

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791495

研究課題名(和文)胆道閉鎖症の肝組織におけるテロメア長の解析

研究課題名(英文)Hepatocellular Telomere Length in Biliary Atresia

研究代表者

眞田 幸弘 (Sanada, Yukihiro)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60406113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症の自己肝は肝硬変であり、長期生存率は低いとされているが、今回の研究で、胆道閉鎖症のテロメア長は肝硬変の進行に関わらず著明に短縮していることが明らかになった。したがって、胆道閉鎖症の自己肝の予備能は低く、将来の癌化や肝不全への進行が予測された。肝移植適応を迷う胆道閉鎖症においてテロメア長が短い場合、自己肝の予備力が低いことを反映しているため肝移植を考慮すべきであり、また、テロメア長は肝細胞の障害程度の客観的指標となりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：As the native liver of biliary atresia patients is cirrhotic and the long-term survival rate of such patients with their native liver is low, coupled with the fact that extremely short telomeres are associated with subsequent carcinogenesis and organ failure, it can be said that prominent telomere shortening in the hepatic tissue of biliary atresia patients in comparison with normal controls supports the early implementation of liver transplantation, regardless of the degree of liver cirrhosis. Telomere length analysis using quantitative fluorescence in situ hybridization could be an objective indicator of hepatocellular reserve capacity in patients with biliary atresia, and excessive telomere shortening supports the early implementation of liver transplantation.

研究分野：一般外科

科研費の分科・細目：移植外科学

キーワード：テロメア 胆道閉鎖症 肝移植 Q-FISH法 Southern blot法 PELDスコア

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道閉鎖症は出生1万に1人の稀な疾患であり、出生後から乳児早期に発症する閉塞性黄疸を主徴とする小児肝胆道系疾患の中では、最も頻度が高い。治療として肝門部空腸吻合術が全世界的に採用されているが、肝門部空腸吻合術を施行しても、その半数以上で胆汁うっ滞による肝硬変の進行や繰り返す胆管炎、消化管出血などの門脈圧亢進症、致命的となる肺血管合併症を認め、肝移植を余儀なくされる。現在、小児肝移植の対象となる疾患の約70%が胆道閉鎖症であり、肝門部空腸吻合術後の移植適応時期の決定は非常に重要である。しかし、実際の肝移植適応時期に関しては、移植医と小児科医、小児外科医の間で一定のコンセンサスを得られていない。現在のところ細胞生物学的に肝細胞の障害程度を正確に反映する指標はなく、蛋白合成能やビリルビン値、凝固機能などで代用(PELDスコア: Pediatric end-stage liver disease score)することにより肝予備能を把握している。しかし、PELDスコアで肝予備能が期待されても、繰り返す胆管炎、消化管出血などの門脈圧亢進症、肺血管合併症を合併することがあり、正確な肝予備能の指標としては不十分である。

(2) ヒト体細胞において、テロメアは染色体の末端に存在するTTAGGGの6塩基を単位とする反復配列からなり、染色体内遺伝子の恒常性維持に関与している。また、染色体の安定化や複製に関与している構造物であり、細胞分裂のたびに、末端複製問題により、その長さを短縮することが知られている。つまり、生存するための限界の長さ(6kbp)にまで短縮すると分裂限界に至りアポトーシスにより細胞死を迎えるため、テロメア長の短縮は細胞老化の指標とされている。慢性肝疾患や肝硬変、肝細胞癌においてテロメア短縮は報告されているが、胆道閉鎖症ではその報告はない。胆道閉鎖症の肝細胞は必然的に継続的な胆汁うっ滞を認めるため、胆汁うっ滞による慢性肝障害とそれに引き続く細胞増殖によりテロメア長の短縮をきたすことが予想される。したがって、肝門部空腸吻合術後の肝細胞の障害程度の指標として、テロメア長を用いて肝予備能を評価することができると思われる。

2. 研究の目的

細胞老化や細胞障害の指標とされるテロメア長が、胆道閉鎖症において肝予備能の客観的指標となりうるかを検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) [概略] 本研究では、Southern blot法と組織Q-FISH法を用いて胆道閉鎖症の肝細胞のテロメア長を評価し、さらに細胞老化のマーカーである老化関連-galactosidase

(SA- β -Gal)染色を行い、老化細胞を検出した。そして、胆道閉鎖症において、テロメア長が肝移植適応の指標になりうるかを検討した。

(2) [対象] 肝移植時に摘出された胆道閉鎖症の肝組織(20例)と、正常コントロールとして乳児剖検例の肝組織(10例)を用いた。

(3) [Southern blot法] ゲノムDNAは、プロテアーゼKとドデシル硫酸ナトリウムを用いた標準方法を用いて抽出した。Hinf-Iで切断されたDNAのTerminal restriction fragment(TRF)の長さは、標準Southern blot法によって測定した。本研究では、Telometric software package version 1.2 (Fox Case Cancer Center, USA)を用いて、TRFの長さや分布を測定した。TRF値は正規分布を示さなかったため、TRFの中央値をテロメア長とした。

