

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11502

研究課題名（和文）多彩な閉塞病型と遺伝子発現制御に着目した胆道閉鎖症の病因・病態進展に関する研究

研究課題名（英文）Research on the etiology and disease progression of biliary atresia focusing on various obstructive types and gene expression

研究代表者

佐々木 英之（Sasaki, Hideyuki）

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：40438461

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではこれまでの網羅的解析で胆道閉鎖症の病因、病態形成に関連がある可能性がしめされたmicroRNAを候補して、定量的解析を行うことで、さらに4種類まで絞り込みを行った、その4つのmicroRNAと病型以外の手術日齢などの因子や臨床経過の検討を進めた結果、予後と肝内microRNAの発現により症例を層別化できることを見いだした。

すなわち胆道閉鎖症の多彩な病態において肝内microRNAの発現が重要な意義を持つことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では病型以外の手術日齢などの因子や臨床経過の検討を進めた結果、予後と肝内microRNAの発現により症例を層別化できることを見いだした。すなわち胆道閉鎖症の多彩な病態において肝内microRNAの発現が重要な意義を持つことが確認された。

本研究のデータをもとにさらに研究を進めることで、胆道閉鎖症の病因を明らかにして病態を解明できる可能性ならびにmicroRNAの発現パターンの相違と病型とを総合的に評価して術後治療の反応性を予測することにより、症例に応じた適切な術後治療の確立に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we narrowed down candidates, which may be related to the pathogenesis and pathogenesis of biliary atresia in the comprehensive analysis so far, to four microRNAs by quantitative RT-PCR. As a result of investigating factors such as the four microRNAs, the age of initial surgery, disease type, and the clinical course, we found that cases can be stratified by the prognosis and the expression of intrahepatic microRNAs. Therefore, we confirmed that the expression of intrahepatic microRNA has important significance in various pathological conditions of biliary atresia.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 病型 病因 microRNA

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は新生児及び乳児期早期に発症し閉塞性黄疸を呈する代表的疾患である。胆道閉鎖症に対する第一の治療法は1950年台に開発された葛西手術(肝門部腸吻合術)である。しかし日本胆道閉鎖症研究会の全国登録事業によると、葛西手術による黄疸消失率は6割程度である。さらに20年自己肝生存率は50%以下である。その結果、18才以下で実施される肝移植の67.5%が胆道閉鎖症を原疾患としている。このように胆道閉鎖症は非常に難治であるため、新規治療法の開発は急務である。しかし胆道閉鎖症はその病因は未だ特定されていない。また1950年台に開発された葛西手術と1990年台に本格的に導入された肝移植術以降、有効な治療法は開発されていない。

これまで胆道閉鎖症の病因に関する研究は多く行われており、免疫異常説、血行異常説、ウィルス感染説、遺伝子異常など、各方面から検討が行われているが、決定的な証拠は得られていない。また胆道閉鎖症の特徴の一つはその多彩な病型である。病型は図に示すように非常に多彩である。

現在活発に研究されている胆道閉鎖症動物モデルは新生児マウスの腹腔内にロタウィルスを注入するモデルである(J Clin Invest. 2004 Aug;114(3):322-9)。このモデルでは肝外胆道が全長にわたって索状に閉塞する病型は再現されているが、他の病型(肝外胆管に嚢胞を形成するタイプや肝外胆道が消失するタイプ)は再現されない。さらに、ヒトでの検討では胆道閉鎖症症例におけるウィルス感染を実証したという報告は非常に少ない。またノックアウトマウスの検討で *inversin*(Hepatology. 1999 Aug;30(2):372-8.)や *SOX17*(Development. 2013 Feb 1;140(3):639-48)などで胆道閉鎖症に類似の胆道閉塞が報告されているが、ヒトでの遺伝子異常についての報告は限定的である。

また胆道閉鎖症の治療では適切な葛西手術とともに術後の薬物治療が重要である。従来、術後療法としてステロイドの有用性が報告されている(Pediatr Surg Int. 2013 Nov;29(11):1091-5)(J Hepatol. 2013 Nov;59(5):1054-8)。しかし、近年欧米で実施された大規模 RCT では有効性を疑問視する報告もなされている(JAMA. 2014 May 7;311(17):1750-9.)

しかし特定の患者集団では有効という報告もあり、実臨床でもステロイドが有効であったと考えられる症例は確かに存在する。

このように胆道閉鎖症はステロイドの反応性をはじめとした臨床経過が症例により異なり、胆道閉鎖症の発生に関与する因子が多彩であることが考えられる。よって多彩な病型を示す原因を究明することを視野にいれた研究遂行が必要である。

一方、近年ノンコーディング RNA の一種である microRNA と様々な炎症を伴う疾患との関連が注目されている。microRNA は 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA で、他の遺伝子発現を調節する機能を有すると考えられている。

本症においても、新生児マウスの腹腔内にロタウイルスを投与して得られる実験モデルにおいて miR-29 のアップレギュレーションにより *Igf1* や *Il1RAP* を直接制御している事が示され、病態形成への関与が注目されている。(J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012 54(2): 186-92)

ステロイドの治療反応性と microRNA との関連についても、潰瘍性大腸炎といった炎症性疾患での報告があり(Gastroenterology 2008 135 1624-35)注目すべきである。

ステロイド反応性をはじめとした術後治療反応を予測するマーカーとしての研究を通じて胆道閉鎖症の病態を解明することは、本症の適切な治療層別化を可能とするために必須の研究である。

これまでの研究で生後 70 日以内の比較的早期で且つ、肝門部が閉塞し肝外胆管の嚢胞を形成しない病型に限定して、肝臓における microRNA の発現を microarray による網羅的検討を行ってきた。その結果、予後良好と予後不良との比較において、1.5 倍以上と発現の違いが認められた microRNA を計 23 個同定した。

これらの microRNA がターゲットとする mRNA について、実験的に確認されているものは 68 個である。さらに相互作用のある可能性ある遺伝子を PITA, TargetScan, microRNAorg で抽出したところ、146 遺伝子が抽出された。

2. 研究の目的

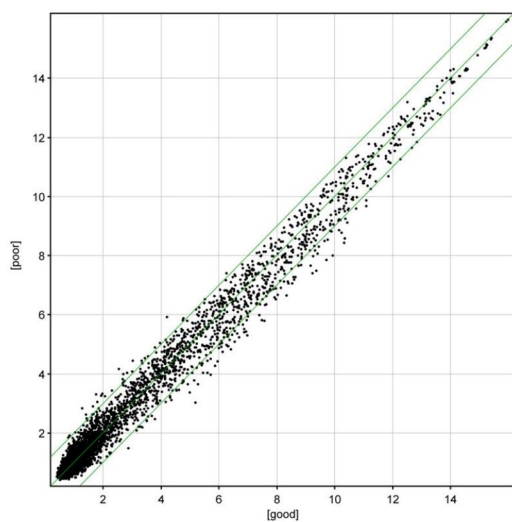
今回の研究の目的は、これまでの既存の研究結果をもとに、多彩な病型を呈するという胆道閉鎖症の特徴に着目して研究を進めることで、胆道閉鎖症の病因を明らかにして病態を解明することである。microRNA の発現パターンの相違と病型とを総合的に評価して術後治療の反応性を予測することにより、症例に応じた適切な術後治療の確立に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、これまでの網羅的解析で有意差を認めた microRNA のなかで、発現制御のターゲットとなる mRNA や GO term などについて、胆道閉鎖症の病因・病態進展に関連があると予想されるものを候補因子として選定を進めて、さらに定量的な検討を進めた。そのために多彩な胆道閉鎖症の病型のなかで最も高頻度に認められる肝門部閉塞型(胆道閉鎖症基本病型 III 型)のなかで、肝門部が結合組織塊に置換され、総胆管が索状に閉塞している例を 30 例ピックアップして、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出した microRNA について real-time RT-PCR による定量的検討を行った。併せて対象症例を中心に病型以外の手術日齢や病理学的所見などの因子や臨床経過の検討を進めた。

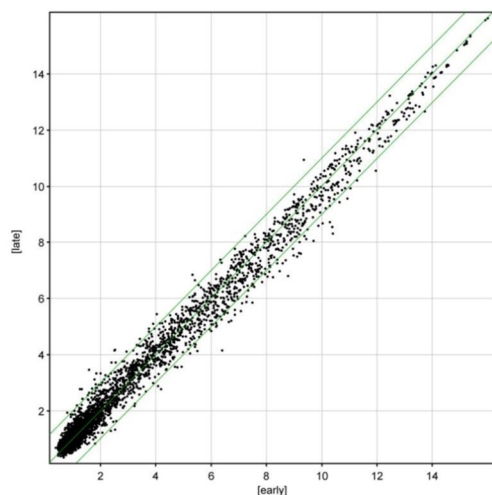
4. 研究成果

本研究では、これまでの網羅的解析で有意差を認めた microRNA のなかで、発現制御のターゲットとなる mRNA や GO term などについて、胆道閉鎖症の病因・病態進展に関連があると予想されるものを候補因子として選定を進めて、さらに定量的な検討を進めた。



黄疸消失群で1, 5倍以上の発現増加	黄疸消失群で1, 5倍以上の発現減少
hsa-miR-4455	hsa-miR-154-3p
hsa-miR-4676-5p	hsa-miR-548a-3p
hsa-miR-6865-5p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-3151-5p	hsa-miR-361-3p
hsa-miR-3125	hsa-mir-3910-1
	hsa-mir-3910-2
	U22
	hsa-miR-502-5p
	hsa-miR-628-3p
	hsa-mir-323a
	hsa-mir-548a-1
	hsa-mir-6516

図1：予後による miRNA の発現の違い
統計学的に有意な差を認めた microRNA は 17 個同定されている



早期群で1, 5倍以上の発現増加	早期群で1, 5倍以上の発現減少
hsa-miR-5100	hsa-miR-486-5p
hsa-miR-3176	hsa-miR-4648
hsa-miR-3156-5p	hsa-miR-3667-5p
ACA55	ENSG00000252277
hsa-miR-4454	

図2：臨床経過による miRNA の発現の違い
統計学的に有意な差を認めた microRNA : 9 個同定されている

網羅的解析で有意差を認めた microRNA について、さらに定量的 RT-PCR により検討を加えた。そ

の結果 has-miR-3176, has-miR-193a-5p, has-miR-30b-3p, has-miR-338-5p の4つの microRNA が層別化に有用な因子である可能性が示された (図 4, 5)。

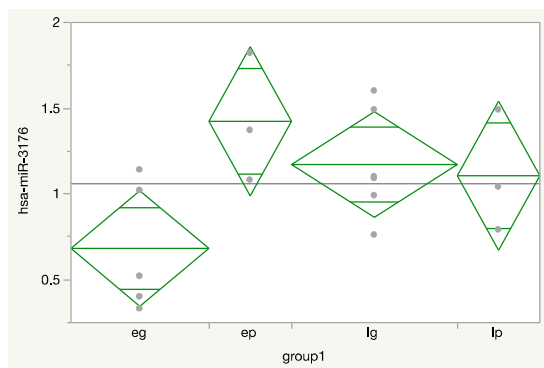


図 4 : has-miR-193a-5p

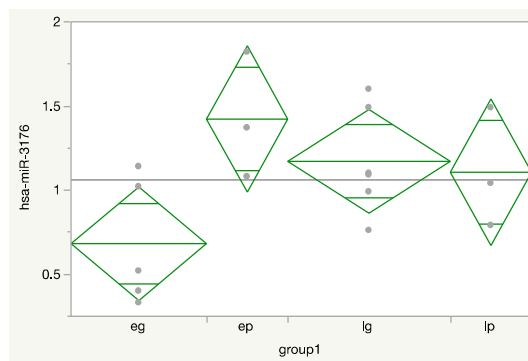


図 5 : has-miR-3176

eg: 早期手術予後良好例
 ep: 早期手術予後不良例
 lg: 非早期手術予後良好例
 lp: 非早期手術予後不良例

このデータを元に、多彩な胆道閉鎖症の病型のなかで最も高頻度に認められる肝門部閉塞型(胆道閉鎖症基本病型 III 型)のなかで、肝門部が結合織塊に置換され、総胆管が索状に閉塞している例を 30 例ピックアップして、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出した microRNA について real-time RT-PCR による定量的検討を行った。

