様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 １１ 日現在

機関番号：２３９０３

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：１７Ｋ１０１４８

研究課題名（和文）遺伝性抱合型ビリルビン血症に対し次世代シークエンサーを用いた病態探索と臨床応用

研究課題名（英文）A study of molecular genetic analysis to hereditary conjugated hyperbilirubinemia with next-generation sequencing

研究代表者

戸川　貴夫（Takao, Togawa）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：１０７９２８１４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は，新生児Dubin-Johnson症候群とRotor症候群を次世代高速シークエンサーを用い分子遺伝学的に診断する事と，分子診断された疾患の遺伝型と表現型の関係を明らかにする．目的遺伝子を含む新生児胆汁うっ滞疾患と関係のある遺伝子61個を搭載した遺伝子パネルを作成した．研究期間で124例について解析を行い，40例（32%）で分子遺伝学的診断ができた．私たちの先行研究は26%の診断率であったことから，本研究により改善を認めた．新生児DJ症候群は9例（23%）で確認された．Rotor症候群は認めなかった．新生児DJ症候群患児の特徴的な臨床経過，肝臓病理所見，病原性変異をまとめて論文報告した．

研究成果の学術的意義や社会的意義
新生児Dubin-Johnson症候群やRotor症候群はかつて非常に稀な疾患とされ，その疾患の詳細は不明であった．近年，次世代高速シークエンサーの登場により，このような稀な遺伝性疾患を分子レベルで診断できるようになった．
今回の研究により，日本人，東アジア人に於いて，遺伝子診断できる新生児Dubin-Johnson症候群患者は比較的高い頻度で見られることが分かった．そして，新生児，乳児期に特徴的な症状経過をたどること，肝臓病理学所見は成人のものと異なることが証明された．一方Rotor症候群は発見されず，極めて稀な疾患であることが再認識された．

研究成果の概要（英文）：We aimed to establish a method of molecular genetic diagnoses to hereditary conjugated hyperbilirubinemia, neonatal Dubin-Johnson syndrome (nDJS) and Rotor syndrome (RS). Another target was to clarify genotype-phenotype correlations in these syndromes.
We designed a method of targeted next-generation sequencing with 61 candidate genes including ABCC2, and OATP1B1 and OATP1B3, and those are responsible genes for nDJS and RS, respectively. During this study period, we analyzed 124 patients with neonatal/infantile intrahepatic cholestasis and identified 40 (32.3%) patients as having a molecular genetic diagnosis. Because a diagnostic ratio was 25.7% in our previous study using a 18 genes panel, we improved the diagnostic ratio to those patients. Nine of 40 patients (22.5%) having a definitive molecular diagnosis were nDJS. Consequently, we reported its unique clinical features, pathological liver findings, and pathogenic variants of ABCC2 in the Journal of pediatrics.

研究分野：新生児学

キーワード：遺伝性抱合型高ビリルビン血症　Dubin-Johnson症候群　Rotor症候群　新生児胆汁うっ滞　遺伝学的解析　体質性黄疸

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．　研究開始当初の背景

Dubin-Johnson 症候群（DJ 症候群）と Rotor 症候群は，小児期に発症する遺伝性抱合型高ビリルビン血症で，良性疾患（体質性黄疸）と考えられている．日本での大規模な疫学調査は殆ど無く，1977 年滝野らの報告まで遡る（滝野ら．日本消化器病学会雑誌．1977）．両疾患は臨床的に共通点が多い（表 1）．

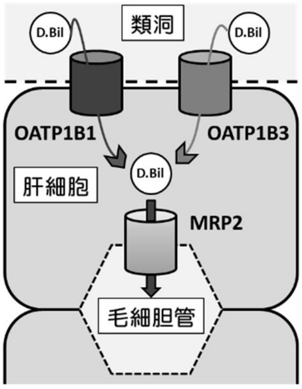
責任遺伝子はそれぞれ *ABCC2*, *OATP1B1* / *OATP1B3* である．*ABCC2* は肝細胞の毛細胆管側に発現する輸送蛋白である多剤耐性関連蛋白 2（MRP2）をコードする（図 1）．この蛋白の障害により，胆汁中への抱合型ビリルビン排泄障害がおこり黄疸を呈する．一方で，*OATP1B1* / *OATP1B3* は類洞側に発現する有機アニオン輸送体，organic anion transporter 1B1（OATP1B1）と organic anion transporter 1B3（OATP1B3）をコードする．Rotor 症候群はこれら 2 種の蛋白が同時に障害されることにより，抱合型ビリルビンが肝細胞に取り込まれず黄疸を示す．

表1）DJ症候群とRotor症候群の特徴

	DJ症候群	Rotor症候群
発症頻度	1/100万人	1/100万人
発症・診断時期	小児期	小児期
責任遺伝子	*ABCC2*	*OATP1B1*と*OATP1B3*
蛋白	MRP2	OATP1B1とOATP1B3
遺伝形式	常染色体劣性遺伝	常染色体劣性遺伝
血清ビリルビン値	2～5 mg/dL（抱合型優位）	3～6 mg/dL（抱合型優位）
一般肝機能検査	正常	正常
肝病理	***肉眼的黒色肝***．組織学的に肝細胞内に粗大褐色顆粒	正常
治療	不要	不要

我々は胆汁うっ滞のある新生児・乳児に対して次世代高速シークエンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行い，遺伝子診断の重要性を世界に先駆けて論文報告した（Togawa T, Sugiura T, et al. J. Pediatr. 2016）．109 名を対象とした我々の先行研究において全体の診断率は 28 例（26%）であったが，予想に反して DJ 症候群責任遺伝子 *ABCC2* の病原性変異を 5 名（4.6%）の患児に見いだした．過去の文献で新生児 DJ 症候群を遺伝子診断したものは 5 例のみである（Lee JH, et al. Pediatr Res 2006. Pacifico L, et al. Clin Genet 2010. Okada H, et al. Pediatr Int 2014）．我々の 5 名の患児について臨床経過を後方視的に検討した結果，上述した DJ 症候群の表現型とは異った，新生児 DJ 症候群に特有な症状の存在が疑われた．

図1



一方で，同定した病原性変異について検討すると，我々の病原性変異は 6 種類であった．過去の報告では，MRP2 の ABC ドメインを構成するエクソンに病原性変異があるとき，DJ 症候群が若年期に発症するという指摘がある（Lee JH, et al. Pediatr Res 2006）．ところが，我々の同定した変異はその報告とは別のエクソンやイントロンにも存在した．また重複する変異は R768W のみであり，新生児 DJ 症候群を発症するための，現在分かっていない分子遺伝学的な機序が示唆された．

Rotor 症候群の責任遺伝子 *OATP1B1* / *OATP1B3* は 2012 年に報告された（van de Steeg E, et al. J Clin Invest, 2012）．Rotor 症候群は黒色肝がないため DJ 症候群と鑑別できるとされている．しかし，我々の知見では新生児期に黒色肝を認めない患者が存在するため，新生児 DJ 症候群と Rotor 症候群の鑑別は臨床的に難しいと考えられる．その一方で，両疾患について次世代高速シークエンサーを用いた遺伝子解析の報告は日本において見られない．

２．　研究の目的

本研究は，新生児 DJ 症候群と Rotor 症候群を次世代高速シークエンサーとバイオインフォマティクスを用い，分子遺伝学的に診断する解析手法の確立を指向する．その上で，遺伝子診断された患児における遺伝子型と表現型の関係を明らかにし，病態を探索する研究である．