(4) [Q-FISH法] 肝組織を6時間中性ホルマリンに固定し、次に、標準組織処理を行い、パラフィン包埋した。組織標本として、2 μ mに薄切し、病理組織学的評価(Hematoxylin-Eosin染色)とQ-FISHを行った。テロメアでラベルされたPNAプローブと、セントロメアでラベルされたPNAプローブを用いて組織切片を80 \times で3分間ハイブリダイズした。室温で1時間ハイブリダイズした後、核をDAPIにて染色し、Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)を用いて、スライドを作製した。Q-FISHのデジタル画像は、CCDカメラを使って取り込み、DAPI/FITC/Cy3のtriple band-pass filterと40倍接眼レンズを備えた蛍光顕微鏡で撮影した。その後、テロメア解析ソフト(Image-Pro Plus: version 5.0, Media Cybernetics Co Ltd, Silver Spring, MD)で解析し、個々の細胞のテロメア、セントロメアの蛍光光度を測定し、テロメアとセントロメアの蛍光光度比(TCR: telomere centromere ratio)を求めた。そして、スライド作製に伴うサンプル間の誤差をなくすために、同一切片上にセルブロックとしてヒト胎児肺由来線維芽細胞(TIG-1: 34集団倍加レベル、8.6 kbp)の2 μ mのパラフィン切片を載せ、各細胞のTCRをセルブロックのTCRで除してNTCR (Normalized TCR)を求めた。NTCRの中央値をテロメア長とした。

(5) [SA- β -Gal染色] 凍結された肝組織を8 μ mに薄切し、リン酸緩衝生理食塩水10%ホルマリンで1分間固定後、水洗し、SA- β -Gal染色液に37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。水洗後、ケルン・エヒトロートでカウンター染色を行って、スライドを作製した。老化細胞では細胞質が青に染色され、10%未満の陽性細胞の存在を陰性グループ、10%以上の陽性細胞の存在を陽性グループと定義した。

(6) [統計学的解析] 胆道閉鎖症と正常コントロールである乳児剖検例の NTCR と TRF の関係、SA-β-Gal と PELD スコアの関係は、Mann-Whitney U-test を用いて解析した。胆道閉鎖症児の肝細胞の NTCR と PELD スコアの関係は、Pearson's correlation coefficient and single regression analysis を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) [病理組織学的評価] 胆道閉鎖症は全例多くの炎症細胞浸潤や間質細胞浸潤を伴う胆汁性うっ滞性肝硬変を呈していた。正常コントロールである乳児剖検例は、軽度リンパ球浸潤と髓外造血を認めた。

(2) [Southern blot 法] 胆道閉鎖症と乳児剖検例の TRF は同様の分布を示し、胆道閉鎖症の TRF は中央値 13.8kb (10.9-15.9) であり、乳児剖検例の TRF は中央値 13.5kb (10.3-13.5) であった。胆道閉鎖症と乳児剖検例の TRF の間に有意差を認めなかった (p=0.425)。

(3) [Q-FISH 法] 胆道閉鎖症の NTCR は乳児剖検例の NTCR に比べて有意に小さく、テロメア長は有意に短縮していた (p<0.001)。胆道閉鎖症の NTCR と PELD スコアの回帰分析を行ったところ、PELD スコアが高値であるほど BA のテロメア長は有意に短縮していた (p<0.001)。

(4) [SA-β-Gal 染色] 胆道閉鎖症 20 例の中で、陽性細胞は 7 例 (35.0%) に認めた。胆道閉鎖症における SA-β-Gal 陽性グループの平均 PELD スコアは 23.1 であり、陰性グループの平均 PELD スコアは 4.3 であった。胆道閉鎖症における SA-β-Gal 陽性グループで有意に PELD スコアが高値であった (p <0.001)。

(5) [考察] 本研究は Southern blot 法および Q-FISH 法を用いて、胆道閉鎖症と正常コントロールである乳児剖検例の肝組織のテロメア長を測定し、比較解析した。胆道閉鎖症の肝組織は、肝細胞、慢性炎症細胞および線維芽細胞のように様々な細胞を含んでいるため、肝細胞傷害を正確に評価するには細胞を特異的に評価できる方法で、テロメア長を測定することが必要である。Southern blot 法は、肝組織中の各細胞を特異的に測定できないが、Q-FISH 法は、細胞を特異的に分析できるため、胆道閉鎖症のような肝細胞の数倍もの間質細胞が存在する組織におけるテロメア長の測定においては、肝細胞のみを選択的に測定できる Q-FISH 法を用いることが重要である。

