

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592697

研究課題名(和文)キメリズム解析による胆道閉鎖症成因の解明

研究課題名(英文)The study of ethiology of biliary atresia by identify the presence and extent of maternal microchimerism

研究代表者

林田 真 (Hayashida, Makoto)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70452761

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)：【目的】妊娠中母児間に細胞の交換が行われていることが知られており、一部の自己免疫疾患においてmicrochimerismとGVHDの関連が示唆されている。今回、胆道閉鎖症におけるmaternal microchimerismの関連について検討した。

【対象と方法】胆道閉鎖症(BA)男児6例と他肝疾患男児6例の肝生検標本をCEP X/Yプローブを用いFISHを行ないXX染色体を持つ細胞の陽性率を検討した。

【結果】両群ともにXX染色体を持つ細胞を検出したが、BA群では有意に陽性率が高かった(P=0.0015)。免疫学的機序がBAの病態に関連している可能性を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the presence and extent of maternal microchimerism and to determine whether it play a role in the etiology of BA. 【Methods】 The liver biopsy specimens of 6 male BA patients (BA group) and 6 males with other liver diseases (non-BA group) were assayed for X- and Y-chromosome using fluorescent in situ hybridization (FISH). 【Result】 The frequency of cells with XX chromosomes per 1,000 host cells in the BA group and the non-BA group were significantly higher in BA group. Moreover the age at the time of biopsy did not affect the number of chimeric cells. 【Conclusion】 The presence of female cells in the liver of male BA patients was significantly higher than in males with other liver disease. Maternal microchimerism is therefore suggested to contribute to the pathogenesis of BA.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 成因

#### 1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は、進行性で肝移植を余儀なくされることも多く、現在においても解決すべき問題が残されている。胆道閉鎖症の病因として様々な仮説が提唱されてきたが、いずれも胆道閉鎖症の発生を十分に説明するにはいたっていないのが現状である。

最近、免疫学的機序の関与が示唆されるもが報告され、また、胆道閉鎖症と GVHD の間にはいくつかの病理学的な類似点があるとされている。肝臓は GVHD において target organ の一つであり胆管の破壊と T 細胞優位のリンパ球浸潤が特徴であるが、これも胆道閉鎖症との類似点である。

以前より自己免疫疾患と chronic GVHD との臨床および病理組織学上の類似点が指摘されている。さらに近年胎児母体間での両方向性の細胞の移動が報告されるようになり、母親から胎児へ移動した細胞 (Maternal microchimerism) が長期間存続することが示されている。以上のことから体内に移入した胎児・母体細胞により GVHD 様反応が引き起こされ、自己免疫疾患が発症するという仮説が提唱されている。

#### 2. 研究の目的

GVHD と胆道閉鎖症との類似性より、母体より移入した母親由来の細胞が GVHD 様反応を引き起こし、形成されていた胆管を傷害し胆管が閉鎖するという仮説とし、その関連について証明することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

胆道閉鎖症の成因と maternal microchimerism の関連を検討するため、胆道閉鎖症初回手術時に得られる肝生検標本と肝門部肝管・胆嚢・総胆管標本を使用し microchimerism の証明、分布について以下の方法により検討する。対照群として他の肝疾患肝生検標本を使用する。(他肝疾患：胆道拡張症、濃縮胆汁症候群、肝腫瘍正常肝部分など)

胆道閉鎖症群：男児胆道閉鎖症症例の初回葛西手術時の肝生検標本

他肝疾患群：他肝疾患症例の手術時の肝生検標本または肝腫瘍摘出標本の正常肝部分

肝内の microchimerism の存在の証明 (Fluorescent in situ hybridization (FISH) を用いた chimera 細胞の検出)

対象

胆道閉鎖症群：男児胆道閉鎖症症

例の初回葛西手術時の肝生検標本

他肝疾患群：他肝疾患症例の手術時の肝生検標本または肝腫瘍摘出標本の正常肝部分

肝組織凍結標本とパラフィン包埋肝生検標本を 5µm に薄切後、脱パラフィン、酵素処理を行ったあと FISH を行う。X 染色体プローブをオレンジ、Y 染色体プローブを緑の蛍光

色素でラベルした CEP X/Y プローブを用い、ハイブリダイゼーションを行い蛍光顕微鏡で観察。男児肝細胞 (XY) 中の XX 細胞数を検索する。

#### 4. 研究成果

・ BA 群 (n=6) 手術時年齢 84.8±57.3 生日  
・ non-BA 群 (n=6)

手術時年齢 229±171 生日

年齢、肝機能 (AST, ALT, T-Bil, D-Bil) は BA 群、non-BA 群において統計学的有意差を認めなかった。

細胞 1,000 中の chimerism 率は

BA 群 3.00±0.75, non-BA 群 1.00±0.50 と有意に BA 群が高い結果となった (P=0.005)。

また、14 歳、22 歳の症例においても XX 細胞を認め、chimerism が長期間存続し続けることが示された。

BA 群の chimerism は年齢と関係なく高値を示した。また、non-BA 群においても年齢と関係なく chimerism の存在を認めるが、一貫して non-BA 群の方が低値である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Alatas FS, Hayashida M, Matsuura T, Saeki I, Yanagi Y, Taguchi T

Intracranial hemorrhage associated with vitamin K deficiency bleeding in biliary atresia patients: Focus on long-term outcome.

J Pediatr Gastroenterol Nutr. 54(4):552-7, 2012

Saeki I, Tokunaga S, Matsuura T, Hayashida M, Taguchi T

A formula for determining the standard liver volume in children: a special reference for neonates and infants.

Pediatr Transplant 16(3): 244-249, 2012

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. 36(4):908-16, 2012

Alatas FS, Masumoto K, Matsuura T, Hayashida M, Saeki I, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T  
Synchronized expression of hepatic stellate cells and their transactivation and liver regeneration during liver injury in an animal model of cholestasis.  
J Pediatr Surg. 46(12): 2284-2290, 2011

Matsuura T, Kohashi K, Yanagi Y, Saeki I, Hayashida M, Aishima S, Oda Y, Taguchi T  
A morphological study of the removed livers from patients receiving living donor liver transplantation for adult biliary atresia.  
J Pediatr Surg. 28(12): 1171-1175, 2012

村守克己、宗崎良太、家入里志、松浦俊治、永田公二、林田 真、木下義晶、富川盛雅、橋爪 誠、田口智章  
小児における腹腔鏡下虫垂切除の有用性および Interval appendectomy の必要性について  
臨床と研究 89(4): 528-532, 2012

家入里志、柳 佑典、松浦俊治、宗崎良太、永田公二、林田 真、木下義晶、橋爪 誠、田口智章  
【急性虫垂炎の治療方針の変遷と現状】  
Interval appendectomy の適応と至適手術時期についての検討  
日本腹部救急医学会雑誌 32(4): 771-774, 2012

高橋良彰、宗崎良太、永田公二、林田 真、田口智章  
当科における過去 10 年間の腸重積症例の検

討  
日本小児外科学会雑誌 49(4): 904-908, 2013

藤田紋佳、林田 真、田口智章  
生体肝移植後の学童後期・思春期の小児の療養生活の実態と生活の満足度  
移植 49: 303-311, 2014

永田公二、手柴理沙、江角元史郎、宗崎良太、林田 真、家入里志、金城唯宗、落合正行、木下義晶、原 寿郎、田口智章  
【低出生体重児に対する外科手術の長期予後】外科疾患を伴う極低出生体重児と外科疾患を伴わない極低出生体重児の長期予後  
小児外科 44(11): 1077-1081, 2012

田口智章、林田 真、松浦俊治、副島雄二  
【プロが見せる手術シリーズ(3)：難易度の高い肝・胆・膵・脾・横隔膜手術】肝移植後の門脈閉塞に対する Rex-shunt 手術  
小児外科 45(11): 1253-1258, 2013

林田 真、江角元史郎、柳 佑典、吉丸耕一郎、田口智章  
【ここまで来た小児小腸移植】脳死小腸移植後の急性拒絶反応  
小児外科 45(7): 738-740, 2013

〔学会発表〕(計 32 件)  
林田真  
「先天性胆道拡張症術後長期経過例における問題点」  
第 112 回 日本外科学会  
H24 年 4 月 12-14 日 千葉

林田真  
小児臓器移植の現状と未来「脳死肝臓移植希望レシピエント選択基準の現状と問題点」  
第 49 回 日本小児外科学会  
H24 年 5 月 14-16 日 横浜

林田真

「当科で経験した腸回転異常症の検討」

第 26 回 日本小児救急医学会

H24 年 6 月 1-2 日 東京

Makoto Hayashida

・ The Outcome of Biliary Atresia in Transplantation Era : A Single-Center Experience

・ Long-term postoperative problems of congenital biliary dilatation special reference for remnant intrapancreatic bile duct

Pacific Association of Pediatric Surgeons 2012

H24 年 6 月 3-7 日 上海

林田真

「教室における肝芽腫の治療経験と肝移植」

日本小児肝移植懇話会

H24 年 6 月 13 日 福岡

林田真

「Transplantation Era における胆道閉鎖症 予後に関する検討 ～A Single-Center Experience～」

第 30 回 日本肝移植研究会

H23 年 6 月 14-15 日 福岡

林田真

「頭蓋内出血で発症した非症候性肝内胆管 低形成症の一例」

「胆道閉鎖症におけるビタミン K 欠乏性出血 症の予後に関する検討」

第 39 回 日本小児栄養消化器肝臓学会

H23 年 7 月 14-15 日 大阪

林田真

「小児肝移植後の脱毛症」

第 48 回 日本移植学会

H24 年 9 月 20-22 名古屋

Makoto Hayashida

The Outcome of Biliary Atresia in Transplantation Era : A Single-Center Experience

IPTA regional education meeting

H24 年 9 月 23 日 名古屋

林田真

「九州大学小児外科にける脳死移植の経験」

第 11 回 九州沖縄小児救急医学研究会

H25 年 2 月 2 日 小倉

林田真

「肝移植導入による胆道閉鎖症の予後に関する検討」

第 113 回 日本外科学会

H25 年 4 月 11-13 日 福岡

林田真

「成人に到達した胆道閉鎖症症例に対する 生体肝移植」

「当院における小児肝移植の術後合併症と 予後」

第 50 回 日本小児外科学会

H25 年 5 月 30 日-6 月 1 日 東京

林田真

「九州大学小児外科における脳死下臓器移 植の経験」

第 27 回 日本小児救急医学会

H25 年 6 月 14-15 日 沖縄

林田真

「乳児生体肝移植における臓器立体モデル を用いた術前シミュレーションの有用性」

第 31 回 日本肝移植研究会

H25 年 7 月 4-5 日 熊本

Makoto Hayashida

「The incidence and criteria of variant Hirschsprung's disease -Results from the nationwide survey in Japan」

13th CAST

H25年9月2-6日 京都

林田真

「ヒルシュスブルグ病類縁疾患に対する脳死小腸移植後急性拒絶の1例」

第49回 日本移植学会

H25年9月5-7日 京都

林田真

「生体肝移植後の遷延する血小板減少と脾容量に関する検討」

第20回 日本門脈圧亢進症学会

H25年9月19-20日 名古屋

林田真

「当科における外傷性小腸穿孔症例の検討」

第29回日本小児外科学会秋期シンポジウム

H25年10月26日 東京

Makoto Hayashida

Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure due to familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in the neonatal period」

13thAPPSGHAN & 40thJASPGHAN

H25年10月31日-11月3日 東京

林田真

「胆道造影を施行した乳児胆汁うっ滞の検討」

第40回 日本胆道閉鎖症研究会

H25年11月16日 茨城

林田真

「小児外傷性小腸穿孔の治療戦略」

第114回 日本外科学会

H26年4月11-13日 京都

林田真

「先天性胆道拡張症長期経過例における管理上の問題点 ～臍内遺残胆管を中心に～」

第51回 日本小児外科学会

H26年5月8-10日 大阪

林田真

「ビタミンK欠乏性出血症による頭蓋内出血を契機に発見された乳児胆汁うっ滞性疾患に関する検討」

第28回 日本小児救急医学会

H26年6月6-7日 横浜

林田真

「当科における小児鼠径ヘルニアに対する治療の現状」

第12回 日本ヘルニア学会

H26年6月6-7日 東京

Makoto Hayashida

「Diagnostic strategy for cholestasis in infant」

EUPSA 2014

H26年6月18-21日 Dublin

林田真

「小児肝移植におけるウィルス感染の検討」

第32回 日本肝移植研究会

H26年7月2-4日 東京

林田真

「小児肝移植におけるサイトメガロウィルス感染」

第50回 日本移植学会

H26年9月10-12日 東京

林田真

「肝移植を念頭に置いた葛西手術の妥当性」

第 41 回 日本胆道閉鎖症研究会

H26 年 11 月 14 日 熊本

林田真

「短腸症の腸管不全に関する研究」

第 27 回 日本小腸移植研究会

H27 年 3 月 14 日 岡山

〔図書〕(計 2 件)

小児栄養消化器肝臓病学 診断と治療社

胆石症、胆嚢炎 pp451-453

小児の臓器移植および免疫不全状態におけ

る予防接種ガイドライン 2014

第 2 章 移植 2-1 小児固形臓器移植患者への  
予防接種 pp10-32

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林田 真 (HAYASHIDA, Makoto)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70452761

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20197247

柳 佑典 (YANAGI, Yusuke)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30596664