

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07844

研究課題名(和文)片側発症一卵性双生児の網羅的ゲノム解析による胆道閉鎖症の遺伝的素因の解明

研究課題名(英文) Genetic predisposition to biliary atresia by comprehensive genomic analyses on monozygotic twins with unilateral onset

研究代表者

別所 一彦 (Bessho, Kazuhiko)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80423169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症の成因における遺伝的素因を明らかにするために、片側のみ胆道閉鎖症を発症した4組の一卵性双生児の血球からDNAの抽出し、エクソーム解析を行った。それぞれの双胎において罹患児もしくは非罹患同胞のみが持っている一塩基多型を調べたが、4組の双胎に共通する多型や多型を有する遺伝子は認めなかった。次に、4組中3組の双胎についてコピー数多型解析を行なったが、双胎間で異なるコピー数を持つ共通の遺伝子は認めなかった。さらに、過去に胆道閉鎖症の感受性多型として報告されている遺伝子座につき、双胎の罹患児と非罹患児間で比較したが、双胎間で異なる一塩基多型は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症は世界中で最多の小児肝移植適応疾患であり、本邦でも全肝移植の中で最多適応疾患である。一方で慢性的なドナー不足、高額な医療費などは解決すべき重要な課題となっている。これまで胆道閉鎖症には有効な内科的治療法は存在しないが、根本的治療の開発には病因・発症機序の解明が必須である。本研究目的は、胆道閉鎖症の遺伝的素因を、本来同一の遺伝子を有するはずの一卵性双生児のうち片側のみ胆道閉鎖症を発症したペアのゲノム配列を比較することにより明らかにすることを目的としたが、研究期間中に感受性遺伝子は同定されなかった。更なる解析の追加、胆道閉鎖症の発症における環境因子の探索が必要である。

研究成果の概要(英文)：To determine the genetic predisposition in the etiology of biliary atresia, DNA was extracted from blood cells of four pairs of monozygotic twins who developed biliary atresia unilaterally and subjected to exome analysis.

Single nucleotide polymorphisms that were discordant between the twins were examined, but no polymorphisms or polymorphic genes common to all four twin pairs were identified. Next, copy number variant analysis was performed on the twins, and no common genes with different copy numbers were found between the twin pairs. Furthermore, we compared affected and unaffected twins at loci previously reported as susceptibility polymorphisms for biliary atresia, but no single nucleotide polymorphisms that differed between the twins were identified.

研究分野：小児肝臓病学

キーワード：胆道閉鎖症 一卵性双生児 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

胆道閉鎖症は生後数週間のうち肝外胆管が線維性に閉塞する疾患で、日本での発症率は約1万出生に1例と小児期の慢性肝疾患の中で最も頻度が高い。また最終的には7~8割の患者が肝移植による救命を要し、世界中で小児肝移植の適応の最も多い疾患であるとともに、これまで本邦で行われてきた肝移植の中でも最多適応疾患となっている。一方で慢性的なドナー不足、健常生体ドナーに肝切除を行うリスク、高額な医療費などは解決すべき重要な課題となっている。胆道閉鎖症の生命予後は、肝門部空腸吻合術(葛西術)、肝移植という2つの外科的治療により著しく改善してきたが、急速に進行する肝線維化に対して有効な内科的治療法はいまだに存在しない。言うまでも無く、根本的治療の開発には病因・発症機序の解明が必要であるが、胆管の発生障害、ウイルス感染など胆道閉鎖症に関して提唱されてきた様々な病因は、これまでいずれも再現性に乏しい。これに対し、胆道閉鎖症の成因に対する遺伝的素因に対しては、家族内集積を認めないことから否定的とされてきた。しかし一方で、①以前より胆道閉鎖症の発症率には人種差があり、フレンチポリネシアンで1/3000出生と高く、アジア人(1/8000~1/12000)、黒人、白人(1/18000)と発症率は低下すること、②胆道閉鎖症の10~20%の患者では、多脾、無脾、先天性心疾患、腸回転異常、左右軸の形成異常などの肝外症状を合併すること、③Inversinを初めとした遺伝子欠損マウスにおいて胆道閉鎖症に酷似した病態を認めること、④さらに最近では複数のgenome-wide association study(GWAS)やコピー数多型解析により、異なる人種で*ADD3*、*GPC1*などが胆道閉鎖症感受性遺伝子の候補として報告されるなど、胆道閉鎖症の遺伝的素因・感受性の存在を示唆するデータが蓄積されてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胆道閉鎖症の発症における遺伝的素因の有無を、本来同一の遺伝子を有するはずの一卵性双生児のうち片側のみ胆道閉鎖症を発症した双胎ペアのゲノム配列を比較することにより明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では申請者および共同研究者が診療している片側のみ胆道閉鎖症を発症した双胎4組の保護者に同意を得のたち、罹患児及び同胞から血液検体を採取した。また罹患児が乳児期に肝門部空腸吻合術を受けた医療施設から肝門部空腸吻合術に際して摘出されホルマリン固定もしくは組織切片作成のためにパラフィン包埋された胆管組織の譲渡を受けた。

その後、罹患時及び同胞の血球より注したゲノムDNAの抽出を行い、全エクソーム解析を行い、双胎間でゲノム配列を比較した。さらに各双胎ペア間で異なった一塩基多型を4組で比較し、ペア間で共通していた多型に対して、サンガーシーケンス法により配列の確認を行った。さらに過去にコピー数多型解析、ゲノムワイド関連解析(GWAS)で報告されている胆道閉鎖症の感受性一塩基多型についても双胎間で比較検討し、ペア間で共通していたものはサンガーシーケンス法で配列の確認を行った。