肝臓領域における Q-FISH 法を用いたテロメア研究は、慢性肝疾患や肝細胞癌においてテロメア長が短縮していると報告されている。

一方、テロメア以外の細胞老化マーカーとしては、SA-β-Gal 染色が知られており、簡便に細胞老化を起こした老化細胞を検出できるマーカーとして現在まで広く用いられている。本研究では、Q-FISH 法を使用して、胆道閉鎖症の肝細胞のテロメアが過度に短縮していることと、PELD スコアの進行とともに、テロメア長短縮が進行することを証明し、更に、老化細胞の存在を SA-β-Gal 染色においても確認した。これは、胆道閉鎖症のテロメア長の短縮は、生後より存在する肝硬変と胆汁うっ滞の進行によりテロメアが短縮する可能性を示唆しており、肝細胞のテロメアは肝細胞傷害の客観的指標になると考えられた。

肝門部空腸吻合術後の自己肝による胆道閉鎖症の 10 年生存率は 31-60% であり、20 年生存率は 23-48% である。死因はほとんどが肝不全であり、これは、BA は正常児に比べて肝予備能が低いことを示唆する。一方で、胆道閉鎖症の肝移植後 10 年生存率は、90-95% であり、肝移植による根治性が認識されている。PELD スコアは肝不全の進行を把握するために、非侵襲的で有用なマーカーであるが、PELD スコアが低い症例であっても、難治性胆管炎や門脈圧亢進症、肝肺症候群、門脈肺高血圧症などによって、肝移植が適応になることはある。したがって、肝予備能をより正確に反映するマーカーが求められるが、テロメアや SA-β-Gal 染色などの老化関連マーカーはそれらのマーカーとして期待される。本研究では、PELD スコアが高値であるほど胆道閉鎖症の肝細胞のテロメア長は有意に短縮しており、PELD スコアの有効性が支持されたが、胆道閉鎖症のテロメア長は PELD スコア値に関係なく、正常コントロールに比べて非常に短い。これは PELD スコアが低くても胆道閉鎖症は自己肝の予備能が低いことを反映し、テロメア長が短い胆道閉鎖症に対しては、早期肝移植の適応を考慮すべき結果であると考えられた。

(6) [結語] 本研究の Q-FISH 法を用いたテロメア長測定は、現時点では、限られた施設でしか測定できないため、普遍的な研究や検査という面で劣る。しかしながら、本研究の Q-FISH 法は、肝細胞のみのテロメア長を測定できるため、組織全体を測定する Southern blot 法に比べて、より正確に細胞傷害や細胞老化を評価できると考えられる。今後、本研究の Q-FISH 法の普及が期待される。

胆道閉鎖症の自己肝は肝硬変であり、長期生存率は低いとされているが、今回の研究で、胆道閉鎖症のテロメアは肝硬変の進行に関わらず著明に短縮していることが明らかとなった。これは、BA の自己肝の予備能は低く、将来の癌化や肝不全への進行が予測されるため、肝組織のテロメアが短い胆道閉鎖症に対しては、早期肝移植の適応を考慮すべき指標になると思われた。しかし、肝移植後のグ

ラフト肝の長期予後や細胞老化に関しては、
解明されていないのが現状であるため、今後は
肝移植後のグラフト肝のテロメア研究を
行うことによって、肝移植後の長期予後を明
らかにすることが重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Sanada Y, Aida J, Kawano Y, Nakamura K,
Shimomura N, Ishikawa N, Arai T, Poon
SS, Yamada N, Okada N, Wakiya T,
Hayashida M, Saito T, Egami S,
Hishikawa S, Ihara Y, Urahashi T,
Mizuta K, Yasuda Y, Kawarasaki H,
Takubo K. Hepatocellular Telomere
Length in Biliary Atresia Measured by
Q-FISH. World J Surg. 2012
Apr;36(4):908-16. doi:
10.1007/s00268-012-1453-z.

[学会発表](計 3 件)

眞田幸弘, 相田順子, 川野陽一, 仲村賢
一, 泉山 - 下村七生貴, 石川直, 山田直
也, 岡田憲樹, 脇屋太一, 井原欣幸, 江
上聡, 菱川修司, 浦橋泰然, 水田耕一,
河原崎秀雄, 田久保海誉. 胆道閉鎖症の
肝組織におけるテロメア長の解析. 第 10
回自治医科大学シンポジウム. 2011 年 9
月 2 日. 栃木県下野市.

眞田幸弘, 相田順子, 川野陽一, 下村七
生貴, 仲村賢一, 石川直, 新井富生, 山
田直也, 岡田憲樹, 脇屋太一, 井原欣幸,
浦橋泰然, 水田耕一, 田久保海誉. 胆道
閉鎖症の肝組織における細胞老化関連
-galactosidase の解析. 第 101 回日本病
理学会総会. 2012 年 4 月 28 日. 東京都.

眞田幸弘, 浦橋泰然, 井原欣幸, 脇屋太
一, 岡田憲樹, 山田直也, 平田雄大, 水
田耕一. 胆道閉鎖症の肝組織における細
胞老化関連マーカーの解析. 第 40 回日本
胆道閉鎖症研究会. 2013 年 11 月 16 日.
茨城県水戸市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 幸弘 (SANADA, Yukihiro)

自治医科大学・移植外科・助教

研究者番号: 60406113