

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 6 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591403

研究課題名（和文） プロテインアレイシステムを用いた小児劇症肝不全の病態解明

研究課題名（英文） Application of SELDI ProteinChip system in pathogenesis of pediatric fulminant hepatic failure

研究代表者

笠原 群生（KASAHARA MUREO）

独立行政法人国立成育医療研究センター・臓器移植センター・センター長

研究者番号：30324651

研究成果の概要（和文）：

小児劇症肝不全に対して肝移植を行った症例の摘出肝組織を用いて、サイトカインの発現、免疫担当細胞、タンパク発現について検討した。サイトカインアレイ（RayBio）を用いた検討では、劇症肝不全で発現の高い5種類のサイトカインを同定した。最も発現の高かったサイトカイン A は、類洞内皮細胞に発現しており、その receptor の発現は肝細胞、小葉内胆管に認められた。摘出肝における免疫担当細胞は、cCD3+, CD8+, granzymeB+の T-cell が主体で、小葉内(類洞)への浸潤が特徴的であった。SELDI プロテインチップによる解析では、CM10 チップで、劇症肝不全で低くなる分子が3つ、高くなる分子が3つ検出され、Q10 チップでは、劇症肝不全で低くなる分子、高くなる分子が1つずつ検出された。これらの分子の同定により、より劇症肝不全の病態の理解が進むものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We examined about cytokine expression, infiltrating lymphocytes, protein expression in explanted liver tissue of pediatric fulminant hepatic failure (FHF). Five cytokines which were expressed higher in FHF liver tissue were identified by cytokine array (RayBio). Cytokine A which showed highest expression was localized in sinus endothelial cells, and the receptor was seen in hepatocytes and ductular cells by immunohistochemistry. Infiltrating lymphocytes were predominantly cCD3+CD8+granzymeB+T-cell and their distribution in sinus was characteristic. Using SELDI ProteinChip system, three highly expressed molecules and three lowly expressed molecules were identified by CM10 Chip, and one highly and one lowly expressed molecule were identified by Q10 Chip. Further analysis of those molecules could promise to clarify the pathogenesis of pediatric FHF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：劇症肝不全、サイトカイン、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

小児劇症肝不全は、その多くが原因不明であり、内科的治療で救命できる確率は14%と非常に低く、肝移植を行っても救命率は73%にとどまる(須磨崎亮ら 治療学 41:358-62, 2007)。特に乳児では移植後に肝不全に陥る例が多く、移植専門施設でも生存率は28%と低い(Sakamoto S et. al. Pediatr transplant 12:167-73, 2008) ため、病態の解明とそれに基づいた新規治療法の確立が急務である。

我々は、2005年11月より2008年9月までに71例の小児生体肝移植を行い、うち13例が劇症肝不全であった(笠原ら 日小外会誌 44:679-88, 2008)。移植後に高度の肝不全をきたした症例は13例中3例あり、この3例を含む12例が生存している。摘出肝の病理学的検索では、高度の出血・壊死が認められ、80%以上の肝細胞の脱落を認めた。サイトメガロウイルス封入体が1例で認められた以外は、原因を示唆する所見は認められなかった。上述の病理学的所見は concaavalin A を投与したマウス劇症肝不全モデルと同様である。また、応募者の施設では初期より血液浄化療法を積極的に行っていることが生存率の高い一因と考えられる。これらのことから、小児劇症肝不全の病態には、血液中の因子、サイトカインの関与が強く示唆される。これらのサイトカインの種類やその増減の変化を明らかにすることは、生体内で起きている免疫学的反応の理解には極めて重要と考えられる。また血液中には、病態と関連するさまざまなタンパク(遺伝子解析では明らかとはならない、病態特異的修飾後タンパクなど)の存在が考えられる。それらのタンパクの系統的なプロファイリングは、病態の理解や診断治療に有用な情報を与えるはずである。我々は、Desorption / Ionization (SELDI)

プロテインチップシステムによる網羅的なタンパク解析により腎癌細胞株における IFN 感受性を左右するバイオマーカーの同定に成功しており (Nakamura K et al. Int J Oncol 28:965-70, 2006)、プロテインチップシステムによる網羅的なタンパク解析が可能である。

2. 研究の目的

小児劇症肝不全の病態をサイトカイン発現解析、網羅的なタンパク発現解析によって明らかにし、小児劇症肝不全における新規治療法の開発、予後予測など、診療に有用な新規バイオマーカーを探索することを企図する。

3. 研究の方法

小児劇症肝不全に対する生体肝移植症例の摘出肝を材料とし、対象には、胆道閉鎖症、先天性代謝疾患で生体肝移植された症例の摘出肝を用い、以下の研究を行う。

1) サイトカイン発現解析

サイトカインアレイを用いて、数十種類のサイトカインの発現について検索する。小児劇症肝不全症例で発現の高いサイトカインを同定し、発現量と肝不全の重症度、移植後の拒絶反応との関連などについて比較検討する。

2) 免疫担当細胞の解析

CD20, CD3, CD4, CD8, CD56 抗体を用いて、肝組織における B-cell, T-cell, NK-cell の解析を行う。

3) プロテインチップシステムによる網羅的なタンパク解析

Desorption/Ionization (SELDI) プロテインチップシステムにより、小児劇症肝不全において有意に発現しているタンパクを同定

する。

4. 研究成果

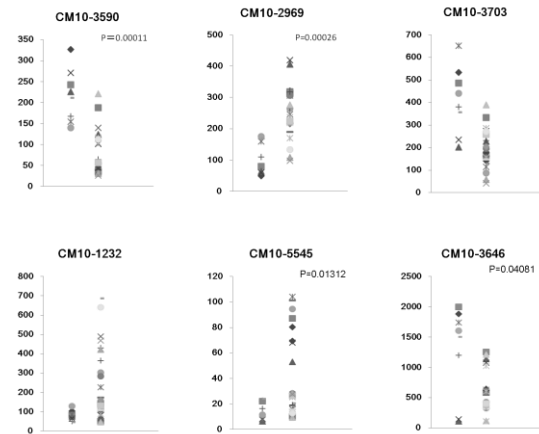
2005年11月から2009年8月までに国立成育医療センターで生体部分肝移植を行った92例のうち、劇症肝不全症例17例について検討した。男児13例、女児4例、移植時月齢は1から87カ月で、中央値は14カ月であった。16例は原因不明で、1例はサイトメガロウイルス封入体が摘出肝にて認められた。17例中1例は移植後74日目に敗血症により死亡したが、16例は生存している。摘出された肝組織8例について、サイトカインアレイ (RayBio) を用い、42種類のサイトカインの発現を測定し、正常肝と比較した。劇症肝不全では、5種類のサイトカインの発現が高く、これらのサイトカインは、正常肝では発現がほとんど認められなかった。最も発現の高かったサイトカインAについて、凍結肝組織を用いた蛍光抗体法にて発現を検討したところ、類洞内皮細胞に発現しており、小葉内胆管、中心静脈、門脈壁には発現が認められなかった。サイトカインAのreceptorの発現は肝細胞、小葉内胆管に認められたが、発現はかなり微弱であった。

摘出肝における免疫担当細胞は、cCD3+, CD8+, granzymeB+の T-cell が主体で、小葉内(類洞)への浸潤が特徴的であった。cCD3+, CD4+, CD8-の T-cell は門脈域における浸潤をみたが、小葉内の浸潤は乏しかった。CD20+の B-cell、CD56+の NK-cell はごく少数であった。

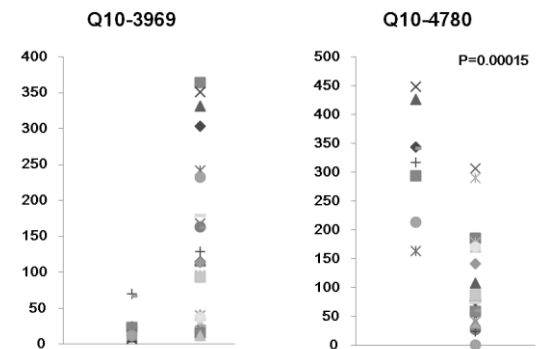
小児劇症肝不全において有意に発現しているタンパクを同定するため、劇症肝不全10例、コントロール5例について、それぞれの組織の lysate を作成し、分子量5万のフィルターで遠心濾過後、通過したタンパクについて Desorption/Ionization (SELDI) プロテ

インチップによる解析を行った。

その結果、CM10 チップでは、コントロールで量的に高く、劇症肝不全で低くなるものが3つ、コントロールで低く、劇症肝不全で量的に高くなるものが3つ検出できた。



各タイトルの数値が検出されたタンパクの分子量



各タイトルの数値が検出されたタンパクの分子量

また、Q10 チップでは、量的にコントロールで高く、劇症肝不全で低くなるもの、コントロールで低く、劇症肝不全で量的に高くなるものが、それぞれ1つずつ検出された。

以上、コントロールと劇症肝不全組織で、量的に異なる分子を検出した。これらの分子の同定により、より劇症肝不全の病態の理解が進むものと考えられる。

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 4 件)

Shigeta T, Imadome K, Sakamoto S, Fukuda A, Kakiuchi T, Matsuno N, Tanaka H, Nakazawa A, Kasahara M Epstein-barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation -management and risk factors. Transplant Proc. 査読有り 42 (10) 2010, 4178-4180

唐木千晶, 笠原群生, 清水直樹, 六車崇, 齊藤修, 齊藤一郎, 中川聡 小児劇症肝不全の集学的管理と生体肝移植適応 日本集中治療医学会雑誌 査読有り 16 巻 3 号 2009, 279-288

白川利彦, 亀井宏一, 寺町昌史, 笠原克明, 中山真紀子, 鈴木輝明, 肥沼幸, 新井勝大, 清水直樹, 中川聡, 笠原群生, 飯島一誠 当院における小児劇症肝不全 9 症例に対する血液浄化療法/人工肝補助の経験 日本小児腎不全学会雑誌 査読有り 28 巻 2009, 202-204

Sasaki K, Kasahara M, Fukuda A, Kimura T, Shigeta T, Tanaka H, Nakagawa S, Ito S, Nakagawa A. Living-donor liver transplantation using hyper-reduced graft for a neonatal fulminant hepatic failure. Pediatr Int. 査読有り 53 2011, 247-248

[学会発表] (計 8 件)

重田孝信, 阪本靖介, 福田晃也, 田中秀明, 中川温子, 笠原群生 当院における、肝移植後 CMV・EBV 感染の現況と対策. 第 28 回日本肝移植研究会 広島 2010. 7.

垣内俊彦, 柳忠宏, 清水泰岳, 新井勝大, 中川聡, 中澤温子, 笠原群生, 齊藤朋子, 松井陽 重症肝不全を合併した全身型若年性黄色肉芽腫(disseminated juvenile xantho-granuloma)の 1 例. 第 27 回日本小児肝臓研究会 千葉 2010. 7. 24.

木澤洋恵, 堀越麻玲, 小川礼佳, 野中裕子, 安齋利一, 石井幸雄, 宮崎澄夫, 笠原群生, 森鉄也, 中澤温子 小児劇症肝不全に対する生体肝移植 血液学的推移と合併症の報告. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会 東京 2010. 9. 10.

入江理恵, 中澤温子, 中野夏子, 松岡健太郎 小児特発性劇症肝不全の病態に関する検討. 第 100 回 日本病理学会総会 横浜 2

011. 4. 29.

垣内俊彦, 阪本靖介, 金澤寛之, 唐木千晶, 福田晃也, 中川 聡, 中澤温子, 笠原群生, 松井陽 当センターにおける小児急性肝不全症例に対する肝移植医療体制の検討. 第 47 回 日本移植学会総会 仙台 2011. 10. 6.

入江理恵, 中澤温子, 佐藤泰樹, 中野夏子, 大喜多 肇, 松岡健太郎, 垣内俊彦, 福田晃也, 阪本靖介, 笠原群生 小児特発性劇症肝不全の病態に関する検討. 第 39 回 日本肝臓学会西部会 岡山 2011. 12. 10.

中澤温子, 入江理恵, 佐藤泰樹, 中野夏子, 大喜多 肇, 松岡健太郎, 垣内俊彦, 福田晃也, 阪本靖介, 笠原群生 小児原因不明劇症肝不全の臨床病理学的特徴. 第 39 回 日本肝臓学会西部会 岡山 2011. 12. 10.

Nakazawa A, Irie R, Matsuoka K, Sakamoto S, Kasahara M. Pediatric fulminant hepatic failure of unknown etiology- A unique immune mediated mechanism of CD8-positive T-cell activation causing simultaneous bone marrow suppression. The 101st USCAP annual meeting Vancouver, Canada 2012. 3. 21.

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ

http://www.ncchd.go.jp/hospital/section/special/transplant_surgery/fulminant_hepatitis.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 群生 (KASAHARA MUREO)

独立行政法人国立成育医療研究センター
臓器移植センター・センター長

研究者番号：30324651

(2) 研究分担者

松井 陽 (MATSUI AKIRA)

独立行政法人国立成育医療研究センター
院長

研究者番号：00159146

中澤(中川)温子 (NAKAZAWA-NAKAGAWA
ATSUKO)

独立行政法人国立成育医療研究センター
病理診断部・部長

研究者番号：90227736

吉川 和宏 (YOSHIKAWA KAZUHIRO)

愛知医科大学医学部・准教授

研究者番号：60109759