

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 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592275

研究課題名（和文）膵胆管合流異常の病態と治療に対する統合的研究

研究課題名（英文）Integrated study on the pathophysiology and treatment of pancreaticobiliary maljunction

研究代表者

金子 健一郎 (KANEKO KENITIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90335042

研究成果の概要（和文）：膵・胆管合流異常の症状発現機序に基づき、症状が増悪ないし遷延する小児例に対し、内視鏡的膵管胆管造影を行いドレナージする方法が、症状の改善をもたらす新しい治療法として確立された。また、胆道発癌機序に関する研究は行き詰まりをみせている。Microarray を用いて、合流異常が小児期に既に胆道上皮へ及ぼす遺伝子発現の変化を網羅的・統合的に分析し、さらに PCR で病態と関わる 5 遺伝子 (UCA1, DUOX2, DUOXA2, ID1, BMF) の亢進と、1 遺伝子 (GP2) の低下が確認された。特に UCA1 は、癌と胎児組織に発現し、合流異常の癌化にも関与する可能性が高いと予想される。

研究成果の概要（英文）：Based on the protein plug theory, we have developed a new therapy of endoscopic biliary drainage (EBD) for patients with persistent or exacerbated symptoms of pancreaticobiliary maljunction. The mechanism of carcinogenesis of pancreaticobiliary maljunction remains unknown. Microarray analysis and Real-time PCR identified 5 upregulated genes and one downregulated gene, including UCA1, DUOX2, DUOXA2, ID1, BMF, and GP2. UCA1, a noncoding RNA, is an oncofetal gene, and its upregulation may be important for biliary carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

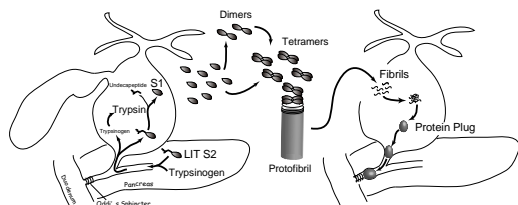
キーワード：先天性消化器疾患学，先天性胆道拡張症，膵・胆管合流異常，蛋白栓

1. 研究開始当初の背景

膵・胆管合流異常は、膵液と胆汁の相互逆流により、小児には腹痛・嘔吐といった症状を生じ、成人では胆道癌を高頻度に引き起こす。われわれは過去の科学研究費による研究で、症状発現機序の解明に成功した。すなわち、合流異常により、膵液が胆管へ逆流して、

胆汁中で膵のタンパク分解酵素が活性化される。膵臓からは可溶性の lithostathine S2 が膵液中に分泌され、胆管へ逆流する。胆道内でこの S2 がタンパク分解酵素により分解されて不溶性の S1 が形成される。S1 は自己集合して原線維 protofibril を形成し、これが線維を形成し、さらに凝集して蛋白栓が形

成される。蛋白栓が共通管に詰まることで、胆管・膵管の内圧が上昇して症状が発現する。(下図)



また、現在も行われている手術治療は肝内結石の発生や遺残胆管癌発生などの問題点を有しており、将来的には手術を必要としない治療法の開発が望まれる。そのためには、胆道の発癌機序の解明が必要であるが、その研究は行き詰まりをみせていた。

2. 研究の目的

症状発現機序に基づく新治療法の開発を一つの目標とした。従来、症状の増悪や遷延しているときに、内視鏡的膵管胆管造影は危険であるとされたが、蛋白栓の閉塞による症状発現機序からすれば、むしろ積極的にこれを行い、ドレナージを実施することが、症状の改善に繋がると予想した。また、蛋白栓を実際に溶解する薬剤の発見は将来の治療薬の開発に繋がる。

癌化に関しては、分子生物学的手法を用いて、膵・胆管合流異常が小児期で既に胆道上皮へ及ぼす遺伝子発現の変化を網羅的・統合的に解明し、新しい観点から癌化への病態を捉えることをもう一つの目標とした。

