

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08637

研究課題名（和文）細胞死パターンから解明する胆道閉鎖症の病因・病態

研究課題名（英文）Etiology and pathogenesis of biliary atresia elucidated by cell death patterns

研究代表者

佐々木 英之（Hideyuki, Sasaki）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40438461

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：当院でのBAの初回手術時肝生検59例，BA術後肝移植となった摘出肝14例，先天性胆道拡張症(CBD)の手術時肝生検30例の計103例を対象としたnecroptosis関連因子と臨床因子との関連を行ったところ、BA，CBDともに肝内胆管上皮細胞でnecroptosisが認められた。Necroptosis関連因子であるTLR3，RIP1，MLKLの発現もCBD群よりもBA群で有意に高い値を示した。以上よりnecroptosisがBAの病態に関与している事が示唆された。また臨床的な検討では、GTPは、術後早期にはD-Bilと負の相関を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ病因が未解明である胆道閉鎖症の病因・病態におけるネクロプトーシスの関与について検討を行ったことは意義がある。また今回の研究は単にネクロプトーシス関連分子の発現について検討したのみではなく、その臨床経過との比較を行って、一定の知見を得ることができた、という点についても学術的な意義があると考えられる。胆道閉鎖症は小児において肝移植を要する疾患の代表的な疾患であることより、このような研究を進めることは社会的にも意義深いものである。

研究成果の概要（英文）：We examined the association between necroptosis-related factors and clinical factors in a total of 103 cases, including 59 BA liver biopsies at the time of initial surgery, 14 liver explanted for liver transplantation after BA surgery, and 30 liver biopsies at the time of surgery for congenital biliary dilatation (CBD). The expression of TLR3, RIP1, and MLKL was significantly higher in the BA group than in the CBD group. Necroptosis was observed in intrahepatic bile duct epithelial cells in both BA and CBD but not in intrahepatic bile duct epithelial cells in the normal liver of neonates and infants. These results suggest that necroptosis is involved in the pathogenesis of BA. In a clinical study, GTP showed a negative correlation with D-Bil in the early postoperative period and tended to increase during the period of increased bile excretion.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 予後 necroptosis

## 1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は新生児期から乳児期早期に閉塞性黄疸を呈する代表的疾患である。本症に対する治療は肝門部腸吻合術(葛西手術)と肝移植が主体である。葛西手術の成績は術式および周術期管理の進歩で改善し、長期自己肝生存例も増加しているものの、黄疸消失率は全体で60%程度と決して良好とはいえない。術後補助療法としてステロイドの投与が広く行われているが、その有効性および作用機序については不明な点が多い。

本症の特徴として、1)発症時期が新生児期から乳児期早期に限定されていること、2)多くの症例で診断時には肝内において門脈域の拡大から P-P bridging を呈するほどの線維化の進行、3)肝内胆管から肝外胆管まで広範にみられる不可逆的な炎症による破壊、4)門脈域における著明な細胆管増生、5)肝細胞の風船様変化といった強い障害などが挙げられるが、原因は未だ不明である。本症の発症時期は成人とは異なり Th2 が優位という免疫学的特徴を有している。浸潤している炎症細胞の詳細な検討の結果、本症の肝内で Th2 炎症を引き起こす mast cell の浸潤が目立っていることを見いだしている (J Pediatr Surg. 2000 Dec;35(12):1762-5. doi: 10.1053/jpsu.2000.19245.) が、新生児期から乳児期早期に特徴的な免疫環境に注目した検討は多くはない。

また本症における細胞死の研究も盛んに行われており、我々もアポトーシスが本症の肝内胆管で亢進していることを報告している (Pathol Int. 2001 Dec;51(12):923-32. doi: 10.1046/j.1440-1827.2001.01304.x)。

細胞死は以前ではアポトーシスとネクローシスという2つの形式と捉えられていたが、近年はネクローシスの形態をとる制御された細胞死が注目されている。この細胞死の一つであるネクロプトーシスと様々な疾患との関連についての研究が進められており、我々も本症の肝内胆管におけるネクロプトーシスについて一定の知見を得ている。

また様々な疾患におけるエピジェネティック制御の観点から non-coding RNA の関与が注目されており、研究代表者もこれまでの研究で本症の肝組織における microRNA の発現に注目して研究を進めているところである。

近年、胆道閉鎖症の診断に対する新たなバイオマーカーとして血清 IL-33 の有用性が報告された (JPGN 2020 70 (3) 344-349)。さらに興味深いことに IL-33 はネクロプトーシスを起こした細胞が放出する DAMPs の一つであることと、miR-378a-3p が IL-33 発現と関連があることが報告されている (Front Immunol. 2019 Nov 20;10:2449. doi: 10.3389/fimmu.2019.02449. eCollection 2019.)。

