

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462768

研究課題名(和文) microRNA発現解析による胆道閉鎖症患者の層別化と個別化治療のための研究

研究課題名(英文) A study of microRNA expression in biliary atresia

研究代表者

佐々木 英之 (Hideyuki, Sasaki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：40438461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症の葛西手術時肝生検標本を用いて、microRNAの発現レベルについての網羅的解析を行った。具体的には手術時期の違い、術後経過の違いとmicroRNAの発現レベルについての違いを検討した。さらにGO解析により転写ネットワークにおいて有意な要因となり得るmicroRNAを抽出して、ホルマリン固定パラフィン包埋標本からのmicroRNAによるリアルタイムPCRによる発現解析を実施した。今回の研究で胆道閉鎖症の病態進展にmicroRNAによるエピジェネティック制御が関与している可能性について追求することができ、microRNAの発現状況により患者の層別化の可能性を確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we comprehensively analyzed microRNA expression status using liver biopsy in biliary atresia patients. Furthermore, we evaluated a relationship between microRNA expression status and clinical status. On the basis of comprehensive microRNA expression study, proposed prognostic factors were picked up by gene ontology analysis. The quantitative analysis using real-time PCR were performed in these proposed factors. In this study, microRNA might play a crucial role in development of biliary atresia. Therefore, biliary atresia patients might be stratified in accordance with microRNA expression status.

研究分野：小児外科学

キーワード：胆道閉鎖症 予後 microRNA 網羅的解析

### 1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は新生児及び乳児期早期に閉塞性黄疸を呈する代表的疾患である。その原因は未だ不明であるが、ウイルス感染説や自己免疫の関与などが考えられている。手術時の肝生検では門脈域に炎症細胞浸潤が認められ、肝内胆管および肝外胆管は炎症性に破壊され閉塞している。日本胆道閉鎖症研究会による全国登録によると、胆道閉鎖症に対する葛西手術により黄疸が消失する割合は6割程度である。また黄疸が消失した症例においても、その後の肝病態の悪化に伴い最終的には肝移植を要する症例も決して少なくはない。このような状況に対して、我々は通常の採血検査のみならず、核医学検査による機能的画像評価などを積極的に取り入れて、病態の正確な把握による、病態悪化に対する早期対応を行うことで自己肝生存率の向上を目指している。

しかし本症の予後を正確に予測するバイオマーカーが確立されていない点が、本症の治療において大きな問題となっている。本症の治療において肝移植を必要とするかどうかの判断ならびにそのタイミングは非常に重要である。

一方、本邦におけるドナーの現状は未だ生体ドナーにその多くを依存している。そのような状況の中で、長期自己肝生存例の増加とともに、年長児から成人にかけて、肝移植を要する症例も増加している。患者の年齢や体格により肝外側区域、肝左葉、肝右葉と必要となるグラフトの種類が異なる。すなわち長期自己肝生存を果たした後の肝移植症例においては、生体ドナーの負担が増えるというジレンマが起こり得る。患者の自己肝生存を目指すのは、様々な面から理想である。しかし現実の問題としては、どの程度まで悪化したら肝移植を考慮するのかは、今でも議論的であり、明確な判断基準を設定しにくい症例も存在する。この問題を克服するためにも本症の予後を正確に予測するバイオマーカーの確立は急務である。

さらに自己肝生存患者の肝病態も肝機能がほぼ正常の症例から慢性炎症・胆汁うっ滞が持続する症例など多彩であり、症例に応じた対応が必要である。このためにも正確に評価されたバイオマーカーによる患者の層別化を行い、治療の個別化を目指すことは有用と考えられる。

最近になり、多くの microRNA の発現状態を一度に検索できる miRNA Oligo chip の技術が確立され、既存の臨床検体を用いての網羅的解析が可能となった。これに伴い microRNA の発現の網羅的解析により新たなバイオマーカーを見出し症例の層別化による治療戦略への応用といった報告も見られる。(Br J Cancer. 2011 105(9): 1352-61) また従来は RNA を対象とした検討について、ホルマリン固定パラフィン包埋組織(以下 FFPE 組織)は不向きと考えられていた。し

かし近年 FFPE 組織からの RNA 抽出により microRNA の発現解析が可能である、という報告が増えている。(J Pathol. 2011 225(1): 43-53) このことはこれまで蓄積してきた標本の新たな利用を意味しており、さらに長期的な臨床経過との関連性の検討が行い得るということの意味している。また様々なマイクロアレイが使用できるような状況で、大量のデータをどのように解析して、意味づけしていくのかという手法も確立されつつある。すなわちマイクロアレイ登場当初の対象との発現量の差のみの評価だけではなく、クラスター解析や決定木分析などを用いた層別化やネットワーク解析による多因子の相互作用の解析などが、PC のマシンスペックの向上とソフトウェアの進歩により以前よりも簡便に行えるようになった。

このような背景において、今回は本症の予後を正確に予測するバイオマーカーの確立および microRNA 発現パターンによる症例の層別化をするために教室に保管してある FFPE 組織から RNA 抽出を行い、miRNA Oligo chip を用いて microRNA 発現状態の網羅的解析を行うことと、研究期間内に発生した胆道閉鎖症の凍結標本を用いて mRNA の発現と microRNA の発現とを同時に評価して、これらの相互作用をネットワーク解析するという着想を得るに至った。

### 2. 研究の目的

胆道閉鎖症(以下本症)は新生児および乳児期に肝内・肝外胆管が炎症性変化に閉塞する。葛西手術後経過は肝機能がほぼ正常の症例から慢性炎症・胆汁うっ滞が持続する症例など多彩であり、症例に応じた対応が必要である。

本症では 20 歳までに肝移植を要する症例が半数程度存在するが、その予後因子は確立されていない。

一方では近年 microRNA と炎症性疾患との関連が注目され、様々な疾患でその関与が取りざたされている。本症でも実験モデルでは関連が示唆されている。

このような背景の中で、今回はホルマリン固定パラフィン包埋標本から得られる microRNA の網羅的解析より本症の予後因子を同定し、症例の層別化を行うことで、本症治療の個別化を目指すことを研究目的とする。

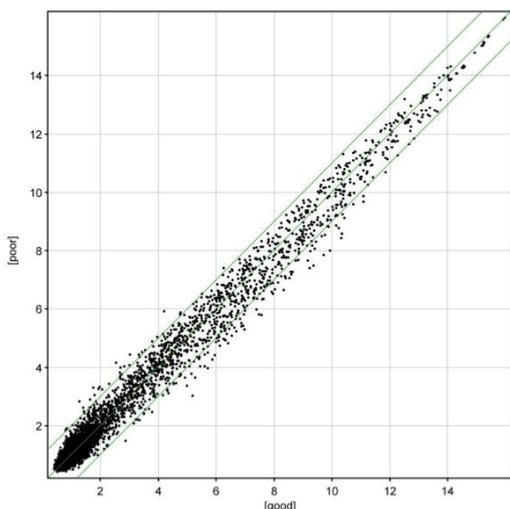
### 3. 研究の方法

胆道閉鎖症の葛西手術時肝生検標本を用いて、microRNA の発現レベルについての網羅的検討を行った。具体的には手術時期の違い、術後経過の違いと microRNA の発現レベルの違いについて検討を行った。

さらに GO 解析により転写ネットワークにおいて有意な要因となり得る microRNA を抽出して、ホルマリン固定パラフィン包埋標本からの microRNA によるリアルタイム PCR による発現解析を実施した。

### 4. 研究成果

(1) 葛西手術時凍結肝生検標本から抽出した RNA による網羅的な microRNA の発現解析 micro array による網羅的な microRNA は発現解析で予後良好群と予後不良群との比較において 1.5 倍以上の発現の違いが認められ、統計学的に有意な差を認めた microRNA が 17 個同定された。



予後良好で 1,5 倍以上の発現増加	予後良好で 1,5 倍以上の発現減少
hsa-miR-4455	hsa-miR-154-3p
hsa-miR-4676-5p	hsa-miR-548a-3p
hsa-miR-6865-5p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-3151-5p	hsa-miR-361-3p
hsa-miR-3125	hsa-mir-3910-1
	hsa-mir-3910-2
	U22
	hsa-miR-502-5p
	hsa-miR-628-3p
	hsa-mir-323a
	hsa-mir-548a-1
	hsa-mir-6516

これらの microRNA がターゲットとする mRNA について

PITA: [http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_data.html](http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html)

TargetScan : <http://www.targetscan.org/microRNAorg>: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>

の 3 種でデータベース検索を実施したところ、良好群で発現増加を認めた miRNA に関連した遺伝子が 189 遺伝子、良好群で発現減少を認めた miRNA に関連した遺伝子が 62 遺伝子抽出された。

予後良好で 1,5 倍以上の発現増加した miRNA に関連した mRNA (p 値の上位 10 遺伝子)

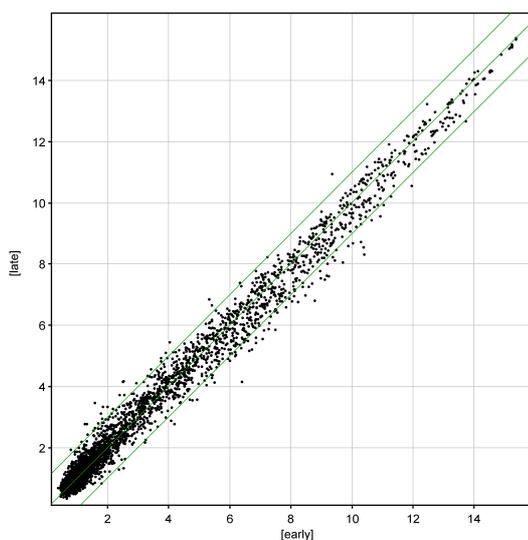
Transcript ID_Array Design_	Symbol
hsa-miR-3156-5p, hsa-miR-3176	NRAP
hsa-miR-3156-5p, hsa-miR-3176	ANKRD30A
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	CD48
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	PPP1R16B

hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	KAZALD1
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	NEK5
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	KIF6
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	ZNF319
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	ZNF576
hsa-miR-3176, hsa-miR-3156-5p	KLRK1

予後良好で 1,5 倍以上の発現減少した miRNA に関連した mRNA (p 値の上位 10 遺伝子)

Transcript ID_Array Design_	Symbol
hsa-miR-486-5p	COL6A6
hsa-miR-486-5p	NCOA6
hsa-miR-486-5p	MDH1
hsa-miR-486-5p	IGFBP2
hsa-miR-486-5p	CNTNAP4
hsa-miR-486-5p	SMAD2
hsa-miR-486-5p	CYP27C1
hsa-miR-486-5p	ZNF367
hsa-miR-486-5p	CLDN10
hsa-miR-486-5p	SERPINE1

同様に早期手術群と非早期手術群についても検討を行った。その結果、網羅的な microRNA は発現解析で早期手術群と非早期手術群との比較において 1.5 倍以上の発現の違いが認められ、統計学的に有意な差を認めた microRNA が 9 個同定された。



早期手術で 1,5 倍以上の発現増加	早期手術で 1,5 倍以上の発現減少
hsa-miR-5100	hsa-miR-486-5p
hsa-miR-3176	hsa-miR-4648
hsa-miR-3156-5p	hsa-miR-3667-5p
ACA55	ENSG00000252277
hsa-miR-4454	

これらの microRNA がターゲットとする mRNA について 3 種でデータベース検索を実施したところ、早期手術群で発現増加を認めた miRNA に関連した遺伝子が 344 遺伝子、早期手術群で発現減少を認めた miRNA に関連した

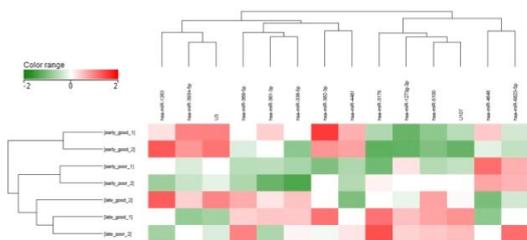
遺伝子が 91 遺伝子抽出された。  
 早期手術で 1,5 倍以上の発現増加した miRNA  
 に関連した mRNA (p 値の上位 10 遺伝子)

Transcript ID_Array Design_	Symbol
hsa-miR-3125	LCE1D
hsa-miR-3125	C19orf33
hsa-miR-3125	RPL39
hsa-miR-3125	MYL6B
hsa-miR-3125	RPL37A
hsa-miR-3125	COX6B1
hsa-miR-3125	MST1
hsa-miR-3125	TNMD
hsa-miR-3125	SAA1
hsa-miR-3125	ERGIC3

早期手術で 1,5 倍以上の発現減少した miRNA  
 に関連した mRNA (p 値の上位 10 遺伝子)

Transcript ID_Array Design_	Symbol
hsa-miR-361-3p,hsa-miR-502-5p	CADM4
hsa-miR-361-3p,hsa-miR-502-5p	NCOA2
hsa-miR-628-3p,hsa-miR-502-5p	CHTF8
hsa-miR-628-3p,hsa-miR-502-5p	ERLIN2
hsa-miR-361-3p,hsa-miR-502-5p	MYO1C
hsa-miR-502-5p	SSBP4
hsa-miR-628-3p	ZNF567
hsa-miR-502-5p	USH1G
hsa-miR-502-5p	ZGPAT
hsa-miR-502-5p	DOT1L

また microRNA の発現状況と臨床経過について  
 クラスター解析を実施したところ、臨床経過  
 と発現状態での層別化が可能であった。



### (2) GO 解析

この候補遺伝子について GO 解析を実施した  
 ところ、GO:0010720 (positive regulation of  
 cell development) や GO:0001837  
 (epithelial to mesenchymal transition)など、  
 計 86 個の GO term で有意差を認めた。

(3) ホルマリン固定パラフィン包埋標本から  
 のリアルタイム PCR による発現解析  
 リアルタイム PCR を実施する microRNA として、  
 hsa-miR-3176、hsa-miR-193a-5p、  
 hsa-miR-26b の 3 種類を選定した。その結果  
 hsa-miR-3176 は予後が良好な群において有意  
 に低値であった。また統計学的有意差には  
 至らないが手術日齢が遅い症例で高値で

ある傾向を認めた。

今回の研究で胆道閉鎖症の病態進展に  
 microRNA によるエピジェネティック制御が  
 関与している可能性について追求すること  
 ができた。また本研究の目的である、ホルマ  
 リン固定パラフィン包埋標本から抽出した  
 microRNA により患者予後についての層別化  
 についての可能性について確認することが  
 できた。

### 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 5 件)

1. Tanaka H, Sasaki H, Wada M, Sato T, Kazama T, Nishi K, Kudo H, Nakamura M, Nio M. Postnatal management of prenatally diagnosed biliary cystic malformation. J Pediatr Surg (査読有) Vol.50 2015, p507-10
2. Gu YH, Yokoyama K, Mizuta K, Tsuchioka T, Kudo T, Sasaki H, Nio M, Tang J, Ohkubo T, Matsui A. Stool color card screening for early detection of biliary atresia and long-term native liver survival: a 19-year cohort study in Japan. J Pediatr. (査読有) Vol.166 2015, p897-902
3. Nio M, Wada M, Sasaki H, Tanaka H, Watanabe T. Long-term outcomes of biliary atresia with splenic malformation. J Pediatr Surg (査読有) Vol.50 2015, p2124-27
4. Nio M, Wada M, Sasaki H, Tanaka H, Does hepatic hilum morphology influence long-term prognosis in type I/I cyst biliary atresia? Pediatr Surg Int. (査読有) Vol.31 2015, p931-6
5. Sasaki H, Tanaka H, Wada M, Kazama T, Nishi K, Nakamura M, Kudo H, Kawagishi N, Nio M. Liver transplantation following the Kasai procedure in treatment of biliary atresia: a single institution analysis. Pediatr Surg Int. (査読有) Vol.30 2014, p871-5

[学会発表](計 1 件)

1. Sasaki H, Tanaka H, Wada M, Kazama T, Nishi K, Nakamura M, Kudo H, Nio M. Analysis of the prognostic factors for short- and mid-term native liver survival in biliary atresia. WOFAPS2016(国際学会)2016年10月08日~2016年10月11日 Washington DC, US

[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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 英之 (SASAKI Hideyuki)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：40438461

(2) 研究分担者

仁尾 正記 (NIO Masaki)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70228138

田中 拡 (TANAKA Hiromu)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：50579448