

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08251

研究課題名(和文)小児期発症の原因不明肝不全における分子病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Molecular Pathogenesis in Childhood-Onset Liver Failure

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児期に発症する急性肝炎とそれに続発する急性肝不全の原因疾患は多岐にわたる。しかし、未だに約半数は原因不明で、劇症化する症例では肝移植以外に有効な治療法がない。肝臓での代謝や排泄に関わる分子機構に異常がある場合や、感染症などを契機にした免疫原性の肝炎病態など、多種多様である。未だ原因の特定や分子レベルでの病態理解は不明のままである。本研究では、患者のゲノム解析を行い、原因遺伝子を探索した。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症など小児期に肝不全を来し得る疾患を診断した。また、一部の症例で末梢血で活性化CD8陽性T細胞が増殖し、肝臓病理でCD8陽性T細胞が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝不全を呈する小児における原因検索でゲノム解析が有用であることが示唆された。本研究の過程で免疫原性と思われる急性肝炎の小児において免疫解析を実施したところ、末梢血で活性化CD8陽性T細胞が増殖し、肝臓病理でCD8陽性T細胞が増加していた。なんらかの過剰な免疫応答が急性肝炎の主病態の一つであることが示唆された。これらのように、約半数以上で不明とされる小児の急性肝炎や肝不全における分子レベルでの原因検索方法について本研究で見出すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：There are a wide variety of causative diseases of acute hepatitis and subsequent acute liver failure that occur in childhood. However, the cause is still unknown in about half of the cases, and there is no effective treatment other than liver transplantation in cases of fulminant cases. There are many different types of hepatitis, including cases with abnormalities in molecular mechanisms involved in liver metabolism and excretion, and immunogenic hepatitis pathologies triggered by infections and other diseases. Identification of the cause and understanding of the pathogenesis at the molecular level remain unknown. In this study, we performed genome analysis of patients to search for causative genes. We diagnosed diseases that can cause liver failure in childhood, such as progressive familial intrahepatic cholestasis. In addition, activated CD8-positive T cells proliferated in peripheral blood in some cases, and CD8-positive T cells were increased in liver pathology.

研究分野：小児肝臓病学

キーワード：肝不全 急性肝炎 小児 ゲノム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝不全は肝臓での合成能や代謝能が著しく障害される致死性病態の一つである。小児期に発症する肝不全の原因には、ウイルス性肝炎から稀な代謝性疾患までさまざまな疾患群が含まれるが、30~40%は原因不明である [Hepatology 2018]。さらに、原因不明の肝不全では特に予後不良で、死亡率が8割にも達するという報告もある [Liver Int 2017]。原因不明例では肝移植以外の効果的な治療法が存在しないため、救命率向上を目指す新しい治療戦略を開発する上で、未解明の疾患遺伝子や分子機構の解明が望まれている [Hepatology 2017]。また、本邦における肝移植はドナーの絶対的不足状態が常態化しており、ほとんどが肉親からの生体肝移植により行われる。諸外国と比較して健常者ドナーに依拠している国内の現状があり、小児期発症の原因不明肝不全における分子病態の理解は重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では小児期発症肝不全の原因究明のため、ゲノム解析で基礎疾患の同定を試みるほか、病態の首座である肝組織を用いた病理学的解釈あるいは RNA を用いたスプライシング解析などでその診断率を向上させることを目的とする。また、遺伝性肝疾患以外にも免疫原性の肝炎など、これまで病態が十分に解明されていない患者群の解析も行う。全体の半数近くが原因不明と言われる小児期発症肝不全の原因探索研究に取り組む。

3. 研究の方法

1) 未診断の小児肝疾患に対するゲノム解析

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 (CIRCLE) で共同研究施設 (名古屋市立大学) と協力して 61 種類のターゲット遺伝子パネル解析を実施した。さらに遺伝子パネル解析で診断に至らない症例のうち、肝障害や黄疸が遷延する症例を対象に全エクソーム解析を実施した。

2) 原因不明の小児急性肝炎に対する免疫解析

健常小児における急性肝炎で末梢血の免疫機能解析を実施した。マルチカラーフローサイトメトリーで末梢血中の白血球表面抗原の解析を行った。サイトカインやケモカインは Cytometric Bead Array で測定した。また、T細胞レパトア解析も合わせて実施した。これらのデータを肝臓病理や臨床経過、血清学的マーカーと比較検討した。

4. 研究成果

1) 未診断の小児肝疾患に対するゲノム解析

遺伝子パネル解析では、162 例のうち 26 例で疾患と関連する遺伝子変異を同定し、アラジール症候群 (ALGS) 4 例、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) / 良性反復性肝内胆汁うっ滞症

(BRIC) 3 例、シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD) 4 例、Dubin-Johnson 症候群 (DJS) 10 例、Wilson 病 3 例、嚢胞性線維症 (CF) 1 例、先天性胆汁酸代謝異常症 (IEBAM) 1 例であった。PFIC/BRIC, DJS の病理診断では、BSEP、MRP2 の発現減弱/消失など遺伝子診断と合致する所見が得られた。

