

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19391

研究課題名（和文）鑑別困難な類似疾患が混在する小児肝疾患群の早期診断・治療を具現化する方法論の創出

研究課題名（英文）Development of novel diagnostic method for refractory pediatric liver diseases

研究代表者

林 久允（Hayashi, Hisamitsu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：10451858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：小児遺伝性肝疾患群では、臨床診断の後、遺伝子検査による病変変異の同定を以って各疾患の確定診断がなされる。しかしながら変異を同定できない、あるいは病変変異とrare normal variantの区別が出来ない等の理由により類似疾患との鑑別に難渋し、確定診断に至らない症例が散見される。本現状を打破すべく、遺伝子の機能発現の有無に立脚した診断法の開発を行った。当該疾患患児の末梢血単球からマクロファージを分化誘導し、疾患鑑別に資する複数の表現型異常の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児遺伝性肝疾患群では、臨床診断の後、遺伝子検査を経て確定診断に至ります。しかしながら変異を同定できない、あるいは病変変異とrare normal variantの区別が出来ない等の理由により、遺伝子検査では類似疾患との鑑別に難渋し、確定診断に至らない症例が散見されます。本研究では、当該疾患患児の末梢血単球を活用し、疾患鑑別に資する複数の表現型異常を同定しました。

研究成果の概要（英文）：In the pediatric hereditary liver diseases, a definitive diagnosis of each disease is made by clinical findings followed by genomic analysis. However, there are some cases in which it is difficult to distinguish from similar diseases due to inability to identify the mutation or to distinguish between the pathogenic mutation and the rare normal variant. In order to solve this situation, this study developed a diagnostic method based on gene function analysis. Peripheral blood monocytes from the patients were differentiated into macrophages and subjected to various analysis. Abnormal phenotypes that could contribute to discriminate the pediatric hereditary liver diseases was identified.

研究分野：小児肝臓病学

キーワード：小児遺伝性肝疾患 診断 マクロファージ 表現型解析

1. 研究開始当初の背景

小児遺伝性肝疾患群では、臨床診断の後、遺伝子検査による病因変異の同定を以って各疾患の確定診断がなされる。しかしながら、研究代表者らによる当該疾患群を対象とした全国疫学調査では、変異が検出できない、あるいは病因変異と rare normal variant の区別が出来ない等の理由により類似疾患との鑑別に難渋し、確定診断に至らない症例が散見された。小児遺伝性肝疾患群では、疾患毎に治療指針が異なり、その適切な選択が予後に直結する。従って、各疾患を発症早期に正確に鑑別する新たな診断法の確立は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

実臨床で生じる上述の課題は、遺伝子異常の直接的な検出を試みる、現在の遺伝子診断法の限界に起因する。本現状を打破すべく、本研究では、遺伝子の機能発現の有無に立脚した診断法の開発に挑む。すなわち、各疾患原因遺伝子の機能発現を低侵襲、且つ簡便に検出する方法論を開発し、小児遺伝性肝疾患群の診断ツールとして確立する。

3. 研究の方法

本研究は、臨床所見では類似疾患との鑑別に難渋する、Alagille syndrome (AGS), Arthrogyrosis–renal dysfunction–cholestasis (ARC) syndrome, Familial cholanemia (FC), neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD)を対象とする。これら疾患の原因遺伝子としては、*JAG1*(AGS), *NOTCH2*(AGS), *VPS33B*(ARC syndrome), *VIPAS39*(ARC syndrome), *BAAT*(FC), *TJP2*(FC), *SLC25A13*(NICCD)が同定されている。

研究代表者は、当該遺伝子が、肝臓のみならず、低侵襲に採取が可能な末梢血に含まれる各種血液細胞、特に単球を分化誘導培養して得られるマクロファージ(Mφ)に高発現することを見出している。本知見及び、当該遺伝子の直接的な機能評価には煩雑な操作を要することを踏まえ、本研究では、当該遺伝子の機能欠損に付随して生じる Mφ の表現型異常を探索する。具体的には、不死化細胞株における各原因遺伝子の発現抑制により疾患モデル Mφ を構築し、顕微鏡観察、Omics 解析等により、各疾患で特異的に生じうる Mφ の表現型異常を見出す。次に、各疾患症例の末梢血単球由来 Mφ を用いた検証実験を行い、本表現型異常が診断ツールに資することを担保する。

本研究は、研究代表者が、小児肝臓病に精通する小児科医の中野聡(研究協力者)、細胞生物学的手法に習熟した大学院生の大坂周平(研究協力者)とともに、連携研究者である小児肝臓病専門医 3 名から患者検体、臨床情報の提供を受け実施する。本研究内容は、Mφ の表現型を利用し PFIC1 の鑑別法を世界に先駆けて確立した、研究代表者自身の成功事例を踏襲している(Hayashi H, EBioMedicine. 2018)。全参加機関の倫理委員会から実施承認を得た後に開始する。

4 . 研究成果

不死化細胞株 THP-1 において AGS、ARC syndrome、FC、NICCD の各原因遺伝子の発現を抑制した細胞株 (疾患モデルマクロファージ株) を構築した。本細胞株を種々の解析に供し、各疾患に特異的に生じうる表現型 (細胞表面抗原の差異など) を同定することに成功した。次に各疾患 (AGS、ARC syndrome、FC、NICCD) の確定診断済の患者 10 名にご協力を頂き、当該患者の末梢血単球からマクロファージを分化誘導し、疾患モデルマクロファージ株から見出した表現型異常の発現の有無を評価した。その結果、各疾患の鑑別に資する複数の表現型異常の同定に成功した。今後、小児期発症の胆汁うっ滞性肝疾患群を対象とした前向き研究の診断ツールとして本成果を導入することにより、本成果を介した診断性能評価を行う計画である。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizutani A, Sabu Y, Naoi S, Ito S, Nakano S, Minowa K, Mizuochi T, Ito K, Abukawa D, Kaji S, Sasaki M, Muroya K, Azuma Y, Watanabe S, Oya Y, Inomata Y, Fukuda A, Kasahara M, Inui A, Takikawa H, Kusuhara H, Bessho K, Suzuki M, Togawa T, Hayashi H	4. 巻 5
2. 論文標題 Assessment of Adenosine Triphosphatase Phospholipid Transporting 8B1 (ATP8B1) Function in Patients With Cholestasis With ATP8B1 Deficiency by Using Peripheral Blood Monocyte Derived Macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 52～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1605	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 Okamoto Tatsuya, Sonoda Mari, Ogawa Eri, Ito Shogo, Togawa Takao, Hayashi Hisamitsu, Okajima Hideaki, Uemoto Shiji	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Long-Term Outcomes of Living-Donor Liver Transplantation for Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition	6. 最初と最後の頁 425～429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPG.0000000000002983	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 Zen Yoh, Kondou Hiroki, Nakazawa Atsuko, Tanikawa Ken, Hasegawa Yasuhiro, Bessho Kazuhiko, Imagawa Kazuo, Ishige Takashi, Inui Ayano, Suzuki Mitsuyoshi, Kasahara Mureo, Yamamoto Kouji, Yoshioka Takako, Kage Masayoshi, Hayashi Hisamitsu	4. 巻 50
2. 論文標題 Proposal of a liver histology based scoring system for bile salt export pump deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 754～762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13494	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 該当する

1. 著者名 Nakano S, Osaka S, Sabu Y, Minowa K, Hirai S, Kondou H, Kimura T, Azuma Y, Watanabe S, Inui A, Bessho K, Nakamura H, Kusano H, Nakazawa A, Tanikawa K, Kage M, Shimizu T, Kusahara H, Zen Y, Suzuki M, Hayashi H	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of food on the pharmacokinetics and therapeutic efficacy of 4-phenylbutyrate in progressive familial intrahepatic cholestasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53628-x	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisamitsu Hayashi
2. 発表標題 Development of Novel Medical Therapy for Pediatric Liver Diseases with Intrahepatic Cholestasis
3. 学会等名 APASL STC Tokyo 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型の病態解明を基盤とした創薬研究
3. 学会等名 京都小児外科セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 トランスポーター関連希少疾患に対する新規治療戦略の開発を指向した創薬研究
3. 学会等名 第26回HAB研究機構学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisamitsu Hayashi
2. 発表標題 Translational and reverse translational research on pediatric cholestatic liver diseases
3. 学会等名 THE 14th SUGIYAMA LABORATORY (RIKEN) OPEN SYMPOSIUM (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisamitsu Hayashi
2. 発表標題 Repurposing of 4-phenylbutyrate for treatment of pediatric liver diseases with intrahepatic cholestasis
3. 学会等名 JDDW2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 家族性肝内胆汁うっ滞症の成因、診断、治療に関する最新知見
3. 学会等名 第46回日本小児栄養消化器肝臓学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 肝内胆汁うっ滞症に対する創薬研究を基盤としたリバーストランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第2回若手研究者コミュニティ：順天堂大学 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 久允
2. 発表標題 難治性肝内胆汁うっ滞症の医薬品開発研究を基盤としたリバーストランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第11回小児肝臓・肝移植研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐分 雄祐, 水谷 歩, 伊藤 彰吾, 伊藤 孝一, 楠原 洋之, 戸川 貴夫, 林 久允
2. 発表標題 家族性肝内胆汁うっ滞症2型の病型鑑別を目的としたABCB11の病変変異の解析
3. 学会等名 第36回日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷 歩, 佐分 雄祐, 伊藤 彰吾, 伊藤 孝一, 楠原 洋之, 戸川 貴夫, 林 久允
2. 発表標題 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者が保因する変異が病因遺伝子のsplicingに及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第36回日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷 歩, 佐分 雄祐, 伊藤 彰吾, 伊藤 孝一, 楠原 洋之, 戸川 貴夫, 林 久允
2. 発表標題 家族性肝内胆汁うっ滞症患者が保因する変異が病因遺伝子のsplicingに及ぼす影響の検討
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 林久允、近藤宏樹、別所一彦、箕輪圭、戸川貴夫、水落建輝、村上潤、虻川大樹、乾あやの
2. 発表標題 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症に対するブフェニールの医薬品開発研究について（進捗状況報告）
3. 学会等名 第45回 日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林久允、近藤宏樹、別所一彦、戸川貴夫
2. 発表標題 胆道閉鎖症が否定された胆汁うっ滞症例の早期診断・症例登録システムの構築に向けた試み
3. 学会等名 第45回 日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林久允
2. 発表標題 日本における希少難病を対象とした治験について ~PFIC2の事例を通して感じたこと~
3. 学会等名 RDD東大薬学部（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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------