

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23792025

研究課題名(和文) 分子生物学的手法を用いた胆道閉鎖症術後の肝内胆管再生機構の解明

研究課題名(英文) elucidation of the intrahepatic bile duct regenerative mechanism after Kasai procedure : a molecular biological approach

研究代表者

田中 拓 (TANAKA, HIROMU)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50579448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症術中に採取し余剰となった肝組織を用いて、マイクロアレイで日齢別および黄疸消失の有無を比較し、術後黄疸消失を得るための因子を検討した。日齢30,60,90での1.0倍以上差があるTranscript Clusterはともに48226、2.0倍以上差があるTranscript Clusterはそれぞれ866、1220、523を検索しえた。また、黄疸消失の有無だけでは、Transcript Clusterは48226、2.0倍以上差があるTranscript Clusterは325を検索しえた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the factor that make possible Jaundice free in comparison with age in days and, presence or absence of Jaundice after Kasai procedure using microarray analysis. The numbers of Transcript Cluster which show more than double in comparison with presence or absence of Jaundice were 325.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症(本症)は10,000出生に対して1の割合で発症する非常にまれな疾患である。新生児および乳児期早期に閉塞性黄疸を来す代表的疾患で、原因は不明である。本症は放置すると胆汁うっ滞による肝硬変へと進展していく非常に重症な疾患である。本症の治療には外科手術が必須であり、現在では葛西手術と肝移植術がその主体をなしている。葛西手術が世界で初めて当科で開発されるまでは、1年前後で必ず死亡する不治の病であった。しかし、葛西手術が行われてから黄疸消失が得られるようになったが、黄疸消失しなければ生存するためには肝移植しかない。最近の葛西手術による黄疸消失率は日本胆道閉鎖症研究会全国登録によると未だ6割程度である。また、30日以内の症例は80%程度であるものの日齢が進むにつれ黄疸消失率が低下する。手術が安定した現在でもいまだに黄疸消失例と非消失例があり、その違いは不明である。

2. 研究の目的

胆道閉鎖症(本症)は新生児および乳児期早期に閉塞性黄疸を来す代表的疾患である。その原因は不明で、放置すると胆汁うっ滞による肝硬変へと進展していく非常に重症な疾患である。本症の治療には外科手術が必須であり、現在では葛西手術と肝移植術がその主体をなしている。葛西手術が世界で初めて当科で開発されるまでは、1年前後で必ず死亡する不治の病であった。葛西手術が行われてから徐々に黄疸消失が得られているものの、最近の葛西手術による黄疸消失率は日本胆道閉鎖症研究会全国登録によると未だ6割程度である。つまり、外科的治療を行っても100%の成績をえる治療はまだ確立されていない。日齢別にわけて黄疸消失率を検討すると、30日以内の症例は80%程度であるものの日齢が進むにつれ黄疸消失率が低下する。日齢が進むにつれ黄疸消失率が低下すること、日齢が早くても(早期手術しても)黄疸消失率が100%ではない原因を検索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト凍結肝組織7サンプルを使用した。日齢30日以内で手術し黄疸消失有の一例の1検体(sample name: 30Y)、無しの一例の2検体(再手術施行例で初回手術時と再手術時(sample name: 30N1, 30N2))、日齢31-60で手術し黄疸消失有の一例の1検体(sample name: 60Y)、日齢31-60で手術し黄疸消失無の一例の1検体(sample name: 60N)、日齢61-90で手術し黄疸消失有の一例の1検体(sample name: 90Y)、日齢61-90で手術し黄疸消失無の一例の1検体(sample name: 90N)の計7検体を用いた。

(2) total RNA 抽出

細胞の破碎

細胞の粉碎はビーズ式細胞粉碎装置を使用した。

total RNA の抽出および DNase 処理

粉碎液から RNeasy Lipid Tissue Mini Kit を用いて抽出した。また、抽出の過程で RNase-Free DNase Set を用いて、DNase 処理を行った。

total RNA の品質確認

抽出した total RNA の一部を使用して、品質確認を行った。GeneChip 解析の実施基準を RNA 濃度 33.3ng/μL 以上、RNA 100ng 以上および RNA Integrity Number (RIN) 7.0 以上とした。

total RNA 濃度測定および total RNA の RIN 値測定

total RNA の濃度は NanoDrop 1000 Spectrophotometer を使用して測定した。total RNA の RIN 値は、Agilent RNA 6000 Nano Kit または Agilent RNA 6000 Pico Kit を使用して測定した。

(3) GeneChip 解析

GeneChip WT PLUS Reagent Kit を用いて、GeneChip 解析を行った。

cDNA 合成および精製

T7 プロモーターを含むプライマーを用いて逆転写反応を行い、50ng の total RNA より cDNA を合成した。得られた cDNA より T7 ポリメラーゼを用いた in vitro 転写反応によりアンチセンス cDNA を合成し、増幅および精製を行った。

