

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2009～2011  
課題番号：21591637  
研究課題名（和文） 肝移植における非侵襲的グラフト病態診断法の確立とリアルタイム免疫応答モニタリング  
研究課題名（英文） Establishment of non-invasive diagnostic methods for allograft dysfunction and real-time monitoring of immunological status in liver transplant  
研究代表者  
丸橋 繁（MARUBASHI SHIGERU）  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20362725

研究成果の概要（和文）：OMICS 解析法を肝移植分野に応用し、観血的材料である肝生検組織と非侵襲的材料である末梢血、胆汁を用いて解析を行った。肝障害時の肝生検サンプルを用いた網羅的遺伝子解析と胆汁サンプルを用いた網羅的蛋白解析を行うことにより、急性拒絶反応に関連する肝組織中および末梢血液中に発現上昇する遺伝子群および胆汁中に増加する蛋白群を同定した。これらの結果を用いて臨床応用可能な非侵襲的診断法を確立した。

研究成果の概要（英文）：We investigated liver biopsy samples and bile samples in clinical liver transplant, applying molecular biological techniques. We found that biomarkers which were associated with acute cellular rejection after liver transplant in the two different OMICS levels; DNA microarray and proteomic analyses. We then established the non-invasive method for diagnosing acute cellular rejection in liver transplant recipients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：肝移植、生体材料、拒絶反応、DNA マイクロアレイ、プロテオーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト全遺伝子の配列が解明され、様々な分野において遺伝子レベルでの病態解明が進んでいる。特に mRNA 発現のプロファイルを解析する網羅的遺伝子発現解析 (DNA マイクロアレイ) は、移植医学の分野にも取り入れられ、なかでも拒絶反応に関与する遺伝子群の解明を中心とした研究が内外で行われ、一定の研究成果を上げてきた。しかしその一方で、mRNA 発現プロファイルと翻訳蛋白との相関が乏しいことが知られるようになり、網羅的遺伝子解析そのものの限界も認識されるようになった。これに対し最近、遺伝子発現解析に加え、蛋白の解析を行うプロテオーム解析、代謝産物を解析するメタボローム解析を総合した OMICS 解析法が発展し、がん治療の分野などで新たに革命的な知見が得られている。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまで培ってきた網羅的遺伝子発現解析法、プロテオーム解析法、およびメタボローム解析法の成果や様々な経験を肝移植分野に応用し、肝生検組織と非侵襲的である末梢血や胆汁などの生体材料との相関を比較検討することにより、①これまでに不可能であったグラフト肝の臨床診断を確実にかつ非侵襲的に診断する方法を確立すること、さらに、これを応用して②非侵襲的リアルタイム免疫応答モニタリング法を確立すること、を目的として立案した。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝移植生体材料の採取と保存

肝移植患者においては、術前の末梢血、術

後の末梢血、胆汁、尿をプロトコールに従い無菌操作で採取し、各解析法に適した方法で保管する。肝生検は肝提供者の術中肝生検、および患者 (レシピエント) の術後肝生検を対象とする。術後肝生検は、肝移植後 3 ヶ月、1 年、2 年、5 年および肝機能異常が認められ、拒絶反応や原疾患の再発が疑われる場合にインフォームド・コンセントを得て行う。肝生検の方法は、16G 組織バイオプシーニードルを用い超音波ガイド下に行なう。これにより約 20~25mm の円柱状の肝組織を採取することが可能である。肝生検を施行する場合は必ず非侵襲的生体材料 (末梢血、胆汁、尿) を採取する。

肝生検組織あるいは末梢血サンプルから mRNA を抽出し、超微量 mRNA 分析用マイクロラボチップによる quality check を行なった上で、cy3、cy5 による蛍光色素標識を行ない target DNA を調整する。また、抽出 mRNA 量を定量し、DNA マイクロアレイに必要な量 (> 20ng) であることを確認する。

保存胆汁および尿を用いて、胆汁や尿に含まれる様々な共雑物 (胆汁酸、脂質、ビリルビン等の分析の妨げになる物質) を効率よく除去する方法を確立する。さらに高効率で消化ペプチドを抽出、回収しナノフロー逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて分離精製する方法を確立する。

### (2) 肝移植生体材料 (肝生検組織、血液、胆汁) の OMICS 解析

#### ① DNA マイクロアレイ

ヒトの全遺伝子を網羅した 44000 遺伝子が搭載された DNA マイクロアレイチップを用いて発現量測定を行う。対象サンプルは侵襲的生体材料 (肝生検組織) および非侵襲的生体材料 (末梢血) を用いる。肝生検組織は組織全