3. 研究の方法

(1) Pilot study

遺伝子転写 (RNA) レベルでの変化に注目し、mRNA のみならず、タンパクをコードしない microRNA (miRNA) についても網羅的な解析を pilot study で試みた。合流異常の3歳女児と、3歳女児の他腫瘍の再発で合併切除した胆嚢を用いた。パラフィンブロックから上皮を切り出し、total RNA を抽出し、DNA microarray (OpArray Human v4.0) と miRNA アレイ (mirVana miRNA Bioarray v9.2) にハイブリダイゼーションした。

(2) 治療法の開発

臨床的研究として、先天性胆道拡張症・膵胆管合流異常の症状を発症した患児に対し、その保護者に文書での同意を得た上で、発症後早期に内視鏡的逆行性胆道膵管造影を行う。蛋白栓が充満している場合、5Fr 5-7cm のステントチューブを留置して内視鏡的胆道ドレナージ (EBD) を行う。留置されたチュ

ーブは胆管切除時に抜去する。

基礎的研究として、文書で同意の得られた膵胆管合流異常患者から実際に採取されたタンパク栓を用い、超深度デジタル実体マイクロスコープによる蛋白栓の各種薬品による溶解実験を行う。

(3) 膵胆管合流異常に対する分子生物学的アプローチ

事前に文書で同意の得られた膵胆管合流異常患者から手術で採取された胆嚢を対象として、他疾患の患児で合併切除がなされた胆嚢標本を文書で同意が得られた上で対照として用いる。胆嚢を摘出した直後に生食で洗浄後、上皮のみ剥離する。細切してチューブに入れ、液体窒素で急速凍結し、 -80°C で冷凍保存する。2008年から2009年に当科で手術した膵・胆管合流異常6名(平均5.4歳, 2-8歳, 男2女4)、肝芽腫4名(平均2.8歳, 1-4歳, 男3女1)の胆嚢を、それぞれ対象および対照とした。

RNeasy Mini Kit を用いて totalRNA を抽出する。MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit を用いて aRNA を合成する。ラベルした aRNA を CodeLink Human Whole Genome Bioarray (Applied Microarrays, Tempe, AZ) にハイブリダイゼーションする。

Cy5-streptavidin

for the microarray を用いてハイブリダイゼーション後の染色を行う。GenePix4000B でスキャンして、結果は Microarray Data Analysis Tool version 3.0 (Filgen, Nagoya, Japan) にて正規化する。

強度が十分あり、有意に対象で亢進または低下発現した遺伝子を抽出し、real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて、発現異常を確認する。

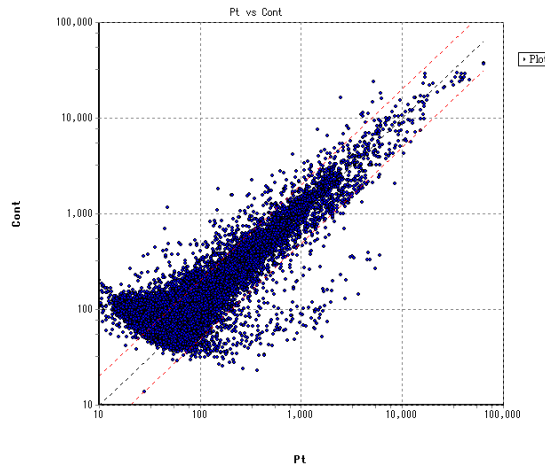
さらに蛋白発現する遺伝子については、免疫組織学的に蛋白レベルでの発現異常を検討する。2008年から2010年に手術した合流異常19例(5ヶ月~11歳, 男5女14)、肝芽腫5例(対照, 1~4歳, 男4女1)、胆石症5例(5~12歳, 男2女3)の胆嚢を免疫組織学的に検討した。胆嚢はホルマリン固定後パラフィン切片とし、脱パラフィン後に各種抗体で染色した。使用抗体は、DUOX2 抗体(DUOX2 Y-15: sc-49939, Santa Cruz; dilution, 1:100)、DUOX2 抗体(Anti-DUOX2 HPA011085, Sigma-Aldrich; 1:20)、ID1 抗体(Id1 C-20: sc-488, Santa Cruz; 1:80)、と BMF 抗体(PAB2443, Abnova; 1:50)。抗原賦活として Target Retrieval Solution pH 9 と microwave を DUOX2 Y-15 に、citrate buffer pH 6 と microwave を他の3抗体に用いた。ABC法で使用し、DABで発色した。細胞質の発現は3段階に評価