次に、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、15μg の cDNA からセンス鎖の cDNA を合成した。その後 RNase H を用いて cDNA を分解し、cDNA を精製した。

cDNA 断片化およびビオチン標識

ウラシル-DNA グリコシラーゼによって 5.5μg の cDNA を断片化した。その後、Agilent 2100 Bioanalyzer および Agilent RNA 6000 Nano Kit を用いて 40-70ヌクレオチド付近に断片化されたことを確認し、その後ビオチン標識した。

ハイブリダイゼーション

ビオチン標識化した cDNA を GeneChip Human Gene 2.0 ST Array に注入し、GeneChip Hybridization Oven 645 内でプローブとハイブリダイゼーションさせた。

洗浄および染色

ハイブリダイゼーション後、GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit を用いて洗浄を行い、フィコエリスリンで染色を行

った。装置は GeneChip Fluidics Station 450 を使用した。

スキャン

アレイ内のプローブにハイブリダイゼーションした cDNA のフィコエリスリン染色による蛍光シグナルを GeneChip Scanner 3000 7G を使用して測定した。解析ソフトウェア GeneChip Command Console を使用し、raw data である CEL ファイルを取得した。さらに、Affymetrix Expression Console を用いて CEL ファイルのデータを正規化し、CHP ファイルを作成した。正規化のアルゴリズムには RMA を使用した。

(4) データ解析

CHP ファイルをデータマイニングソフト Affymetrix Transcriptome Analysis Console による発現差解析を行った。各サンプル間で Transcript Cluster の発現強度比較を行い、組み合わせのサンプル間で発現強度に 1.0 倍以上および 2.0 倍以上の差がある Transcript Cluster のリストを作成した。Transcript Cluster は refseq データおよび遺伝子予測ツールで予測されたスプライシングバリエーションを含む複数の転写産物をカバーするヌクレオチド配列を示す。また、1.0 倍以上および 2.0 倍以上差がある Transcript Cluster のデータを用いて Scatter Plot を作成した。なお、サンプル間の比較として、30N と 30Y、60N と 60Y、90N と 90Y、30N・60N・90N と 30Y・60Y・90Y の比較を行った。

4. 研究成果

(1) total RNA の品質確認

各組織サンプルから抽出した totalRNA の濃度測定および RIN 値測定の結果を表 1 に示す。

表 1

Sample No.	サンプル名	濃度 (ng/μL)	OD (260/280)
01	30Y	758.45	2.13
02	30N1	1624.60	2.13
03	30N2	1901.95	2.12
04	60Y	1643.05	2.13
05	60N	1565.85	2.12
06	90Y	1957.10	2.12
07	90N	2078.05	2.12

すべての totalRNA で、RNA 量 100ng 以上および RIN 値 7.0 以上を満たした。

(2) GeneChip 解析

cDNA 合成および精製

cDNA 精製後の濃度測定結果を表 2 に示す。すべての cDNA において断片化に必要な 183ng/μL 以上の濃度が得られた。

表 2

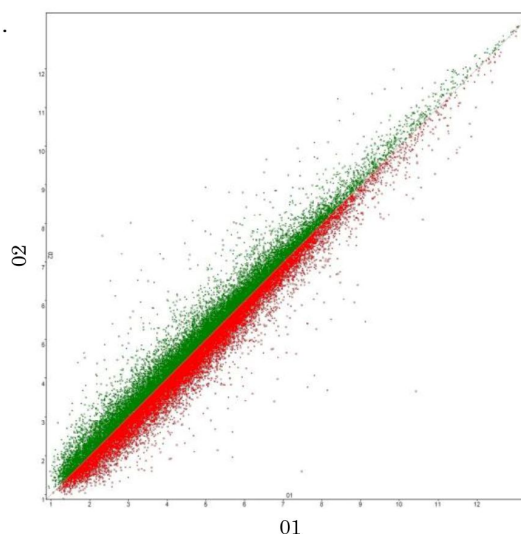
Sample No.	サンプル名	濃度 (ng/μL)	OD (260/280)
01	30Y	267.61	1.97
02	30N1	448.21	2.03
03	30N2	490.54	2.04
04	60Y	477.28	2.03
05	60N	453.82	2.03
06	90Y	497.59	2.04
07	90N	499.75	2.03