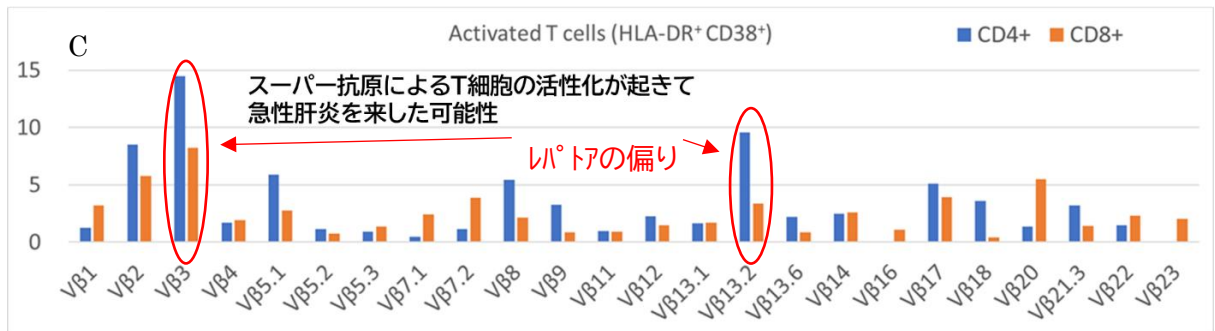
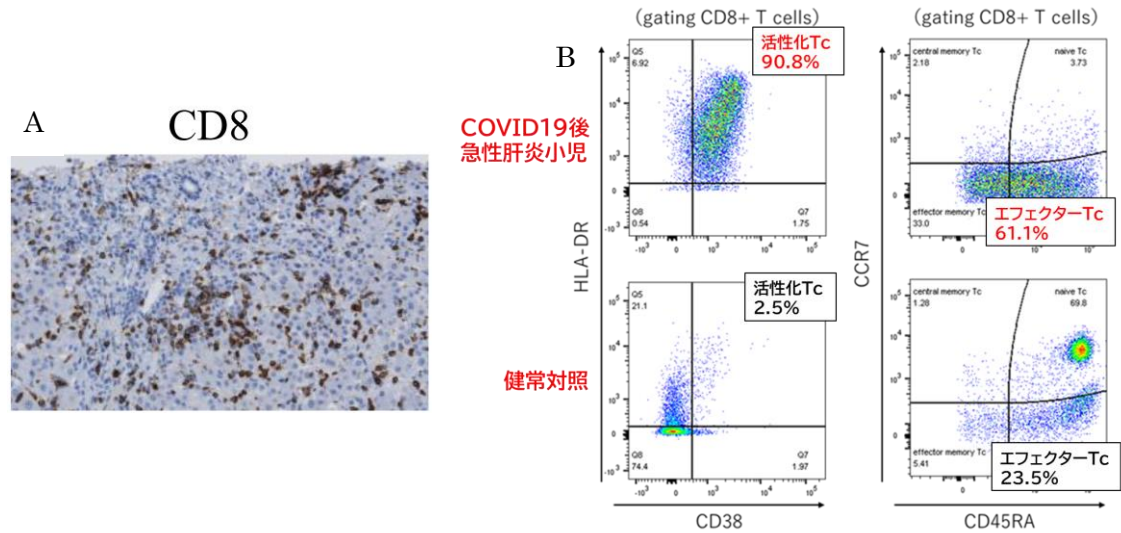
診断に至らない症例のうち、肝障害や黄疸が遷延する症例で全エクソーム解析を実施した。17 例に実施し、そのうち 6 例で診断と関連するバリエントを検出した。未同定の症例においては、新規の病因遺伝子候補の探索として機能解析実験を予定している。

変異を同定した症例のうち、臨床病像や病理学的に進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型と診断されているもののヘテロ接合性の ABCB11 遺伝子病原性変異のみ検出されていた 1 例で intron にバリエントを認めた。この変異意義を確かめるため、肝組織の mRNA を抽出し RNA-seq を実施した。マッピングデータから、約 100 塩基相当のイントロン配列が挿入されるスプライシング異常を惹起することが示唆された。これにより、当症例の遺伝学的診断が可能であった。ゲノム解析だけでなく、肝組織の病理像や RNA を用いたスプライシング解析が診断に有用であった。

2) 原因不明の小児急性肝炎に対する免疫解析

原因不明の急性肝炎小児 4 例における急性期免疫動態解析を行い、そのうち 3 例では急性期の末梢血で CD8 陽性 T 細胞が 80%以上活性化し、うち肝生検を急性期に実施した 2 例で肝内に CD8 陽性 T 細胞の高度浸潤を認めた (図 1A)。これらは病状の増悪期に実施したステロイドパルス療法が奏功し、肝不全への進展を防ぎ得た。一方で、急性期の末梢血で CD8 陽性 T 細胞に活性化がみられなかった 1 例においては、副腎皮質ステロイドを投与することなく経過観察のみで軽快した。また、COVID19 感染の 1 か月後に原因不明急性肝炎を発症した小児例では、レパトアの偏りを認めるなど免疫学的に特異な所見を認め、SARS-CoV2 スパイクタンパクがスーパー抗原として作用し、T 細胞の異常な活性化と分化傾向を呈した可能性が示唆された (図 1A-C)。

図 1 : COVID19 の先行感染後に原因不明急性肝炎を発症した小児の末梢血免疫解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 2件）

1. 著者名 Morita Atsushi、Imagawa Kazuo、Ishiodori Takumi、Tagawa Manabu、Takada Hidetoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Kawasaki disease with dilatation of the common bile duct: A case report and review of literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1325 ~ 1330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1756-185X.14208	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 Imagawa Kazuo、Morita Atsushi、Fukushima Hiroko、Tagawa Manabu、Takada Hidetoshi	4. 巻 64
2. 論文標題 A novel BMPR1A mutation affects mRNA splicing in juvenile polyposis syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e15041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.15041	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 42
2. 論文標題 【膵と胆道の先天性形成異常～発生から臨床まで～】アラジール症候群	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 973-977
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 Yuhara Yuka、Kido Takahiro、Imagawa Kazuo、Yano Yusuke、Nozaki Yoshihiro、Ishiodori Takumi、Ishikawa Nobuyuki、Kato Hideyuki、Kato Yoshiaki、Takahashi Igari Miho、Murakami Takashi、Horigome Hitoshi、Takada Hidetoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Abdominal aortic thrombus formation in a neonate with an interrupted aortic arch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1943 ~ 1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.3911	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 Tagawa Manabu, Morita Atsushi, Imagawa Kazuo, Mizokami Yuji	4. 巻 33
2. 論文標題 Endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic ultrasound in children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.13928	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 Kawahara Sakura, Imagawa Kazuo, Takeuchi Shusuke, Iwasaki Tomoya, Okada Yuki, Nakamura Yuri, Saito Shogo, Sasaki Takato, Masumoto Kouji, Takada Hidetoshi	4. 巻 94
2. 論文標題 Differential diagnosis of neonatal cholestasis by genetic testing: A case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 102658 ~ 102658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epsc.2023.102658	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 Kawahara Sakura, Imagawa Kazuo, Hisato Suzuki, Tatsuyuki Ohto, Takada Hidetoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Marked hypertriglyceridemia with a novel splicing mutation in GPIHBP1.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatrics International	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) 10.1111/ped.15559	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 Morita Atsushi, Imagawa Kazuo, Asayama Kei, Terakado Tsubasa, Takahashi Shoko, Yaita Katsuyuki, Tagawa Manabu, Matsubara Daisuke, Takada Hidetoshi	4. 巻 245
2. 論文標題 Immunological characteristics of severe acute hepatitis of unknown origin in a child post SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 109138 ~ 109138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2022.109138	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今川和生、伊藤彰悟、戸川貴夫、伊藤孝一、齋藤伸治、林久允
2. 発表標題 東南アジア地域における原因不明胆汁うっ滞小児に対するゲノム解析
3. 学会等名 第48回日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今川和生、戸川貴夫、伊藤彰悟、伊藤孝一、水野忠快、林久允、高田英俊、齋藤伸治
2. 発表標題 胆汁うっ滞を伴う早産児・低出生体重児における遺伝学的解析
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長友公美絵、福島紘子、鈴木涼子、八牧愉二、今川 和生、加藤元博、須川 正啓、高田英俊
2. 発表標題 肝不全で発症した若年性骨髄単球性白血病に少量シタラピン療法で移植前治療を行った一例
3. 学会等名 第62回日本小児血液がん学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田篤志、今川和生、田川 学、高田英俊
2. 発表標題 EBV関連脳症治療後に薬剤性過敏症候群を発症した小児における免疫動態
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今川和生、森田篤志、田川 学、高田英俊
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染後に発症した原因不明急性肝炎の小児例における末梢血免疫表現型解析
3. 学会等名 第49回日本小児栄養消化器肝臓学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今川 和生、野崎良寛、出口拓磨、嶋侑里子、石踊巧、村上卓、高橋実穂、堀米仁志
2. 発表標題 Fontan関連肝疾患に合併する食道胃静脈瘤の予測におけるLiver stiffness-spleen size-to-platelet ratio risk scoreの有用性
3. 学会等名 第58回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今川 和生、野崎 良寛、森田 篤志、田川 学、嶋 侑里子、石踊 巧、村上 卓、高橋 実穂、堀米 仁志、高田 英俊
2. 発表標題 Fontan術後肝疾患における血清亜鉛濃度の検討
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuo Imagawa
2. 発表標題 Use of a Comprehensive 61-Gene Cholestasis Sequencing Panel Cholestatic Infants, Children in Japan and Southeast Asia
3. 学会等名 PAS 2023 (Pediatric Academic Societies) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	森田 篤志 (Morita Atsushi)	筑波大学・附属病院・病院助教 (12102)	

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