「問い」

胆道閉鎖症に認められる炎症性変化の本態とは、細胞死の観点から改めて問い直す。

再生を導く炎症なのか、破壊へとつながる炎症なのか。

この状況を最新の細胞死の視点から明らかにすることで、既存の治療の科学的基盤を得るとともに、新たな治療法へ開発へとつながることが期待される。

## 2. 研究の目的

胆道閉鎖症の病因に関するこれまでのエビデンスをもとに細胞死のプロファイリングから本症の病因・病態を解明することを目的とする。さらに本症の限定された発症時期に特有の免疫環境に着目している点においても、本症の病因・病態解明に迫ることが期待できる。本研究で胆道閉鎖症の病因・病態とアポトーシス/ネクロプトーシスの細胞死パターンとの関連が明らかとなれば、necroptosis inhibitor をはじめとした本症の治療におけるブレイクスルーも期待される。

## 3. 研究の方法

(1)胆道閉鎖症の肝内におけるアポトーシスとネクロプトーシスに焦点を当てた細胞死パターンの解析:アポトーシスとネクロプトーシスとはシグナルを共有しており、Caspase-8 の活性化状態によりそれぞれの細胞死のパターンをとることが知られている。そしてアポトーシスとネクロプトーシスとで細胞死を起こした細胞周囲への影響が大きく異なる。すなわちアポトーシスでは周囲への alarmin の放出は抑えられ、組織修復再生へとつながる反応を惹起するのに対して、ネクロプトーシスは alarmin の放出から炎症惹起、肝線維化へとつながる反応を引き起こすことが想定される。従って本症の肝内におけるアポトーシスとネクロプトーシスの状況を免疫組織化学による形態的評価を行い、本症の細胞死パターンからの病因・病態の理解を深めることができる。

(2)細胞死パターンと臨床状況との比較:上記で確認された細胞死パターンが臨床状況にどのような影響を与えているかを検討する。

## 4. 研究成果

胆道閉鎖症(以下 BA)は新生児期から乳児期早期に閉塞性黄疸を呈する代表的疾患であり、その原因は未だ不明の難治性疾患である。 当院での BA の初回手術時肝生検 59 例、BA 術後肝移植となった摘出肝 14 例、先天性胆道拡張症(CBD)の手術時肝生検 30 例の計 103 例を対象とした necroptosis 関連因子と臨床因子との関連を行ったところ、BA、CBD とともに肝内胆管上皮細胞で necroptosis が認められたが、新生児、乳児の正常肝の肝内胆管上皮細胞では認められなかった。Necroptosis 関連因子である TLR3、RIP1、MLKL の発現も CBD 群よりも BA 群で有意に高い値を示した。BA、CBD とともに肝内胆管上皮細胞で necroptosis が認められたが、新生児、乳児の正常肝の肝内胆管上皮細胞では認められなかった。以上より necroptosis が BA の病態に関与している事が示唆された。また臨床的な検討として、胆道閉鎖症における胆汁分泌活性の指標としての YGTP の意義を検討したところ、GTP は、術後早期には D-Bil と負の相関を示すこと、とくに胆汁排泄が増加する時期に上昇する傾向がみられることより、本症の術前・術後早期においては、胆汁うっ滞の指標としてより胆汁分泌活性の指標としての意義が大きい可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Sasaki Hideyuki, Nio Masaki, Ando Hisami, Kitagawa Hiroaki, Kubota Masayuki, Suzuki Tatsuya, Taguchi Tomoaki, Hashimoto Takashi, The Japanese Biliary Atresia Society	4. 巻 28
2. 論文標題 Anatomical patterns of biliary atresia including hepatic radicles at the porta hepatis influence short and long term prognoses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 931 ~ 941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.989	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木英之、大久保龍二、和田基、福澤太一、工藤博典、安藤亮、遠藤悠紀、遠藤龍眞、仁尾正記
2. 発表標題 胆道閉鎖症における肝脾容積と病態の関連についての検討
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本昌俊、仁尾正記、笹野公伸
2. 発表標題 Necroptosis in Biliary Atresia of the liver Necroptosis in Biliary Atresia of the liver
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保龍二、佐々木英之、福澤太一、工藤博典、安藤 亮、遠藤悠紀、遠藤龍眞、仁尾正記、和田 基
2. 発表標題 胆道閉鎖症における胆汁分泌活性の指標としてのYGTPの意義
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 英之、大久保龍二、和田 基、福澤太一、工藤博典、安藤 亮、遠藤悠紀、仁尾正記
2. 発表標題 胆道閉鎖症の年長例に対する肝移植適応について
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 佐々木 英之、大久保龍二、和田 基、福澤太一、工藤博典、安藤 亮、遠藤悠紀、仁尾正記
2. 発表標題 胆道閉鎖症における肝脾容積と病態の関連についての検討
3. 学会等名 第48回日本胆道閉鎖症研究会
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
研究分担者	工藤 博典 (Kudo Hironori)  (00723032)	東北大学・医学系研究科・助教  (11301)	
研究分担者	大久保 龍二 (Okubo Ryuji)  (00791865)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	
研究分担者	橋本 昌俊 (Hashimoto Masatoshi)  (20897954)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師  (11301)	

#### 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
---------	---------