所見が BA で特に強いことが見受けられ (Figure 1)、肝組織内ミトコンドリアは肝予備能と相関する重要な因子であることが示唆された。RNA-seq Gene Ontology 解析では、クリステ形成に重要な CYP11A1 などのマトリックス機能関連分子が、Normal 群と比して BA 群で低発現だった。以上より、BA 肝組織ではミトコンドリアの形態機能障害がみられ、HSP60 発現は特に BA の自己肝生存に重要であることが示唆された。今後、BA 肝内ミトコンドリアの詳細な機能障害を検証し、かつその治療標的としての可能性を探ることで、臨床的に重要な意義が示し得ると思われる。

Figure 1



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤本 隆士、後藤 宏希、鈴木 光幸、宮野 剛、岡崎 任晴、矢崎 悠太、田中 奈々、浦尾 正彦、矢内 俊裕、山高 篤行、古賀 寛之、須田 一人
2. 発表標題 胆道閉鎖症肝におけるミトコンドリア機能障害の臨床的意義
3. 学会等名 第50回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuto Suda, Takashi Fujimoto, Hiroki Goto, Masataka Hida, Masahiro Takeda, Soichi Shibuya, Yuta Yazaki, Nana Tanaka, Go Miyano, Tadaharu Okazaki, Toshihiro Yanai, Masahiko Urao, Mitsuyoshi Suzuki, Hiroyuki Koga, Geoffrey J. Lane, Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 Liver mitochondrial morphology and gene expression as markers of liver reserve. Prognostic implications for native liver survival in biliary atresia.
3. 学会等名 The 57th Annual Pacific association of pediatric surgery meeting (国際学会)
4. 発表年 2024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	有井 瑠美 (Arii Rumi) (50794418)	順天堂大学・医学部・特任准教授 (32620)	
研究分担者	須田 一人 (Suda Kazuto) (60784725)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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