

上皮におけるOPN発現亢進の一因となっている可能性がある。今回検討した原発性硬化性胆管炎症例に、OPN発現亢進を示す大型胆管が見られたことは、胆管炎を基盤としたOPN発現亢進機序を示唆する。次に、OPNが結石形成のどの段階でどのように作用し、肝内結石症の特徴である結石形成に関与するのだろうか。今回の検討で、肝内結石症の顕微鏡的微小結石を含有する胆管ではOPNの発現を認めたが、大型結石を含有する残存胆管上皮でのOPN発現は乏しかった。慢性増殖性胆管炎に伴う胆管上皮の脱落や局所的なOPN産生の低下が結石形成に関与しているのかもしれない。その他、上記の如く、胆汁中OPNの構造の変化や細胞接着能の消失などの要因も結石形成の原因として挙げられる。これらの要因は、肝内結石症の結石形成を解明する特徴的な諸因子であり、今後詳細に検討する必要がある。

PCKラットは、当初、多発性嚢胞腎の動物モデルとして報告されたが、肝内にもヒトカロリ病類似の多発性嚢胞状病変を生じる¹⁾。また、我々は9ヶ月～15ヶ月齢の7%に肝内結石を合併することを見だし、今回の検討を行った。その結果、コントロールであるSDラットでは、OPNの発現は胆管付属腺に限局していたが、PCKラットでは胆管付属腺の他、肝内胆管上皮と結石にもOPN発現（沈着）を認め、ヒト肝内結石症と類似した所見が得られた。原因は不明であるが、結石の成分解析は成功していない。コッサ染色にて石灰成分の存在は推定されたが、ビリルビン、コレステロールの有無は不明であり、ヒト肝内結石との類似性に興味を持たれる。

古くから細菌感染と肝内結石症との因果関係が指摘されており、特に大腸菌などの腸内細菌の関与が注目されてきた。また、我々は肝内結石の胆管上皮細胞から歯周病菌である*Campylobacter rectus*（または*C. showae*）を分子生物学的に検出、同定している⁷⁾。今回、PCKラットの結石周囲に細菌繁殖像がみられ、分子生物学的に3種の常在菌が同定し得

た。そのうち二種は腸内常在菌であり、残り一種は口腔咽頭に存在する常在菌であった。近年、口腔内感染症と全身疾患との関連性が注目されており、今後、肝内結石症においても口腔内感染症との関連性を検討すべきであろう。

結 語

OPNは、肝内大型胆管や胆管付属腺から産生、分泌され、肝内胆管系の結石形成に対する生体防御機構の一つとして作用していることが想定された。また、肝内結石のマトリックス成分としてOPNが存在することは確かであり、今後、肝内結石症の病態発生にOPNがどのように関与するのかを検討する必要がある。

文 献

- 1) Sanzen T, Harada K, Yasoshima M, *et al*: Polycystic kidney (PCK) rat is a novel animal model of Caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Am J Pathol* (in press)
- 2) Franzen A, Heinegard D: Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 1985; **232**: 715-724
- 3) 梅川 徹: 蔭酸カルシウム結晶に対するオステオポンチンの構造的特徴. *日泌尿会誌* 1999; **90**: 436-444
- 4) 久保木芳徳, 藤沢隆一: 石灰化の機序とその障害. *The Bone* 1991; **5**: 27-34
- 5) Yamate T, Kohri K, Umekawa T, *et al*: The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996; **30**: 388-393
- 6) 郡健二郎, 廣田誠一, 伊藤尊一郎, 他: 尿路結石の石灰化の分子機構. *細胞工学* 1994; **13**: 1082-1089
- 7) Harada K, Ozaki S, Kono N, *et al*: Frequent Molecular Identification of *Campylobacter* but not *Helicobacter* Genuses in Bile and Biliary Epithelium in Hepatolithiasis. *J Pathol* 2001; **193**: 218-223

肝内結石症 4 症例における HMG-CoA reductase と cholesterol 7 α -hydroxylase の mRNA レベルの検討： 結石葉、非結石葉との対比およびコントロール症例との比較

宮崎医科大学 第一外科

研究協力者 瀬戸口敏明

共同研究者 甲斐 真弘, 山田 学
永友 淳司, 前田 資雄
東 秀史

はじめに

肝内結石症の成因の一つとして、コレステロールおよび胆汁酸の代謝異常の関与が指摘されている。とくにそれぞれの代謝過程での律速酵素である HMG-CoA reductase と cholesterol 7 α -hydroxylase の調節機構の解明は結石生成の成因解明につながる。近年、肝内結石がコレステロール含有量の多いことが報告され^{1,2)}、さらにその背景の一つとして肝内結石症における HMG-CoA reductase の上昇と cholesterol 7 α -hydroxylase の低下に起因するコレステロール過飽和胆汁の存在が報告されている³⁾。しかし、従来、両酵素の調節は parallel に制御されるという報告が多く^{4,6)}、両酵素の feedback regulation の mechanisms を考えた場合、さらに症例を重ねた検

討が必要であろう。しかし、近年は症例数の減少により、まとまった解析が比較的困難となっている。今回、1999年から2000年にかけての肝内結石症 4 症例について両酵素の mRNA レベルを 7 例のコントロール症例と比較して検討した。

症例と方法

肝内結石症例は 4 例、コントロール症例は 7 例である (表 1)。肝内結石症例は男性 2 例、女性 2 例で年齢範囲は 58 才から 66 才。4 症例とも肝左葉に集簇した肝内結石で、いずれも肝の萎縮を認めた。手術は肝左葉外側区域切除術をおこなった。コントロール症例は男性 4 例、女性 3 例で年齢範囲は 45 才から 79 才。コントロール症例の疾患は肝硬変をとも

表 1. Cases

	Name	Age/Sex	Disease	Treatment
1.	H.O.	64 M	Hepatolithiasis (L)	Lateral segmentectomy
2.	H.T.	66 F	Hepatolithiasis (L)	Lateral segmentectomy
3.	T.N.	61 M	Hepatolithiasis (L)	Lateral segmentectomy
4.	K.N.	58 F	Hepatolithiasis (L)	Lateral segmentectomy
1.	H.I.	79 F	H.C.C. with Liver cirrhosis	Subsegmentectomy (S8)
2.	K.N.	45 F	H.C.C. with Liver cirrhosis	Left lobectomy
3.	N.S.	56 M	H.C.C. with Liver cirrhosis	Right lobectomy
4.	N.S.	67 M	Metastatic liver tumor	Subsegmentectomy (S6)
5.	K.H.	65 M	Metastatic liver tumor	Subsegmentectomy (S7, 8)
6.	M.S.	57 M	G.B. cancer	Extended cholecystectomy
7.	N.O.	53 F	G.B. cancer	Extended cholecystectomy

なう肝癌が 3 例、転移性肝腫瘍が 2 例、胆嚢癌が 2 例であった。肝硬変症例では肝硬変の程度が高度な症例は除外した。ICG 15 分値で 15% 以下の症例を選択した。また、いずれの症例も脂質代謝異常を認めず、術前の食事摂取もほぼ同じ条件とした。

肝組織の採取は開腹後時間をおかず、血行遮断をしない状態で採取した。肝内結石症例では結石葉と非結石葉から、コントロール症例では肝切除予定部からそれぞれ肝組織を採取した。採取した肝組織からただちに RNA の調整をおこない、HMG-CoA reductase と cholesterol 7 α -hydroxylase について Northern blot hybridization をおこなった。また、肝組織の採取は午前 10 時から午後 1 時までの間におこなった。これは個々の症例の比較において HMG-CoA reductase と cholesterol 7 α -hydroxylase の mRNA レベルの日内変動の影響を最小限にするためである。結石は十分に乾燥させた後、赤外分光分析をおこない、かつコレステロールの定量を chloroform-methanol で抽出した後、 $\Delta 4, 3$ oxo 形にした後、HPLC で定量した。

結 果

結石分析：日本分光社の FT-IR 型赤外分光光度計を用いた分析で、4 症例とも結石の主成分は calcium bilirubinate であった。結石中のコレステロール含量は 3.0W/W% から 31.7W/W% であった。

Northern blot hybridization：肝内結石症例 4 症例とコントロールの 7 症例で total RNA 20 μ g を用いて HMG-CoA reductase と cholesterol 7 α -hydroxylase の Northern blot hybridization をおこなった (図 1)。肝内結石症例は結石葉と非結石葉をそれぞれ調べた。Image analyzer の BAS2000 で定量した後、G3PDH で補正した。

コントロール症例の中で、肝硬変の症例と非肝硬変の症例では両酵素の mRNA レベルに違いを認めなかった。HMG-CoA reductase の mRNA レベル (図 2) は肝内結石症例の結石葉と非結石葉の間で有意

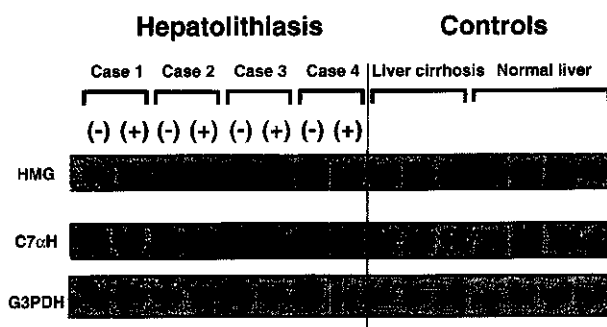


図 1. Northern blot hybridization analysis (-), hepatic lobes unaffected by intrahepatic gallstones; (+), affected lobes

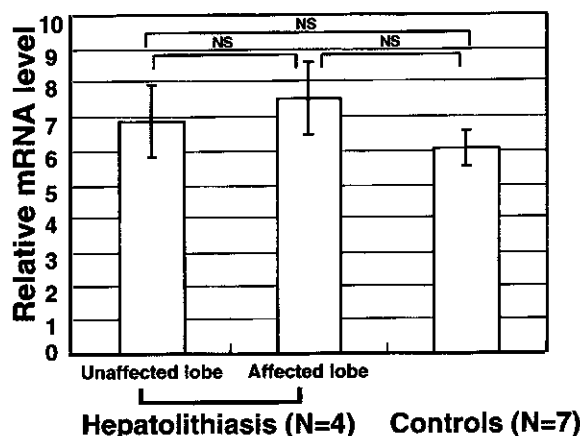


図 2. Relative mRNA levels of HMG-CoA reductase The results are given as means \pm standard errors (vertical bar) of means.

な違いを認めなかった。また、肝内結石症例とコントロール症例との間にも有意な違いを認めなかった。cholesterol 7 α -hydroxylase の mRNA レベル (図 3) は肝内結石症例の結石葉と非結石葉の間で有意な違いを認めなかった。肝内結石症例の非結石葉の mRNA レベルがコントロール症例と比較して有意に高かった。

考 察

肝内結石症の臨床例検討に際しては、組織採取をおこなう際、いくつかの問題がある。まず HMG-CoA reductase と cholesterol 7 α -hydroxylase の日内変動の存在である。両酵素には、ラット、マウス、ウサギ等で mRNA レベル、酵素活性のいずれにも強

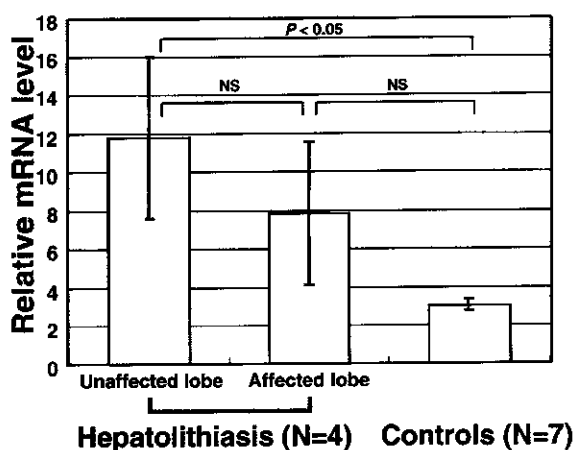


図 3. Relative mRNA levels of cholesterol 7 α -hydroxylase
The results are given as means \pm standard errors (vertical bar) of means.

い日内変動が確認されている⁷⁻¹¹⁾。ヒトにおける日内変動は間接的な証明しかなされていないが¹²⁾、個々の症例における採取時間の違いは、測定結果に日内変動の要素が反映される可能性がある。ヒトにおいて採取時間を均一に設定することは困難であるが、できるだけ同一時間帯に採取するべきである。我々は組織採取を午前10時から午後1時の間におこなった。

次に組織採取部位の問題である。とくに結石葉は限局性に線維化をとまなう萎縮などの変化を認めることがあり、肉眼的にも病理組織学的にも均一ではない。したがって結石葉でも病態を反映する部位と炎症等にとまなう2次的変化の修飾が関与している部位が存在すると思われる。実際、今回我々が解析した症例のうち結石葉から3カ所組織採取した症例では、萎縮および線維化の著明な部位はそうでない部位に比べて両酵素ともmRNAレベルが低値であった。Total RNAの収量も少なく、病理組織学的にも線維性変化が高度で肝細胞の著明な減少が認められた。したがって萎縮や線維化が著明な部位は炎症による2次的変化の修飾が関与している可能性があり、組織採取部位としては適切ではない。以上のようなことから組織採取の点で採取時間と採取部位には留意すべきである。

今回の結果からは、報告³⁾されているような肝内結石症例におけるHMG-CoA reductaseの上昇とcholesterol 7 α -hydroxylaseの低下という傾向は認められなかった。

今回はbile drainageの影響については考察をしなかったが、症例を増やしてこの問題も追求していきたい。

最近注目されている肝内コレステロール結石、コレステロール含有量の多いbrown pigment stoneとともにコレステロール含有量の少ない結石についても、その代謝上の背景をコレステロール代謝の面から解析していくことによって、より詳細な成因解明の糸口がつかめると想定している。

文 献

- 1) Yamashita N, Yanagisawa J, Nakayama F, *et al*: Composition of intrahepatic calculi-etioloical significance. *Dig Dis Sci* 1988; **33**: 449-453
- 2) Shoda J, Tanaka N, He B, *et al*: Alterations of bile acid composition in gallstones, bile, and liver of patients with hepatolithiasis, and their etioloical significance. *Dig Dis Sci* 1993; **38**: 2130-2141
- 3) Shoda J, He B, Tanaka N, *et al*: Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patients with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1534-1546
- 4) Heuman DM, Vlahcevic ZR, Bailey ML, *et al*: Regulation of bile acid synthesis. II. Effect of bile acid feeding on enzymes regulatiing hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology* 1988; **8**: 892-897
- 5) Xu G, Salen G, Sheffer S, *et al*: Different feedback regulation of hepatic cholesterol and bile acid synthesis by glycodeoxycholic acid in rabbits. *Gastroenterology* 1993; **105**: 112-1199
- 6) Pandak WM, Vlahcevic ZR, Heuman DM, *et al*: Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Hepatology* 1994; **19**: 941-947
- 7) Gielen J, Cantfort JV, Robaye B, *et al*: Rat liver cholesterol 7 α -hydroxylase. New results about its cir-

- cadian rhythm. *Eur J Biochem* 1975; **55**: 41-48
- 8) Noshiro M, Nishimoto M, Okuda K, *et al*: Rat liver cholesterol 7 α -hydroxylase. Pretranslational regulation for circadian rhythm. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10036-10041
- 9) Kai MH, Eto TA, Kondo KH, *et al*: Synchronous circadian rhythms of mRNA levels and activities of cholesterol 7 α -hydroxylase in the rabbit and rat. *J Lipid Res* 1995; **36**: 367-374
- 10) Clarke CF, Fogelman AM, Edwards PA: Diurnal rhythm of rat liver mRNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Correlation of functional and total mRNA levels with enzyme activity and protein. *J Biol Chem* 1984; **259**: 10439-10447
- 11) Yamada M, Nagatomo J, Setoguchi Y, *et al*: Circadian rhythms of sterol 12 α -hydroxylase, cholesterol 7 α -hydroxylase and DBP involved in rat cholesterol catabolism. *Biol Chem* 2000; **381**: 1149-1153
- 12) Yoshida T, Honda A, Tanaka N, *et al*: Determination of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one level in plasma using isotope-dilution mass spectrometry and monitoring its circadian rhythm in human as an index of bile acid biosynthesis. *J Chromatogr B* 1994; **655**: 179-187

肝内結石症の病変部結石側肝臓で特異的に 発現する遺伝子のFluorescence Differential Display (FDD) 法を用いた解析

愛媛大学医学部 第一外科

研究協力者 本田 和男

共同研究者 大谷 広美, 小林 展章

はじめに

我々は、蛍光色素を用いたFluorescence Differential Display (FDD) 法を用いて、肝内結石症の肝臓のlateralityを解析してきたが、初期の段階では左右の肝臓で発現差のあるDNA断片を検出しても、それを増幅精製して塩基配列を決定する過程で、混入した他のDNA断片のためシーケンシング反応がうまくゆかず目的の遺伝子を効率よく同定することができなかった。その後、切り出した左右差のあるバンドに混入した少量の不純なDNA断片を除去するため様々な工夫を重ね（平成11年度報告書）、安定して塩基配列の決定が行えるようになり、今回結石側の肝臓で発現の強い遺伝子10種類、非結石側の肝臓で発現の強い遺伝子4種類、結石側の胆管で発現の強い遺伝子1種類を同定することができた。また、同定された遺伝子について、RT-PCR用のプライマーを設定し、 β -actinをinternal controlとしてoriginalのサンプルから直接RT-PCRを行い発現の差の確認し、FDDで検出された左右差の信頼性の検討を行った。

方 法

1. 標 本

肝内結石症患者4症例に対して行われた肝切除手術時に、開腹後直ちに結石の存在する切除側の肝臓

と、その対照として結石の無い非切除側の肝臓を各々約1g採取し、液体窒素にて凍結保存した。結石側の胆管組織は、結石が充満して拡張肥厚している病変部位の肝内胆管組織を採取した。その対照として非結石側肝内胆管組織の採取が望ましいが、同部位は通常、肝切除術の際の切除組織には含まれないため、肝切除手技上胆嚢摘出が必要であった1例について、総胆管にできるだけ近い胆嚢管組織を非結石部胆管として採取し、同様に液体窒素にて凍結保存して実験に使用した。

2. Differential Display法

Fluorescence Differential Display Kit (Fluorescein version)¹⁾、Enzyme Set-FDD、Cloning-Sequencing Primer Set for FDD (TaKaRa) を使用し、定量性と確実性を向上させるため若干の条件の変更を行って本研究を行った。キットに付属のUpstream primerは10 baseのarbitrary primerで24種類、蛍光Downstream primer (アンカープライマー) はオリゴ (dT) 配列の3' 端に2塩基のアンカー配列を付加し、認識の際の精度が低いVT配列 (AT、GT、or CT) を除いたVV配列9種類である (表1)。本研究ではUpstream primer 24種類と、蛍光Downstream primer 2種類、合計48種類の組み合わせについて検討を行った。また1つの組み合わせにつき最低3症例分の解析を行い、肝内結石症患者に共通して発現に差のある遺伝子につき検討した。

表1. FDDの上流プライマーと下流プライマー

Upstream primers		Downstream primers	
No.1	5' GATCATAGCC	No.13	5' TGGATTGGTC
No.2	5' CTGCTTGATG	No.14	5' GGAACCAATC
No.3	5' GATCCAGTAC	No.15	5' GATCAATCGC
No.4	5' GATCGCATTG	No.16	5' TCGGTCATAG
No.5	5' CTTGATTGCC	No.17	5' GATCTGACTG
No.6	5' AGGTGACCGT	No.18	5' TCGATACAGG
No.7	5' GATCATGGTC	No.19	5' TACAACGAGG
No.8	5' TTTTGGCTCC	No.20	5' GATCAAGTCC
No.9	5' GTTTTCGCAG	No.21	5' GATCTCAGAC
No.10	5' GTTGCGATCC	No.22	5'AGCCAGCGAA
No.11	5' GATCTGACAC	No.23	5' CAAACGTCGG
No.12	5' CTGATCCATG	No.24	5' CTTTCTACCC

n=13-16

凍結標本の約0.4gよりQuickPrep Micro mRNA purification kit (Pharmacia) を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNA 5.5 μ lに5'末端を蛍光標識したDownstream primer (10 μ M) (キット付属の9種類のうちの1種類) 5 μ lを加え、70 $^{\circ}$ Cで10min加熱後氷上で急冷した。10 \times RNA PCR Buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 4 μ l、dNTP Mixture (10mM) 2 μ l、RNase inhibitor (40U/ μ l) 0.5 μ l、AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μ l) 1 μ lを加え、総量 20 μ lにて、55 $^{\circ}$ C 30min、95 $^{\circ}$ C 5 min、5 $^{\circ}$ C 5 min逆転写反応を行ない、TEバッファを80 μ l加え、選択したDownstream primerに対応する蛍光標識されたcDNAを作成した。また、PCRのプラトー効果を避け、初期濃度差が維持されていることを確認するために、その5倍希釈溶液も準備し以下の1st PCRを同時に行い、ペアにして電気泳動した。cDNA溶液 2 μ lとUpstream primer (2 μ M) 5 μ l (24種類のうちの1種類) と最初に選択した同じ蛍光Downstream primer (10 μ M) 0.5 μ lを加え、10 \times LA PCR Buffer II 2 μ l、25mM MgCl₂ 1 μ l、dNTP Mixture (2.5mM) 0.65 μ l、TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l) 0.1 μ l、dH₂O 8.75 μ l、total 20 μ lにて、annealing温度38 $^{\circ}$ Cで30 cycleのPCRを行った。

20cm \times 30cmの無蛍光ガラスプレート (バイオクラフト) を使用し、7M尿素変性4%polyacrylamide gelを2枚作成した。1st PCR産物 7 μ lに、5 μ lの95

%formamide-20mM EDTA液を加え、94 $^{\circ}$ C、2 min熱変性後急冷し1本鎖に解離した状態で、それぞれのgelに5 μ lずつアプライした。電気泳動はTBEバッファにて40W (約1200~1300V) 45 $^{\circ}$ Cにて行い、15minの予備泳動後、一方のゲルを短鎖解析用に約60min、他方を長鎖解析用に150min電気泳動した。泳動終了後、蛍光イメージアナライザー-Fluor-Imager SI (Molecular Dynamics) で読みとり、等寸大にプリントアウトしガラスプレートをそのうえに重ね、濃度の差を認めるバンドの部分を結石側、非結石側ともに切り出した (図1)。切り出した後のゲルを再度スキャンし、目的とするバンドが正確に切り出せたことを確認した。切り出したゲル断片に50 μ lのTEバッファを加え94 $^{\circ}$ Cで3 min加熱し目的のDNAを抽出した。

この切出しDNA断片抽出液 2 μ lに1st PCRと同じ組み合わせのUpstream primer (2 μ M) 5 μ l、蛍光Downstream primer (10 μ M) 1 μ lと、10 \times LA PCR Buffer II 5 μ l、25mM MgCl₂ 4 μ l、dNTP Mixture (2.5mM) 4 μ l、TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l) 0.25 μ l、dH₂O 28.75 μ lを加え、総量50 μ lにて2nd PCRを行った。annealing温度38 $^{\circ}$ Cで、回数は、12サイクルから18サイクルの間で1st PCRでのバンドの濃さにあわせて決定した。2nd PCR産物を結石側と非結石側を並べて2%低融点アガロースゲルNuSieve GTG Agarose (BMA) にアプライして電気泳動し、frag-

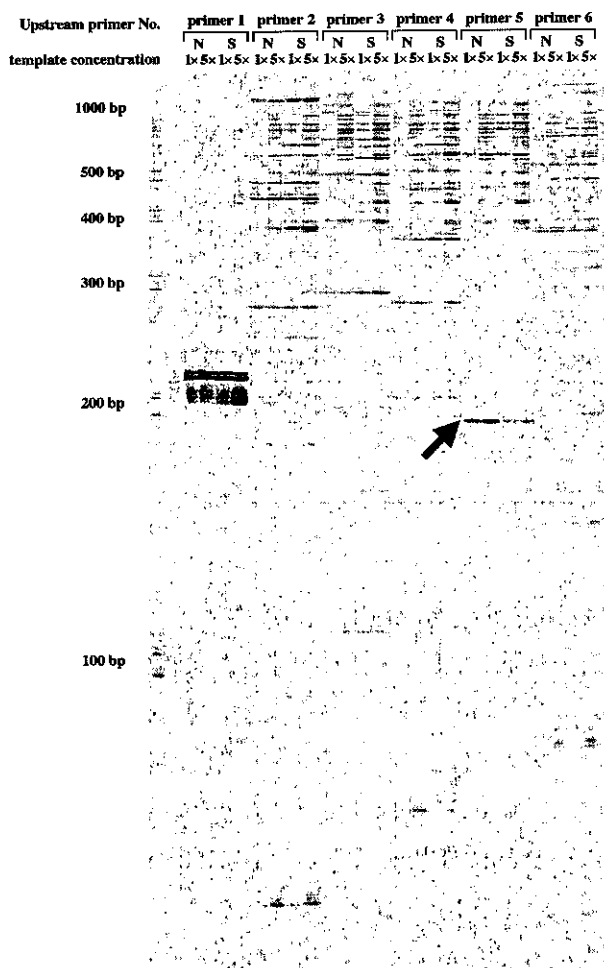


図1. 肝臓の非結石側 (N) と結石側 (S) のDifferential display

1st PCRの後DNAを7M尿素含有4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動分離。反応の信頼性を検討するためcDNA溶液は5倍の異なる濃度で反応を行った。矢印は非結石側でのCRPの濃いバンドを示す。

mentの大きさ及び濃度差を確認した。また同時にH.A.-Yellow或いはH.A.-Red (TaKaRa) 添加2%アガロースゲルにもアプライし、わずかに含まれる同じ長さのDNA断片を塩基配列内のAT、GC含有量の差によりさらに分離し²⁾、蛍光イメージアナライザーで読みとって目的とするbandを切り出した。切り出したアガロースゲルにTEバッファーを50 μ l加え70 $^{\circ}$ C 2分間の過熱にてゲルを融解しDNAの抽出を行った。

精製の確認と、高いannealing温度で厳密なsequencing反応を行う準備として、5'末端にDirect sequencingの際のprimerがannealする配列を付加したExtended primerを使用し3rd PCRを行った。2nd PCR後の切出しDNA断片抽出液2 μ lに、対応するExtended Upstream primer (10 μ M) 1 μ lと蛍光Extended Downstream primer (10 μ M) 0.5 μ lを加え、10 \times LA PCR Buffer II 5 μ l、25mM MgCl₂ 4 μ l、dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μ l、TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l) 0.25 μ l、dH₂O 33.25 μ lの総量50 μ lにて、annealing温度38 $^{\circ}$ Cで2サイクル、60 $^{\circ}$ Cで30サイクルのPCRを行ない、2nd PCRと同様H.A.-Yellow及びH.A.-Redを使用しDNAの精製と抽出を行った(図2)。次にDirect sequencing primer 1 (10 μ M) 1 μ l、Direct sequencing primer 2 (10 μ M) 1 μ l、10 \times Ex Taq Buffer 10 μ l、dNTP Mixture (2.5mM)

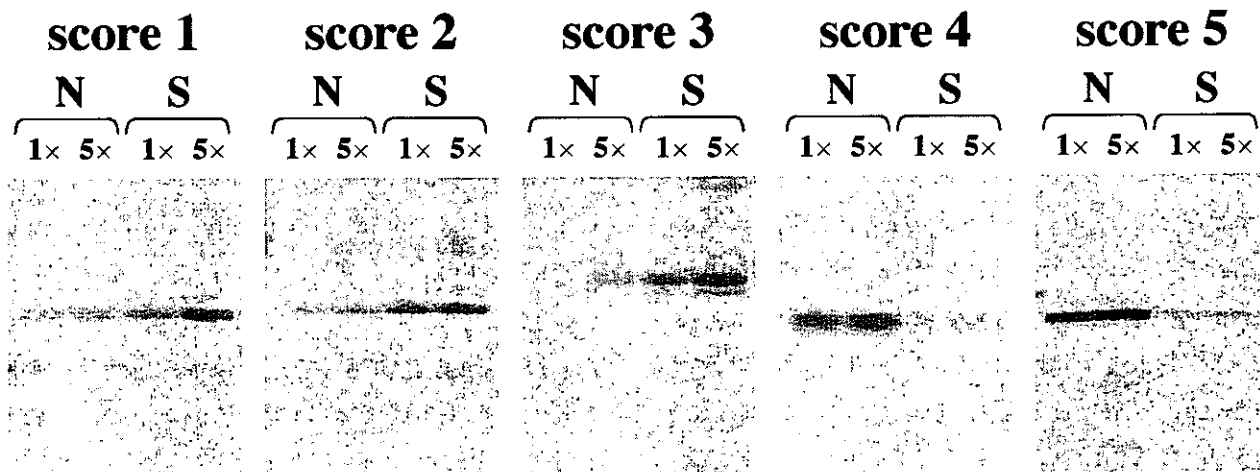


図2. ビジュアルスコア

著しく差が認められるものを5とし、わずかに差が認められるものを1とした。

8 μ l, TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l) 0.5 μ l, dH₂O 79.5 μ l total 100 μ lにてannealing温度58 $^{\circ}$ Cで36サイクルの4th PCRを行い、H.A.-Yellow又はH.A.-Red添加アガロースゲルにて電気泳動し1本のバンドであることを確認して切り出し、Gel Extraction Kit (Qiagen) にてDNAを精製抽出した。

3. 塩基配列の解析

このDNA断片を、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にてTemplate DNA (200~500ng) 5 μ l, Terminator Redy Reaction Mix 8 μ l, Direct sequencing primer (1 μ M) 3.2 μ l dH₂O 3.8 μ l, Total 20 μ lにて、96 $^{\circ}$ C 30秒の後、96 $^{\circ}$ C 10秒、58 $^{\circ}$ C 5秒、60 $^{\circ}$ C 4分を25サイクルのCycle Sequencing反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて解析した。結果は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子データベースをBLASTにて検索した。

4. RT-PCR

Differential Display法にて共通して差の認められた遺伝子につき、 β -actinをinternal controlとしてRT-PCRで発現の差の確認をした。PLATINUM Quantitative RT-PCR THERMOSCRIPT One-Step System (LIFE TECHNOLOGIES) を用い、mRNA抽出液 5 μ l, 2X THERMOSCRIPT Reaction Mix 12.5 μ l, β -actin F primer 0.5 μ l, β -actin R primer 0.5 μ l, Gene-specific primer (GSP) F primer 0.5 μ l, GSP R primer 0.5 μ l, THERMOSCRIPT Plus /PLATINUM Taq Mix 0.5 μ l, RNase OUT (40U/ μ l) 0.5 μ l, RNase free H₂O 4.5 μ l, 総量25 μ lの組成で58 $^{\circ}$ C 30分にてRT反応を行い、95 $^{\circ}$ C 5分にてRT反応の酵素であるTHERMOSCRIPT Plusを失活させると同時にPLATINUM Taqを活性化させた。連続して95 $^{\circ}$ C 15秒、58 $^{\circ}$ C 30秒、70 $^{\circ}$ C 30秒の反応をそれぞれ28、32、36サイクル行ったものを用意し、反応がプラトーに達していないことを確認しつつ、それぞれの遺伝子について β -actinで補正した非結石側と結石側のmRNAの発現量を比較した。

結 果

肝内結石症の結石側と非結石側の肝臓より抽出したmRNAについて、Downstream primerはNo.1を、Upstream primerはNo.1からNo.6までを使用して1st PCR後、7M尿素変性4%ポリアクリルアミドゲルにて短鎖解析用として60分間電気泳動を行い、蛍光イメージアナライザーで読みとると非常に多数のバンドが検出されたが、結石側と非結石側でバンドの濃さに明らかな差を認めるものは少なかった (図1)。それぞれのprimerの組み合わせについてtemplateとなるcDNAに5倍の濃度差を持たせて1st PCRを行っているが、バンドの濃度差はよく保たれており、この反応条件でPCRのプラトー効果の領域には達していないことが示されている。図1の矢印はDownstream primerはNo.1、Upstream primerはNo.5の組み合わせで得られた、結石側肝臓と比較して非結石側肝臓で濃いバンドが認められたDNA断片である。DD法では非常に多くのバンドが出現し、目的とするバンドのすぐ近傍にも別のバンドが存在することが多く、画像解析ソフトによる数値化は逆に不正確になることもあり、それぞれのバンドの濃度差の程度をvisual scoreにて評価する事とした。結石側と非結石側でわずかに差が認められるものをscore 1、強い差が認められるものをscore 5として5段階に分けて図2のように点数化し、3例の症例でのscoreの和を求めた。3例の症例で共通して発現の差が認められるDNA断片は肝内結石症の病因病態に関係している遺伝子であることが期待できるが、本研究ではscoreの和が4以上となったものを複数の症例で共通して差があるDNA断片とみなし、精製分離の上塩基配列を決定した (表2)。非結石側肝臓で発現が多い遺伝子として4種類、結石側肝臓で発現の多い遺伝子として、10種類、また1症例ではあるものの結石側の胆管で強い発現をしめす遺伝子として1種類が同定された。

FDD法で切除抽出されたバンドに対して2nd PCR後、2%低融点アガロースゲルにて電気泳動を行

表 2. FDD法で検出された遺伝子

Gene	Score*	Fragment length (bp)
1. Liver		
<i>Non-stone side</i>		
C-reactive protein (CRP)**	8	152
C-reactive protein (CRP)**	8	151
Transferrin	7	308
Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)	6	217
Hemopexin	4	246
<i>Stone side</i>		
unidentified human genes, KIAA0605 gene product	9	617
Factor H-related protein 2 (FHR2)	8	313
human RNA polymerase II 33-kDa subunit (hRPB 33)	6	60
Sterol 27-hydroxylase (CYP27)	5	15
Stromal cell-derived factor 1 (SDF1)	5	262
Chromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1)	5	392
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)	5	413
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (HNRPD)	4	227
Transmembrane 4 superfamily member 3 (TM4SF3)	4	605
Deoxyribonuclease II	4	165
2. Bile duct		
<i>Stone side</i>		
Lactoferrin	5***	363

* The scores in this table are the sums of 3 cases.

** CRP was detected by 2 different sets of primers.

*** One case only.

い、同時にbase-specific DNA ligandを添加したゲルで泳動すると、最初に切り出したバンドに含まれていた目的としない複数のDNA断片が分離された(図3)。2nd PCRの回数をできるだけ少なくすると、バンドの濃度差はそのまま保たれ、非結石側の方で濃いバンドが目的とするDNA断片であることが確認できた。図3の例では、H.A.-Yellowでの分離は、主なバンドの周囲に、数本のバンドが認められ、ゲルからの切り出し時に、数種類のDNA断片を含む可能性が高いため、バンドが比較的明瞭なH.A.-Red側から切り出し、3rd PCRを行った。以後、同様に精製を行いつつ3rd PCRでsequence primerの付加を行い、4th PCRにて増幅してDNA量を確保し、direct sequencingを行った。

塩基配列を決定したDNA断片は最長が617bp、最短が51bpで、NCBIのデータベースで検索を行った(表2)。非結石側肝臓で発現が高かった4種の遺伝

子は、C-reactive protein (CRP)、Transferrin、Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)、Hemopexinで、結石側肝臓で発現の高かった10種の遺伝子は、unidentified human genes、KIAA0605 gene product、Factor H-related protein 2 (FHR2)、human RNA polymerase II 33-kDa subunit (hRPB 33)、Sterol 27-hydroxylase (CYP27)、Stromal cell-derived factor 1 (SDF1)、Chromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1)、EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)、Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (HNRPD)、Transmembrane 4 superfamily member 3 (TM4SF3)、Deoxyribonuclease IIであった。また結石側の胆管で強い発現を示した遺伝子はLactoferrinであった。

次に上記のFDDで得られた結果をRT-PCRで確認した。 β -actinをinternal controlとし、product size

を β -actinは約200bp、目的とする遺伝子は約300bpとなるようにプライマーを設計した(表3)。図4はLactoferrinの例を示している。Internal controlである β -actinとLactoferrinは共にこのサイクル数では

プラトーに達しておらず、 β -actin量はほぼ同量であるがLactoferrin量は結石側の方が多いた事が示されている。他の遺伝子についても同様にプラトーに達していないサイクル数での電気泳動画像とinternal

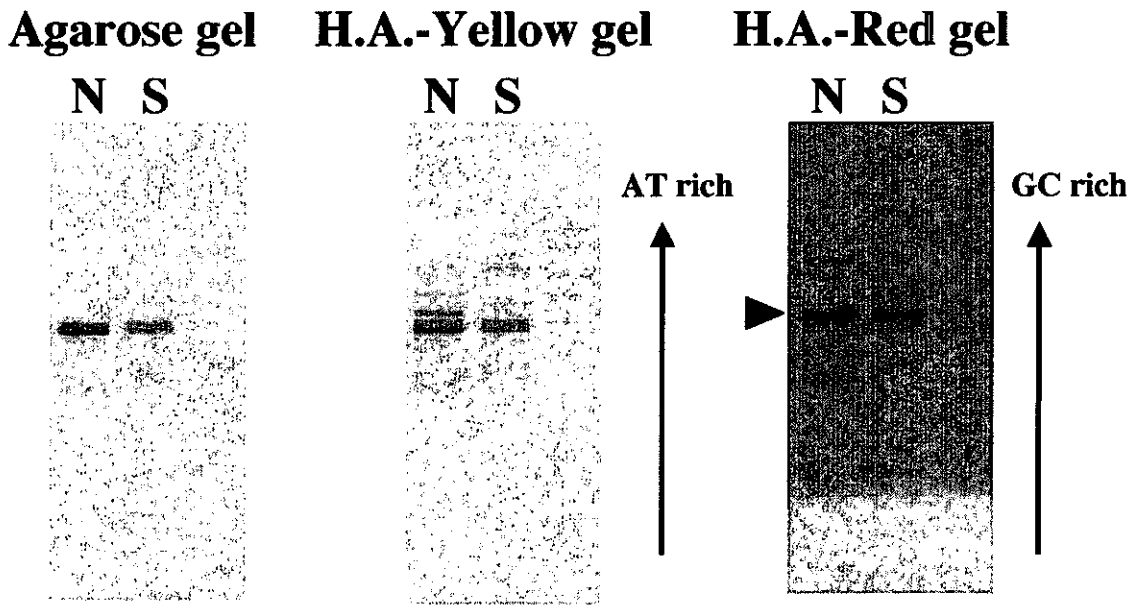


図3. 2nd PCR後のH.A.-YellowまたはH.A.-Redを含むアガロースゲル電気泳動
ATまたはGCの含有量により泳動度が異なる。矢印は切り出して次のPCRに使用したバンド。

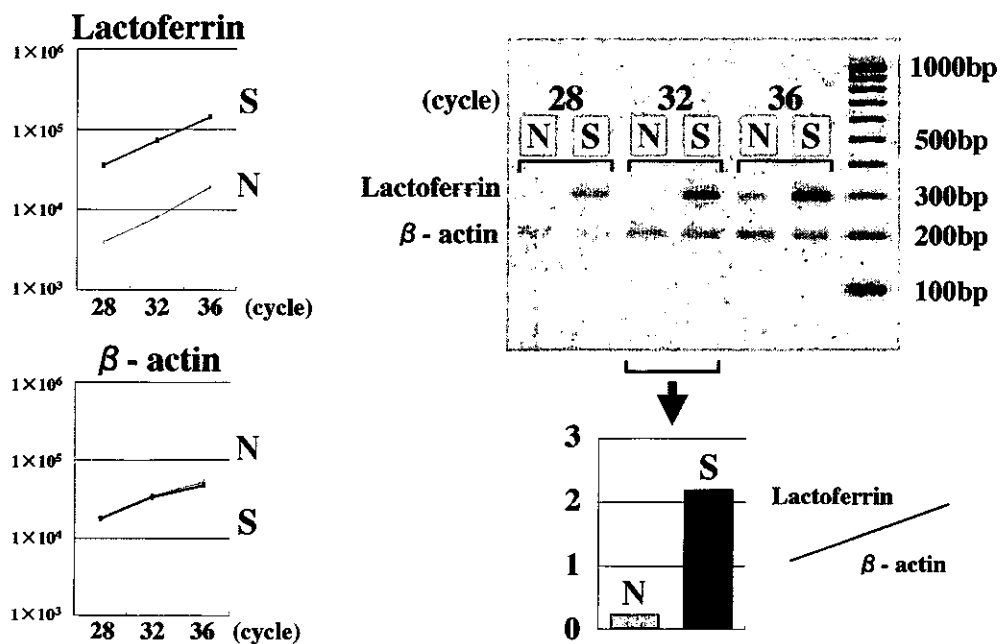


図4. ラクトフェリンのRT-PCR

cDNAはラクトフェリンと β -actinのプライマーで36サイクル増幅した。バンドの蛍光強度はFluorImager SI (Molecular Dynamics)で計測した。ラクトフェリンも β -actinも36サイクルではプラトーに達しなかった。

表 3. RT-PCRのプライマー

gene	product size		primer
β -actin	203	F	GGCATCCTCACCTGAAGTA
		R	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
C-reactive protein (CRP)	296	F	GGATCGTGGAGTTCTGGGTA
		R	CTGGGGTTTGGTGAACACTT
Transferrin	299	F	CGGAAGCCGGTAGATGAATA
		R	CATGTGCCTTCCCCTAGATT
Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)	298	F	CCCTCAAGTCGGGTATGAAG
		R	TGCCCGTTCAGAGACATCTT
Hemopexin	301	F	TCTGATCAAGGGGGACAAAG
		R	GAAGCGCAGGAATTGGTTAC
unidentified human genes, KIAA0605 gene product	297	F	CATGTACCGGTGGAAGCTCT
		R	CTGTACACGGAGCTGTCCGAA
Factor H-related protein 2 (FHR2)	288	F	AGTGGACAAACCAACAAAAGC
		R	TGCATTTTCACAAATCAACACA
human RNA polymerase II 33-kDa subunit (hRPB33)	294	F	TGACTACGTGGAGCAGGATG
		R	GAGCCACAGGACTCCACATT
Sterol 27-hydroxylase (CYP27)	300	F	CCATCGGGTTAATGTTCCAG
		R	TGTTGGATGTCGTGTCCACT
Stromal cell-derived factor 1 (SDF1)	302	F	CCTGGGGATGTGTAATGGTC
		R	GACCTTCTGTGGATCGCATT
Chromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1)	298	F	GAGCCTAAAAGGGGATCGAG
		R	AGTTGCCAGCGCTACATTCT
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	298	F	CGTGTGCCAAGACATAGACG
		R	GCACTGCTGAGCACATTGAT
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (HNRPD)	306	F	GATCCTAAAAGGGCCAAAGC
		R	CCACTGTTGCTGTTGCTGAT
Transmembrane 4 superfamily member 3 (TM4SF3)	299	F	TTGCTGTAGGTGCCATCATC
		R	AGCAGCTCCATTGACCAAAC
Deoxyribonuclease II	301	F	CGACTTGGAGAATGTGGTCA
		R	GTGGTCTCTGTGCTGTTGA
Lactoferrin	301	F	AAATGCTTCCAATGGCAAAG
		R	CTGTGTGGCAGGACTTCAGA

controlで補正したグラフを図5に示す。Chromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1) のみがFDDをサポートする結果が得られなかったが、他の14種の遺伝子については、FDDと同様の結果が得られた。

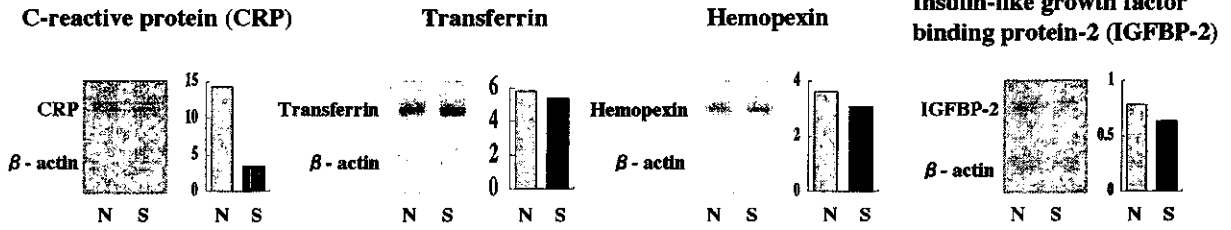
考 察

Liangらによって開発されたDifferential Display法³⁾、異なる条件下の細胞で発現しているmRNAの量の差異を簡便に検出できる方法として注目され、

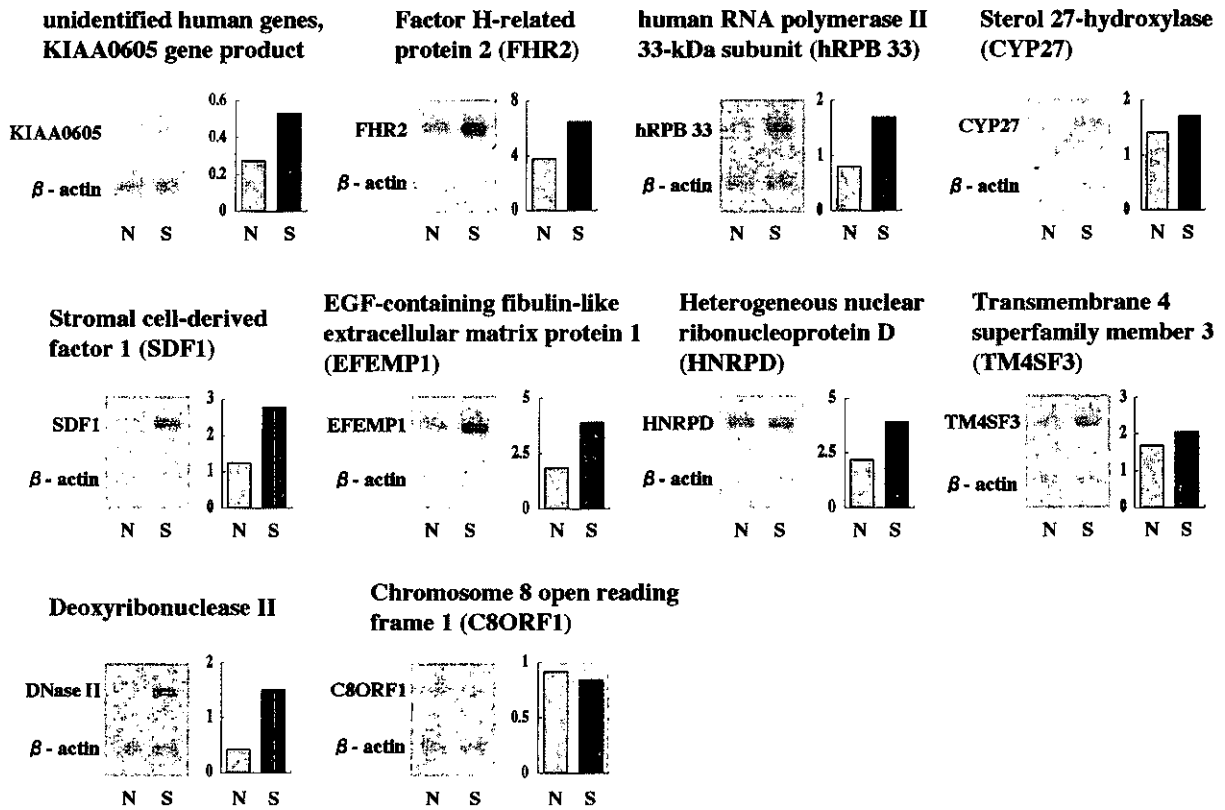
Itoらによる蛍光アンカープライマーを用いるFluorescent differential displayの開発により⁴⁾、更に実用性を増した。しかし、Liang自ら、DD法の偽陽性の多さを報告しており⁵⁾、Callardらはゲルからの切り出し時に近接するバンドが混入することや、サイズが同じでも、複数のDNA断片が含まれることが偽陽性の主な原因であると報告している⁶⁾。すなわち、今までのDD法の最大の問題点は、バンドの濃度差の原因となったDNA断片を、正確に単離できていなかったことにある。ゲルからの切り出しの際の物理的な精度は、切り出し後に容易に確認できる

1. Liver

Non-stone side



Stone side



2. Bile duct

Stone side

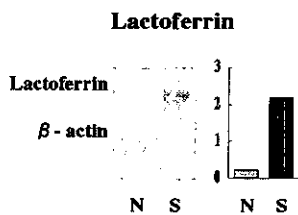


図 5. RT-PCR

Chromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1) 以外は FDD の結果に一致していた。

こともあり、本実験で用いた蛍光法はRI法よりも有利である。また目的DNA断片の単離については、従来からの大腸菌等を利用した方法は、確実にクローニングできる反面目的としないDNA断片をpick upする可能性も高い。一方、本研究に用いたbase-specific DNA ligandを添加したゲルを用いて、AT、GCの含有量の差により分離する方法は、確実に目的とする差のあるDNA断片を同定でき、非常に簡便で短時間で分離でき有用であった。事実本研究でのFDD法の結果とRT-PCRでの結果の一致率は、従来の同様の報告よりも著しく高く、本研究における方法が非常に有用であることが示された。DD法は主として培養細胞などを用いる比較的単純な実験系で用いられ様々な成果をあげてきたが、最近では癌組織と正常組織との比較など生体試料にも応用されるようになってきている。本研究では、偏側発生が特徴的である肝内結石症にこの方法を応用し、結石が生じた側の組織と生じなかった側の組織で発現に差がある遺伝子の解析を可能とした。

上記のFDD法及びRT-PCR法で発現量の差が確認された遺伝子は計15種類に及んだ(表2)、(図6)。C-reactive protein (CRP)は3症例でいずれも明らかに非結石側で発現が高くなっており、さらに別のプライマーの組み合わせでも同定された。CRPは肝臓で合成され、傷害や感染がおこるとその血中濃度は1000倍以上になる代表的なacute phase proteinである。CRPには、異物、病原体、障害された細胞を特異的に認識する能力があり、液性、細胞性免疫システムと相互作用し、それらを排除する機能をもつ。

同様に非結石側で多く発現がみられたTransferrinは鉄結合性の蛋白質で、血中の鉄イオン輸送に関与する。 β_1 -globulinの一つで、分子量7万5000の糖蛋白質である⁷⁾。またHemopexinは肝のみで合成されるglobulinで、hemeと結合し肝細胞に運び、鉄を回収する役割を持つ。またHemopexinはCRPと同様にIL-6の刺激により上昇し、Transferrinと併せてacute phase proteinとしての側面も持つ。

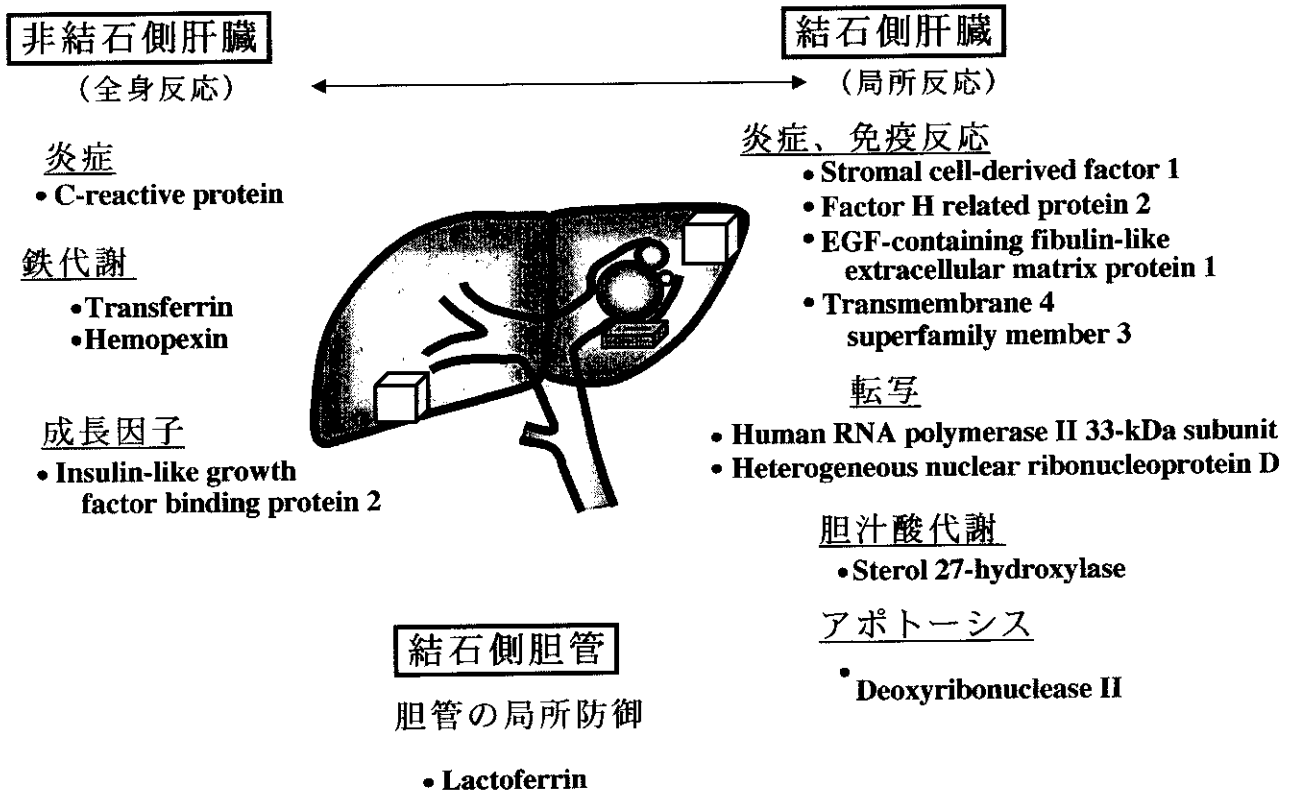


図6. 肝内結石症の肝臓での遺伝子発現

Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) もまた非結石側でより多くの発現が認められた。IGFBPは、成長ホルモンにより産生され同様の作用をもつInsulin-like growth factor (IGF) と血漿中で結合している。IGFはこの状態では生理活性が無く、IGFBPから乖離してIGF receptorに結合することにより作用するため、IGFBPはIGFの作用を間接的に調節している。IGFBPは主な物でIGFBP-1からIGFBP-6まで報告されているが、サーカディアンリズムとの関連で小児の血中IGFBP-1濃度はcortisolと関連しているがIGFBP-2には関係が見られないとの報告がある程度で⁸⁾、IGFBPのそれぞれの機能的特徴は、明らかになっていない。IGFBPと炎症反応の関係については、炎症性好中球からでるタンパク質分解酵素 (cathepsin B, elastase) が、炎症や創傷治癒においては、細胞外基質だけではなくIGFやIGFBPのタンパク質分解酵素として働き、特にIGFBPを分解し標的細胞でのIGFの機能を高めている可能性が指摘されている⁹⁾。

肝内結石症の結石の存在する側の肝臓では、結石による胆管の相対的狭窄による胆汁の鬱滞と胆道感染がみられ、胆管壁は拡張肥厚して増殖性胆管炎の病像を示す。さらにこの状態が慢性的に続くと、実質肝細胞は繊維化し肝萎縮の状態となる。治療として肝切除が行われる症例は、通常このような持続する胆管炎と肝萎縮を伴った例である。本研究で非結石側肝組織で強い発現が認められた遺伝子は、炎症時のacute phase protein等、肝から分泌されて全身に作用する因子で、正常肝の担うべき機能と言える。よってこの発現の差は、非結石側で発現が高くなっていると言うより、むしろ結石側に対する相対的な変化で、結石側肝組織の正常機能の荒廃を示しており、本症の特徴的な病像を反映しているものと考えられる。

結石側の肝組織で最もscoreが高かったのはKIAA-0605 gene productであった。これはNCBIのデータベースにcDNA fragmentとして登録されているがその機能が明らかになっていない遺伝子で、今後さら

に検討を要する。

Factor H-related protein 2 (FHR2) は補体のalternative pathwayの制御因子で^{10), 11)}、short consensus repeat (SCR) と呼ばれる20の特徴的な構造部位を持っており、それらの1部を共通とする遺伝子familyを形成している。このfamilyとしてFactor H-like protein 1 (FHL-1) とFactor H-related protein 1、2、3、4、5 (FHR1~5) が同定されており、主に肝臓で合成され、血漿に分泌されるタンパク質である。現時点ではFHR1~5の生理的機能については解明されておらず、補体系の制御にかかわっていると推測されている。結石側肝臓では細菌に対する抗体産生や補体系を含む免疫反応が活発に起こっていると考えられ、局所において、FHR-2が何らかの生理的役割を担っているものと思われる。

human RNA polymerase II 33-kDa subunit (hRPB 33) は核質にあり、それぞれmRNAの前駆体 (hnRNA) とsnRNAの合成を担当する。RNA polymerase IIは10個以上のサブユニットから成り、細菌の酵素の β , β' 両サブユニットと高い相同性をもつ2個の大サブユニットと、約10個の小サブユニットがある。hRPB 33は275a.a.で3番目に大きいサブユニットである^{12), 13)}。肝内結石症の結石側では炎症に対する活発な反応が見られ、それに対応すべく、遺伝子の転写とタンパク合成も活発に行われており、それを反映した物と考えられる。

Sterol 27-hydroxylase (CYP27) はミトコンドリアに存在する胆汁酸合成のalternative pathwayのkey enzymeである¹⁴⁾。胆汁酸合成のclassical pathwayのkey enzymeは細胞質に存在する7 alpha-hydroxylaseであるが、田中らは肝内結石症患者の肝臓では胆道疾患を有しない正常の対照例に比べて、7 alpha-hydroxylaseの発現と活性が有意に低下しているとの報告している。また、肝臓の結石側と非結石側の比較では有意差は認められなかったとしている¹⁵⁾。結石側では、何らかの理由でclassical pathwayが阻害されalternative pathwayが活性化されている可能性が考えられる。

Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) は、human intercrine reduced in hepatomas (hIRH)、Pre-B-cell growth-stimulating factor (PBSF) と呼ばれている。intercrine familyに属するcytokineで、alpha chemokineを含むCXC subfamilyに属している。選択的splicingの結果alphaとbetaの2つのisoformが存在する。lipopolysaccharideやTNF、IL1などと同様、炎症性の刺激によって白血球を活性化し、リンパ球に対する強い走化性活性を示す。hIRH/SDF-1alphaの発現は大多数の癌において隣接する非癌組織に比べて著明に減少しているとの報告もあり¹⁶⁾、癌免疫とも関連しているようである。最近ではHIV-1との関係が活発に研究されている^{17), 18)}。肝内結石症においては通常結石側において胆管炎が持続的におこっており、起縁菌に対する免疫反応や、炎症反応が起こっている。SDF1の結石側での上昇はこのような局所の炎症に対する反応と思われる。

Chromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1) は染色体8p21上のNijmegen breakage syndrome (NBS) geneの上流にあるChromosome 8 open reading frame 1 (C8ORF1)/hT41と名付けられた6つのexonを持つ505個のアミノ酸からなる詳細不明のタンパク質である¹⁹⁾。NSB1との関連は無いものと考えられている。いくつかのphosphorylation siteと1つのN-glycosylation siteを持ち細胞質中に存在していると予測されている。正常組織に広範囲に分布しているが、特に睾丸と卵巣でレベルが高いと報告されている。肝内結石症との関連は不明である。

EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) はfibrillinに似た構造とのことで‘fibrillin-like’と名付けられ全身の組織で発現しているが、脳とリンパ球には発現していない²⁰⁾。この蛋白は血液凝固、補体の活性化、細胞の接着や細胞の分化に関係しているとされているが²¹⁾、詳細は明らかになっていない。早期に老化を来すWerner症候群で発現しているという報告があり²²⁾、またこの遺伝子の突然変異は、Doyme honeycomb

retinal dystrophy (DHRD) という眼病変を引き起こす。補体との関連があることから免疫との関係が考えられる。

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D、(HNRPD) はAU-rich mRNA binding factor (AUF1) と呼ばれていて、10のexonからなり(exon 9, 10は3' UTR) mRNAのsplicingにより、37、40、42、45kDの4つのisoformがある²³⁾。cytokineや生体内物質のmRNAはubiquitin、proteasome networkにより3-prime untranslated region (3' UTR) のAU-rich成分より非常に速やかに分解されるが、HNRPDはこれに結合し促進する機能を持っている。HNRPDは、Heat-shock protein (HSP) やEukaryotic translation initiation factor 4 gamma (EIF4G)、Poly(A)-binding protein (PABP) と複合体を形成しそれぞれ関連している²⁴⁾。肝内結石症の結石側では、炎症免疫反応亢進により、cytokineをはじめとした活発なmRNAの転写が起こっており、HNRPDの上昇をもたらしているものと思われる。

Transmembrane 4 superfamily member 3 (TM4SF3) は細胞表面の27~34kDaの糖タンパク質で、腫瘍関連抗原として同定された²⁵⁾。メラノーマ関連抗原ME491、sarcoma antigen SAS白血球細胞表面抗原CD37、 Manson住血吸虫のSm23抗原等と同じ細胞表面抗原familyに属している。肝内結石症において結石側で発現が増加しているのは、局所での免疫反応と関連しているものと思われる。

Deoxyribonuclease IIはDNA分解酵素であるが、最近apoptosisのDNA-ladder formationに関与している酵素との報告あり、注目されている^{26), 27)}。肝内結石症で肝切除を受ける結石側肝臓は通常肝萎縮が認められるが、この肝萎縮にapoptosis機構が働いている可能性を示唆するものと考えられる。

以上、結石側肝組織において発現の高い遺伝子は、非結石側とは異なり、局所性に作用する因子である。結石側肝組織においては、活発な免疫、炎症反応が起こっており、それに伴い、転写の亢進がお

こっていると考えられる。また、結石側肝組織における胆汁酸合成系のfeedback機構の存在や、本症の肝萎縮におけるapoptosis機構の関与の可能性が示された。

次に1症例でFDD法を用いて肝内結石存在部位の胆管と非結石部の胆管を比較した結果、結石存在部位の胆管にLactoferrinが非常に強く発現していた。Saitoらは肝内結石症患者においては結石のある部位において、免疫組織化学的検討において壁内壁外とも、LactoferrinとLysozyme陽性頻度が増えていたとの報告している²⁸⁾。Lactoferrinは殺菌活性をもち、Lysozymeとともに胆道の細菌感染に対する局所性粘膜防御機構として機能していると考えられる。SaitoらはLactoferrinのこの作用に着目して、抗体を用いて肝内結石症の胆管の免疫染色を行ったが、本研究では全く作業仮説にたよらず遺伝子レベルのスクリーニングで同じ結論に達していて、FDD法の有用性があらためて明らかとなった。

結 語

実験方法の工夫により、肝内結石症臨床検体において、Fluorescence Differential Display (FDD) 法を用いて、mRNAの発現の差を検出する、従来よりも遥かに信頼性が高く効率のよい、実験系を確立した。FDD法を用いて肝内結石症に対し、今回初めて遺伝子の網羅的な検索を行い、本症の病因及び病態の解明につながる遺伝子レベルでの有用な知見を得る事ができた。

文 献

- 1) Yoshikawa Y, Mukai H, Asada K, *et al*: Differential display with carboxy-X-rhodamine-labeled primers and the selection of differentially amplified cDNA fragments without cloning. *Anal Biochem* 1998; **256**(1): 82-91.
- 2) Wawer C, Ruggeberg H, Meyer G, *et al*: A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**(23): 4928-9.
- 3) Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; **257**(5072): 967-71.
- 4) Ito T, Kito K, Adati N, *et al*: Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett* 1994; **351**(2): 231-6.
- 5) Liang P, Averboukh L, Pardee AB: Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**(14): 3269-75.
- 6) Callard D, Lescure B, Mazzolini L: A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques* 1994; **16**(6): 1096-7, 1100-3.
- 7) Sass KS, Moqbel R, Mackay JA, *et al*: Human granulocyte/pollen-binding protein. Recognition and identification as transferrin. *J Clin Invest* 1984; **73**(1): 202-10.
- 8) Martinelli JC, Yateman ME, Cotterill AM, *et al*: Correlation between cortisol and insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) under physiological conditions in children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; **50**(6): 767-74.
- 9) Gibson TL, Cohen P: Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm IGF Res* 1999; **9**(4): 241-53.
- 10) McRae JL, Cowan PJ, Power DA, *et al*: Human Factor H-related protein 5 (FHR-5): A new complement associated protein. *J Biol Chem* 2000 Oct 31; [epub ahead of print].
- 11) Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwege J, *et al*: The factor H protein family. *Immunopharmacology* 1999; **42**(1-3): 53-60.
- 12) Pati UK, Weissman SM: The amino acid sequence of the human RNA polymerase II 33-kDa subunit hRPB 33 is highly conserved among eukaryotes. *J Biol Chem* 1990; **265**(15): 8400-3.
- 13) Schaller S, Grandemange S, Shpakovski GV, *et al*: Interactions between the full complement of human RNA polymerase II subunits. *FEBS Lett* 1999; **461**(3): 253-7.

- 14) Chiang J: Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci* 1998; D176-93.
- 15) 田中直見, 正田純一, 何 氷芳ほか: 肝内結石症に認められた肝コレステロール・胆汁酸代謝の一次的異常. 厚生省特定疾患肝内結石症調査研究班平成6年度研究報告書, 1995: 26-31.
- 16) Shibuta K, Begum NA, Mori M, *et al*: Reduced expression of the CXC chemokine hIRH/SDF-1alpha mRNA in hepatoma and digestive tract cancer. *Int J Cancer* 1997; **73**(5): 656-62.
- 17) Bleul CC, Farzan M, Choe H, *et al*: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; **382**(6594): 829-33.
- 18) Oberlin E, Amara A, Bachelier F, *et al*: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; **382**(6594): 833-5.
- 19) Tauchi H, Matsuura S, Isomura M, *et al*: Sequence analysis of an 800-kb genomic DNA region on chromosome 8q21 that contains the Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1. *Genomics* 1999; **55**(2): 242-7.
- 20) Ikegawa S, Toda T, Okui K, *et al*: Structure and chromosomal assignment of the human S1-5 gene (FBNL) that is highly homologous to fibrillin. *Genomics* 1996; **35**(3): 590-2.
- 21) Katsanis N, Venable S, Smith JR, *et al*: Isolation of a paralog of the Doyme honeycomb retinal dystrophy gene from the multiple retinopathy critical region on 11q13. *Hum Genet* **106**(1): 66-72.
- 22) Lecka CB, Lumpkin CJ, Goldstein S: An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1995; **15**(1): 120-8.
- 23) Dempsey LA, Li MJ, DePace A, *et al*: The human HNRPD locus maps to 4q21 and encodes a highly conserved protein. *Genomics* 1998; **49**(3): 378-84.
- 24) Laroia G, Cuesta R, Brewer G, *et al*: Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1999; **284**(5413): 499-502.
- 25) Szala S, Kasai Y, Steplewski Z, *et al*: Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**(17): 6833-7.
- 26) Torriglia A, Perani P, Brossas JY, *et al*: L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Mol Cell Biol* 1998; **18**(6): 3612-9.
- 27) Counis MF, Torriglia A: DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol* 2000; **78**(4): 405-14.
- 28) Saito K, Nakanuma Y: Lactoferrin and lysozyme in the intrahepatic bile duct of normal livers and hepatolithiasis; An immunohistochemical study. *J Hepatol* 1992; **15**(1-2): 147-53.

肝内結石症における遺伝子発現の網羅的解析

名古屋大学大学院 器官調節外科¹⁾

名古屋大学大学院 分子病態研究部門²⁾

研究協力者 二村 雄次¹⁾

共同研究者 國料 俊男¹⁾, 山本 竜義¹⁾

小田 高司¹⁾, 神谷 順一¹⁾

濱口 道成²⁾

はじめに

肝内結石症の治療成績の向上により長期生存例が増え経過中に胆管細胞癌を発症する症例の報告^{1)~4)}がされるようになり、われわれは肝内胆管癌が肝内結石症の重要な予後規定因子であると考えている。

肝内結石症に肝内胆管癌を併発する場合の病因に関しては多くの研究がされ、病態が少しずつ明らかになっている^{5)~7)}。また発癌に関する遺伝子解析にていくつかの遺伝子が結石存在部位の肝葉に特異的に発現していることも報告されている^{8) 9)}。しかしそれらは単一遺伝子についての解析であり、網羅的に遺伝子発現を調べた報告はされていない。一般に発癌のプロセスはいくつかの遺伝子により多段階的の過程を経ると考えられており^{10) 11)}、網羅的に遺伝子の変化を解析することが重要である。本研究は肝内結石症およびそれに伴う肝内胆管癌発症における遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、胆管癌発症に関与する遺伝子を同定することである。

対象と方法

症例は肝内結石症 4 例（胆管細胞癌 2 例を含む）。男性 1 例、女性 3 例で、45歳から50歳で、平均年齢47.5歳であった。

肝内結石症患者の肝切除標本の結石存在部位の肝葉と結石非存在部位の肝葉から、また胆管細胞癌合

併例では癌部よりサンプルを採取した。サンプルはそれぞれ200mgで、採取後RNAlaterにて24時間常温で固定してから、液体窒素で凍結し、 -80°C にて保存した。凍結標本よりTRIzolTM、 $\mu\text{MACS mRNA isolation kit}^{\text{TM}}$ を用いてmRNAを抽出した。

DNAarrayの原理について簡単に説明する¹²⁾。図1に示したようにサンプルから抽出した $5\mu\text{g}$ のmRNAよりcDNAへ逆転写する際に、 ^{32}P でラベルしたdATPを用いてプローブDNAを作成した。

CLONTECH社のmembrane typeのDNAarray kit (Atlas Human Cancer 1.2 ArrayTM) を使用してDNAarrayをおこなった。このmembrane上には1176個の癌関連遺伝子がプロットされている。これらの1176個の癌関連遺伝子とプローブDNAをハイブリダイズさせ、遺伝子の発現をアイソトープのシグナルとして検出した。

シグナル強度としてグリッドのなかの放射線量(PSL: PSL= αDT , D: image plate上のRIラベルサンプルの放射線量, T: 露光時間, α : 定数にて定義)、面積より単位面積あたりの放射線量を測定する。測定した単位面積あたりの放射線量のバックグラウンドの補正をおこなった後、各membrane間のhouse keeping geneの発現をそろえるために β アクチンにて補正をおこなった¹³⁾。結石非存在部位の肝葉に対する結石存在部位の肝葉のシグナル強度の比を2を底とする対数とし、1以上、 -1 以下を有意とした。

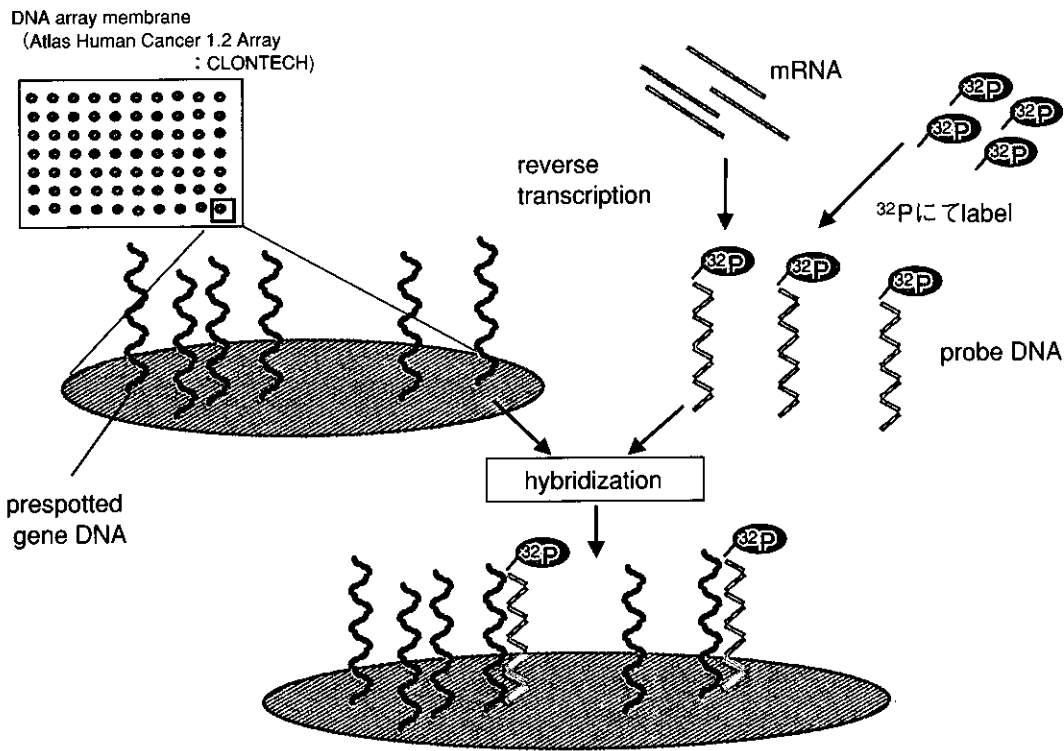


図1. DNAarrayの原理

発がんの機序としてわれわれは肝内結石による慢性炎症の結果、一酸化窒素などが生じこれらがDNAに損傷を与え、tumor suppressor gene、proto-oncogene、およびDNA damage repair geneが異常をおこし、癌が発生するという仮説をたてた(図2)。以上の仮説に基づいて、癌関連遺伝子1176個からtumor suppressor gene 33個、proto-oncogene 100個、DNA damage repair gene 37個の遺伝子について検討した。

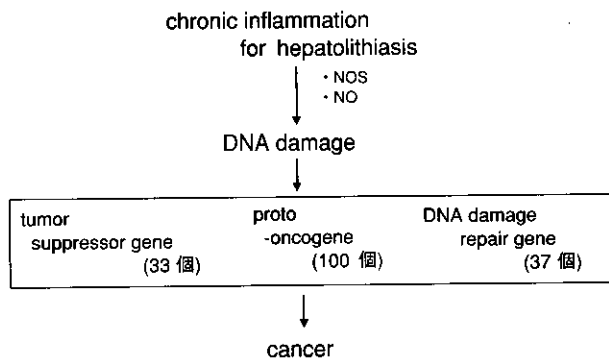


図2. 発癌の機序

結果

1. 癌関連遺伝子1176個の遺伝子発現

図3は癌関連遺伝子1176個を横軸に、縦軸は発現強度(結石非存在部位の肝葉に対する結石存在部位の肝葉のシグナル強度の比を2を底とする対数)を示した。赤のプロットがproto-oncogene、tumor suppressor gene、黒のプロットはこれ以外の遺伝子を示している。proto-oncogene、tumor suppressor

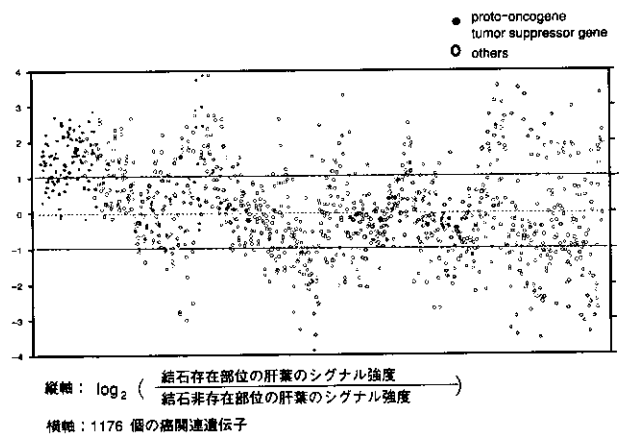


図3. 癌関連遺伝子1176個の発現