

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461924

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とテロメラゼ活性の解析

研究課題名(英文)Telomere length in the liver tissue of biliary atresia

研究代表者

眞田 幸弘 (Sanada, Yukihiko)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60406113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症(BA)は肝門部空腸吻合術によって長期生存できるようになった一方で、成人期になって肝不全まで進行する症例を経験するようになった。成人期BAの肝移植成績は小児期に比べて不良であり、また成人期は生体ドナー不在や脳死登録困難など移植が実施できないこともある。既存の肝予備能マーカーでは将来的な肝不全の予測ができないため、本研究では学童期以降のBA児の肝細胞のテロメア長を測定した。肝予備能マーカーは正常であったが、テロメア長が短縮していたこともあり、臨床的に相対的肝移植適応と判断することができた。肝細胞のテロメア長は、既存の肝予備能マーカーに比べて有用なマーカーになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although biliary atresia (BA) patients can get a long-term survival by Kasai portoenterostomy, some BA patients progress to native liver failure in adulthood. The result of liver transplantation in adult BA patients is poorer than that of in pediatric BA patients. In addition, most adult BA patients cannot have liver transplantation by absence of living donor and impossibility of deceased donor registration. In this study, we evaluated a telomere length of hepatocyte of school-age BA patients because existing hepatocellular reserve biomarkers cannot predict the future native liver failure. These patients with normal results of existing hepatocellular reserve biomarkers showed a shortening of telomere length of hepatocyte. Therefore, we could judge a relative indication of liver transplantation. Telomere length analysis using quantitative fluorescence in situ hybridization could be an objective indicator of hepatocellular reserve capacity in BA patients.

研究分野：肝移植

キーワード：テロメア 胆道閉鎖症 肝細胞 組織Q-FISH法 肝予備能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道閉鎖症 (BA : biliary atresia) は出生 1 万に 1 人に発症する原因不明の胆汁うっ滞性疾患であり、放置すると肝硬変から肝不全に進行する予後不良な疾患である。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状態、致死性的となる肺血管合併症、成長障害などによる QOL の低下を認め、肝移植を余儀なくされる。生物学的な見地では、本来、胆道閉鎖症での移植適応時期は肝細胞の障害が生命を維持出来ないほどまでに達した時であるべきと考えられるが、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、MELD スコア : model for 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/MELD スコアで肝予備能が期待されていても、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、また、胆管炎や妊娠などをきっかけに急激に肝不全に進行することもあり、正確な肝予備能を反映していない可能性がある。したがって、肝門部空腸吻合術後の肝細胞の障害程度を細胞生物学的に客観的に評価することが可能であれば、より正確で具体的な肝移植適応時期を判断できると思われる。

(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、増殖のたびに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る。近年、組織 Q-FISH 法により、組織切片にて正確なテロメア長の測定が可能となった。本法の利点としては、肝細胞そのもののテロメア長を測定することが可能であり、その正確性と有用性は本研究の共同研究施設である東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チームにより報告されている (Aida J. *Exp Gerontol* 2008, Kurabayashi R. *Hum Pathol.* 2008, Aida J. *Hum Pathol.* 2007)。また、種々の肝疾患においてその短縮程度が変化するため、肝におけるテロメア長の変化は肝細胞の障害程度の指標になることが近年報告されている (Lechel A. *J Hepatol.* 2004, Stefanie U. *FASEB J.* 2002)。

(3) 我々はこれまでに BA 肝のテロメア長は、PELD/MELD スコアに関係なく正常剖検乳

児例よりも著明に短縮していることを組織 Q-FISH 法を用いて明らかにし、BA の自己肝の肝予備能が低いことを証明した (Sanada Y. *World J Surg.* 2012)。しかし、これまでの研究の対象は肝移植症例のみの BA 肝のテロメア長であり、肝移植を必要とせずに自己肝で生存している BA 肝のテロメア長は評価されていないため、肝予備能検査としてのテロメア長測定の有用性を確立するまでには至っていない。したがって、今回の研究では、自己肝温存症例の BA の肝細胞のテロメア長を解析するとともに、年齢と PELD/MELD スコアを match させた肝移植症例の BA と正常剖検例のテロメア長を解析し、それらを比較検討することによって、新しい肝予備能検査としてのテロメア長測定の有用性を確立することが研究意義となる。

## 2. 研究の目的

本研究は、BA における自己肝温存症例のテロメア長を組織 Q-FISH 法によって明らかにし、テロメア長が肝予備能の指標になりうるかを検討することが目的である。

## 3. 研究の方法

肝予備能検査としてのテロメア長測定の有用性を確立するために、以下の 2 つの研究を行った。

### 方法 :

(1) 正常コントロールのテロメア長の短縮率を解明するために、各年齢別の正常肝組織を用いて、肝細胞のテロメア長を組織 Q-FISH 法によって明らかにした。非肝疾患の剖検例として 0-5 才の 10 例の肝臓と、肝移植時にグラフトとして使用せずに残ったドナー肝臓 (29-36 才) の 6 例をコントロールとした。これらの 16 例において組織 Q-FISH 法を行い、肝細胞のテロメア長を測定した。また、これらのデータを基に、正常肝のテロメア長の加齢曲線を明らかにした。

(2) 自己肝温存 BA におけるテロメア長と肝予備能を比較検討するために、自己肝温存症例の BA 肝 5 例のテロメア長を測定し、正常肝の加齢曲線や既存の肝予備能マーカーと比較検討した。

