

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592692

研究課題名(和文)胆道閉鎖症における制御性T細胞の機能解析

研究課題名(英文) Numerical and Functional Analyses of Regulatory T Cells in Biliary Atresia.

研究代表者

齋藤 武 (Saito, Takeshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20406044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症(Biliary Atresia:BA)の全身・局所免疫におけるTh17/Treg細胞の相互関係とTreg機能につき、flowcytometry, real-time PCR, 免疫組織化学染色にて検討した。BAでは術前血清中Treg分画が低下し、局所ではFoxP3 mRNAが高発現していた。Tregの肝内分布は門脈域に集中しており、全身から局所にTregが動員され病態に關与していることが推測された。またBAではTregの増殖抑制能が低下していることが示唆された。Th17/Treg関連サイトカインは血中濃度と肝内mRNA発現ともに有意差を認めず、両者の不均衡は明らかでなかった。

研究成果の概要(英文)：Relationship of Th17 and Treg in the systemic and local immune environment of biliary atresia (BA) was investigated. Significantly lower frequency of Treg (CD4+CD25+) population in the preoperative systemic circulation, higher mRNA expressions of FoxP3, representative Treg transcriptional factor, in the liver tissue, and the focal distribution of FoxP3 mRNA centering on the portal area, in patients with BA, showed that Treg migrated from the systemic circulation into the liver, especially portal area, demonstrating the possible involvement of Treg in the development and progression of BA. However, there was no evidence for significantly activated Th17-related immunological loop based on the results from plasma concentration analysis by flowcytometry and hepatic mRNA expressions by real-time PCR, concerning Th17 representative cytokines, negating the Th17-related proinflammatory process. Moreover, Treg suppression assay showed the comparatively lower Treg functions in progressive BA.

研究分野：小児外科学

キーワード：制御性T細胞 胆道閉鎖症 サイトカイン 炎症制御 免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 獲得免疫の一翼を為すヘルパーT細胞は、Th1/Th2系 subset として相補的に作用することで全身と局所の炎症を特徴づけるとされてきた。近年新たな subset である制御性T細胞(Regulatory T cell: Treg)と Th17細胞(Th17)が存在することが判明し、両者のreciprocalな関係が病態の形成と進行に影響することが明らかとなった。とりわけ Tregは全身や局所の免疫寛容を成立させる重要な因子であるが、全身もしくは局所におけるTregの絶対数や機能の低下が炎症を促進し、原発性胆汁性肝硬変や自己免疫性肝炎を重症化することが判明した。

(2) 胆道閉鎖症(Biliary Atresia: BA)の病因として従来ウイルス感染説、ductal plate malformation説、maternal microchimerismなどが提唱されてきたが決定的な結論は得られていない。その病態は肝胆道での原因不明の炎症の惹起と増悪であり、宿主の肝胆道の免疫系が破綻し免疫寛容が損なわれた状態であるとの指摘がなされていた。Th1 paradigm への偏向という視点から、肝胆道組織におけるCD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T細胞分布やサイトカイン発現を調べたり、ELISA法で血中サイトカイン濃度を測定した報告は散見されてきた。しかし免疫系の制御因子であるTregに焦点をあて、TregとTh17のimbalanceを念頭に置き病態を説明しようとする報告は皆無であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胆道閉鎖症(Biliary Atresia: BA)患児における、炎症機転や感染防御に関わるTregの意義と機能を解析することである。最近注目されているTregとTh17のreciprocalな関係を明らかにし、病態の中心をなす肝内外胆道の炎症性閉塞を予防もしくは制御する可能性を探る。

### 3. 研究の方法

(1) Flowcytometryを用い全身免疫環境下(血液検体)におけるTh17とTregの代表的サイトカインの濃度を解析した。BA16例の術前血清を用いTh17サイトカインであるIL-17AとTreg関連サイトカインであるIL-10濃度を測定し、正常コントロール群(normal control: NC)13例・胆汁鬱滞性コントロール群(cholestatic control: CC)15例と比較した。

(2) TGF- $\beta$ はTregとTh17細胞両者の分化に必須である。一方Tregへの分化を促進・抑制するサイトカインとして各々IL-2・IL-6が知られ、これらはTh17細胞への分化に対しては各々抑制・促進に働く。また活性化したTregはTGF- $\beta$ ・IL-10を、Th17細胞はIL-17A/F・IL-21・IL-22を産生する。これらcytokineとTregのマスター転写因子であるFoxP3の肝組織におけるmRNA発現量を、real-time PCRを行い分析する。BAとnonBA群各10例を用いmRNAレベルをreal-time PCR法で測定した。BAとcontrol群間で発現量に著しい相違を認めたcytokineを取りあげ、特異抗体を用い免疫を行う。

(3) BAにおけるTregの意義を探るため、FACSにて末血CD4<sup>+</sup>Tリンパ球中に占めるCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞(Treg)のpopulationを測定した。BAはいずれも術前検体で採取日齢は22-98(中央値57)日で、control群4例における採取日齢は45-200(中央値70)日であった。control群はいずれも非手術症例で、血液採取時炎症反応は陰性であった。

(4) CFSE suppression assayにて、TregによるCFSE標識T細胞の増殖抑制能を調べた。まず全血よりficollを使って末血単核球成分をよりわけ、ビーズを用いてTreg(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)とCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>を分離した。1well中に $3.0 \times 10^4$ 個のT細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞)を撒布し $6.0 \times 10^3$ 個のTregを添加、resting状態にあるT細胞を刺激するためCD3/CD28とrIL-2を加え3日間

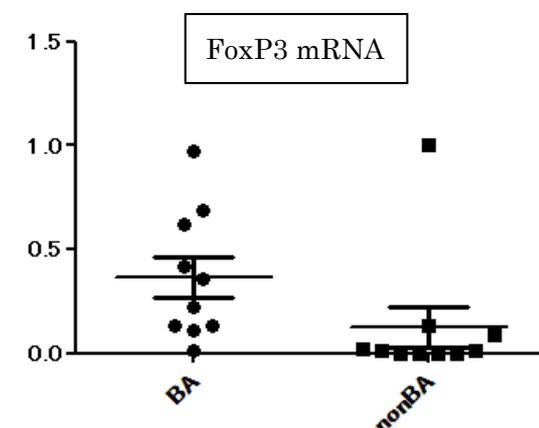
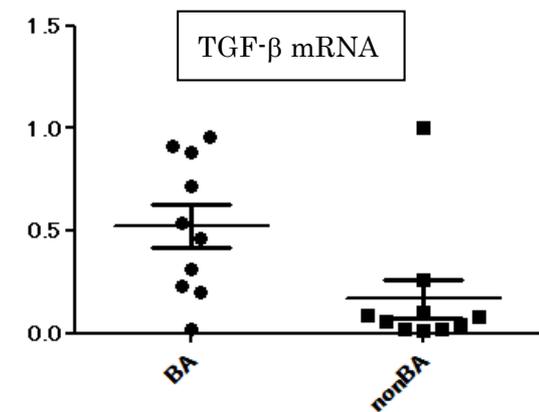
培養した。特定の CFSE 減衰 (4 回分裂) を示した Treg 細胞の割合 (M4, %) を計測した。実験開始当初は放射性同位元素を用いた proliferation assay を試みたが、手技が煩雑であり手間がかかることから、蛍光標識 CFSE を用いた上記手法を選択した。

(5) Treg の表面マーカーとして CD8<sup>+</sup>FoxP3 T 細胞 (J Immunol 2007;179:4323)、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T 細胞や  $\gamma\delta$ T 細胞、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>[natural killer T (NKT)] 細胞の免疫抑制能も注目されている (Hepatology 2010;52:999)。naïve T cell は TGF- $\beta$  と IL-2 刺激により Treg に分化するが、FoxP3 はその際発現する転写因子である。Treg の標的細胞であるヘルパー T 細胞、細胞障害性 T 細胞、樹状細胞は各 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>、CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>、CD123<sup>+</sup> をマーカーとする。これらの特異抗体を用い二(多)重染色を行って、各細胞の肝における局在と population を分析する。本実験では Th17 細胞の局在と多寡を調べ、Treg や Treg-like T 細胞との関連を検討する。Th17 細胞のマーカーとして CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t を用いる。検体は BA の葛西術時に採取した肝組織 4 例 (手術日齢中央値 58 日) と、control 群として先天性胆道拡張症 (CBD) 例の肝組織 3 例 (手術日齢中央値 2 歳) を用いた。

#### 4 . 研究成果

(1) BA, NC, CC 群の各サイトカイン濃度(平均  $\pm$  SE)は IL-10  $1.18 \pm 1.02$ ,  $2.71 \pm 2.71$  ( $p=0.77$ ),  $3.47 \pm 2.23$  ( $p=0.52$ ) であり、IL-17A は順に  $10.1 \pm 10.1$ ,  $7.0 \pm 7.0$  ( $p=0.96$ ),  $21.1 \pm 15.3$  ( $p=0.54$ ) であった。

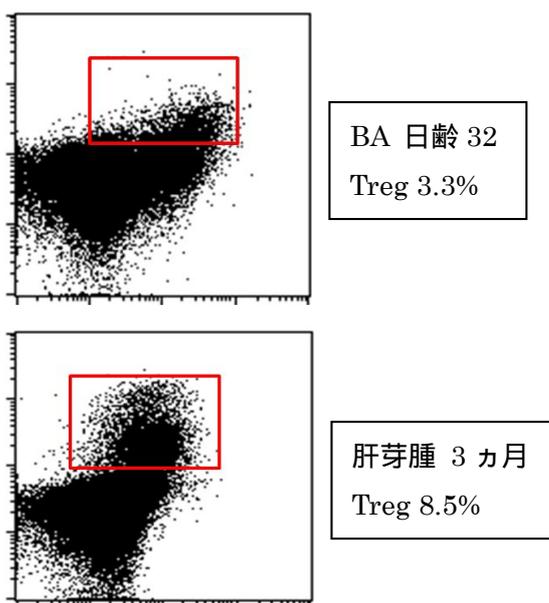
(2) 肝組織中の mRNA 発現は BA, nonBA の順に TGF- $\beta$   $0.57 \pm 1.10$ ,  $0.17 \pm 0.10$  ( $p=0.02$ ), FoxP3 で  $0.42 \pm 0.11$ ,  $0.13 \pm 0.10$  ( $p=0.01$ ) であった。



さらに IL-2 は  $0.83 \pm 0.42$ ,  $0.37 \pm 0.30$  ( $p=0.04$ ) と BA 群で有意に高く、逆に IL-6 は  $0.15 \pm 0.23$ ,  $0.35 \pm 0.18$  と BA で低値を示す傾向が観察された。Th17 関連サイトカインでは、IL-17A  $1.42 \pm 0.42$ ,  $18.8 \pm 17.8$  ( $p=0.86$ ), IL-17F  $0.57 \pm 1.10$ ,  $0.43 \pm 0.60$  ( $p=0.52$ ), IL-21  $0.21 \pm 0.15$ ,  $0.17 \pm 0.10$  ( $p=0.36$ ), IL-22  $0.97 \pm 0.30$ ,  $0.38 \pm 0.17$  ( $p=0.02$ ) であり、IL-22 以外総じて BA/nonBA の二群間で有意差はみられなかった。TGF- $\beta$ , FoxP3, IL-2, IL-6 および IL-17F につき BA における局在を確認すると、門脈域のうち細胆管に近接するように FoxP3 と IL-2 が存在し、IL-6 と IL-17F は門脈域と小葉域の境界にわずかに発現する程度であった。一方 TGF- $\beta$  は門脈域同士を連絡する間質に主として分布し FoxP3 と IL-2 が集中する箇所に集簇する傾向にあった。

(3) 術前 BA の Treg population は  $3.1 \pm 2.6\%$ 、

control 群のそれは  $7.2 \pm 2.1\%$  であり、両群間に有意差が認められた ( $p=0.03$ )。日齢が Treg population 分画に与える影響を検討するため日齢 70 を境に日齢 70 未満、以上の二群に分けると日齢 70 未満  $3.8 \pm 3.3$ 、日齢 70 異常  $5.6 \pm 2.4$  となり日齢が小さいほど Treg 分画が低値を示す傾向は見られたが有意差は生じなかった ( $p=0.43$ )。



(4) コントロール (卵巣嚢腫日齢 6) では M4 分画は 23% 存在したが、Treg 添加 ( $6.0 \times 10^3$  個) により 9% に抑制された。BA I cyst 胎児診断例 (日齢 4) は M4 が 29% 存在したが、Treg を添加しても 32% のままであった (triplet の mean,  $p=0.02$ )。一方 3 倍量の Treg を加えると ( $1.8 \times 10^6$  個)、M4 は 20% に抑制された。また日齢 65 の BA 患児で同様の検討を行うと、Treg 無 27%、Treg 有 26% であり、3 倍量 Treg 添加により 17% に抑制された。

(5)  $CD8^+$ FoxP3<sup>T</sup> 細胞、 $CD8^+$ CD28<sup>T</sup> 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞は、BA/CBD とともに肝内に極わずかに存在しているに過ぎず、両者間の肝内分布細胞数と局在には有意差はみられなかった。一方、 $CD3^+$ CD56<sup>+</sup>[natural killer T (NKT)] 細胞は BA の門脈域、特に細胆管増生が旺盛な箇所での分布が顕著であり、その  $CD3^+$ CD56<sup>+</sup>/CD3 の ratio は BA で  $0.65 \pm 0.31$ 、CBD で  $0.13 \pm 0.28$  を示し、有意差が認

