

氏 名 (本籍)	き さ き 木 ひで ゆき 佐 々 英 之
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 2 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	免 疫 組 織 化 学 的 手 法 に よ る 胆 道 閉 鎖 症 肝 内 胆 管 の 細 胞 間 接 着 及 び 成 熟 度 の 検 討 : 胆 道 閉 鎖 症 と ductal plate malformation と の 関 連 に つ い て

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 大 井 龍 司	教 授 笹 野 公 伸
	教 授 里 見 進	教 授 福 本 学

論文内容要旨

研究目的

胆道閉鎖症（以下 BA）は乳児閉塞性黄疸の代表的な疾患であるが、その病因は未だ明らかにされていない。また肝内胆管は、胎生期に門脈域に接する肝細胞を起源とする ductal plate から発生するが、近年 BA の肝内胆管と ductal plate remodeling の異常である ductal plate malformation との関連が注目されている。一方、近年カルシウム依存性の細胞間接着分子である cadherin と、その裏打ち蛋白である catenin の発現が ductal plate remodeling の際に重要な役割を担っている可能性についての報告がなされている。またサイトケラチン（以下 CK）は肝内胆管の発生段階においてその発現パターンが変化することが知られており、これを指標として胆管細胞の成熟度を検討する事が可能であると考えられる。そこで本研究では

1. BA の肝内胆管における E-cadherin, α 及び β -catenin の発現の検討
2. BA の肝内胆管における細胞間接着とアポトーシス, 細胞回転との関連についての検討
3. CK の発現パターンによる BA の肝内胆管の成熟度に関する検討

を行い、BA の病因及び肝内胆管病態と ductal plate malformation との関連を検討することを目的とした。

研究方法

BA 根治術時に肝組織を採取した 45 例を対象とした。比較検討するために non-BA 群として胆道拡張症 7 例、肝芽腫の正常肝組織 4 例の計 11 例と、胎児肝 21 例を用いた。標本は 10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本として用いた。一部標本を periodate-lysine-paraformaldehyde 固定による凍結標本、及び 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde 固定パラフィン包埋標本とした。これらの標本を用いて以下の検討を行った。

1. 免疫組織化学による肝内胆管での E-cadherin, α 及び β -catenin の発現及び局在
2. mRNA in situ hybridization による BA の肝内胆管及び胎児肝の remodeling ductal plate での E-cadherin mRNA の局在
3. 二重免疫染色及びミラー切片による BA の肝内胆管及び胎児肝の remodeling ductal plate での E-cadherin とアポトーシス, 細胞回転との関連
4. 免疫組織化学による肝内胆管での CK の発現パターン

本研究では、E-cadherin, α 及び β -catenin, CK の免疫組織化学の結果を、免疫強度と分布による半定量的方法である H score system（以下 H score）により評価した。

研究結果

1. E-cadherin の発現は、胎児肝では remodeling stage において ductal plate stage 及び remodeled stage に比較し有意に減弱していた。また BA の肝内胆管では non-BA 群に比較し

て E-cadherin の発現が有意に減弱していた。

2. 胎児肝の remodeling stage と BA の肝内胆管では、E-cadherin の発現が共に減弱していたが、mRNA の発現をみると、胎児肝の remodeling stage では減弱していたが、BA の肝内胆管では保たれていた。
3. E-cadherin と TUNEL 法の二重染色では、E-cadherin の発現が減弱している BA の胆管細胞および胎児肝における remodeling stage の胆管細胞に TUNEL 陽性所見を認めた。ミラー切片における検討では、BA の胆管細胞では E-cadherin の H score と TUNEL Labeling Index (以下 LI) との間に有意な負の相関関係が認められ、胎児肝の remodeling stage でも統計学的有意差には至らなかったものの、BA の肝内胆管と類似の傾向が認められた。また E-cadherin と p27 との二重免疫染色によると、E-cadherin の発現が減弱している胆管細胞では p27 は陰性であった。一方 p27 陽性胆管細胞では E-cadherin の発現は保たれていた。ミラー切片による検討では、E-cadherin の H score と p27 LI との間には、BA の胆管細胞では有意な正の相関を認め、胎児肝の remodeling stage でも統計学的有意差には至らなかったものの、BA の肝内胆管と類似の傾向が認められた。
4. 胎児肝では肝内胆管の発達段階に従って CK 7 及び 19 の発現が増加しており、この両者は肝内胆管細胞に於いて "maturation marker" になりうると考えられた。一方 CK 20 は発達段階が進むに従ってその発現は減弱していき、肝内胆管細胞に於いて "immaturity marker" と考えられた。BA の肝内胆管では、non-BA 群と比較して CK 7 および 19 の発現は減弱していた。CK 20 については、non-BA 群の肝内胆管ではその発現を認めなかったが、BA の肝内胆管では一部にその発現が認められた。これらの所見は BA の肝内胆管細胞の未熟性を示す所見と考えられた。

結 論

本症肝における肝内胆管は、細胞間接着及び細胞の成熟度の観点からは胎児期の発達過程の肝内胆管と類似の細胞学的特性を認めた。更に BA の肝内胆管及び胎児肝の remodeling stage では、両者とも細胞間接着と、アポトーシス及び細胞回転との関連が認められた。以上の所見は BA の病因及び BA の肝内胆管病態の進展と ductal plate malformation との強い関わりを示唆するものと考えられた。

研究の意義・独創的な点

本研究は、未だ病因が明らかとはなっていない BA において、その病因病態と ductal plate malformation との関連を、細胞間接着及びサイトケラチンを指標とした細胞の成熟度の観点からアプローチし、検討した初めての研究である。本研究で得られた知見は、BA の病因論に関する従来の研究結果とは異なった側面からのものであり、今後 BA の病因解明上での新たな手がかりとなる事が期待できる。

審 査 結 果 の 要 旨

胆道閉鎖症（以下 BA）は乳児閉塞性黄疸の代表的な疾患であるが、病因は未だ明らかではない。近年 BA と胆管細胞の発生異常又は分化障害である ductal plate malformation（以下 DPM）との関連が注目されている。

本研究は免疫組織化学的手法を用いて BA の肝内胆管における E-cadherin（以下 E-cad）、 α 及び β -catenin の発現と、細胞間接着とアポトーシス、細胞回転との関連について検討し、更に cytokeratin（以下 CK）の発現パターンによる BA の肝内胆管の成熟度に関する検討により BA の病因、病態と DPM との関連を検討したものである。

対象は BA 根治術時に肝組織を採取した 45 例で、比較検討のために non-BA 群 11 例（胆道拡張症 7 例、肝芽腫の正常肝組織 4 例）と胎児肝群 21 例を用いた。

免疫組織化学による肝内胆管の E-cad、 α 及び β -catenin の検討を行った結果、E-cad の発現は、胎児肝では remodeling stage（以下 RS）でその他の stage より減弱していた。BA の肝内胆管では non-BA 群より E-cad の発現が減弱していた。mRNA in situ hybridization による E-cad mRNA の局在の検討では、胎児肝の RS では減弱していたが、BA の肝内胆管では保たれていた。二重免疫染色及びミラー切片による BA の肝内胆管及び胎児肝の RS での E-cad とアポトーシス、細胞回転との関連の検討では、E-cad とアポトーシスの関係で、E-cad と TUNEL 法との間に負の相関関係を認め、E-cad と p27 との関係では、E-cad と p27 との間に正の相関を認めた。肝内胆管の CK の発現パターンの検討では、胎児の肝内胆管の CK の発現パターンより CK7 及び 19 は肝内胆管細胞の“maturation marker”と考えられ、一方 CK 20 は肝内胆管細胞の“immaturity marker”と考えられた。BA の肝内胆管では、non-BA 群と比較して CK7 および 19 の発現は減弱しており、CK 20 は、non-BA 群の肝内胆管では発現を認めなかったが、BA の肝内胆管の一部に発現が認められた。以上の所見より BA の肝内胆管細胞の未熟性が示されている。

本論文では、BA の肝内胆管が、細胞間接着及び細胞の成熟度の観点から胎児期の発達過程の肝内胆管と類似の特性を持ち、更に BA の肝内胆管及び胎児肝の RS では、細胞間接着と、アポトーシス及び細胞回転との関連が示され、BA の病因及び肝内胆管病態の進展と DPM との関わりが示されている。

これまで BA において、その病因病態と DPM との関連を、細胞間接着及び CK を指標とした細胞の成熟度の観点からアプローチし検討した研究は認められず、独創的な研究と考えられ、学位論文に値するものである。