

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10696

研究課題名(和文) 新生児ヘモクロマトーシスの胎児肝細胞抗原蛋白の特定と母体IgG抗体測定方法の開発

研究課題名(英文) Identification of fetal hepatic antigen of neonatal hemochromatosis and development of maternal IgG assay for NH

研究代表者

佐々木 愛子 (Sasaki, Aiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センター・産科医師

研究者番号：60560711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：希少重症疾患である新生児ヘモクロマトーシス(NH)の胎児肝細胞抗原蛋白の特定と病
因母体IgG抗体の測定法の開発へ向け、以下の3つを実施した。本邦における全国調査を通じた疾患発症率の推
定と家系収集、罹患者血清を用いた原因蛋白の同定実験、罹患者家のエクソーム解析を通じた原因遺伝子
の絞り込みである。まず、2010～2014年の全国調査を行い発症率は対100万出生4～5例と推定された。患者血清を
用いた免疫染色やウエスタンブロット法による原因蛋白同定は困難であった。エクソーム解析では事前に想定し
ていた単一遺伝子によりコードされる蛋白抗原に対する同種免疫病としての候補遺伝子は絞り込めなかった。

研究成果の概要(英文)：I performed the neonatal hemochromatosis(NH) national survey to estimate the
disease rate in Japan and found out that NH occurred from 4 to 5 cases in a year among one million
births. This survey also contributed to revise the disease criterion, 2018. Through this survey, we
collected the samples from six NH cases. Using these patient's serums, we carried out the
immunohistochemistry staining and Western blotting, however we couldn't identify the specific
protein related to NH. In exome analysis, we assumed that NH was alloimmune disease and conducted
haplotype analysis. From these analyze, we couldn't narrow down the list of candidate genes.
Finally, NH is thought to be multigenic/multifactorial-genetic disease.

研究分野：周産期免疫

キーワード：新生児ヘモクロマトーシス 同種免疫性疾患 原因遺伝子 エクソーム解析 全国調査 発症頻度 原
因蛋白 ハプロ解析

1. 研究開始当初の背景

新生児ヘモクロマトーシス (Neonatal hemochromatosis; NH) は、研究開始当初においても胎児由来肝抗原は未だ不明の状態であり、治療法としては盲目的な母体大量ガンマグロブリン療法が世界で 200 例ほど実施されている状況であった。

海外においては、抗原抗体反応を用いた免疫学的研究がなされているとの情報は得ていたが、その当時、既に NH との関連が報告された SC5b-9 複合体の肝細胞沈着について疾患特異性は低いのではないかという推察が臨床経験から出始めていた。

研究者は、新生児肝移植が実施可能な数少ない施設に所属し、また、出生前遺伝カウンセリングを実施していることから、この疾患に罹患した児を持つ家族からの相談を受け、本疾患における原因検索と疾患マーカー検索の必要性を感じ、本研究を開始した。

2. 研究の目的

新生児ヘモクロマトーシスの胎児肝細胞抗原蛋白の特定と病因母体 IgG 抗体の測定法の開発が目的である。

3. 研究の方法

本疾患の病因は、その特異な疫学情報(家族歴)より、同種免疫性胎児肝障害が疑われていることから、本邦における同疾患の家系を収集し、同種免疫疾患を想定した遺伝型からのアプローチや、患者血清を用いた免疫学的アプローチなど多方面から情報を絞り込むことで、病因抗原の同定を目指した。

4. 研究成果

< 全国調査 >

- ・本邦の全国調査(肝移植数含む)と発症頻度推定
- ・診断基準改訂への寄与
- ・胎内治療時の薬物動態解析
- ・治験プロトコール立案への寄与

新生児ヘモクロマトーシス (NH) は原因不明の極めて稀な難病である。発症頻度含め本邦における実態が不明であるため、年間

発症数・発症率を推定するための全国一次調査・二次調査「新生児ヘモクロマトーシスに対する実態調査」研究を、自施設の倫理委員会の承認を得て初年度(平成 27 年度)に行った。一次調査は、全国の総合周産期母子医療センター(産婦人科、新生児科)、臓器移植センターへあて、症例登録カードにより行った。それにより、平成 22 年から 26 年の 5 年間における該当症例数と、該当症例がある場合の二次調査への参加の可否につき回答を得た。回収率は 71.6%

(275 施設中 197 施設)であった。一次調査にて、二次調査に参加可能と返信のあった上記施設を対象に、各症例についての詳細(各児の出生年月、NH の診断方法、行われた治療法、治療経過・転帰)、また患者検体を用いた「新生児ヘモクロマトーシスの病因解明と診断方法の開発」研究への参加可否について調査した。調査期間外の症例を含め 39 例の本邦の NH 症例の集積が可能であった。また、文献調査として、最近 20 年における国内の NH に対する論文・症例報告を収集し、86 報告を確認した。以上のことから、NH は本邦において年間 100 万出生中、4~5 例発症していることが推測された。今後、このデータは患者検体を用いた疾患原因探索や、海外で行われている胎内治療の実施へ向けての基礎資料となる。

上記調査にて知り得た全 39 例の本邦の NH 症例のうち、2010~2014 年の 5 年間の 19 症例については詳細な二次、三次調査を行い、各症例の臨床経過についてデータ収集を行った。現在、収集した症例データについて解析・検討を行い日本周産期・新生児医学会雑誌へ向け論文執筆中である。

また、これらの全国調査により、既存の小児消化器栄養代謝肝臓学会による NH 診断基準が実際の症例にマッチしていないという問題が浮き彫りになった。よって、別研究である、厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患政策研究事業の「小児期発症の希少難治性肝胆膵疾患の移行期を包含し診療の質の向上に関する研究班(仁尾班)」より要望を受け、NH の診断の手引きの改訂への基礎資料として我々の全国調査結果の提供を行った。

(<http://ped-hbpd.jp/diseases/10>)

一方、NH に対する本邦における肝移植の実施数を調査するため、上記の一次~三次調査に加え、日本肝移植研究会の協力を得た。これにより 2008 年~2015 年の 13 年間

における肝移植数が 15 例であることも把握した。これらの症例の一部に対しては、摘出肝臓標本につき当該研究へ検体提供への協力を依頼し、免疫染色などの蛋白解析につなげた。

また、本邦における新生児ヘモクロマトーシスに対する胎内 IVIG 療法の既実施 8 例の詳細についても全国調査を行い、投与期間中の血中 IgG 濃度の薬物動態について解析を行った。この成果は第 69 回日本産科婦人科学会学術集会で発表し、J Matern Fetal Neonatal Med (査読あり) へ投稿し受理された。2018 年に掲載予定となっている。

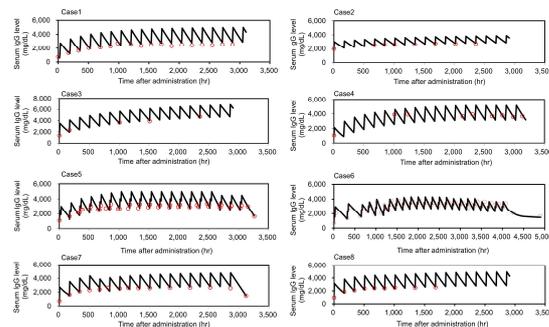


Figure2: The simulation of IgG concentrations

図 胎内 IVIG 療法中の薬物動態解析

この血中濃度のデータを用いて、日本医師会治験促進センター、臨床試験・治験推進研究事業 (AMED 研究) の医師主導治験の立案研究 (CCT-A-2805, 161k0201037h0002) のプロトコール作成へ応用した。

<免疫染色, Western blotting 解析>

- ・ AML12 細胞, HepG2/C3A 細胞, 成獣・胎仔マウス肝組織を用いた免疫染色で特異的染色パターンは確認できず
- ・ 成獣・胎仔マウスの肝組織、成人肝組織抽出蛋白、ヒト肝細胞初代培養抽出蛋白・ヒト胎盤由来栄養膜細胞初代培養抽出蛋白を用いて WB を行ったが特異的な Band は観察できず

「新生児ヘモクロマトーシスの病因解明と診断方法の開発 (承認番号 747)」研究への同意を得た患者母体血清と様々な細胞・組織を用い、抗原抗体反応で抗胎児肝細胞 IgG 抗体及びその抗原の同定を実施した。

自施設及び全国調査で集積した新生児ヘモクロマトーシス罹患児を分娩した既往の

ある女性の血清 (n = 6) 及び二重膜濾過血漿交換の廃液 (n = 1) を収集した。この血清及び廃液中には抗胎児肝細胞 IgG 抗体が含まれると考えられるため、これを一次抗体とした。この IgG は肝細胞に発現する抗原を認識すると考えられるため、その抗原を含むと考えられる組織・細胞を用いて蛍光免疫染色, Western blotting を実施した。具体的には、マウス肝細胞株である AML12 細胞, ヒト肝細胞株である HepG2/C3A, 及び成獣・胎仔マウスの肝組織の免疫染色を実施したが、対照血清 (妊娠 19 週正常妊婦血清, 成人健常男性血清) と比較し特異的な染色パターンを示す結果は得られなかった。また、成獣・胎仔マウスの肝組織、成人肝組織抽出蛋白, ヒト肝細胞初代培養 (非吸着プレートを用いてスフェロイド形成をさせたもの) 抽出蛋白・ヒト胎盤由来栄養膜細胞初代培養 (新生児ヘモクロマトーシスで胎盤障害があるという報告があるため) 抽出蛋白を用いて Western blotting を実施した。IgG 抗体を精製することによりしっかりとヒト IgG と反応する蛋白の Band を検出できるようになったが、対象血清と比較し特異的な Band は観察できなかった。