達成目標

1)．　新生児期・乳児期早期に新生児 DJ 症候群と Rotor 症候群を正確に診断するための分子遺伝学的解析手法を確立する．

2)．　分子遺伝学的に診断された新生児 DJ 症候群患者，Rotor 症候群患者を対象に，臨床データを収集・解析し疾患の特徴を明らかにする．

3)．　*ABCC2* と *OATP1B1* / *OATP1B3* の遺伝子変異を元に，遺伝子型と表現型の関係を明らかにする．

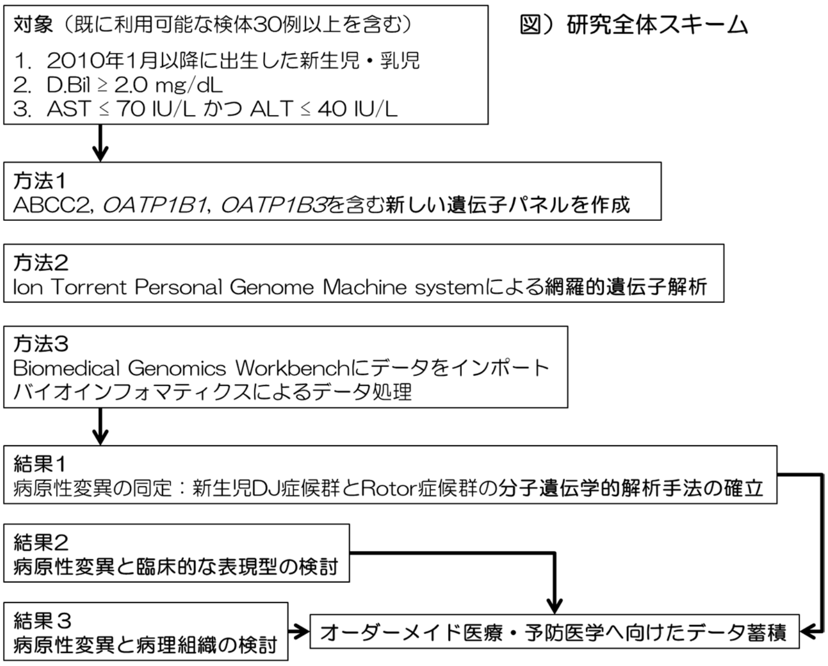
4)．　肝臓組織を用いた病理学的な検討により，遺伝子型と組織所見の関係を明らかにする．

３．　研究の方法

本研究は，新生児 DJ 症候群と Rotor 症候群を次世代高速シークエンサーとバイオインフォマティクスを用い，分子遺伝学的に診断する解析手法の確立を指向する.

方法

1). *ABCC2*, *OATP1B1* / *OATP1B3* を含む新しい遺伝子パネルを作成.
2). 網羅的遺伝子解析の手法を確立：Ion Torrent Personal Genome Machine system による網羅的遺伝子解析.
3). 遺伝子診断のついた患児から質の高い臨床データを収集・解析.
4). 病原性の遺伝子変異と臨床的な表現型の関係を検討.
5). 肝臓組織を用いた病理組織学的検討.



図）研究全体スキーム

４．　研究成果

1). *ABCC2*, *OATP1B1* / *OATP1B3* を含む新しい遺伝子パネルを作成.

対象61遺伝子	疾患/機能	疾患に関わる病態
ATP8B1, ABCB11, ABCB4, TJP2, NR1H4	進行性家族性肝内胆汁うっ滞症	細胞膜輸送の異常
SLC25A13	シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症	
VPS33B, VIPAS39	Arthrogryposis-Renal Dysfunction-cholestasis症候群	
ABCC2	Dubin-Johnson症候群	
SLCO1B1, SLCO1B3	Rotor症候群	
CFTR	嚢胞性線維症	
CLDN1	Neonatal sclerosing cholangitis	
PEX1, PEX2, PEX3, PEX5, PEX6, PEX10, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX26	Zellweger症候群	
HSD3B7, AKR1D1, CYP7B1, SLC27A5, CYP7A1	先天性胆汁酸代謝異常症	代謝異常
BAAT	家族性高胆汁酸血症	
UGT1A1	Crigler Najjar / Gilbert症候群	
NPC1, NPC2	Niemann-Pick病 C型	
ATP7B	Wilson病	
SERPINA1	α1アンチトリプシン欠損症	
AMACR	Alpha-methylacyl Co-A recemase deficiency	
CYP27A1	脳腱黄色腫症	
GALT	ガラクトース血症	
LIPA	ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 / Wolman病	
DHCR7	Smith-Lemli-Opitz症候群	
FAH	チロシン血症1型	
JAG1, NOTCH2	Alagille症候群	胚形成異常
CC2D2A, MKS1	Joubert / Meckel症候群	
NPHP1, INVS, NPHP3, NPHP4	ネフロン癆	
PKHD1, PKD2	多発性嚢胞腎	
SEC63, PRKCSH	Polycystic liver disease	
DGUOK, MPV17, BCS1L, POLG	ミトコンドリア病	ミトコンドリア病
TRMU	Infantile liver failure	
ATP11C	Coding aminophospholipid flippase	その他
HNF1B	Bile duct development genes	

上の表のように，目的遺伝子を含む新生児乳児胆汁うっ滞疾患との関連のある遺伝子 61 個搭載した胆汁うっ滞遺伝子パネルをデザインした. 先行研究のコントロールを用いて新しいパネルが機能することを確認した.