(3) データ解析

sample No.02(30N1) vs sample No.01(30Y) の比較

図 1A

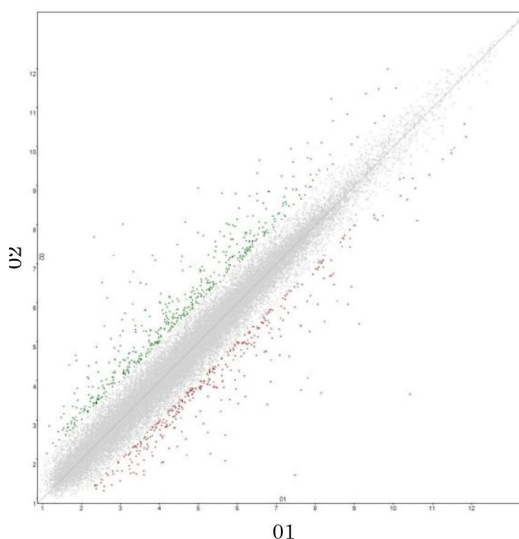
1.0 倍以上差がある Transcript Cluster (全 Transcript Cluster) の Scatter Plot



Transcript Cluster 数:48226

図 1B

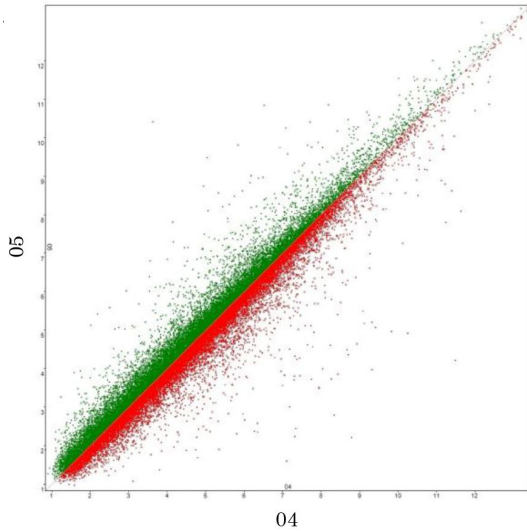
2.0 倍以上差がある Transcript Cluster (全 Transcript Cluster) の Scatter Plot



Tanscript Cluster 数:866

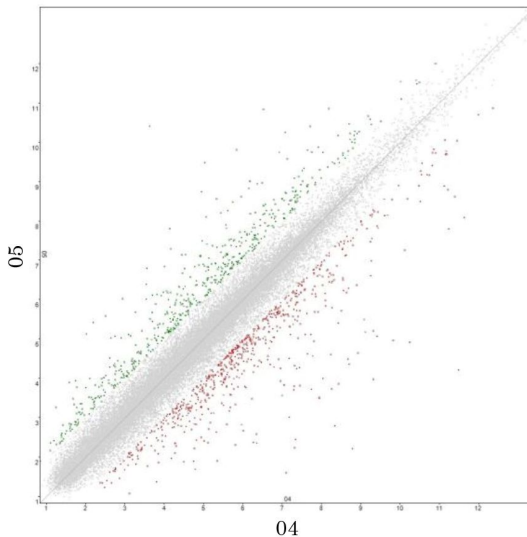
sample No.05(60N) vs sample No.04(60Y)
の比較

図 2A
1.0 倍以上差がある Tanscript Cluster (全
Tanscript Cluster)の Scatter Plot



Tanscript Cluster 数:48226

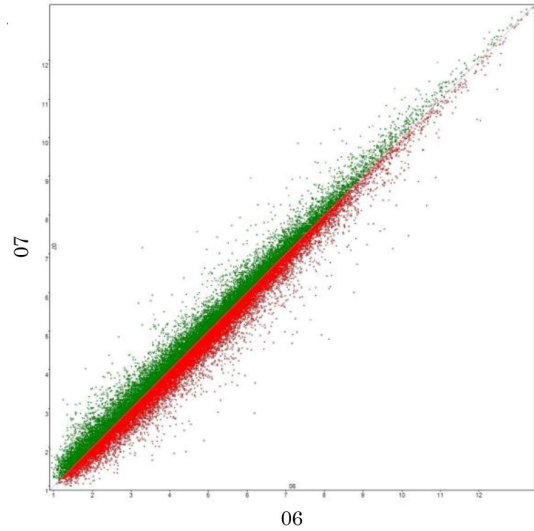
図 2B
2.0 倍以上差がある Tanscript Cluster (全
Tanscript Cluster)の Scatter Plot



Tanscript Cluster 数:1220

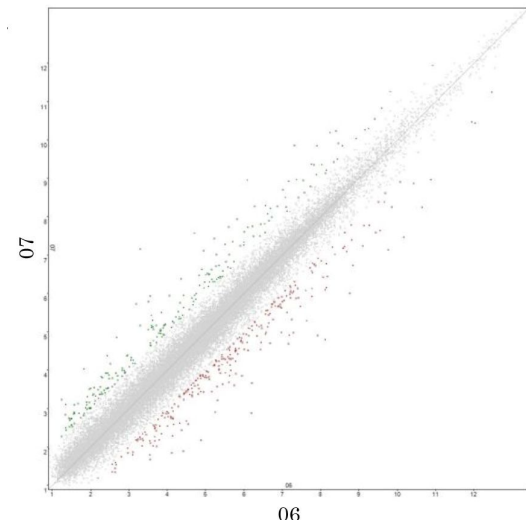
sample No.07(90N) vs sample No.06(90Y)
の比較

図 3A
1.0 倍以上差がある Tanscript Cluster (全
Tanscript Cluster)の Scatter Plot



Tanscript Cluster 数:48226

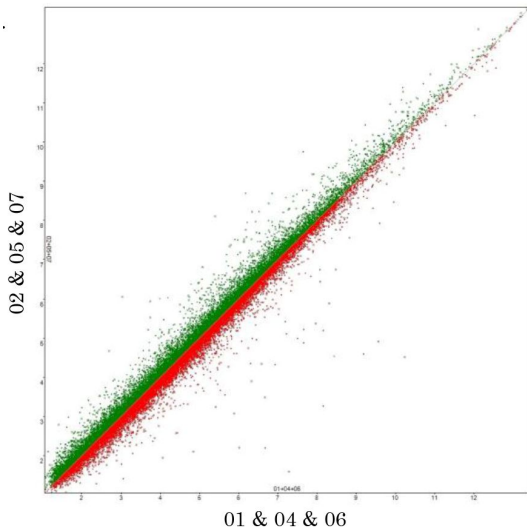
図 3B
2.0 倍以上差がある Tanscript Cluster (全
Tanscript Cluster)の Scatter Plot



Tanscript Cluster 数:523

sample No.05(60N) vs sample No.04(60Y)
の比較

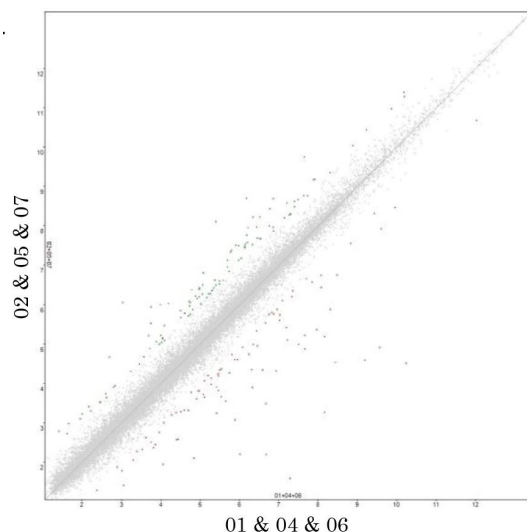
図 4A
1.0 倍以上差がある Tanscript Cluster (全
Tanscript Cluster)の Scatter Plot



Transcript Cluster 数:48226

図 4B

2.0 倍以上差がある Transcript Cluster (全 Transcript Cluster)の Scatter Plot



Transcript Cluster 数:325

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1件)

Postnatal management of prenatally diagnosed biliary cystic malformation.

Tanaka H, Sasaki H, Wada M, Sato T, Kazama T, Nishi K, Kudo H, Nakamura M, Nio M. J Pediatr Surg. 2015 50(4):507-10 査読有

[学会発表](計7件)

胆道閉鎖症術後小腸出血発症のリスク因子の検討 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 第 42 回日本胆道閉鎖症研究会 H27 年 11 月 7 日東京大学山上会館

(東京都)

胆道閉鎖症に対する再手術後の長期的予後予測因子の検討 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 第 41 回日本胆道閉鎖症研究会 H26 年 11 月 15 日熊本市医師会館(熊本市)

反復性胆管炎に対して大建中湯が著効した胆道閉鎖症術後の 1 例 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 第 19 回日本小児外科漢方研究会 H26 年 10 月 31 日兵庫県立淡路夢舞台国際会議場(淡路市)

葛西術時肝生検で肝内胆管減少を認めた胆道閉鎖症早期産児の一例 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 東北小児肝胆膵消化管研究会 H26 年 3 月 21 日良陵会館(仙台市)

胆道閉鎖症と先天性胆道拡張症の出生前診断例の取り扱い 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 第 50 回日本小児外科学会学術総会 H25 年 5 月 31 日京王プラザホテル(東京都)

胆道閉鎖症術後 Roux-en-Y 脚通過障害合併症例の検討 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 第 39 回日本胆道閉鎖症研究会 H24 年 11 月 17 日大阪大学医学部学友会館(大阪市)

当科における頭蓋内出血を契機に発見された胆道閉鎖症の 3 例 田中 拓、佐々木英之、仁尾正記 第 38 回日本胆道閉鎖症研究会 H23 年 12 月 10 日名古屋大学医学部第一講義室(名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 拓 (TANAKA, Hiromu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50579448