

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861674

研究課題名(和文) DNAマイクロアレイによる遺伝子解析を用いた胆道閉鎖症予後予測の研究

研究課題名(英文) Genetic research of pathogenesis and prognosis in biliary atresia with DNA microarray

研究代表者

田井中 貴久(Takahisa, Tainaka)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30378195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究の目的は、胆道閉鎖症の原因および病態をさらに究明することであり、遺伝子マイクロアレイを用いて胆道閉鎖症の肝組織における遺伝子発現の変化を網羅的・統合的に分析した。胆道閉鎖症患者から手術で採取された肝組織を対象として、他疾患で得られた肝組織を対照として用いた。肝組織からRNAを抽出してマイクロアレイを行った。遺伝子発現プロファイルから、胆道閉鎖症においては60遺伝子がupregulateし、39遺伝子がdown-regulateしていた。GO解析により、免疫及び炎症応答に関連するいくつかの生物学的経路が胆道閉鎖症の発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to further investigate the cause and pathology of biliary atresia, and analyzed changes in gene expression in liver tissues of biliary atresia closely and comprehensively using gene microarray. Liver tissue obtained by surgery from a patient with biliary atresia and other diseases as a control were used. RNA was extracted from liver tissue and microarray was performed. From the gene expression profile, 60 genes were up-regulated and 39 genes were down-regulated in biliary atresia. GO analysis suggested that several biological pathways related to immune and inflammatory responses may be involved in the development of biliary atresia.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 遺伝子解析 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は、新生児期に発生する胆汁うっ滞性疾患である。現在行われている手術治療は、肝門部から微小胆管から胆汁を排泄させるようにすること(葛西手術)であるが、全例が根治できるものではない。また、手術治療が成功し胆汁が排泄されるようになって、やがて肝硬変や肝不全と呼ばれる病態に陥ることが少なくない。自己肝での成績は未だ満足できるものではなく、長期的には約半数の患児が肝移植を受けざるを得ないのが現状で、難病に指定されている。本疾患の原因として、ウイルス感染、胆汁酸代謝異常、血行異常、**ductal plate malformation** などの諸説があるが依然として不明のままである。そのために胆道閉鎖症の発生機序の解明が必要であり、さらなる研究が望まれているところである。

2. 研究の目的

胆道閉鎖症においては、遺伝的要素がその発症に関与している可能性があるが、明らかとなっていない。ここ数年にわたって胆道閉鎖に関する研究が進められており、いくつかの有望な遺伝子が同定されつつある。例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)および細胞間接着分子-1(ICAM-1)の遺伝的変異は、胆道閉鎖と関連することが証明されている。ゲノムワイド関連研究(GWAS)は、**XPNPEP1** および **ADD3** のプロモーター領域の突然変異が胆道閉鎖の発症に関連している可能性があることを同定した。さらに、胆道閉鎖症のサンプルにおける多くの **protein coding** 遺伝子の異常発現が広く報告されている。本研究の目的は、胆道閉鎖症の原因および病態をさらに究明することであり、遺伝子マイクロアレイを用いて胆道閉鎖症の肝組織における遺伝子発現の変化を網羅的・統合的に分析した。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

事前に文書で同意の得られた胆道閉鎖症患者から手術で採取された肝組織を対象として、他疾患の患児で合併切除がなされた肝組織標本を文書で同意が得られた上で対照として用いた。得られた肝組織は細切してチューブに入れ、液体窒素で急速凍結して、-80度で冷凍保存した(図1)。2015年から2016年に当科で手術施行した胆道閉鎖症(BA)3名(平均75.3日、男0女3例)、他疾患3名(平均4.2才、男3女0例)の肝組織を対象および対照(正常)とした。

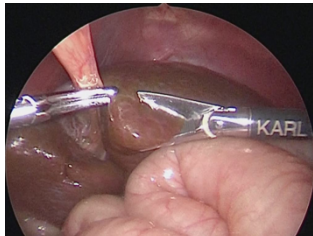


図1 腹腔鏡下肝生検

(2) 肝組織のマイクロアレイ

胆道閉鎖症群および対照群の肝組織から遺伝子発現解析を行った。

① RNA 品質検査

RNA 吸光度測定

・NanoDrop 1000 を使用し RNA モードにて吸光度を測定した。

RNA 品質検査

・Agilent 2100 BioAnalyzer series II を使用して RNA 品質検査を行った。

1) 分注済みの Gel に Dye を 1 μ L 加え、13,000xg で 10 分間遠心。

2) 分取した RNA サンプルを 70°C で 3 分間インキュベート後、急冷し、熱処理。

3) チップ調製スタンドを用意し、Lab Chip をセットし、Gel-Dye Mix をチップに充填。

4) マーカー(内部標準) 5 μ L をラダーウェルと全てのサンプルウェルに分注し、RNA サンプルを各サンプルウェルに分注。

5) LabChip を 1 分間攪拌し、直ちに調製したチップを BioAnalyzer にセットして測定した。

② cDNA の合成、cRNA のラベルと増幅

・Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies を使用し cDNA の合成、cRNA のラベルと増幅を行った。

1) Total RNA、T7 Promoter Primer、Nuclease Free Water を加えた。

2) RNA Spike In Kit(1 カラー用)をサンプルに 2 μ L 加えた。65度で 10 分インキュベート後、5 分間氷上に置き熱変性させた。

3) cDNA マスターミックスを調製(5 \times First Strand Buffer 2.0 μ L、0.1M DTT 1.0 μ L、10mM dNTP mix 0.5 μ L、Affinity Script 1.2 μ L、Total 4.7 μ L)

4) 熱変性させた RNA に cDNA マスターミックスを加え、2 時間インキュベートした。

5) 70°C で 15 分間インキュベートし、反応を停止した後、氷上で 5 分間冷却。

6) この間に、Transcription マスターミックスを調製(1 反応の必要量: Nuclease Free Water 0.75 μ L、5 \times Transcription Buffer 3.2 μ L、0.1M DTT 0.6 μ L、NTP Mix 1.0 μ L、T7 RNA polymerase Mix 0.21 μ L、Cyanine 3 CTP 0.24 μ L、Total 6.0 μ L)

7) 各反応チューブに 6 μ L の Transcription ミックスを加えた。

8) 40°C のウォーターバス遮光しながら 2 時間インキュベートした。

③ ラベル化 cRNA の精製

・RNeasy mini spin columns, QIAGEN を使用しラベル化 cRNA の精製を行った。

1) 84 μ L の Nuclease Free water を反応チューブに加えた。

2) 350 μ L の RLT Buffer を反応チューブに加えた。

3) 250 μ L のエタノール(96-100%purity)を反応チューブに加えた。

4) 700 μ L の cRNA サンプルをカラムに移し、13,000rpm で 1 分間遠心。

5) フロースルーを別のチューブに移し、カラムをコレクションチューブに戻した。

6) 500 μ L の RPE Buffer を加え、13,000rpm で

- 1 分間遠心した。
 7)5)、6)の作業をもう一度繰り返した。
 8)カラムを 1.5mL のチューブに移した。
 9)30 μ L の Nuclease Free water を加え、1 分間静置。
 10)13,000rpm で 1 分間遠心し、溶出した。

④ラベル化 cRNA の品質検査

- 1)cRNA 品質検査 Agilent 2100 BioAnalyzer series II を使用して RNA 品質検査を行った。細かな手順は、前述と同様。
 2)cRNA 吸光度測定 NanoDrop 1000 を使用し Microarray Measurement モードにて吸光度を測定し、cRNA サンプルを -80°C で保管した。

⑤ハイブリダイゼーション

- ・ Gene Expression Hybridization Kit, Agilent Technologies を使用しハイブリダイゼーションを行った。
 1)2 \times cRNA ターゲット溶液を調製 (1 チューブあたり Cyanine3 ラベル化 cRNA 必要量、10 \times Blocking Agent 5 μ L、Nuclease Free Water 適量、Total 24 μ L になるように)。
 2)2 \times cRNA ターゲット溶液に 25 \times フラグメンテーションバッファーを 1 μ L 加えた。
 3)60 $^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスで 30 分インキュベートした。
 4)フラグメンテーションをストップさせるために、2 \times ハイブリダイゼーションバッファーを 25 μ L 加えた。
 5)Microarray に 40 μ L アプライし、65 $^{\circ}\text{C}$ で約 17 時間、ハイブリオーブで攪拌しながらハイブリダイゼーションを行った。

⑥スライドガラスの洗浄

- ・ Gene Expression Wash Buffer, Agilent Technologies を使用しスライドガラスの洗浄を行った。

⑦スキヤニング

- ・ Agilent Technologies Microarray Scanner を用いて Scan Resolution; 3 μm 、TIFF file dynamic range; 20bit でスキヤンした。

⑧数値化

- ・ Agilent Feature Extraction 12.0.3.1 を用いて各スポットの数値化を行った。

⑨ノーマライズ(75Percentile Shift)

- ・ Agilent Feature Extraction 12.0.3.1 ソフトで数値化した際に出力される生データの Text ファイルを GeneSpring にインポートし、75 パーセンタイルシフトでノーマライズした。

⑩Individual Sample Data の作成

- GeneSpring から出力される 75Percentile Shift の値は \log_2 の対数のため、真数に変換。

⑪解析用データの作成

- 胆道閉鎖症と対照群とを比較する組み合わせで Foldchange を算出した。

4. 研究成果

(1) RNA 品質検査と遺伝子発現解析

得られた肝組織から RNA 抽出を行なった。A260/230 値、RIN による分解の度合いにて品質を確認した (Table.1)。データをノーマライズ後に遺伝子発現プロファイルを評価した。スキヤッタープロットは図の通りである (図 2)。胆道閉鎖症と正常との比較で 60 の遺伝子が up-regulate されており (倍率 10 以上)、上位 10 遺伝子は、*XIST*、*VTCN1*、*CXCL6*、*AKR1B10*、*LOXL4*、*AKR1B10*、*CYP19A1*、*KRT23*、*STMN2*、*MMP7* であった。また 39 の遺伝子が down-regulate されており (倍率 0.1 以下)、上位 10 遺伝子は、*RPS4Y2*、*RPS4Y1*、*DDX3Y*、*FOSB*、*MYH7B*、*CYP1A2*、*NR4A3*、*AOX1*、*SSTR1*、*DPP6* であった。

Table.1 RNA 品質検査

	A260/230	RIN
BA	2.11	7.5
BA	2.10	6.8
BA	1.99	6.7
正常	2.09	6.6
正常	2.16	6.9
正常	2.20	7.4

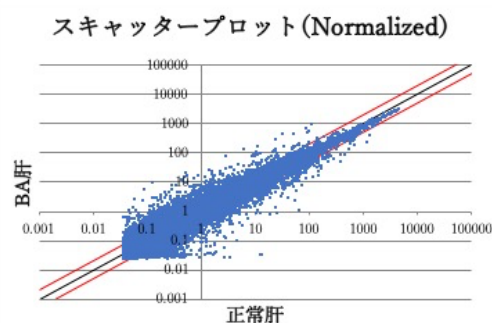


図 2 スキヤッタープロット

Table.2 遺伝子発現解析 (BA vs. 正常)

GeneName	BA	正常	Fold change
Up-regulated genes			
<i>XIST</i>	9.223043	0.132242	69.74359
<i>VTCN1</i>	5.592990	0.090525	61.78395
<i>CXCL6</i>	2.628666	0.060502	43.44731
<i>AKR1B10</i>	19.79343	0.517617	38.23954
<i>LOXL4</i>	16.30753	0.549883	29.65638
<i>AKR1B10</i>	14.93458	0.503998	29.63224
<i>CYP19A1</i>	2.344008	0.083868	27.94877
<i>KRT23</i>	11.44870	0.448898	25.50403
<i>STMN2</i>	7.500954	0.296599	25.28991
<i>MMP7</i>	73.63772	2.993510	24.59912
Down-regulated genes			
<i>RPS4Y2</i>	0.033275	14.02088	0.002373
<i>RPS4Y1</i>	0.031664	12.70651	0.002492
<i>DDX3Y</i>	0.025859	3.430386	0.007537
<i>FOSB</i>	1.023183	65.87734	0.015532
<i>MYH7B</i>	0.094785	4.619652	0.020518
<i>CYP1A2</i>	0.825227	26.09034	0.031630
<i>NR4A3</i>	0.734196	18.86248	0.038924
<i>AOX1</i>	2.201968	55.32429	0.039801
<i>SSTR1</i>	0.120479	3.023904	0.039842
<i>DPP6</i>	0.073307	1.817668	0.040330

(2) GSEA 解析

得られた遺伝子データより GSEA (gene set enrichment analysis) 解析を行った。特に Genome Ontology 解析の結果、胆道閉鎖症で

up-regulate された遺伝子は 241 セット (p<0.05) (Table. 3)、正常肝で up-regulate された遺伝子は 254 セット (p<0.05) であった

Table.3 GSEA 解析 (BA)

GO term	GO ID	Size	NOM p-value
Protein heterooligomerization	0051291	31	0.000
Myeloid leukocyte activation	0002274	36	0.000
Activation of innate immune response	0002219	75	0.000
Immune response regulating cell surface receptor signaling pathway	0002768	111	0.000
DNA dependent DNA replication	0006261	34	0.000
Lymphocyte costimulation	0031294	21	0.000
Activation of immune response	0002253	144	0.000
Antigen receptor mediated signaling pathway	0050851	72	0.000
Pattern recognition receptor signaling pathway	0002221	41	0.000
Trans-Golgi network membrane	0032588	25	0.000
Regulation of leukocyte mediated cytotoxicity	0001910	19	0.000
Positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	1903557	25	0.006
Toll like receptor signaling pathway	0002224	33	0.000
B cell receptor signaling pathway	0050853	21	0.000
Fc receptor signaling pathway	0038093	69	0.000
Regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	1903555	43	0.000
Regulation of interleukin 1 beta production	0032651	16	0.005
Recycling endosome membrane	0055038	16	0.003
Regulation of interleukin 1 production	0032652	19	0.003
Negative regulation of protein polymerization	0032272	26	0.003

Table.4 GSEA 解析 (正常)

GO term	GO ID	Size	NOM p-value
Pyridoxal phosphate binding	0030170	22	0.000
Gated channel activity	0022836	96	0.000
Transmission of nerve impulse	0019226	17	0.000
Caution channel complex	0034703	55	0.000
Extracellular ligand-gated ion channel activity	0005230	24	0.000
Bile acid metabolic process	0008206	16	0.001
Ligand-gated channel activity	0022834	51	0.000
Passive transmembrane transporter activity	0022803	141	0.000
Transporter complex	1990351	105	0.000
Organic acid catabolic process	0016054	89	0.000
Female gamete generation	0007292	31	0.000
Multicellular organismal signaling	0035637	38	0.001
Gamete generation	0007276	188	0.001
Cation channel activity	0005261	93	0.000
Solute cation symporter activity	0015294	34	0.001
Cellular amino acid biosynthetic process	0008652	36	0.001
Monocarboxylic acid catabolic process	0072329	36	0.003
Excitatory extracellular ligand gated ion channel activity	0005231	17	0.006
Alpha amino acid catabolic process	1901606	49	0.000
Vitamin metabolic process	0006766	51	0.000

(Table. 4)。胆道閉鎖症において up-regulate されている GO 遺伝子セットの多くが、主に biological で免疫反応および炎症反応に関与していること判明した。例えば、分子機能の重要な GO は、生来免疫反応の活性化、細胞表面レセプターシグナルを調節する免疫応答、抗原受容体を介するシグナル経路、Toll 様受容体シグナル経路、B 細胞シグナル経路、Fc 受容体シグナル経路、TNFSF 調節、インターロイキン 1 産生調節などが含まれていた。一方、正常肝において up-regulate されている GO は、主に molecular function あるいは cellular component で、細胞膜 channel 活性、受動的トランスポーター活性、細胞内アミノ酸合成に関するものなどであった。

これらの結果から、免疫および炎症応答に関連するいくつかの生物学的経路や細胞膜 channel 活性などに関する変化が、胆道閉鎖症の発症に関与することが見出された。本研究の結果は、本疾患の分子メカニズムの病態解明に役立つと考えられた。

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 3 件)

①Shirota C, Uchida H, Ono Y, Murase N, Tainaka T, Yokota K, Oshima K, Shirotsumi R, Hinoki A, Ando H: Long-term outcomes after revision of Kasai portoenterostomy for biliary atresia. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 23, 715-720, 2016, 査読有

②小田嶋孝之, 金子健一朗, 小野靖之, 田井中貴久, 村瀬成彦, 牧田智, 安藤久實: 経時的に多彩な胆管形態を示した III 型胆道閉鎖症の 1 例. 日本小児外科学会雑誌, 52, 1042-1046, 2016, 査読有

③Murase N, Uchida H, Ono Y, Tainaka T, Yokota K, Tanano A, Shirota C, Shirotsumi R: A new era of laparoscopic revision of Kasai portoenterostomy for the treatment of biliary atresia. Biomed Res Int, 2015 : 173014. doi:10.1155/2015/173014. 2015, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

①村瀬成彦, 内田広夫, 田中裕次郎, 田井中貴久, 住田互, 城田千代栄, 大島一夫, 白月遼, 千馬耕亮: 当院での腹腔鏡下胆道閉鎖症根治術, 第 43 回日本胆道閉鎖症研究会, 2016 年 11 月 29 日, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

②内田広夫, 田中裕次郎, 田井中貴久, 城田千代栄, 住田互, 村瀬成彦, 大島一夫, 白月遼, 千馬耕亮: 名古屋大学での腹腔鏡下肝門部空腸吻合術, 第 32 回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2016 年 10 月 29 日, ソニックスティ (埼玉県さいたま市)

③白月遼, 内田広夫, 田中裕次郎, 田井中貴久, 城田千代栄, 住田互, 横田一樹, 村瀬成彦, 大島一夫, 千馬耕亮, 南坂陽子: 胆道閉

鎖症が疑われた胆汁うっ滞症候群に対する遺伝子診断の意義, 第 33 回日本小児肝臓研究会, 2016年7月2-3日, じゅうろくプラザ (岐阜県岐阜市)

④Uchida H, Murase N, Tainaka T, Shirota T, Yokota K, Oshima K, Shiotsuki R, Chiba K, Hinoki A: Laparoscopic revision of Kasai portoenterostomy is a feasible and effective method for the treatment of biliary atresia. IPEG's 25th Annual Congress for Endosurgery in Children. 2016.5.24-26, Hilton Fukuoka Sea Hawk, Fukuoka, Japan

⑤白月遼, 内田広夫, 棚野晃秀, 田井中貴久, 城田千代栄, 檜頭成, 横田一樹, 村瀬成彦, 大島一夫, 千馬耕亮: 胆道閉鎖症術後の周術期予防的抗生剤投与について 当科での取り組み, 第 53 回日本小児外科学会総会, 2016年5月24-26日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)

⑥Murase N, Uchida H, Tanano A, Shirota C, Hinoki A, Tainaka T, Yokota K, Oshima K, Shiotsuki R, Chiba K: Is laparoscopic Kasai portoenterostomy for biliary atresia minimally invasive? An evaluation of the associated perioperative alterations in inflammatory mediator, creatinine kinase, and liver enzyme levels. The 49th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2016.4.24-28, Hawaii, USA

⑦内田広夫, 村瀬成彦, 田井中貴久, 小野靖之, 棚野晃秀, 城田千代栄, 横田一樹, 大島一夫, 白月遼, 檜頭成: 腹腔鏡下胆道閉鎖症根治術は標準的な術式になりうる, 第 28 回日本内視鏡外科学会総会, 2015年12月10-12日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

⑧Murase N, Uchida H, Tanano A, Tainaka T, Hinoki A, Shirota C, Oshima K, Yokota K, Shiotsuki R: Laparoscopic initial and repeated Kasai portoenterostomy for biliary atresia, Minimally Invasive Surgery Week 2015 Annual Meeting and Endo EXPO. 2015.9.2-7, New York, USA

⑨Uchida H, Murase N, Tainaka T, Tanano A, Hinoki A, Shirota C, Yokota K, Oshima K, Shiotsuki R, Chiba K: The feasibility of laparoscopic Kasai portoenterostomy: our preliminary outcomes and reviews of literature, The 12th Asia-Pacific Congress of Endoscopic and Laparoscopic Surgery. 2015.9.2-5, Daegu, Korea

⑩内田広夫, 小野靖之, 棚野晃秀, 田井中貴久, 城田千代栄, 横田一樹, 村瀬成彦, 牧田智, 村瀬成彦, 白月遼: 腹腔鏡下胆道閉鎖症根治術の短期成績は開腹根治術と同等である Preliminary report, 第 52 回日本小児外科学会総会, 2015年5月28-30日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

⑪内田広夫, 小野靖之, 田井中貴久, 棚野晃

秀, 城田千代栄, 横田一樹, 牧田智, 村瀬成彦, 白月遼: 胆道閉鎖症に対する腹腔鏡下肝門部空腸吻合術, 第 48 回日本小児外科学会東海地方会, 2014年12月14日, 名古屋市立大学病院大ホール, (愛知県名古屋市)

⑫小野靖之, 内田広夫, 棚野晃秀, 城田千代栄, 田井中貴久, 横田一樹, 牧田智, 白月遼: 胆道閉鎖症に対する腹腔鏡下肝門部空腸吻合術の治療成績, 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田井中 貴久 (TAINAKA Takahisa)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30378195

(2) 研究分担者

なし