

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861672

研究課題名(和文) Sox9コンディショナルノックアウトマウスを用いた胆道閉鎖症の病因・病態解析

研究課題名(英文) The analysis for the etiology and pathogenesis of Biliary atresia using a Sox9 conditional knockout mouse

研究代表者

須田 博子 (Suda, Hiroko)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：40632659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症(BA)における病因や病態は未だ明確ではない。近年、SOX9の胆管発生や肝再生に関する報告がある。BAは細胆管増生(DR)が特徴的であり、肝障害とDRにおけるSOX9の関与について検討した。Sox9ノックアウトマウスを利用した肝障害では、四塩化炭素による肝障害でコントロールより有意な肝機能悪化を認めた。Hydrodynamic injection法によるSOX9遺伝子導入では、肝細胞に胆管マーカーであるOsteopontinの誘導と、肝細胞マーカーであるHnf4 α の消失を認めた。これらの結果は、肝障害及び肝細胞の胆管化生に由来するDRにSOX9が関与する事を示唆していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Biliary atresia (BA) is a rare infantile disease characterized by bile duct obliteration with the pathogenesis unknown. Ductular reaction (DR) is one of the characteristic features of BA. We focused on Sex-determining Region Y-box9 (SOX9), which is a crucial transcription factor that regulates bile duct development and liver damage/regeneration. The aims of this study are to investigate the role of SOX9 in liver injury and DR. Experiments using Sox9 knockout (KO) mouse showed that the level of alanine aminotransferase (ALT) of Sox9 KO mouse was significantly higher than that of control mouse in CCL4 treatment. Experiment of the SOX9 gene transfection using hydrodynamic injection method revealed induction of Osteopontin and reduction of Hepatocyte growth factor 4 alpha (Hnf4 α) in the transfected hepatocytes. These results indicated that SOX9 has a potential to involve in liver damage/regeneration and transdifferentiation of hepatocytes to cholangiocytes during progression of DR.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 Sox9

1. 研究開始当初の背景

(1)胆道閉鎖症

胆道閉鎖症は、胎生期もしくは生後早期に肝内・肝外胆管が炎症や線維化により閉塞する疾患で、日本では約10000人に1人に発症すると言われている。もし手術を行わなければ、1歳までに胆汁性肝硬変へ進展し、死に至る。生後、葛西手術と言われる胆汁排泄手術を行ってもなお肝の線維化が進行し、肝移植を行わなければ死に至る事もある重篤な疾患である。病因は不明であるが、先天的な器官形成異常より、ウイルス感染などの周産期の因子を発生要因とみることが主流となっており遺伝学的解析は少ない。

(2)SOX9遺伝子

SOX9 遺伝子は、第 17 番染色体に位置する転写因子で、1994 年に Campomelic dysplasia の原因遺伝子として同定された。様々な細胞や臓器(神経堤、心臓、腸管、精巣、膵臓など)の発生に重要な転写因子として報告されている。肝臓においては、胎生期では胆管発生の制御や、成体では肝細胞や胆管細胞の持続的な供給に参与しているとする報告もあり、肝臓における SOX9 遺伝子の機能は重要であると考えられているが、胆道閉鎖症との関連は未だ検討されていない。

(3)胆道閉鎖症とSOX9遺伝子

これまで、胆道閉鎖症患者におけるSOX9遺伝子の解析は行われていない。我々は、胆道閉鎖症肝組織を用いて、SOX9の発現を免疫染色法にて試験的に解析した。SOX9は胆管細胞マーカーであるが、増生細胆管にSOX9の発現を確認しただけでなく、肝細胞におけるSOX9の異所性発現を確認した。

2. 研究の目的

(1) 胆道閉鎖症モデルとして、四塩化炭素(CCL4) 及び 0.1% 3,5,-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collid

ine(DDC)による肝障害を誘導させる。胆管でのSox9ノックアウトマウスを作成し、胆道閉鎖症モデルとして肝障害をおこす。周産期以降の肝障害における本遺伝子の関与について検討する事を目的とする。

(2) 慢性肝疾患で見られる増生細胆管の由来として肝細胞の胆管化生の報告がある。胆道閉鎖症肝組織で確認したSOX9が異所性発現している肝細胞が増生細胆管の近傍に良くみられたことから、SOX9が肝細胞の胆管化生に寄与している可能性を考え、遺伝子導入による胆管化生を検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)Sox9^{fllox} マウスとAlbumin-cre(Alb-cre)マウスを交配させて、SOX9 コンディショナルノックアウト(KO)マウス(Alb^{cre/+};Sox9^{fllox/fllox})を作製する。C57BL6J マウス(WT マウス)をコントロールとし、CCL4(肝細胞性障害)及び0.1% DDC (oval 細胞活性化モデル)による肝障害を施行する。四塩化炭素モデルでは、週3回腹腔内投与を3週(d21)・6週(d42)・10週(d70)行い解析した。0.1%DDC モデルでは、1週目(d7)・3週目(d21)・3週投与2週休薬(STOP)を行い解析した。

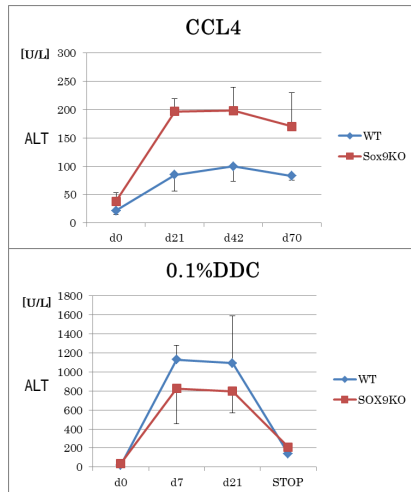
(2)10週齢のC57BL6Jマウスの肝細胞にSOX9を長期・異所性発現させるため、hydrodynamic injection(HDI)法とトランスポゾンシステムを用いた。SOX9の発現カセットを、大量の生理食塩水とともに尾静脈から急速に投与する事で、肝臓(主に肝細胞)にそのタンパクを発現させる。また発現を長期間維持するため、本発現カセットをトランスポゾンシステムへ組み込む。

4. 研究成果

(1)Sox9KOマウスとWTマウスにおける肝障害の比較

四塩化炭素及び0.1%DDCによる肝障害実験を行った。四塩化炭素では、3・6週目でKOマウスに有意なALT上昇を認めた。一方、0.1%DDCでは、いずれに時点においてもALTに差は認めなかった。(図1)

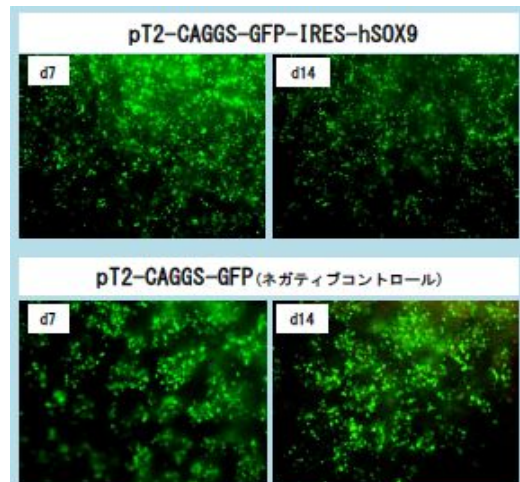
図1 肝障害モデルでの肝障害の比較



(2) マウス肝細胞への遺伝子導入の安定性の検討

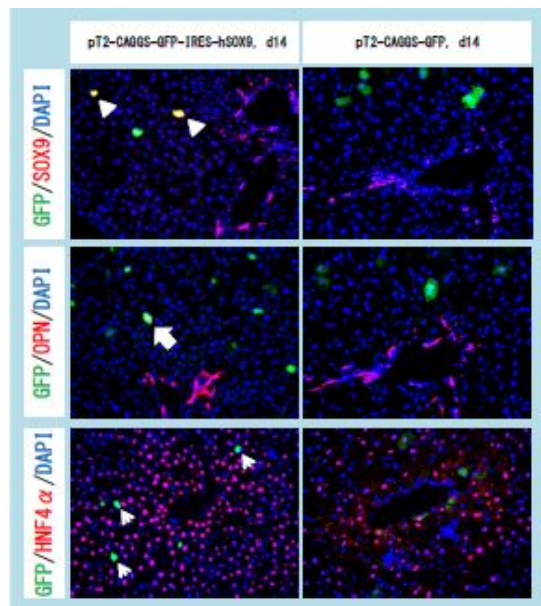
SOX9だけでなくGFPも同時に発現させる事ができるバイシストロニックな発現ユニットを構築し、SOX9発現細胞を可視化した。さらにそれらを、長期発現させることのできるトランスポゾンベクター上に構築した(pT2-CAGGS-GFP-IRES-hSOX9)。ネガティブコントロールとしてGFPのみを発現させるユニットを構築した(pT2-CAGGS-GFP)。HDI施行後14日経過しても、いずれもGFPの発現は持続していた(図2)。

図2 HDI後のマウス肝臓におけるGFPの発現状況



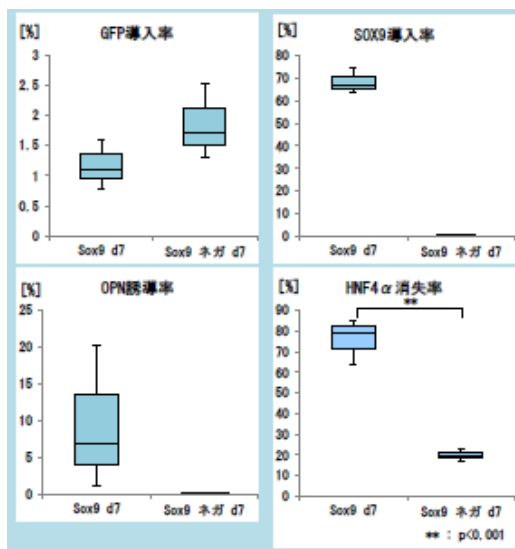
(3) マウス肝細胞へのSOX9の異所性発現
HDI後14日目の蛍光免疫染色画像を提示する。GFP発現細胞にSOX9が導入され、GFP発現細胞の一部に胆管細胞マーカーであるOsteopontin(OPN)の導入、そして肝細胞マーカーであるHepatocyte nuclear factor 4 alpha(HNF4α)の消失が確認された。ネガティブコントロール群には、SOX9・OPNの誘導、そしてHNF4αの消失は確認されなかった(図3)。

図3 HDI後14日目の蛍光免疫染色画像



HDI 後 7 日目の各種マーカーの導入率及び消失率は、肝全体の細胞の 1-1.5%の細胞に GFP の導入を認め、GFP 発現細胞の約 70%に SOX9 が導入され、OPN は、10%前後の GFP 発現細胞に導入されていた。HNF4 は約 80%の GFP 陽性細胞に発現の消失を認め、ネガティブコントロール群とは有意な差を認めた(図 4)。

図 4 HDI 後 7 日目の各種マーカーの発現状況



(4) まとめ

SOX9KO マウスの肝障害実験では、四塩化炭素による肝細胞性障害において肝障害の程度に差がみられたが、oval 細胞活性化モデルにおいては、肝障害の程度に差が見られなかった。oval 細胞の誘導に関しては、Sox9 の関与は少ない事が示唆された。長期にわたる肝細胞性障害における Sox9 の意義に関しては、病理学的な検討を継続したい。また、HDI による SOX9 の異所性発現では、SOX9 を持続的に異所性発現させると、肝細胞に胆管細胞マーカーである OPN の発現と、肝細胞マーカーである HNF4 の消失を確認した。この事は、vivo で、SOX9 が肝細胞の胆管化生に寄与している可能性を示唆するデータではないかと考える。今後、胆管に分化転換しているかは、その他の胆管マーカーの発現や形態学的な検討などさらなる実験の積み重ねが必要

と考える。また、線維化に関して、SOX9 は、細胞外マトリックスの産生を促進する働きや、線維化の重症度のバイオマーカーでもある OPN の発現を SOX9 が直接制御しているなどの報告もあり、今回の実験で SOX9 が OPN を誘導したことは、慢性肝障害における SOX9 の異所性発現が、細胆管増生の周囲にみられる線維化にも何らかの形で寄与していることを意味しているのかもしれない。

<引用文献>

Hartley JL, et al. Biliary atresia, *Lancet*, 374, 2009, 1704-13

Wagner T, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9, *Cell*, 79, 1994, 1111-20

Antoniou A, et al. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9, *Gastroenterology*, 136, 2009, 2325-2333

Furuyama K, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine, *Nat Genet*, 43, 2011, 34-41

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)

Hiroko Suda, Daiki Yoshii, Kenichi Yamamura, Yuji Yokouchi, Yukihiko Inomata, New insight into reactive ductular cells of biliary atresia provided by pathological assessment of SOX9, *Pediatric Surgery International*, 査読有, 30, 2014,

〔学会発表〕(計3件)

吉井大貴、横内裕二、須田博子、猪股裕紀
洋、胆道閉鎖症における肝細胞の胆管細胞化
生、肝線維化に対する SOX9 遺伝子の関与に
ついての検討、第 114 回日本外科学会定期学
術集会、2014 年 4 月 4 日、国立京都国際会館
(京都府)

Daiki Yoshi i, Yuji Yokouchi, Hiroko Suda、
Yukihiro Inomata、Significance of SOX9
gene for trans-differentiation of
hepatocyte in liver、熊本医学・生物科学
国際シンポジウム、2014 年 9 月 4 日、熊本市
医師会館(熊本県熊本市)

吉井大貴、横内裕二、須田博子、猪股裕紀
洋、胆道閉鎖症における肝細胞の細胆管化生
と線維化に対する SOX9 の関与、第 52 回日本
小児外科学会、2015 年 5 月 28 日、神戸国際
会議場(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

須田 博子 (SUDA HIROKO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師

研究者番号：40632659

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

吉井 大貴 (YOSHII DAIKI)

熊本大学・医学部附属病院・大学院生

研究者番号：なし