2). 網羅的遺伝子解析の手法を確立：Ion Torrent Personal Genome Machine system による網羅的遺伝子解析.

本研究期間で 124 例の対象患者について，前述の 61 遺伝子パネルを用いて解析を行った. このうち 40 例（32.3%）で分子遺伝学的診断が確定した. 私たちの先行研究は 18 遺伝子パネルを用いた解析であったが，この時の結果は 25.7 %（28/109 例）の診断率であったことから，診断率の改善が認められた.

一方，本研究での診断した疾患は右の表で示される. 新生児 DJ 症候群は 9 例（22.5%）で確認された. Rotor 症候群は認めなかった. 新生児 DJ 症候群は，かつて考えられていたよりも頻度の高い疾患であると考えられた.

網羅的遺伝子解析結果

診断病名	遺伝子名	診断数	%
Alagille症候群	*JAG1*	10	25.0
Dubin-Johnson症候群	*ABCC2*	9	22.5
シトリン欠損症	*SLC25A13*	7	17.5
Girbert症候群	*UGT1A1*	5	12.5
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型	*ABCB11*	2	5.0
先天性のう胞性線維症	*CFTR*	1	2.5
ネフロン癆	*INVS*	1	2.5
Niemann-Pick病	*NPC1*	1	2.5
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型	*ATP8B1*	1	2.5
ATP11C deficiency	*ATP11C*	1	2.5
ミトコンドリア病	*POLG*	1	2.5
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型	*ABCB4*	1	2.5
合計		40	100

3). 遺伝子診断のついた患児から質の高い臨床データを収集・解析

分子遺伝学的に診断し，詳細な臨床データが揃った全 10 例の新生児 DJ 症候群患児を，その臨床経過，肝臓病理所見，病原性変異をまとめて論文報告した(Togawa T, et al. Clinical, Pathologic, and Genetic Features of Neonatal Dubin-Johnson Syndrome: A Multicenter Study in Japan. The Journal of pediatrics. 2018;196:161-7 e1). 以下，この論文で発表した主旨について，図表を引用一部修正して述べる.

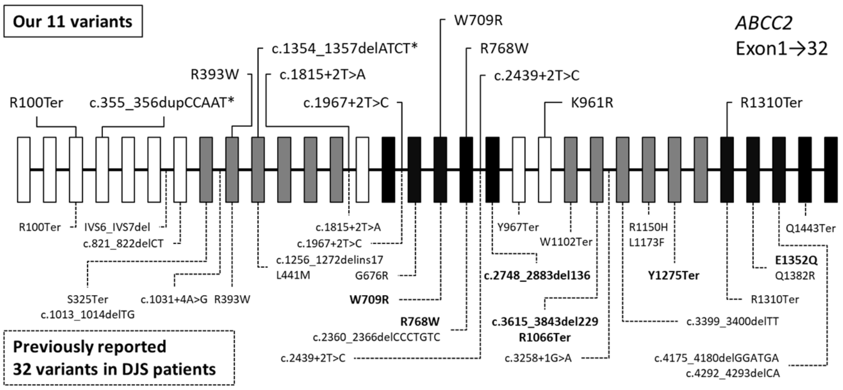
新生児 DJ 症候群は特徴的な臨床経過をたどることが分かった. それらは，①新生児期からの遷延性黄疸，灰白色便があり，②直接ビリルビンが生後 2 ヶ月ごろ頂値に達し，③その後急速に低下をし，中央値で生後 3 ヶ月には<1.5 mg/dL となる. また，④γ-GTP，総胆汁酸は高値，AST/ALT，プロトロンビン時間は正常範囲であった. 一般的に DJ 症候群患者は，胆道シンチにて核種の腸管排泄の遅延または消失がみられる. 新生児 DJ 症候群でも同様であり，そのため多くの症例が胆道閉鎖との鑑別のため，試験開腹または腹腔鏡による胆道造影が行われた.

新生児Dubin-Johnson症候群の臨床的特徴（n=10）

新生児期臨床症状	n / median	range
性別 (男:女)	7：3	
在胎週数	39	(37-40)
出生体重 (g)	3028	(2684-3870)
遷延性黄疸	10	
灰白色便	7	
直接ビリルビン最高日齢（日）	39	(19-60)
直接ビリルビン<1.5 mg/dL (月)	3	(2-9)
血液生化学検査所見		
総ビリルビン (mg/dL)	14.7	(5.5-23.5)
直接ビリルビン (mg/dL)	9.4	(2.6-13.4)
AST (U/L)	27	(19-52)
ALT (U/L)	16	(6-31)
γ-GTP (U/L)	154	(94-246)
総胆汁酸 (μmol/L), n=9	112	(55-231)
総コレステロール (mg/dL)	158	(105-279)
プロトロンビン時間 (INR), n=8	1.07	(0.87-1.2)

4)．*ABCC2* と *OATP1B1* / *OATP1B3* の遺伝子変異を元に，遺伝子型と表現型の関係を明らかにする．

我々の診断した症例について，*ABCC2* における病原性変異では 4 つの変異（R100Ter, R768W, c.1967+2T>C, c.2439+2T>C）が高頻度に出現することが分かった．DJ 症候群は考えられてきたよりも頻度の高い症候群である可能性を疑い，日本人におけるこの 4 つの *ABCC2* 病原性変異のホモまたは複合ヘテロ接合体をもつ割合を推定した．Human Genetic Variation Database（URL: http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB）に登録されたマイナーアレル頻度をもとに計算すると，およそ 54 人に 1 人で病原性変異を保因することが分かった．常染色体劣性形式をとるため，ホモ接合体または複合ヘテロ接合体を持つ日本人は約 12,000 人に 1 人と推測された．遺伝型と表現形の関係は明らかにならなかった．また，Rotor 症候群は遺伝学的な診断症例が無く解析出来なかった．



5)．肝臓組織を用いた病理組織学的検討

新生児 DJ 症候群の肝組織像を詳細に検討し興味深い治験を得た．新生児胆汁うっ滞期に肝生検が実施されたのは 8/10 例であった．それらの肝臓を肉眼的，顕微鏡的に検討した．肝組織は hematoxylin & eosin，Masson's trichrome，Hall's，Fontana-Masson の 4 つの染色法を行い，さらに MRP2 と BSEP の免疫染色を加えた．肉眼的な黒色肝は 25%に認めた．線維化（中等度以上）と肝細胞巨細胞性変化は見られなかった．肝細胞内褐色色素顆粒と脂肪変性はそれぞれ 38%，胆汁うっ滞（bile plugs）は 63%に認めた．既報にはほぼない脂肪変性を 38%に確認した．MRP2 の発現欠失，BSEP の発現増強はそれぞれ 100%であった．教科書的に黒色肝は DJ 症候群に特徴的とされるが，新生児 DJ 症候群では黒色肝はわずか 25%であり，肝細胞内褐色色素顆粒も 38%と低頻度であった．新生児 DJ 症候群は青年期以降の DJ 症候群とは肝組織像が異なることが明らかになった．

Figure 1

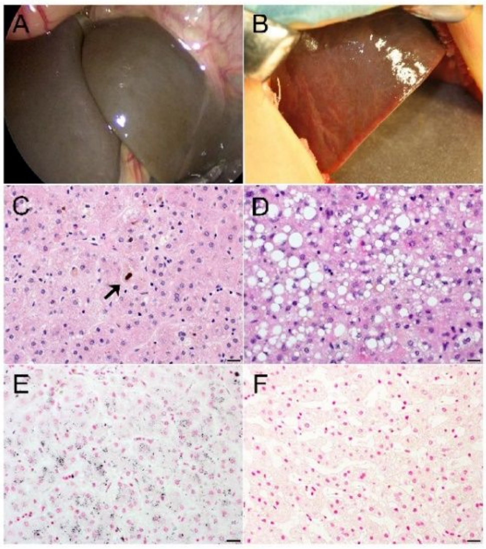
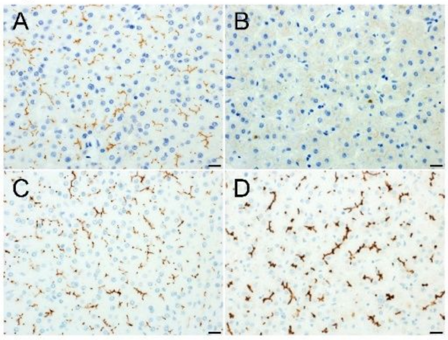


Figure 2



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Hayashi H, Naoi S, Togawa T, Hirose Y, Kondou H, Hasegawa Y, Abukawa D, Sasaki M, Muroya K, Watanabe S, Nakano S, Minowa K, Inui A, Fukuda A, Kasahara M, Nagasaka H, Bessho K, Suzuki M, Kusuhara H	４．巻 27
２．論文標題 Assessment of ATP8B1 Deficiency in Pediatric Patients With Cholestasis Using Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 EBioMedicine	６．最初と最後の頁 187-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 戸川貴夫	４．巻 50
２．論文標題 Alagille症候群	５．発行年 2018年
３．雑誌名 小児内科	６．最初と最後の頁 446-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 清松光貴，水落建輝，石原　潤，髙木祐吾，﨎久土保理，深堀　優，八木　実，草野弘宣，戸川貴夫，山下裕史朗	４．巻 32
２．論文標題 胆道閉鎖症との鑑別が必要であった新生児Dubin-Johnson症候群の1例	５．発行年 2018年
３．雑誌名 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌	６．最初と最後の頁 86-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Togawa T, Tatsuki Mizuochi, Tokio Sugiura, Hironori Kusano, Ken Tanikawa, Takato Sasaki, Fumio Ichinose, Seiichi Kagimoto, Takahisa Tainaka, Hiroo Uchida, Shinji Saitoh	４．巻 -
２．論文標題 Clinical, Pathologic, and Genetic Features of Neonatal Dubin-Johnson Syndrome: A Multicenter Study in Japan.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 The Journal of Pediatrics	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpeds.2017.12.058.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計9件（うち招待講演　4件／うち国際学会　4件）

1．発表者名 戸川貴夫
2．発表標題 小児稀少難病，進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型への遺伝子解析とABCB11日本人高頻度変異:フェニル酪酸ナトリウム治療適応を見据えて
3．学会等名 第63回日本人類遺伝学会
4．発表年 2018年

1．発表者名 戸川貴夫
2．発表標題 DIVERSITY OF ATP8B1 MUTATIONS IN JAPANESE PATIENTS WITH INTRAHEPATIC CHOLESTASIS ASSOCIATED WITH LOW GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE LEVEL
3．学会等名 North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2018（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 戸川貴夫
2．発表標題 Inherited Disorders of Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis and Molecular Genetic Testing in an Era of Precision Medicine
3．学会等名 The 2nd Vinmec international Conference on Cell and Gene Therapy Conference（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 戸川貴夫
2．発表標題 Diversity of JAG1 mutations in Japanese patients with Alagille syndrome
3．学会等名 The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics（国際学会）
4．発表年 2017年

１．発表者名
戸川貴夫

２．発表標題
DIVERSITY OF ABCB11 MUTATIONS IN JAPANESE PATIENTS WITH INTRAHEPATIC CHOLESTASIS ASSOCIATED WITH LOW GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE LEVEL

３．学会等名
North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition 2017（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
戸川貴夫

２．発表標題
新生児Dubin-Johnson症候群の全国多施設研究：遺伝子解析と臨床像の検討

３．学会等名
第34回小児肝臓研究会

４．発表年
2017年

１．発表者名
戸川貴夫

２．発表標題
Inherited Disorders of Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis and Molecular Genetic Testing.

３．学会等名
The 4th international Conference for Paediatric Gastroenterology & Nutrition.（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
戸川貴夫

２．発表標題
遺伝性新生児乳児胆汁うっ滞と分子遺伝学的解析

３．学会等名
日本小児栄養消化器肝臓学会第14回卒後教育セミナー（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名 戸川貴夫
２．発表標題 新生児・乳児胆汁うっ滞疾患と遺伝学的検査・診断の最前線
３．学会等名 第64回日本人類遺伝学会（招待講演）
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	齋藤　伸治 (Shinji Saitoh) (00281824)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授 (23903)	
研究分担者	杉浦　時雄 (Sugiura Tokio) (10381881)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員 (23903)	