

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861666

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いた胆道閉鎖症の新規マーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of novel biomarker candidates for immunohistochemical diagnosis of biliary atresia using a proteomic approach

研究代表者

大竹 耕平 (OTAKE, Kohei)

三重大学・医学部・助教

研究者番号：40378344

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)：胆道閉鎖症の新規診断バイオマーカーを発見することを目的とし、胆道閉鎖症の肝臓の組織を用い、タンパク質の網羅的解析を行い、胆道閉鎖症の肝組織特有のタンパク質が58種類同定した。その中からタンパク質の機能や局在を確認し、4つのタンパク質(ANXA2, HMGC2, CTSD, BHMT)を選出した。それらについて、Multiple reaction monitoring, 免疫組織学的染色による検証を行い、正常肝組織と比べ、胆道閉鎖症の肝組織に高発現であった。4つのタンパク質(ANXA2, HMGC2, CTSD, BHMT)について胆道閉鎖症の新規バイオマーカーの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Biliary atresia is a rare pediatric liver disease of unknown etiology and unpredictable outcome, even when there has been timely diagnosis and surgery. Intraoperative cholangiography is the only reliable method to diagnosis biliary atresia definitely. The aim of this study was to identify a novel biomarker for diagnosing biliary atresia. Fifty-eight proteins, including ANXA2, BHMT, CTSD and HMGC2, were only detected in biliary atresia using shotgun proteomic analysis. Each proteotypic peptide of ANXA2, BHMT, CTSD and HMGC2 was detected at a significantly higher level in biliary atresia by multiple reaction monitoring. Immunohistochemistry revealed that the expression levels of ANXA2, BHMT, CTSD and HMGC2 were significantly higher in the liver tissues of patients with biliary atresia. In conclusion, the detected proteins, including ANXA2, BHMT, CTSD and HMGC2, could be potential biomarkers for diagnosing biliary atresia.

研究分野：小児外科

キーワード：胆道閉鎖症 バイオマーカー プロテオミクス shotgun proteomics MRM 免疫組織学的染色

1. 研究開始当初の背景

1964年に開催された第1回日本小児外科学会総会における“乳児閉塞性黄疸の外科治療”と題したシンポジウムにおいて、故葛西森夫先生(東北大学)は自身の胆道閉鎖症(以下、本症)に対する肝門部腸吻合術の成績とさらなる治療成績の改善を目指した研究の方向性を示された。それから約50年間、我が国の小児外科医は、その方向性に従い、早期診断、早期治療、術式の工夫、上行性感染の防止、ステロイドの利胆促進など、多方面にわたる様々な努力を行い、本症の治療成績を改善してきた。さらに現在は肝移植により、多くの本症患者が助けられ、きわめて大きな福音であったのは間違いないことであるが、我々小児外科医は肝移植に甘えた本症に対する治療や研究を行うべきではなく、先人たちの努力を忘れることなく、“子供を救う”という明確な使命を常に忘れずに、本症の治療・研究においてさらなる向上を目指すべきである。

本症のDNAマイクロアレイを用いた検討では、炎症誘発免疫の誘導が示されており(Lancet 2002:Bezerra JA)、本症の発症病態における免疫グロブリンの役割についても示されている(J Pediatr Surg 2005:Fischler B)。プロテオミクス(Proteomics)とは構造と機能を対象としたタンパク質の大規模な研究を示し(Electrophoresis 1998:Anderson NL, Trends Biotechnol 1999:Blackstock WP)、プロテオミクスを用いた本症のバイオマーカーの検討は2007年にLeeらが、本症罹患児の血清を用いて行っているが(Clin Chim Acta 2007:Lee CW)、それ以降の報告はない。今回、我々は既存の血清を用いたプロテオミクスではなく、本症に罹患したホルマリン固定パラフィン包埋された(以下、FFPE)肝組織を用い、さらに2D gelを用いないshotgun proteomicsによる解析を行い、新規バイオマーカーを検討するという本症では世界初の試みである。

2. 研究の目的

本症は乳児に黄疸と灰白色便で発症する進行性の胆汁うっ滞症であり、肝外胆管の閉塞と硬化が特徴的であり、病変はさらに肝門部胆管、肝内胆管へと波及する。本症は出生1万人に1人の希少疾患であるが、小児肝疾患の中では最も死亡率が高く、その病因については、発生異常、ウイルス感染、免疫異常、自己免疫、血行障害など様々な仮説が検討されているが、病態発生の詳細はいまだ不明である。発症に人種差はなく、本邦では2006年までに2,130名の患児が登録されている。治療法は肝門部腸吻合術(葛西手術)であるが、肝硬変や肝不全に進行した症例では肝移植以外の治療法がない。肝移植登録症例数は2006年で657例である。本症の問題点としては肝門部腸吻合術により、減黄がえられた症例でも、逆行性胆管炎、進行性の肝の線維

化とそれに伴う門脈圧亢進症、食道静脈瘤などにより、患児の日常生活は大きく影響を受けることである。

本症の診断は、血液検査、尿検査、十二指腸液検査、肝胆道シンチグラム、腹部超音波検査などを組み合わせて行なうが、それらの検査で新生児肝炎や肝内胆管形成不全との鑑別は困難で開腹手術による術中胆道造影が唯一の診断、病型確定方法であり、肝生検も重要な役割を占めるのが現状であり、この診断の複雑性が治療の遅れにつながる大きな因子の一つである。本症の治療において、早期発見と早期に肝門部腸吻合術を行うことが、本症患者に良好な術後経過をもたらすと考えられるが、明確な血液診断マーカーがない現状では、いまだ本症の早期発見は不十分な状況であり、この領域に関する研究が非常に重要であると考えられる。

今回の研究の目的は、プロテオミクスを用い、本症に特異的に発現しているタンパク質を同定し、この新たなタンパク質が新規の診断バイオマーカーとして臨床応用可能なものか評価することである。本症の新規の血液マーカーの発見は、簡便な血液検査により本症の早期発見を可能にし、場合によっては本症に対する新生児のスクリーニング検査を実現可能とする。本症を早期発見することで治療成績の向上、合併症の減少をもたらす、患児の予後を劇的に改善することが可能であると考えられる。これは小児外科医療の発展に大きな貢献が可能で、最終的には医療経済に対する貢献だけではなく、児や児の家族のQOL向上が期待できる。

3. 研究の方法

(1) FFPE 標本からタンパク抽出と濃度測定: マクロ、ミクロのレベルで病理組織学的にFFPE標本の状態を確認し、標本ブロックから壊死のない本症組織(BA) 4例を4mmコアで3-4か所摘出する。コントロールとしては、肝臓に病変のない、小児剖検例の肝組織(Control)4例(=正常肝組織)を用いた。60°Cで30分インキュベーションし、パラフィンを溶かし、キシレン、濃度勾配を持たせたアルコール、蒸留水で脱パラフィン処理を行った。50mM ammonium bicarbonate 2%ASB-14 (pH 8.2)を用い、homogenisation, sonicationを行った。BCA assayを用い、タンパク濃度を測定した。

(2) タンパク質の沈殿: 500µgのタンパク質を含むサンプル溶液に、クロロホルム、メタノールを1:2の割合で含んだ溶液を1:3の割合で混合し、-20°Cのフリーザー内に一晩放置した。13,000rpmで2分間遠心を行い、上清を捨て、ペレットはフリーズバキューム内で一晩乾燥を行った。

(3) ペプチドへの消化: それぞれのサンプルから125µgのタンパク質を各群ごとに混合

し、計 500 μ g とした。20 μ l 100mM Tris (pH7.8) 2% ASB-14 6M urea でペレットを溶解した。1.5 μ l dithioerythritol 溶液を加え、60 分室温で振盪した。6 μ l の iodoacetamide 溶液を加え、30 分室温で振盪した。蒸留水を 135 μ l 加え、1 μ g の endoproteinase Lys-C (Sigma-Aldrich Company Ltd) を加えた。37 $^{\circ}$ C の waterbath で 2 時間インキュベーションした。1 μ g のトリプシン (Agilent Technologies) を加え、37 $^{\circ}$ C の waterbath で一晩インキュベーションし、-20 $^{\circ}$ C のフリーザーで保存した。

(4) ペプチド溶液の Fractionation: C18 カラム (Agilent Technologies) を用い、high pH の条件でペプチド溶液を 10 個の画分に分けた。C18 カラムを 200 μ l 50% acetonitrile containing 0.1% ammonia と 400 μ l 0.1% ammonia で洗浄、準備した。100 μ l のペプチド溶液に 0.2% ammonia を加え、C18 カラムを通した。200 μ l 0.1% ammonia で C18 カラムを洗浄し、3% から 50% の acetonitrile containing 0.1% ammonia を C18 カラムに通し、分別を行った。それぞれの画分は Freeze dry を行った。

(5) Mass spectrometry の準備: 6M urea 30 μ l を加え、13,000rpm で 2 分間遠心を行った。18 μ l の溶液に 2 μ l enolase 1 (Sigma Chemical) を加え、十分混和した。

(6) Mass spectrometry での解析とタンパク質の解析: サンプルを mass spectrometry で解析し、得られたペプチドのデータを解析ソフトを用い、タンパク質のデータベースと照合し、タンパク質を同定した。正常肝組織と本症に罹患した肝組織でのタンパク質の発現の差を解析し、本症肝組織に有意に発現の多いタンパク質を新規バイオマーカーの候補として 4 つのタンパク質 (ANXA2, HMGCS2, CTSD, BHMT) を選出した。

(7) Multiple reaction monitoring (MRM) での検証: 当科で経験した胆道閉鎖症の症例 (BA) 4 例と正常肝と考えられた剖検例 (Control) 4 例のホルマリン固定された肝組織を用い、タンパク質を抽出し、ペプチド消化、精製した。MRM により、4 つのタンパク質由来のペプチドについて解析し、内部標準として酵母由来の Enolase 1 の消化されたペプチドを用い、半定量を行った。

(8) 免疫組織学的染色での検証: 当科で経験した胆道閉鎖症症例 (BA) 7 例、経験した新生児肝炎 (NH) 1 例、症候性肝内胆管減少症 (AGS) 1 例、年齢の対応した正常肝機能の剖検例 (Control) 1 例について、4 つのタンパク質について免疫組織学的染色により、それぞれのタンパク質の存在を確認し、胆道閉鎖症の肝組織内での発現を検証した。

4. 研究成果

(1) Shotgun proteomics により、タンパク質の解析を行い、BA 群、control 群の 2 群合わせて合計 162 種類のタンパク質が同定され、本症の肝組織特有のタンパク質が 58 種類同定された。

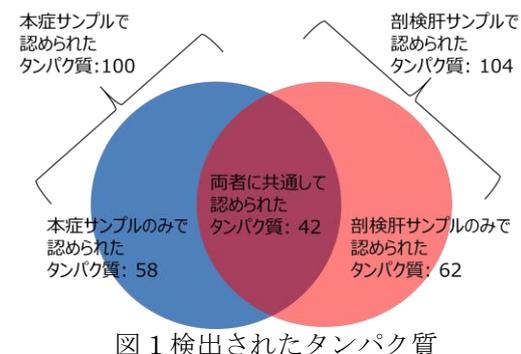
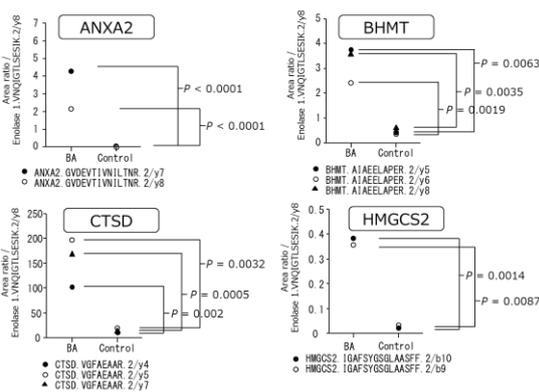


図 1 検出されたタンパク質

1 Serum albumin (Fragment)	30 Collagen alpha-3(VI) chain
2 Alcohol dehydrogenase 1B	31 Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
3 Alcohol dehydrogenase 1C	32 Macrophage migration inhibitory factor
4 Alpha-actinin-1	33 Peroxiredoxin-6
5 Isoform 2 of Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	34 Thioester-dependent peroxide reductase, mitochondrial
6 Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	35 Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
7 Superoxide dismutase [Cu-Zn]	36 3-ketoadipyl-CoA thiolase, mitochondrial
8 Collagen alpha-1(VI) chain	37 Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial
9 Arginosuccinate lyase	38 Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
10 Alcohol dehydrogenase 1A	39 Tubulin beta-4B chain
11 Isoform 2 of Anexin A2	40 Elongation factor 1-alpha 2
12 Tubulin beta-3 chain	41 Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial
13 POTE ankyrin domain family member E	42 Delta(3,5)-Delta(2,4)-dehydroxy-CoA isomerase, mitochondrial
14 Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	43 Phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP), mitochondrial
15 Very long chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	44 Membrane primary amine oxidase
16 Tubulin alpha-1C chain	45 Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1
17 Enoyl-CoA hydratase 2	46 Protein DJ-1
18 ATP synthase subunit beta	47 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2
19 L-xylulose reductase (Fragment)	48 Tubulin beta-2B chain
20 POTE ankyrin domain family member F	49 Hydroxyacid oxidase 1
21 Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	50 Protein disulfide-isomerase A6
22 Regulator of G-protein signaling 12	51 Actin alpha 1 isoform 3
23 Citrate synthase, mitochondrial	52 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
24 Aspartate aminotransferase, mitochondrial	53 Liver carboxylesterase 1
25 Ig heavy chain V-III region KDL	54 C-1-nucleotidylate synthase, cytoplasmic
26 Fibronectin	55 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
27 Catalase	56 Protein disulfide-isomerase
28 Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	57 Sulfurtransferase
29 Cathepsin D	58 L-xylulose reductase (Fragment)

表 1 本症に検出されたタンパク質のリスト

(2) ANXA2, BHMT, CTSD, HMGCS2 の 4 つのタンパク質について、MRM による検証を行い、Enolase 1 のペプチド断片を確認し、ピークの形状が安定して得られるこちらのペプチドを標準とし、開裂した断片は 2~3 片でそれぞれ、相対的に定量した。ANXA2,



BHMT, CTSD, HMGCS2 のペプチドでは BA 群で優位に高値であった。

図 2 MRM の結果

(3) 免疫組織学的染色では ANXA2, HMGCS2, CTSD, BHMT は BA 群の肝組織に発現することが確認され、正常肝組織と比べ、胆道閉鎖症の症例の肝組織に高発現であった。また、NH, AGS 症例よりも、BA 群で高発現であった。

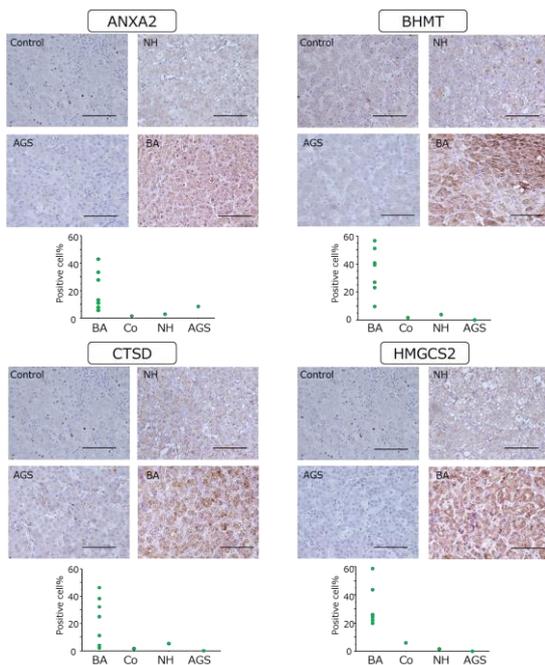


図 3 免疫組織学的染色

Shotgun proteomics 本症の肝組織特有のタンパク質が 58 種類同定された。そのうち、4 つのタンパク質について、**MRM**、免疫組織学的染色による検証を行い、4 つのタンパク質について胆道閉鎖症の新規バイオマーカーの可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①大竹耕平ら、プロテオミクスによって得られた胆道閉鎖症の新規バイオマーカーの検証, 第 52 回 日本小児外科学会学術集会, 2015 年 5 月 28 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

②大竹耕平ら、胆道閉鎖症における肝組織内タンパク質の multiple reaction monitoring (MRM) による検証, 第 41 回日本胆道閉鎖症研究会, 2014 年 11 月 15 日, 熊本市医師会館 (熊本県熊本市)

③大竹耕平ら、**Proteomics** による胆道閉鎖症の新規バイオマーカーの検討, 第 51 回 日本小児外科学会学術集会, 2014 年 5 月 9 日, 大阪国際会議場 (グランキューブ大阪) (大阪府大阪市)

④大竹耕平ら、胆道閉鎖症における肝組織内タンパク質の shotgun proteomics による同定, 第 40 回日本胆道閉鎖症研究会, 2013 年 11 月 16 日, 茨城県近代美術館 (茨城県水戸市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大竹耕平 (OTAKE, Kohei)
 三重大学・医学部・助教
 研究者番号: 25861666

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: