

## 論文内容の要旨

肝障害時における胆管増生および血管新生の3次元構造解析  
(阿部弘昭, 鈴木悠地, 村嶋亜紀, 柿坂啓介, 宮坂昭生, 佐々木登希夫, 木村英二,  
人見次郎, 滝川康裕)  
(岩手医学雑誌 74 巻, 3 号 令和 4 年 8 月掲載予定)

## I. 研究目的

肝細胞が再生不全に陥ると肝移植以外に根治的治療はないが、肝移植はドナー臓器不足など多くの問題を抱えており、非移植治療の開発が求められている。急性肝不全や肝硬変では肝細胞が失われた肝小葉内に細胆管と呼ばれる幼若な胆管構造が出現する。細胆管は、肝小葉内に異所性に出現した胆管上皮細胞マーカー陽性を示す上皮細胞から構成される幼若な胆管である。この細胆管が肝小葉内に増えていく現象は細胆管反応と呼ばれ、細胆管は肝組織修復過程で胆汁ドレナージ機能という重要な意義を持つ。発生学的に、胆管は先立つ門脈の形成に伴い構築され、病的肝臓においては細胆管周囲に門脈由来と思われる脈管構造が確認されている。そのため、細胆管と血管新生の両者は密接に関連していると推察されるが、胆管増生に伴う血管の3次元構造変化および胆管との関係は未解明である。

本研究では、臓器透明化手法と免疫組織化学染色を組み合わせ、肝臓内の胆管と血管の3次元構造解析を同時的に行う手法を確立したうえで、病的肝臓における細胆管と血管新生の関連を詳細に解析した。

## II. 研究対象ならび方法

C57BL/6J マウスに 0.1% 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) 含有飼料を 3 週間給餌することで肝障害を誘導し、肝障害モデルマウスを作成した。DDC 給餌から 3 週間時点で肝臓を摘出し、凍結標本から 3 次元解析用の 200  $\mu$ m の厚切り切片を作成した。厚切り切片に対して臓器透明化手法と蛍光免疫染色を組み合わせることで胆管と血管の 3 次元構造解析を行なった。また、DDC 給餌中に血管新生阻害薬である vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) 阻害剤 (以下 VEGFR-2 中和抗体) を 20 mg/kg body weight の濃度で 3 週にわたり週 3 回の腹腔内投与を行った個体を作成し、3 次元構造解析を行なった。蛍光免疫染色による胆管の標識には、胆管上皮細胞マーカーである CK19 抗体を使用し、血管構造の標識には、血管内皮細胞マーカーである CD31 抗体を使用した。臓器透明化は、透明化試薬として水とフルクトース、還元剤で構成される SeeDB (See Deep Brain) を用いて行った。共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像情報について、NIS-Elements AR ソフトウェアで 3 次元構築した。3 次元取得画像における胆管の面積、血管の面積、分岐点、分枝数を NIS-Elements AR で計測した。

### III. 研究結果

1. 200  $\mu\text{m}$  の厚切り切片で3次元構造解析を行うことで、胆管および血管の連続性を明瞭に描出し、それぞれの構造および位置関係を詳細に観察することが可能となった。
2. DDC 障害肝において、門脈系の血管が肝小葉内に伸長し、胆管増生は形成された血管に伴走して存在していた。
3. VEGFR-2 中和抗体投与下における DDC 障害肝では血管新生の抑制と共に、胆管増生も抑制された。
4. NIS-Elements AR ソフトウェアを用いた定量解析では、DDC 障害肝群は正常肝群と比較し、胆管面積の増加に加えて、血管面積、血管分岐点および血管分枝数のいずれにおいても有意差をもって増加した。
5. VEGFR-2 中和抗体投与下における DDC 障害肝群は DDC 障害肝群と比較して、胆管面積の減少に加えて、血管面積、血管分岐点および血管分枝数のいずれにおいても有意差をもって減少した。

### IV. 結 語

今回我々は、肝臓内部の胆管および血管ネットワークの3次元構造を同時に評価する手法を確立した。この方法を用いることで、肝障害における胆管および血管の構造の変化を詳細に捉えることが可能となった。肝障害時には、門脈周囲の血管の分岐点、分枝数および面積の増加を認め、細胆管反応時には血管新生も生じていることが明らかとなった。また、VEGFR-2 シグナルを介して形成される血管が胆管増生に重要な因子である可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 肥田 圭介 (医療安全学講座)

副査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 講師 片桐 弘勝 (外科学講座)

肝障害組織では肝細胞が失われた肝小葉内に細胆管と呼ばれる幼若な胆管構造が出現し、この細胆管は肝修復過程で胆汁ドレナージ機能という重要な意義を持つ。発生学的に胆管は先立つ門脈の形成に伴い構築されることから、細胆管と血管新生は密接に関連していると推察されるが障害肝における両者の3次元的位置関係は明らかとなっていない。本研究は、臓器透明化手法を用いて、肝内胆管と血管の3次元構造解析を行った論文である。細胆管増生を誘導した障害マウス肝の解析では胆管増生に伴い門脈系の血管新生が生じていた。また、細胆管増生誘導時にVEGFR-2抗体により血管新生を抑制したマウス肝の解析では、血管新生と同時に胆管増生も抑制された。この結果、肝障害時には門脈周囲の血管が胆管構造の変化と同時的に構造変化を示すことが明らかとなり、病的肝臓における細胆管と血管新生の両者に細胞間相互作用が存在する可能性を示した論文である。

本論文は、ヒト病的肝においても3次元解析を行うことで、末期肝不全における病態解明に繋がる事が期待される有益な知見を有した研究と言える。学位に値する論文である。

### 試験・試問の結果の要旨

肝障害時における細胆管反応及び周辺に観察される血管新生が肝再生に及ぼす影響・意義、3次元構造解析の方法、本研究が将来的に臨床にもたらすに意義について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

### 参考論文

- 1) IL-8 induces trans differentiation of mature hepatocytes toward the cholangiocyte phenotype  
(IL-8は成熟肝細胞から胆管細胞への分化転換を誘導する) (佐々木登希夫, 他8名と共著)  
FEBS Open Bio, 9巻, 12号(2021) : p2105-2116
- 2) Tc-99m GSA scintigraphy within the first 3days after admission as an early predictor of outcome in severe acute liver injury (重症急性肝障害の入院後3日以内におけるTc-99m GSAシンチグラフィの早期予後予測因子としての有用性) (鈴木悠地, 他6名と共著)  
Scientific Reports, 11巻1号(2021) : p12518
- 3) Early identification using the referral system prolonged the time to onset for hepatic encephalopathy after diagnosing severe acute liver injury (紹介制度を利用した重症急性肝障害の早期発見が肝性脳症発症までの時間を延長させる) (柿坂啓介, 他6名と共著)  
Scientific Reports, 10巻1号(2020) : p17280
- 4) Autoimmune hepatitis following influenza virus vaccination (インフルエンザウイルスワクチン接種後に発症した自己免疫性肝炎の2例報告) (佐々木登希夫, 他6名と共著)  
Medicine, 97巻30号(2018) : e11621
- 5) Serum alpha-fetoprotein increase prior to fibrosis resolution in a patient with acute liver failure (急性肝不全患者における線維化改善前の血清 $\alpha$ -フェトプロテインの上昇について) (柿坂啓介, 他5名と共著)  
Clinical Journal of Gastroenterology, 14巻5号(2021) : p1470-1475