し、核での発現は labeling index (LI) で比較した。

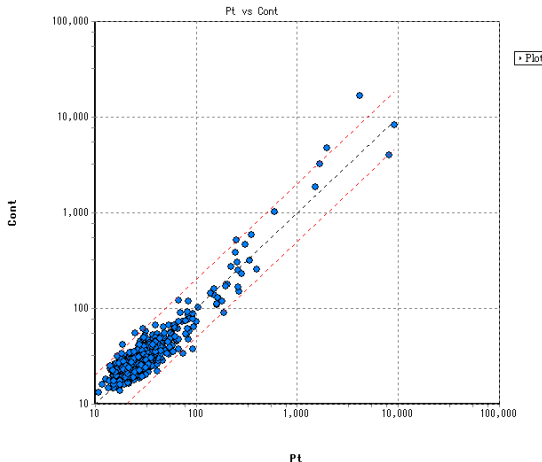
4. 研究成果

(1) Pilot study

合流異常の mRNA では対照より 351 遺伝子が発現亢進 (強度比 ≥ 2) し、902 遺伝子が発現低下 (強度比 ≤ 0.5) していた。発現亢進する遺伝子の Gene Ontology (GO) では生物学的プロセスの gene expression (40 個), cell cycle (16 個), apoptosis (14 個) が、10 以上の遺伝子で有意に発現 ($p < 0.05$, $Z > 0$) する GO であった。発現低下する遺伝子では分子機能の transcription repressor activity (17 個), transcription corepressor activity (10 個) が 10 以上の遺伝子で有意に発現する GO として存在した。発現亢進遺伝子には抗アポトーシス因子である Bcl-2 に結合する因子である BAG1 がみられた。(下図)



合流異常胆嚢上皮の mRNA は apoptosis, cell cycle, 転写に関して小児期で既に発現異常がある可能性が示唆された。これは合流異常で報告されている K-RAS 遺伝子異常, 細胞回転亢進および過形成変化と関連する異常と考えられる。



miRNA アレイでは合流異常胆嚢上皮の miRNA は小児期では発現異常はみられなかつ

た。(上図)

(2) 治療法の開発

症状遷延/悪化症例での内視鏡的ドレナージは、13 例で実施され急速な症状改善が得られた(下図)。全例での蛋白栓の閉塞が証明され、我々の症状発現機序が正しいという証拠となるとともに、新たな治療法として確立された。



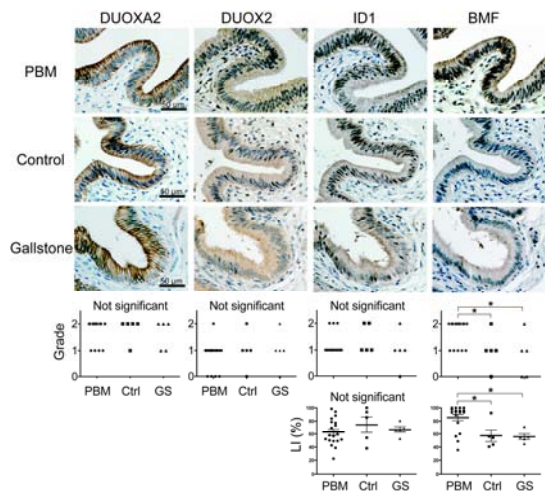
PD, pancreatic duct

ドレナージを実施した結果、手術で蛋白栓検体が得られることが困難となり、基礎的実験は実施することができなかった。

(3) 膵胆管合流異常に対する分子生物学的アプローチ

Microarray では合流異常の 188 遺伝子が亢進し、160 遺伝子が低下していた。RT-PCR で亢進した 6 遺伝子のうち 5 遺伝子 (*UCA1*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *ID1*, *BMF*) の亢進が、低下した 5 遺伝子のうち 1 遺伝子 (*GP2*) の低下が確認された。