30 例の手術日齢分布と臨床経過を図に示す。

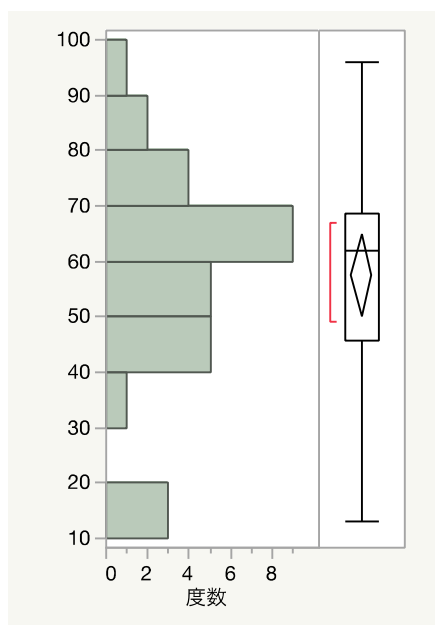


図 6 : 手術日齢分布



図 7 : 臨床経過分布

この対象に対して、これまでの検討で手術日齢および臨床経過と有意な関係を認めていた 5 つの microRNA でクラスター解析を実施した結果を図 8 に示す

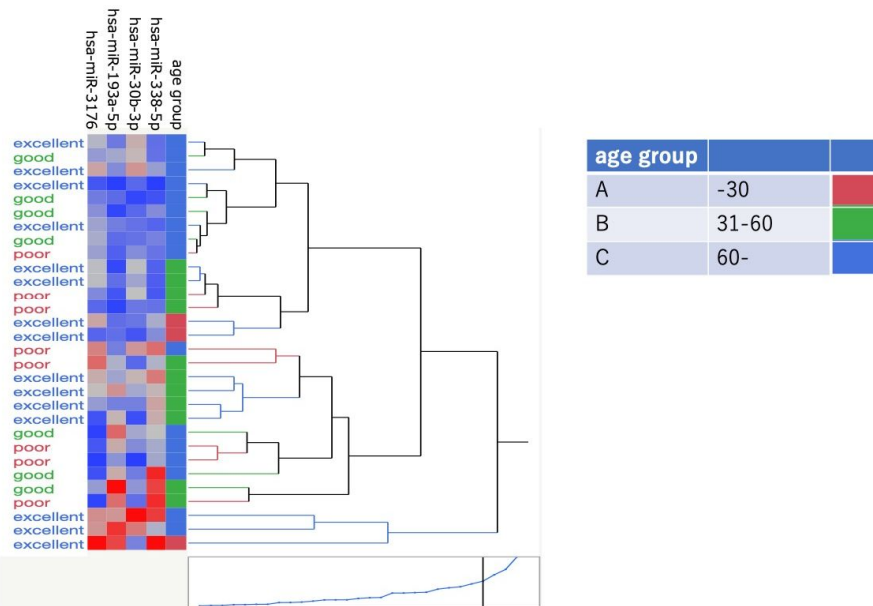


図 8 : microRNA と臨床情報をもとにしたクラスター解析による患者層別化

このように対象症例を中心に病型以外の手術日齢などの因子や臨床経過の検討を進めた結果、予後と肝内 microRNA の発現により症例を層別化できることを見いだした。本研究の成果により胆道閉鎖症の多彩な病態において肝内 microRNA の発現が重要な意義を持つことが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideyuki Sasaki
2. 発表標題 A relationship between microRNA expression and clinical course in biliary atresia
3. 学会等名 51st Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木英之
2. 発表標題 胆道閉鎖症肝組織におけるmicroRNAの発現と臨床経過についての検討
3. 学会等名 第44回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 拡 (Tanaka Hiromu) (50579448)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	仁尾 正記 (Nio Masaki) (70228138)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------