また4人の罹患児のうち、3人の患者のホルマリン固定パラフィン包埋胆管組織を、肝門部空腸吻合術実施施設から各施設の倫理委員会で承認を得た後に収集し、マイクロダイセクションにより胆嚢上皮細胞を採取しゲノムDNAを抽出し、品質管理チェックを行った。

4. 研究成果

研究に参加した4組全員が女児であり検体採取時の年齢は1~9歳であった。双胎第1子が2人、第2子が2人であった。出生週数は35週0日~37週5日、罹患児の出生体重は2086~2512g、胆道閉鎖症罹患児は、生後38~88日に肝門部空腸吻合術を受けており、いずれも肝外合併症は認めなかった。また生後88日で肝門部空腸吻合術を受けていた罹患児は2歳時に生体部分肝移植を受けていた。

血球由来DNAの一塩基多型の双胎間での一致率はそれぞれ、98.3%、98.1%、97.7%、98.5%であり、4組ともに一卵性双生児であると判断した。次に、各双胎のペアで罹患児のみに認める一塩基多型や多型を有する遺伝子を調べたところ、4組に共通する一塩基多型は3箇所、3組に共通する一塩基多型は計10箇所、2組に共通する多型は計83箇所、各ペア特有の多型は計752箇所(164~243箇所/双胎)であった。そのうち4組に共通していた一塩基多型は、2箇所が*KLR3*内に、また残りの1箇所は*DHX40*内に存在していた。しかし各検体の多型をサンガーシーケンス法で確認したところ、いずれも3多型とも双胎間で相違がないことが判明した。

つぎに4組の双胎に関して、SureCall 4.0を用いてコピー数多型解析を行った。各双胎間で異なるコピー数（欠失もしくは重複スコア >0.8）は52~2980個所認められたが、双胎ペア間で共通した領域は認めなかった。

表：胆道閉鎖症の発症に関する遺伝的感受性多型

文献	Locus	Gene	Race/population
1	rs17095355	<i>XPNPEP1/ADD3</i>	Chinese
2	rs17095355	<i>XPNPEP1/ADD3</i>	Thai
3	rs7099604	<i>ADD3</i>	Caucasian
	rs17095355	<i>XPNPEP1/ADD3</i>	
4	rs3126184	<i>ARF6</i>	Caucasian
	rs10140366	<i>ARF6</i>	
5	rs10865291	<i>EFEMP1</i>	Caucasian
	rs6761893	<i>EFEMP1</i>	
	rs727878	<i>EFEMP1</i>	
6	rs2569190	<i>CD14</i>	Chinese
	rs755622	<i>MIF</i>	Turkish
	rs1799969	<i>ICAM1</i>	Turkish
	rs1160263	<i>ITGB2</i>	Chinese
	rs3025039	<i>VEGFA</i>	Chinese
	rs2292832	<i>GPC1</i>	Chinese
	rs3828336	<i>GPC1</i>	Chinese
	rs916145	<i>USF2</i>	Chinese
	rs3746444	<i>miR-499</i>	Chinese
rs1501299	<i>Adiponectin</i>	Thai	

さらに、右表にまとめた過去に報告のある胆道閉鎖症の発症の感受性多型の各遺伝子座のうち、エクソン領域に存在する多型についてサンガーシーケンス法を用いて双胎間で比較を行った。しかし双胎間で多型に差は認めなかった。

最後に、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出した胆嚢上皮細胞由来のゲノムDNAの品質チェックを行ったが、遺伝子の断片化が激しく、全エクソーム解析に用いるには不相当と考えられた。

以上、本研究期間内に行った血球由来DNAのエクソン領域の解析では、胆道閉鎖症罹患児と非罹患同胞の間で、胆道閉鎖症の発症感受性に影響を与える可能性を疑わせる一塩基多型は同定できなかった。今後、血球由来全ゲノム解析を行い非エクソン領域の多型の解析を行う。また経年ホルマリン固定パラフィン組織からより高品質のゲノムDNAを抽出できる方法を模索し、胆道閉鎖症罹患者の胆管上皮細胞と血球細胞由来のゲノムDNAを比較し、胆道閉鎖症発症における胆道系細胞の体細胞変異の可能性について解析行う。

文献

1. Garcia-Barcelo MM et al. Hum. Mol. Genet. 19, 2917-2925, 2010
2. Kaewkiattiyot S, et al. Hepatol. Res. 41, 1249-1252, 2011
3. Tsai EA et al. Hum. Genet. 133, 235-243, 2014
4. Ningappa M, et al. PLoS One. 10, e0138381, 2015
5. Chen Y et al. PLoS Genet. 14, e1007532, 2018
6. Girard M, et al. Curr Opin Gastroenterol. 35, 73-81, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fukuoka T, Bessho K, Tachibana M, Satomura Y, Konishi A, Yasuda K, Kimura T, Hasegawa Y, Ueno T, Miyoshi Y, Ozono K	4. 巻 67
2. 論文標題 Total bile acid concentration in duodenal fluid is a useful preoperative screening marker to rule out biliary atresia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of pediatric gastroenterology and nutrition	6. 最初と最後の頁 383-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPG.0000000000002037	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 里村宣紀、齋藤武、山野由貴、井上泰輔、福井美穂、大沼真輔、福岡智哉、橘真紀子、木村武司、別所一彦
2. 発表標題 一卵性双生児の網羅的ゲノム解析による胆道閉鎖症の遺伝的素因の解明
3. 学会等名 第38回 日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuhiko Bessho, Yoshinori Satomura	4. 発行年 2021年
2. 出版社 SpringerLink	5. 総ページ数 350
3. 書名 Introduction to Biliary Atresia	

〔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
研究協力者	里村 宣紀 (Satomura Yoshinori)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	齋藤 武 (Saito Takeshi)		

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