抗胎児肝細胞 IgG 抗体の血中濃度は妊娠・非妊娠や、妊娠時期により産生量が変動する可能性がある。現在収集できているのは主に非妊娠時の血清だが、妊娠初期や産褥期の方が抗胎児肝細胞 IgG 抗体が高い可能性もある。現在治験の実施を準備中であり、治験が開始されればより正確に母体血清の収集が可能になる。これらを用いて再度検討を進めるとともに、抗原となる蛋白を含む組織・細胞に関してもより幅広く検討していく必要があると思われる。

なお正常ヒト iPS 細胞由来肝細胞及び NH 罹患児 iPS 細胞由来肝細胞に関しては、上記検討の結果から、現在のところは培養の実施を見送った。

<エクソーム解析>

- ・ 単一遺伝子病ではないことを確認
- ・ 抗原抗体反応を想定したハプロ解析による原因遺伝子は絞込み困難
- ・ digenic/multigenic な機序で発症している可能性が示唆

本研究にて平成 27-28 年度に実施した全国調査「新生児ヘモクロマトーシスの対する実態調査 (承認番号 934)」にて収集した症

例を対象に、「新生児ヘモクロマトーシスの病因解析を診断方法の開発(承認番号 747)」研究への検体提供を募った。これにより集まった 6 家系(発端者, 両親, 母方祖父母のクイントット解析を 2 家系, 発端者, 両親のトリオ解析を 4 家系)に対し, 次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を実施した。

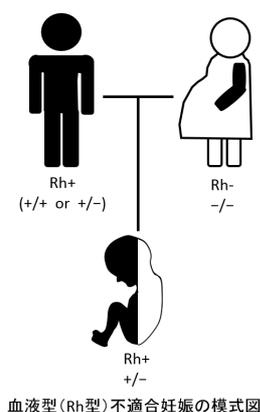
【発端者における病的変異】

新生児ヘモクロマトーシスは, その確定診断に他疾患との鑑別が重要な疾患である。今回, 我々は収集した 6 家系に共通する新規の病的遺伝子変異がないか, また, 新生児ヘモクロマトーシスと症状が類似するとされる, ニーマンピック病 C 型や, ミトコンドリア病などの遺伝子変異がないか解析を行った。全 6 例において新規病的変異や既知変異は検出されなかった。

【同種免疫性抗原をもとに想定される遺伝学的希少アレルの検索】

新生児ヘモクロマトーシスは, その高い再発率(80-90%)と特殊な家族歴(父が代わっても発症するが, 母が代わると発症しない)などから, 血液型不適合妊娠と同様の同種免疫性疾患としての病態が推定されている。

よって, 血液型(Rh 型)不適合妊娠と同様に, 母が抗原を持たず, 児には父由来の抗原 allele が発現しているために, 母児免疫不全を起こすような遺伝型の組み合わせについて検索した。(図参照)



具体的には以下の 4 パターン組み合わせを想定し, エクソーム解析結果を検討した。

母が希少アレルのホモ, 父は一般アレルを保持

母が希少アレルのコンパウンドヘテロ, 父は一般アレルを保持

母が希少アレル保持+欠失, 父は一般アレルを保持

母が両アレル欠失, 父は一般アレルを保持

は, 東北メディカルバンク (ToMMo) から公開されている日本人の遺伝型情報(Integrative Japanese Genome Variation Database)や, HGVD(Human Genetic Variation Database)の情報, また, 当センターの周産期病態研究部で保持している当センターの正常妊婦の variation コントロールデータ(GT-CO)を用いてハプロ解析を行った。の欠失の解析には, 当センターの周産期病態研究部が開発したホモ欠失領域同定アルゴリズム及び, エクソーム解析データを用いた CNV(copy number variation)を検出するツールである EXCAVATOR2 を用いた。その結果, 候補遺伝子は 600 個強まで絞り込まれた。これらの組み合わせに合致する候補遺伝子で, 6 家系のうち 2 家系に共通する遺伝子は見つかったものの, 3 家系以上に共通してみられる候補はなく, また, その遺伝子機能として肝細胞と既に関連が示唆されているものは認めなかった。よって, 本研究立案時に想定していたハプロ解析による原因遺伝子の同定は困難であった。この解析方法の限界として, 次世代シーケンサーでキャプチャーされにくい領域の遺伝子変異や欠失を見逃している可能性は残る。

【今後への検討】

今回, 原因遺伝子の同定にはつながらなかったものの, インフラマソーム関連遺伝子の SNV(single nucleotide variant)を 6 家系中 2 家系の児に認めた。

これは, 一般日本人集団におけるアレル頻度より高頻度であった。事前に想定していた単一遺伝子によりコードされる蛋白抗原に対する同種免疫病としての病態ではなく, 複数遺伝子における変異が重なって発症する digenic/multigenic disease, または multifactorial genetic disease であるとする説を支持する結果であるとも考えられ, 今後の病態解明に参考となる可能性がある。

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)

1. J Pediatr Gastroenterol Nutr (査読あり) 2016 Nov;63(5):e121
Fetal Magnetic Resonance Imaging Detection of Liver Iron Deposition in Neonatal Hemochromatosis During Prenatal Therapy.
Sasaki A, Motomura K, Suyama F, Nagasawa J, Hisano M, Ito R, Miyazakio O, Nakazawa A, Ito Y, Kasawara M, Asai A, Matsumoto K, Sago H, Yamaguchi K.
2. J Matern Fetal Neonatal Med (査読あり), in press
The Japanese experience and pharmacokinetics of antenatal maternal high-dose immunoglobulin treatment as a prophylaxis for neonatal hemochromatosis in siblings
Noriki Okada, Sasaki A, Saito J, Mitani Y, Yachie A, Takahashi H, Matsubara S, Tenkumo C, Tanaka H, Hata T, Motomura K, Nagasawa J, Wada Y, Sako M, Yamaguchi K, Matsumoto K, Nakamura H, Sago H, Mizuta K
3. 【胎児診断・治療の最前線】胎児治療新生児ヘモクロマトーシスに対する免疫グロブリン療法(解説/特集)
佐々木 愛子, 本村 健一郎, 左合 治彦
周産期医学(査読なし)(0386-9881)47巻4号 Page557-561(2017.04)
4. 【知っておくべき治療可能な胎児・新生児希少疾患】<(自己)免疫疾患>新生児ヘモクロマトーシス:母体へのガンマグロブリン療法(解説/特集)
佐々木 愛子, 本村 健一郎, 左合 治彦
周産期医学(査読なし) in press

〔学会発表〕(計 4件)

1. 2015/7/11 福岡
第51回日本周産期・新生児医学会 パネルディスカッション
胎児期に母体高用量 グロブリン療法が行われた新生児ヘモクロマトーシスの一例

長澤純子, 和田友香, 甘利昭一郎, 兼重昌夫, 濱郁子, 宮原史子, 高橋重裕, 藤永英志, 塚本桂子, 佐々木愛子, 伊藤玲子, 伊藤裕司, 左合治彦(会議録)日本周産期・新生児医学会雑誌(1348-964X)51 巻 2 号 Page625(2015.06)

2. 2017/4/16
第69回日本産科婦人科学会 広島
新生児ヘモクロマトーシス児分娩既往妊婦に対する次回妊娠時の胎児大量ガンマグロブリン療法のIgG血中動態と有害事象調査 ~国内既実施8例において~
佐々木愛子, 本村健一郎, 左合治彦, 天雲千晶, 田中宏和, 秦利之, 高倉正博, 藤原浩, 高橋宏典, 薄井里英, 松原茂樹
3. 2018/1/9
第120回東京新生児研究会 東京
新生児ヘモクロマトーシスに対する母体大量ガンマグロブリン療法と新生児予後
佐々木愛子
4. 2018/7/8-10 東京(予定)
第54回日本周産期・新生児医学会
国内における新生児ヘモクロマトーシス症例の実態調査
長澤純子, 和田友香, 諫山哲哉, 佐々木愛子, 本村健一郎, 伊藤玲子, 左合治彦, 伊藤裕司

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織
(1)研究代表者

佐々木 愛子(SASAKI, Aiko)

国立成育医療研究センター
周産期・母性診療センター産科
医師
研究者番号：60560711

(2)研究分担者

松本 健治 (MATSUMOTO, Kenji)
国立研究開発法人国立成育医療研究セ
ンター 免疫アレルギー・感染研究部
部長
研究者番号：60181765

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

本村 健一郎 (MOTOMURA, Kenishiro)
国立研究開発法人国立成育医療研究セ
ンター 免疫アレルギー・感染研究部
リサーチアソシエイト
研究者番号：724329