められた ( $p=0.04$ )。 $CD4^+$ CD25<sup>+</sup>FoxP3 の分布 ( $CD4^+$ CD25<sup>+</sup>FoxP3/ $CD3^+$ ) は門脈域 BA  $0.95 \pm 0.24$ 、CBD  $0.32 \pm 0.16$  ( $p=0.03$ )、小葉域では BA  $0.35 \pm 0.25$ 、CBD  $0.13 \pm 0.10$  ( $p=0.02$ ) であり、門脈域・小葉域とも有意に BA で分布が密となっていた。樹状細胞 ( $CD123^+$ ) の存在部位は主として門脈域であり、門脈域 1 個あたりの CD123 陽性細胞数は、BA  $10.6 \pm 5.7$ 、CBD  $3.7 \pm 2.7$  で有意に BA で高値を示した ( $p=0.01$ )。さらに BA 肝における Treg 関連細胞との局在を調べると、樹状細胞を取り囲むように  $CD4^+$ CD25<sup>+</sup>FoxP3 細胞と  $CD3^+$ CD56<sup>+</sup> 細胞が存在し、同部に近接して増殖旺盛な細胆管が存在した。一方 Th17 細胞マーカーである  $CD4^+$ ROR $\gamma$ t は門脈域、小葉域いずれにも散発的に認められたが、領域間での分布個数に有意差は見られなかった。門脈域での個数 ( $CD4^+$ ROR $\gamma$ t/ $CD4^+$ ) は BA  $0.27 \pm 0.20$ 、CBD  $0.11 \pm 0.15$  で、BA で多く分布する傾向はあったが有意差はなかった ( $p=0.84$ )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. [Saito T](#), Terui K, [Mitsunaga T](#), Nakata [M](#), Yoshida H. (5 人 1 番目) Evidence for Viral Infection as a Causative Factor of Human Biliary Atresia. J Pediatr Surg. 2015 Apr 25. pii: S0022-3468(15)00276-6. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.04.006.
2. [Saito T](#), Terui K, [Mitsunaga T](#), Nakata [M](#), Kuriyama Y, Higashimoto Y, Onuma N, Takahashi H, Yoshida H. (9 人 1 番目) Role of Pediatric ERCP in an Era Stressing Less-invasive Imaging Modalities. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014;59:204-9. 査読有 doi: 10.1097/MPG.0000000000000399
3. Terui K, Higashimoto Y, Saito E, [Saito](#)

T. Mitsuanga T, Nakata M, Iwai J, Yoshida H. (8人4番目) Diagnosis of Biliary Atresia Can not be Excluded by Declining Trend of Serum Direct Bilirubin. *Pediatr Rep.* 2013;5:e17. 査読有 doi: 10.4081/pr.2013.e17. eCollection 2013.

4. 齋藤 武, 菱木知郎, 照井慶太, 他. (12人1番目) 臍・胆管合流異常アップデート術後晩期合併症への対応. *小児外科* 2013;45:683-687. 査読無
5. 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. (21人13番目) Hepatocellular telomere length in biliary atresia measured by Q-FISH. *World J Surg.* 2012;36:908-16. 査読有 doi: 10.1007/s00268-012-1453-z.

〔学会発表〕(計52件)

1. Saito T, Sakamoto A, Terui K, Mitsuanga T, Nakata M, Ono S, Hatano M, Higashimoto Y, Iwai J, Yoshida H. Systemic and Local Cytokine Profile in Biliary Atresia. *Biliary Atresia and Related Diseases* (2014). 10月16-17日, Berlin, Germany.
2. Takeshi Saito, Keita Terui, Tetsuya Mitsuanga, Mitsuyuki Nakata and Hideo Yoshida. Systemic and local cytokine profile in biliary atresia. 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. (2014). 5月26日, Banff, Alberta, Canada. (Final Program and Abstracts

page 44.)

3. Takeshi Saito, Keita Terui, Tetsuya Mitsuanga, Mitsuyuki Nakata and Hideo Yoshida. The significance of imaging modalities in surgery for pediatric choledochal cyst. 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. (2014). 5月26日, Banff, Alberta, Canada. (Final Program and Abstracts page 70.)
4. 齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 他. (10人1番目) 当科の胆道閉鎖症(Biliary Atresia; BA) 疑い症例に対する診断アプローチとその成績. 第41回日本胆道閉鎖症研究会. 2014年11月15日, 熊本市医師会館(熊本県・熊本市)
5. 齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 他. (8人1番目) 臍・胆管合流異常(PBM) 小児例に対する術前・術中画像検査の意義. 第37回日本臍・胆管合流異常研究会. 2014年9月13日, 横浜シンポジア(神奈川県・横浜市)(日本臍・胆管合流異常研究会プロシーディングス. 2014;37:36.)
6. 漆原直人, 神澤輝実, 安藤久實, 齋藤 武, 他(9人9番目) 臍・胆管合流異常の形態分類. 第37回日本臍・胆管合流異常研究会. 2014年9月13日, 横浜シンポジア(神奈川県・横浜市)(日本臍・胆管合流異常研究会プロシーディングス. 2014;37:20.)
7. 齋藤 武, 坂本明美, 照井慶太, 他. (11人1番目) 胆道閉鎖症(Biliary Atresia; BA) における細胞性免疫環境の探索. 第51回日本小児外科学会学術集会. 2014年5月9日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)(日小外会誌. 2014;50:684.)
8. 齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 他. (8人1番目) 臍・胆管合流異常(PBM) に対する術前・術中各種画像検査の意義.

- 第 51 回日本小児外科学会学術集会.  
2014 年 5 月 10 日,大阪国際会議場(大阪府・大阪市)(日小外会誌. 2014;50:412.)
9. Saito T, Kuriyama H, Higashimoto Y, Kouchi K, Takahashi H, Ohnuma N, Hishiki T, Mitsunaga T, Nakata M and Yoshida H. (14 人 1 番目) The Role of Pediatric ERCP in an Era Stressing Less-invasive Image Modalities. 46th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2013 年 4 月 10 日 Hunter Valley, NSW, Australia. (Final Program and Abstracts page 91.)
10. 齋藤 武, 照井慶太, 光永哲也, 他 . (8 人 1 番目)小児先天性胆道拡張症における ERCP 検査の意義 . 第 36 回日本膵・胆管合流異常研究会. 2013 年 9 月 14 日, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)(日本膵・胆管合流異常研究会プロシーディングス. 2013;36:19)
11. 齋藤 武, 菱木知郎, 光永哲也, 他 . (9 人 1 番目)胆道拡張症術後の肝内結石に対する治療 . 第 111 回東京小児外科研究会 . 2013 年 5 月 14 日, 東京ステーションコンファレンス (東京都)(第 111 回東京小児外科研究会アブストラクト 27.)
12. 齋藤 武, 菱木知郎, 光永哲也, 他. (8 人 1 番目)当科における胆道閉鎖症治療の変遷と今後の方向性. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013 年 4 月 13 日, マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)(日外会誌. 2013;114 臨増 2:279.)
13. 齋藤 武, 吉田英生 .胆道閉鎖症(Biliary Atresia; BA)のウイルス感染説のエビデンス . 第 40 回日本胆道閉鎖症研究会. 2013 年 11 月 16 日, 茨城県近代美術館 (茨城県・水戸市)(日小外会誌. 2014;50:956.)
14. Takeshi Saito. The Role of Pediatric

ERCP in an Era Stressing Non-invasive Image Modalities. 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Abstract Book page 32.) 2012 年 11 月 16 日, Taipei, Taiwan.

15. 齋藤 武, 坂本明美, 幡野雅彦, 他 . (14 人 1 番目)胆道閉鎖症における血中CA19-9解析の意義 第 2 報 . 第 49 回日本小児外科学会学術集会. 2012 年 5 月 14 日, パシフィコ横浜アネックスホール(神奈川県・横浜市)(日小外会誌. 2012;48:470.)
16. 齋藤 武, 菱木知郎, 光永哲也, 他 . (9 人 1 番目)当科における先天性胆道拡張症の長期遠隔成績 . 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012 年 4 月 13 日, ホテルニューオータニ幕張(千葉県・千葉市)(日外会誌. 2012;113 臨増 2:212.)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

齋藤 武 (SAITO, Takeshi)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号： 2 0 4 0 6 0 4 4

### (2)研究分担者

幡野 雅彦 (HATANO, Masahiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号： 2 0 2 0 8 5 2 3

坂本 明美 (SAKAMOTO, Akemi)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号： 9 0 3 5 9 5 9 7

吉田 英生 (YOSHIDA, Hideo)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号： 6 0 2 1 0 7 1 2

光永 哲也 (MITSUNAGA, Tetsuya)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 8 0 3 7 5 7 7 4

中田 光政 (NAKATA, Mitsuyuki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 9 0 3 7 5 7 7 5