体の遺伝子発現解析と次項で述べる Laser capture microdissection (LCM)法を用いた、Zone 別遺伝子発現解析をおこなう。また、末梢血有核細胞層の遺伝子発現解析を行う。

## ②プロテオーム解析

胆汁および尿から分離保存されたペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) と飛行時間型 (TOF : Time of Flight) タンデム質量分析計 (MS/MS) の組み合わせにより、蛋白同定を正確に行える質量分析法を確立する。本研究では最新の蛋白発現比較定量解析の方法である iTRAQ (SPLEX) 法を用いることにより、一度に 8 検体の変動解析が可能となる。これにより得られた MS/MS スペクトルから、蛋白質消化ペプチドの部分配列情報を利用し、マーカー蛋白群の同定を行う。

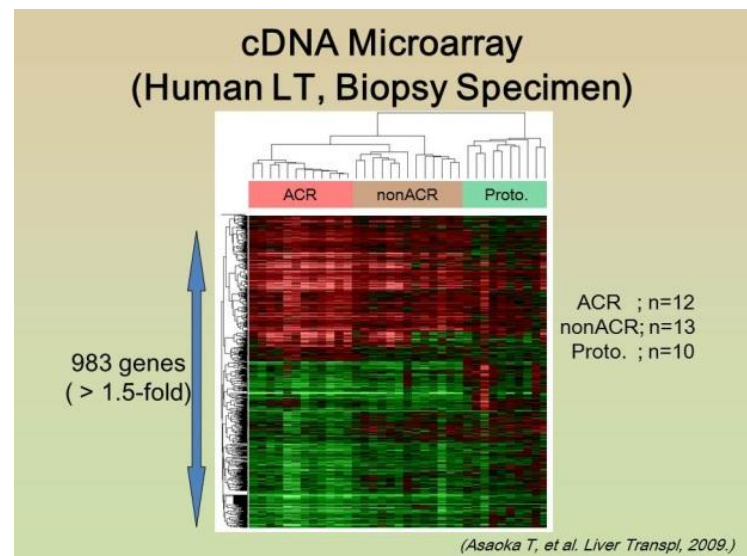
## (3) 臨床病理学的診断および OMICS 解析の総合評価と臨床応用

肝生検をもとに得られた最終臨床病理診断により、得られた各生体材料を急性拒絶反応、HCV 肝炎、他の原病の再発、感染、薬剤性肝障害など重要な項目に分類し、遺伝子発現レベル (特異的 mRNA 発現パターン)、蛋白レベル (特異的胆汁中蛋白) の新規バイオマーカーを同定する。また、同定した新規バイオマーカーを統合し、末梢血や胆汁による OMICS 解析の結果と比較し、OMICS 解析で同定した新規バイオマーカーの有用性について検討する。

## 4. 研究成果

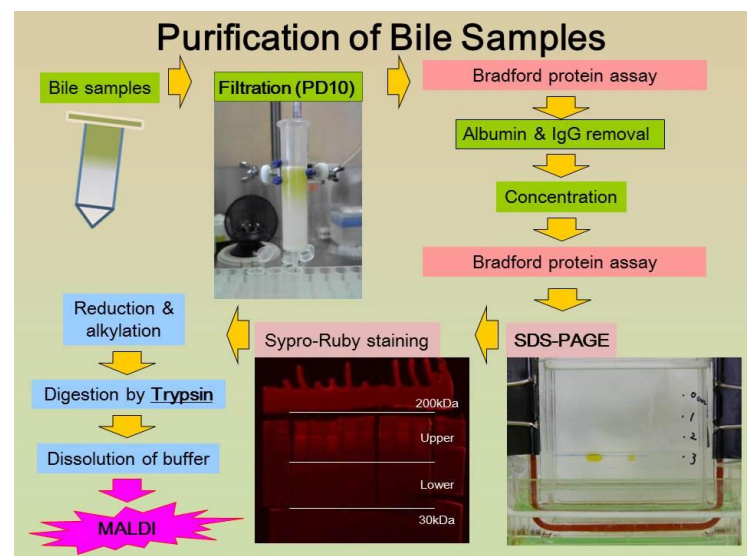
(1) DNA マイクロアレイ : ヒトの全遺伝子を網羅した 44000 遺伝子が搭載された DNA マイクロアレイチップを用いて発現量測定を行っ

た。マイアミ大学で得られた HCV 肝炎再発患者 13 名と拒絶反応陽性患者 9 名の肝生検サンプルの比較により、拒絶反応の候補遺伝子として、Caspase 8、Guanylate-binding protein 2 (BMP2) を同定した。さらに BMP2 に関して、肝移植における末梢血中 mRNA の推移を測定し、拒絶反応時に上昇することを

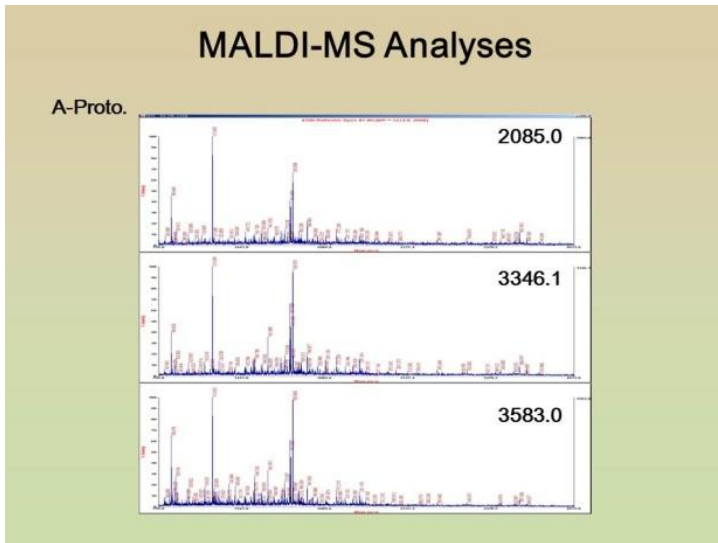


示した。

(2) プロテオーム解析 : 保存胆汁を用いて、胆汁や尿に含まれる様々な共雑物 (胆汁酸、脂質、ビリルビン等の分析の妨げになる物質) を効率よく除去する方法を確立した。さらに高効率で消化ペプチドを抽出、回収しナノフロー逆相高速液体クロマトグラフィー



(RP-HPLC)にて分離精製する方法を確立した。



酸素同位体法を用いた蛋白変動解析の結果から、拒絶反応に関連する候補蛋白として Alanin amniopeptidase (AAP, CD13) を同定した。

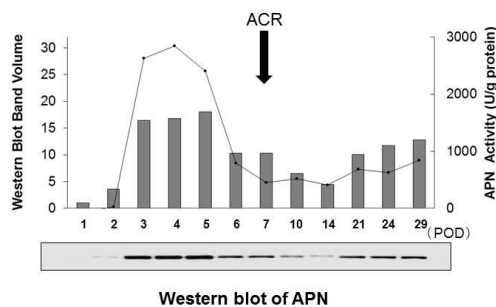


Figure 4B

また、網羅的プロテオーム解析として近年注目されている iTRAQ 法を用いて胆汁中に含まれる蛋白の網羅的解析を行うことに成功した。同定された胆汁中ペプチドは 9000 を超え、蛋白は 220 あまりを同定することができた。

このうち、(1) の解析結果を同時に解析することにより、拒絶反応に関連する遺伝子と蛋白との相互評価を行い、肝内および胆汁蛋白で関連する候補蛋白/遺伝子群を同定した。

## 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 3 件)

- ① Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Okumura N, Takao T, Doki Y, Mori M, Nagano H. Significance of alanine aminopeptidase N (APN) in bile in the diagnosis of acute cellular rejection after liver transplantation. *Journal of Surgical Research* 査読有 2011 Mar 25
- ② Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Hama N, Eguchi TA, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. Guanylate-binding protein 2 mRNA in peripheral blood leukocytes of liver transplant recipients as a marker for acute cellular rejection. *Transplant International* 査読有 23(4) 390-396, 2010
- ③ Asaoka T, Kato T, Marubashi S, Dono K, Hama N, Takahashi H, Kobayashi S, Takeda Y, Takemasa I, Nagano H, Yoshida H, Ruiz P, Tzakis AG, Matsubara K, Monden M, Doki Y, Mori M. Differential transcriptome patterns for acute cellular rejection in recipients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transplantation* 査読有 15(12) 1738-1749, 2009

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 畠野尚典、丸橋 繁、他 iTRAQ 法を用いた胆汁中蛋白質の網羅的発現解析の試み 第 111 回 日本外科学会 2011. 5. 25 広島市
  
- ② 小林省吾、永野浩昭、丸橋 繁、他 臨床肝移植急性拒絶における末梢決 IRF と GBP2 発現の意義 第 28 回 日本肝移植研究会 2010. 7. 1 広島市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸橋 繁 (Marubashi Sigeru)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20362725

### (2) 研究分担者

永野 浩昭 (Nagano Hiroaki)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：10294050

小林 省吾 (Kobayashi Shougo)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30452436

種村 匡弘 (Tanemura Masahiro)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30379250

武田 裕 (Takeda Yu)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90397696

(H21 まで分担者として参画)