免疫染色の結果、DUOXA2 と DUOX2 は細胞質で発現し、ID1 と BMF は細胞質と核で発現した。この発現パターンは合流異常、対照、胆石例で差は見られなかった。BMF のみ、合流異常例で対照と胆石例に比して細胞質と核の両者に有意に高発現がみられた。(下図)



小児期においても合流異常の病態と関連して遺伝子の発現変化が生じていることが確認された。特に *UCA1* は、膀胱癌細胞において過剰発現する mRNA 様の蛋白をコードしない(non-coding) RNA として発見された。癌と胎児組織に発現し、生後は心臓と脾臓以外に正常組織では発現しないとされる。*UCA1* は癌細胞において、増殖、transformation, 運動や浸潤, および薬剤耐性として作用することが示されている。よって、*UCA1* は合流異常の癌化にも関与する可能性が高く、今後の研究の発展に繋がる発見と考えられた。BMF は B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2) family に属する蛋白である。BMF は特有の刺激で活性化され、アポトーシスを引き起こす側の働きをする。今回、小児の合流異常の胆嚢上皮で蛋白レベルでも亢進がみられたことから、合流異常による胆嚢上皮の細胞回転亢進に伴うアポトーシスに関与する可能性が考えられる。*DUOX2*, *DUOX2*, *IDI* の亢進と *GP2* 低下は、潰瘍性大腸炎などの前癌病変でみられると報告されており、合流異常でも病態への関与が予想される。

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 7 件)

- ① 金子健一朗, 小野靖之, 田井中貴久, 土屋博紀, 村瀬成彦, 安藤久實. 先天性胆道拡張症, 膵・胆管合流異常の諸症状は蛋白栓の存在で説明できるのか? 査読無, 胆と膵 2012;33:49-54
- ② Kaneko K, Ito Y, Ono Y, Tainaka T, Tsuchiya H, Shimoyama Y, Ando H. Gene expression profiling reveals upregulated *UCA1* and *BMF* in gallbladder epithelia of children with pancreaticobiliary maljunction. 査読有 J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011;52:744-750
- ③ 小野靖之, 安藤久實, 金子健一朗, 田井中貴久, 土屋博紀, 村瀬成彦. 先天性胆道拡張症術後の反復性膵炎. 査読無, 小児外科 2011;43:728-730
- ④ Kaneko K, Ono Y, Tainaka T, Sumida W, Ando H. Acidic and basic solutions dissolve protein plugs made of lithostathine complicating choledochal cyst/pancreaticobiliary maljunction. 査読有 Dig Dis Sci 2009;54:1475-1480

[学会発表] (計 10 件)

- ① 金子健一朗, 小野靖之, 田井中貴久, 土屋博紀, 安藤久實. 膵・胆管合流異常を有する小児での胆嚢上皮における遺伝子発現の網羅的解析. 第48回日本小児外科学会総会. 2011/07/20 東京
- ② 金子健一朗, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 土屋博紀. 「胆道拡張のない膵・胆管合流異常症, 膵管形成異常症の治療: 成人領域と小児領域」小児における非拡張型膵胆管合流異常について. 第111回日本外科学会総会. 2011/05/25 要旨集
- ③ 金子健一朗, 小野靖之, 田井中貴久, 安藤久實. 膵・胆管合流異常病態下胆嚢上皮における mRNA, miRNA 発現の網羅的解析: pilot study. 第47回日本小児外科学会総会. 2010/06/17 名古屋
- ④ 金子健一朗, 安藤久實, 小野靖之, 田井中貴久, 住田互. 膵胆管合流異常に合併する蛋白栓の溶解実験. 第46回日本小児外科学会総会. 2009/06/01 大阪

[図書] (計 1 件)

- ① 金子健一朗. 膵・胆管合流異常の新たな展開-概念, 疫学, 診断, 治療の総点検-合併病変 1. 小児における合併病変. p. 73-80 医学図書出版 2011 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 健一朗 ((KANeko KENITIRO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90335042

(2) 研究分担者

小野 靖之 (ONO YASUYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10378193
田井中 貴久 (TAINAKA TAKAHISA)
愛知医科大学・特任准教授
研究者番号: 30378195

(3) 連携研究者

なし
研究者番号: