

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16240

研究課題名(和文) 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症における新規疾患遺伝子の探索とその分子機能の解析

研究課題名(英文) Identification of novel disease genes and analysis of their molecular functions in progressive familial intrahepatic cholestasis

研究代表者

今川 和生 (Imagawa, Kazuo)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40708509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原因不明の新生児乳児期発症の胆汁うっ滞症に対して次世代シーケンサーで網羅的遺伝子解析を実施し、既知の疾患関連遺伝子を対象とした解析では診断が困難な症例を見出した。エクソーム解析や肝組織を用いたトランスクリプトーム解析やメチローム解析など網羅的な探索法による更なる解析へと繋げていく基礎データを得た。また、一部の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症で見出された遺伝子変異について、分子機能解析を行い、試験管内での病態評価や治験薬の薬効評価解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児乳児期発症の原因不明胆汁うっ滞症の中には未だ疾患と関連する遺伝子異常が同定されず、今後新規疾患概念の確立に寄与できる集団が含まれていることが明らかになった。今後の胆汁うっ滞病態の分子機序を考察するうえで重要な基礎データが得られた。今後は未診断患者の一群から新規疾患の発見が期待できる。また、日本で最も多く検出されたABCB11変異について、分子機能解析を実施し、病態と新規薬剤の薬効評価を行い、将来の分子機序を基礎とした治療応用への展開も期待される結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted a comprehensive genetic analysis using a next-generation sequencer for neonatal-onset bile stasis of unknown aetiology, and found cases that were difficult to diagnose by analysis of known disease-related genes. We obtained basic data for further analysis using comprehensive exploratory methods such as exome analysis, transcriptome analysis using liver tissue, and methylome analysis. In addition, we performed molecular functional analysis of gene mutations found in a case of progressive familial intrahepatic cholestasis to evaluate the pathogenesis in vitro and to evaluate the efficacy of small molecules.

研究分野：小児科学

キーワード：胆汁うっ滞 遺伝性肝疾患 エクソーム

1. 研究開始当初の背景

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (progressive familial intrahepatic cholestasis; PFIC) は、希少難治性肝疾患の一つで、乳児期早期より高度の肝内胆汁うっ滞性肝障害から肝硬変、肝不全へと進展して致命的な経過を辿ることから、救命のためにしばしば肝移植を要する。疾患遺伝子として ATP8B1、ABCB11、ABCB4、TJP2、FXR が知られ、それぞれ PFIC1 型 ~ 5 型と定義されている。しかし、PFIC の病態を示す症例のうち約 3 分の 1 でこれらの遺伝子に変異を認めず、本疾患における分子機構には未解明な点が多く存在しており、専門家間で key question の一つとされている (Verkade, H.J., et al. J Hepatol 2016)。本疾患では肝移植以外の根治的治療法が存在せず、新しい治療戦略を構築する上で、未解明の疾患遺伝子や分子機構の解明が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、従来のターゲットシーケンスでは既知の遺伝子変異が同定されない新生児乳児胆汁うっ滞症例を対象に、エクソーム解析やトランスクリプトーム解析、メチローム解析などの遺伝子解析技術により探索された疾患関連候補遺伝子を見出すことと、その分子機能について考察することを目標とした。

3. 研究の方法

共同研究機関の名古屋市立大学小児科と共に新生児乳児胆汁うっ滞症例のターゲットシーケンス解析を実施した。また、検出した遺伝子変異の一部は分子機能解析を実施した。稀少疾患を対象にした研究であり、小児期発症の胆汁うっ滞症を対象としたレジストリの構築も試みた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子解析と未診断例の実態把握

ターゲットシーケンスを実施した過去 6 年間 624 例の確定診断率は 25% で、残りの 75% は未診断であった。さらに、未診断例のうち 3 分の 1 は早産低出生体重児であった。早産低出生体重児の確定診断率は 8.6% と低く、未知の遺伝子異常の関与や分子機能異常の関連が示唆された。

全体の未診断例のうち、GTP 正常など肝内胆汁うっ滞症の分子機序が示唆される症例についてエクソーム解析やトランスクリプトーム解析など次のステップへ進む準備が整った。

(2) 胆汁うっ滞性疾患の分子機能解析

PFIC2 型の原因となる ABCB11 遺伝子変異の分子機能異常について in vitro で解析した。変異体を発現する HEK293 細胞を作成し、胆汁酸トランスポーター-BSEP の輸送活性や発現量など

を評価した。本邦で最多となる ABCB11 C129Y 変異は、in silico 解析ではタンパクへの影響が少ない可能性が示唆された（図 1）。細胞発現実験では、変異体の細胞表面発現が低下していることが示された（図 2）。また、フェニル酪酸を作用させると細胞膜上でのトランスポーター発現が増加し、薬効が期待できる変異体であることがわかった（図 3）。国内ではフェニル酪酸を用いた医師主導治験が実施されており、それを支持する結果で分子機能解析の重要性が示唆された。

図 1 ABCB11 C129Y 変異の in silico 解析

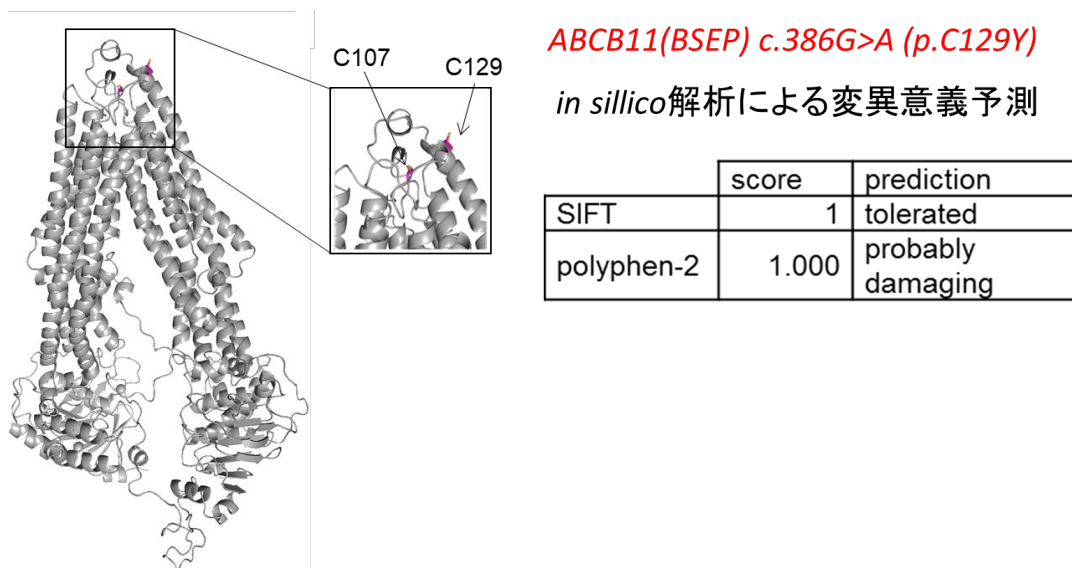
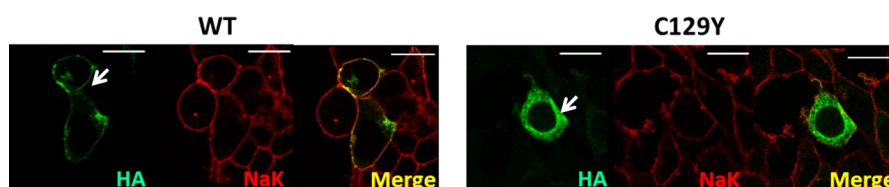
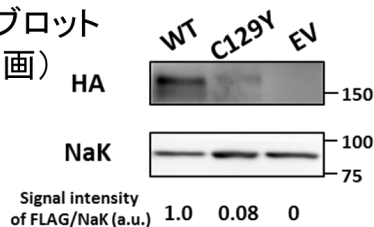


図 2 BSEP 変異体の細胞表面発現



正常BSEPでは細胞膜表面に発現するが、変異BSEP^{C129Y}では細胞質内にとどまっているのが観察された

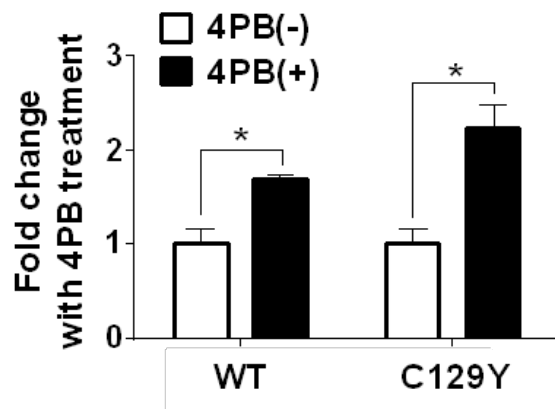
ウェスタンブロット
(細胞膜分画)



HA: hemagglutinin antigen
NaK: Na⁺/K⁺-ATPase α1-subunit
WT: wild type
C129Y: BSEP mutant
EV: empty vector

正常BSEPに比べて変異BSEP^{C129Y}の細胞膜上発現が1/10程度

図3 フェニル酪酸(4PB)によるレスキュー



(3)小児期発症胆汁うっ滞性疾患レジストリ

本研究から繋がる研究発展を目指し、「小児期発症の胆汁うっ滞性肝疾患を対象とした多施設前向きレジストリ研究」の策定にも参加し、2021年2月から運用をスタートした。今後は、多施設共同研究体制を構築し、未診断の新生児乳児発症胆汁うっ滞の遺伝学的検査や分子機構の解明を進めていく予定である。

参考文献

Verkade HJ, et al. Biliary atresia and other cholestatic childhood diseases: Advances and future challenges. J Hepatol. 2016 Sep;65(3):631-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Imagawa Kazuo, Hayashi Hisamitsu, Sabu Yusuke, Tanikawa Ken, Fujishiro Jun, Kajikawa Daigo, Wada Hiroki, Kudo Toyochiro, Kage Masayoshi, Kusuvara Hiroyuki, Sumazaki Ryo | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Clinical phenotype and molecular analysis of a homozygous ABCB11 mutation responsible for progressive infantile cholestasis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Human Genetics | 6. 最初と最後の頁 569 ~ 577 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0431-1 | 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 今川 和生 | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 【小児疾患の診断治療基準】(第2部) 疾患 消化器疾患 新生児肝炎症候群 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 小児内科 | 6. 最初と最後の頁 442 ~ 443 |
| 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 今川 和生、和田宏来、田川学、須磨崎亮 | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 指定難病最前線 vol. 74 アラジール症候群 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 新薬と臨床 | 6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1576 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 今川 和生 |
| 2. 発表標題 子どもの難病とともに生きる-患者会の取り組み-「乳児黄疸ネット」を活用した希少難治性肝疾患の診断支援と情報発信 |
| 3. 学会等名 第46回日本小児栄養消化器肝臓学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今川 和生, 佐々木 英之, 田中 篤 |
| 2. 発表標題 小児肝疾患の移行期医療:現状と問題点 Alagille症候群の成人期診療に関する全国調査 |
| 3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 今川 和生, 成田 綾, 森田 篤志, 田川 学, 中野 聡, 成高 中之, 武井 一, 入戸野 博, 高田 英俊 |
| 2. 発表標題 胆汁うっ滞を伴うNiemann-Pick病C型の乳児例における尿中胆汁酸分析の有用性 |
| 3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 今川和生 |
| 2. 発表標題 乳児胆汁うっ滞性疾患 ~乳児黄疸ネットを活用した診断支援~ |
| 3. 学会等名 第117回茨城小児科学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今川 和生, 戸川 貴夫, 伊藤 彰悟, 遠藤 剛 |
| 2. 発表標題 新生児・乳児の胆汁うっ滞性疾患を効率よく診断するための乳児黄疸ネット |
| 3. 学会等名 第63回日本新生児成育医学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今川 和生, 林 久允, 谷川 健, 和田 宏来, 工藤 豊一郎, 鹿毛 政義, 須磨崎 亮 |
| 2. 発表標題 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型乳児の臨床像と胆汁酸トランスポーターBSEPの変異機能解析 |
| 3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 今川 和生, 林 久允, 佐分 雄祐, 伊藤 彰悟, 戸川 貴夫, 高田 英俊 |
| 2. 発表標題 本邦の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型で頻度の多い\ABCB11 C129Y変異の機能解析 |
| 3. 学会等名 第35回日本小児肝臓研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今川 和生, 田川 学, 酒井 愛子, 須磨崎 亮 |
| 2. 発表標題 希少難治肝疾患の臨床研究を推進する上での乳児黄疸ネットの活用 |
| 3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|