### 材料 :

(1) 非肝疾患の剖検例 (0-5 才) は東京都健康長寿医療センター病理部バイオリソースセンターで -80 で凍結保存されている検体を用いた。東京都健康長寿医療センター倫理委員会承認済。ドナー肝臓 (29-36 才) は当院において施行された肝移植症例のうち、肝移植時にグラフトとして使用せずに残った肝臓を用いた。摘出後速やかに -80 で凍結保存し、その後、凍結状態で東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チームに研究代表者が持参し、テロメア長を測定した (自治医科大学倫理委員会および東京都

健康長寿医療センター研究所倫理委員会承認済)

(2) 当院において施行された自己肝温存 BA に対する肝生検は 16G 針にて 1 本採取され、その 1/4 が研究用となり、研究用標本は、直ちに -80 に凍結保存した。その後、凍結状態で東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チームに研究代表者が持参し、テロメア長を測定した(自治医科大学倫理委員会および東京都健康長寿医療センター研究所倫理委員会承認済)。

テロメア長の測定方法:

テロメア長の測定は組織 Q-FISH 法を用いて東京都健康長寿医療センター研究所老年病理学研究チームのもと研究代表者が行った。肝組織は 2 $\mu$ m の厚さに薄切片し、テロメアでラベルされた Peptide Nucleic Acid (PNA) プローブ (telo C Cy3 probe: 5' -CCCTAACCCCTAACCCCTAA-3', Fasmac, Atsugi City, Kanagawa, Japan) (Cy3; 0.32  $\mu$ mol/L in final concentration) とセントロメアでラベルされた PNA プローブ (Cemp1 probe: 5' -CTTCGGTTGGAAACGGGGT-3', Fasmac) (FITC; 0.12  $\mu$ mol/L in final concentration) を用いて組織切片をハイブリダイズしたのち、プレパレートに散布し、核は DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) にて染色した。

その後、蛍光顕微鏡 (80i, Nikon, Tokyo, Japan) で撮影し、これらを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 $\mu$ 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。

#### 4. 研究成果

##### (1) 非肝疾患剖検例のテロメア長

年齢 (才)	Median-NTCR
-0.85	1.95
-0.73	3.95
-0.70	2.48
-0.53	2.12
-0.53	4.48
0	1.77
0	2.79
2	1.69
5	1.54
5	1.20

##### ドナー肝臓 (29-36 才) のテロメア長

年齢 (才)	Median-NTCR
29	1.11
29	1.60
30	1.23
30	1.40
31	2.00
36	1.20

年齢 (胎生) と NTCR の関係についてピアソンの積率相関分析を行うと (正常コントロールの加齢曲線)  $r = -0.526$ 、信頼区間  $-0.824 \sim -0.00816$ 、 $p = 0.0253$  であった。

##### (2) 自己肝温存 BA のテロメア長

年齢 (才)	Median-NTCR
6.9	1.81
12.9	1.40

自己肝温存 BA は、5 例に組織 Q-FISH 法を施行したが、肝細胞のテロメア長が測定できたのは 2 例であった。残りの 3 例は炎症が強く、組織 Q-FISH 法において核の染色が十分ではなく、テロメア長の測定が不可能であった。テロメア長が測定できた 2 例の自己肝温存 BA は、コントロールの肝細胞のテロメア長の加齢曲線より明らかに低下していた。

これら 2 例の既存の肝予備能マーカーは、Child-Pugh 分類 A であり、PELD/MELD スコアはそれぞれ -6.7、-3.8 と低値であった。そのため、臨床的に肝移植適応と判断されずに長期間経過観察となっていた。しかし、その後 2 例とも入院を繰り返す胆管炎を認めるようになり、難治性胆管炎と診断され、臨床的に相対的肝移植適応と判断されるようになった。つまり、テロメア長以外の肝予備能マーカーは正常であるため、肝移植適応を正確に判断できずに年単位で経過観察されてきたのが現状であった。

これら 2 例は最終的に母親をドナーとする生体肝移植を施行するに至った。既存の肝予備能マーカーでは、肝移植の適応を判断することはできず、また脳死肝移植登録もできない。一方で、肝細胞のテロメア長は肝予備能の有用なマーカーになりうると思われた。かった。

##### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

眞田幸弘、浦橋泰然、井原欣幸、岡田憲樹、山田直也、平田雄大、水田耕一。非黄疸胆道閉鎖症の肝移植適応における肝生検の重要性。第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会。2014 年 9 月 12 日。東京都。  
眞田幸弘、浦橋泰然、井原欣幸、山田直也、岡田憲樹、平田雄大、田代昌久、水田耕一。非黄疸胆道閉鎖症の治療方針決

定における肝生検の役割.第42回日本小児栄養消化器肝臓学会.2015年10月17日.広島県広島市.

眞田幸弘,浦橋泰然,井原欣幸,山田直也,岡田憲樹,平田雄大,田代昌久,水田耕一.長期自己肝温存胆道閉鎖症(BA)における肝不全の予測マーカーの検討.第116回日本外科学会定期学術集会.2016年4月16日.大阪府大阪市.

眞田幸弘,浦橋泰然,井原欣幸,山田直也,岡田憲樹,平田雄大,片野匠,三木厚,笹沼英紀,佐久間康成,佐田尚宏,水田耕一.非黄疸胆道閉鎖症における肝移植適応.第28回日本肝胆膵外科学会学術集会.2016年6月4日.大阪府大阪市.

(4)研究協力者

( )

〔図書〕(計 0件)

〔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:  
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

眞田 幸弘 (SANADA, Yukihiro)

自治医科大学医学部・講師

研究者番号: 60406113

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: