

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860822

研究課題名(和文)単心室循環確立に伴う遺伝子発現変化：マイクロアレイ法による遺伝子プロファイル解析

研究課題名(英文)Immunological and Platelet Functions in Patients after Fontan Operation: Gene Expression Microarray Analysis

研究代表者

本田 崇 (HONDA, TAKASHI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50525532

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)：Fontan患者の免疫異常や血小板機能異常の機序を明らかにするために、全血に対してマイクロアレイ解析を行い、血球細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行った。対象はFontan群6例として、健常児6例との比較検討を行った。40個の遺伝子発現に関する経路で有意差を認めた。5つは免疫機能に関わる経路(IL-12の減弱、PD-1の減弱、ZAP-70の減弱、CD8陽性T細胞におけるTCR伝達の減弱)であり、1つは血小板機能に関わる経路(IFN alfa 11b/beta3の増強)であった。Fontan患者においては遺伝子発現レベルで、免疫機能が低下し、血小板機能が増強していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We performed microarray analysis for the blood cells in order to elucidate the mechanisms of abnormalities in immune system and platelet function in the Fontan patients. 6 Fontan patients and 6 children without any congenital heart diseases were enrolled in the present study. There were significant differences in 40 gene pathways. Among them, 5 pathways were associated with immune system (reduced IL-12 signaling, reduced PD-1 signaling, reduced ZAP-70 signaling, and reduced T cell receptor signaling in CD8+ T cells) and 1 was associated with platelet function (enhanced IFN alfa 11b/beta3). The results of our microarray analysis indicated that the cell-mediated immunity and humoral immunity are repressed and that the platelet function is enhanced in the Fontan patients.

研究分野：小児循環器学

キーワード：Fontan循環 マイクロアレイ 遺伝子発現 免疫機能 血小板機能

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) Fontan 手術は左心低形成症候群や三尖弁閉鎖、肺動脈閉鎖などの、左室もしくは右室が低・無形成であり、体循環のための1つの心室しか有さない疾患群の最終手術である。つまり Fontan 術後の単心室循環では、肺心室が存在しないため、上・下大静脈(SVC, IVC)が直接、左右肺動脈(LPA, RPA)につながり、“十字の形”(Fontan anastomosis)を形成する。肺心室が存在しない Fontan 循環では、極めて非効率的な血行動態となっていることが多くのコンピュータシミュレーションの研究で明らかとなり(Bove et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2003)、こうした血行動態が PLE、血栓症などの、Fontan 循環の遠隔期合併症と関連すると考えられてきた。我々は Fontan anastomosis におけるエネルギーの損失の程度(Energy Loss; EL)をこれまで in vivo で測定し、心機能に与える影響を明らかにしてきた(Honda et al. Pediatric cardiol 2013)。
- (2) しかしながら近年、血行動態が PLE や血栓症の単独の原因ではなく、免疫・凝固機能の異常の関与も考えられている。具体的には、Fontan 術後患者では CD3 陽性 T 細胞の低下、血管炎マーカーの上昇、凝固機能の亢進をはじめとする、免疫・凝固機能の特殊性が近年報告され、PLE や血栓症などの合併症の発症に関与すると考えられるようになった(Odegard et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2009), (Ostrow et al. AnnThorac Surg 2006)。この免疫・凝固機能の特殊性は、Fontan 循環の血行動態の特殊性に起因すると考えられ、単心室循環における静脈圧の上昇が何らかの慢性的な炎症を招いている可能性が考えられるが、血行動態と炎症・凝固機能異常の関係性は不明である。
- (3) そこで我々は、Fontan 術後患者の予後改善には血行力学的な観点のみならず、免疫・凝固の観点からのアプローチが必要であると考え、マイクロアレイ法という 54,000 個にも及ぶ遺伝子の発現を網羅的に解析できる新しいアプローチで分析し、単心室循環の確立に伴う免疫・凝固機能変化のメカニズムを解明したいと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Fontan 患者のリンパ球と血小板を含む全血球中の遺伝子発現を網羅的に解析し、Fontan 術後患者における免疫機能異常や血小板機能異常に関して、遺伝子発現レベルでそのメカニズムを明らかにすることであった。

## 3. 研究の方法

対象は、Fontan 群 6 例として、Control 群は心疾患を有さない健常児 6 例とした。前者に対しては定期フォローにおける採血施行時に、後者に対しては血液型やアレルギー検査などでの血液検査施行時に合わせて検査を施行した。

PAX gene tube® (BD company) で採取した血液 2.5ml より、全血球中に存在する mRNA を抽出した。それらをもとに逆転写で得られた cDNA を抽出し、DNA マイクロアレイを施行した。NCBI BioSystems のデータベースを用いて Pathway 解析を行い、免疫および血小板機能に関する Fontan 患者での特徴を調べた。P<0.01 をもって 2 群間に差のある遺伝子発現に関する Pathway を有意差ありと判断した。同時に、サイトカイン解析を行う目的で、血清 1ml より Bioplex ヒトサイトカインアッセイキット(BIO-RAD)を用いて、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IFN-、TNF- を調べた。

本研究は、北里大学医学部・大学病院の倫理委員会の承認を受けており、患者およびそのご家族に十分なインフォームドコンセントを行ったうえで研究を行った。

## 4. 研究成果

- (1) Control 群において年齢・性別は 3 - 12 歳(中央値: 11 歳)、男児: 女児 = 3 : 3 であり、一方で Fontan 群の年齢は 3 - 20 歳(中央値: 5 歳)、男児: 女児 = 5 : 1 であった。
- (2) 40 個の遺伝子発現に関する Pathway で有意差を認めた。それらのうち、5 つは免疫機能に関わる Pathway であった。Fontan 群で、IL-12 の細胞内伝達シグナルの減弱、PD-1 伝達シグナルの減弱、ZAP-70 伝達シグナルの減弱、CD8 陽性 T 細胞における TCR 伝達シグナルが減弱していた(表 1)。
- (3) Fontan 群において、CD4 陽性 T 細胞では PD-1 の機能低下により細胞内シグナル伝達が抑制されており、さらに IL-12 の異常に伴い Th1 への分化が阻害されていることが推測される。また、CD8 陽性 T 細胞は ZAP-70 機能低下に伴い TCR シグナリングが阻害されていることが示唆された。このように、Fontan 群においては遺伝子発現レベルにおいて T 細胞機能に特徴を有していることが示された。液性免疫機能・細胞性免疫機能ともに正常群のそれらと異なっており、これらが易感染性に関与している可能性がある。また、PLE の発症にも関与している可能性がある。

表1 免疫機能に関する Pathway

Pathway	Z score	P-value
IL-12-mediated Signaling events	6.38	4.29E-05
PD-1 signaling	7.032	0.000145
Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	6.474	0.000594
Downstream signaling in naïve CD8+ T cells	4.087	0.00408
T cell receptor signaling pathway	3.246	0.00834

(4) サイトカイン解析では、IL-6 に関して、Fontan 群で Control 群と比較して優位に高値であった。しかし IL-12 に関しては有意差は認められなかった。

(5) Pathway 解析において、1 つは血小板機能に関わる Pathway に有意差が認められた。Fontan 群で IFN alpha 11b/beta3 が増強していた(表2)。

表2 血小板機能に関する Pathway

Pathway	Z score	P-value
Platelet Aggregation	3.912	0.00750

(6) 血小板機能に関しては、これまでもタンパクレベルでは機能の亢進が示されてきた。本研究より、血小板内の遺伝子発現レベルで血小板凝集が亢進していることが明らかになった。

(7) 変動のあった 40 の Pathway は、以下の通りであった。

表3 有意な変動のあった Pathway

Pathway	Z score	P-value
Ribosome, eukaryotes	6.313	2.95E-05
Ribosome	6.252	3.26E-05
IL12-mediated signaling events	6.38	4.29E-05
PD-1 signaling	7.032	0.000144
Eukaryotic Translation Termination	5.59	0.000146
Peptide chain elongation	5.59	0.000146
Viral mRNA Translation	5.59	0.000146
Eukaryotic Translation Elongation	5.532	0.000160
Aurora B signaling	5.972	0.000226
Nonsense Mediated Decay	5.313	0.000227

Formation of a pool of free 40S subunits	5.11	0.000316
Hematopoietic cell lineage	4.829	0.000500
Generation of second messenger molecules	5.769	0.000537
Influenza Viral RNA Transcription	4.785	0.000538
Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	6.474	0.000594
Ribosome, eukaryotes	4.042	0.000618
Ribosome	4.699	0.000621
Cytokine Signaling in Immune system	4.656	0.000666
Ceruloplasmin expression	4.574	0.000764
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	4.574	0.000764
Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex	6.035	0.000869
Nonsense-Mediated Decay	4.494	0.000873
Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	4.378	0.00106
SRP-dependent Cotranslational protein targeting to membrane	4.378	0.00106
Cap-dependent Translation Initiation	3.767	0.00211
Eukaryotic Translation Initiation	4.131	0.00273
Interferon Signaling	4.795	0.00287
Interferon alpha/beta	5.346	0.00369
Integrin alpha11b beta3 signaling	4.087	0.00408
superpathway of pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis	3.565	0.00418
Downstream signaling in naïve CD8+ T cells	5.113	0.00441
Influenza Life Cycle	5.113	0.00441
GRB2	4.024	0.00442
p130Cas linkage to MAPK signaling	3.428	0.00527
TCR signaling in naïve CD8+ T cells	3.428	0.00527
Influenza Infection	2.845	0.00567
Translation	3.629	0.00743
Immune System	3.912	0.00749

TCR signaling	3.833	0.00820
Platelet Aggregation (Plug Formation)	3.246	0.00834
Primary immunodeficiency	5.769	0.000537
T cell receptor signaling pathway	4.785	0.000538
TCR signaling in naive CD8+ T cells	6.474	0.000594

(8) 本研究では、全血中の mRNA に関して解析を行った。本結果をより詳細に確認するためには、細胞レベルにおいていかなる遺伝子発現の差があるかを明らかにする必要がある。

(9) Fontan 患者において、CD4 陽性細胞は Th1 への分化が阻害され、CD8 陽性 T 細胞は TCR シグナリングが阻害され、結果として細胞性および液性免疫機能が低下している可能性が遺伝子発現レベルにおいて示唆された。一方で、血小板機能は遺伝子発現レベルで増強していた。今後、細胞レベルでの遺伝子発現を検討し、本結果をより詳細に検証する必要がある。ここまでの結果については、今秋の学会にて発表を行い、その後に論文発表する。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 崇 (HONDA Takashi)

北里大学医学部小児科・助教

研究者番号 : 50525532