

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790543

研究課題名(和文)

先天性肝内胆汁うっ滞症の包括的遺伝子診断システムの構築

研究課題名(英文)

Establishment of comprehensive genetic diagnosis system for congenital intrahepatic cholestasis

研究代表者

鳥居 千春 (TORII CHIHARU)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70383908

研究成果の概要(和文):「先天性肝内胆汁うっ滞症」には進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型、2 型、3 型、アラジール症候群などが含まれる。一般に、確定診断には侵襲的な肝臓生検を行うことが必須であるが遺伝子診断の実施により非侵襲的に確定診断を得ることが可能となる。本研究では進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の原因遺伝子である ATP8B1、ABCB11、ABCB4 遺伝子の遺伝子診断システムを新に開発し、その感度・特異度等の有用性を評価した。

研究成果の概要(英文): Congenital intrahepatic cholestasis includes progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) type1, 2 and 3, and Alagille Syndrome. Traditionally the definite diagnosis of the disease has been usually based on a liver biopsy. Genetic diagnosis represents a non-invasive alternative to liver biopsy. In this study, we developed novel genetic diagnosis system of three causing genes (ATP8B1, ABCB11 and ABCB4) of PFIC, and evaluated its specificity and sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ゲノム、遺伝子、先天性肝内胆汁うっ滞症、遺伝子診断

## 1. 研究開始当初の背景

「先天性肝内胆汁うっ滞症」のカテゴリーには進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型、2 型、3 型、アラジール症候群などが含まれる。このカテゴリーには進行の遅い比較的予後の良い疾患から高度の肝機能障害を呈する予後不良の疾患までが含まれる。臨床症状・検査所見・家族歴から疾患名について臨床診断できる場合もあるが、一般に、確定診断には、侵襲的な肝臓生検を行うことが必須である。遺伝子診断の実施により、非侵襲的に確定診断を得ることが可能となる。確定診断を通じて、移植適応の判定・薬物治療の選択・

血縁者間生体移植の際のドナーの選択など治療に不可欠な情報や、遺伝様式など遺伝相談に有用な情報を得ることができる。さらに、先天性肝内胆汁うっ滞症では短期間に急速に高度の肝機能障害を発症した場合、緊急生体肝臓移植が必要となるが、遺伝子診断による確定診断は、血縁者間生体移植の際のドナーの合理的選択に有用である。

現在、汎用されている遺伝子解析技術はダイレクトシーケンス法であるが、先天性肝内胆汁うっ滞症のカテゴリーに含まれる遺伝性疾患の原因遺伝子の遺伝子のサイズは比較的大きいため、ダイレクトシーケンス法を用

いる場合には実施コストが高額（20～40万円）となる。このため、先天性肝内胆汁うっ滞症に対する遺伝子診断の臨床応用は進んでいないのが現状である。この問題を解決するために我々はこれまでの研究において熱変性高速液体クロマトグラフィー法（Denaturing High Performance Liquid Chromatography：DHPLC法）を応用した、効率的な遺伝子診断システムを先天奇形症候群分野で実用化している。すなわちDHPLC法を用いて原因遺伝子すべてのエクソンの中でどのエクソンに異常があるのかをまず決定したあと、当該エクソンの塩基配列のみをダイレクトシーケンス法により解析するという方法である。すでに先天奇形症候群と先天性肝内胆汁うっ滞症のカテゴリーに同時に属する「アラジール症候群」の原因遺伝子であるJAG1の遺伝子解析システムを開発し、当該遺伝子診断システムの有用性について確認している。また当該方法はダイレクトシーケンス法による検査と同等の感度・特異度を有し、解析実施コストは1/4程度である。

## 2. 研究の目的

前述の背景をふまえて、本研究では先天性肝内胆汁うっ滞症について進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型、2型、3型（progressive familial intrahepatic cholestasis:PFIC1,2,3）の体系的な遺伝子診断システムを新たに開発し、網羅的な変異解析を行った。すなわち、これら3疾患全ての翻訳領域における遺伝子変異を効率的にスクリーニングする遺伝子診断システムを開発した。

## 3. 研究の方法

### （1）効率的な遺伝子診断システムの開発

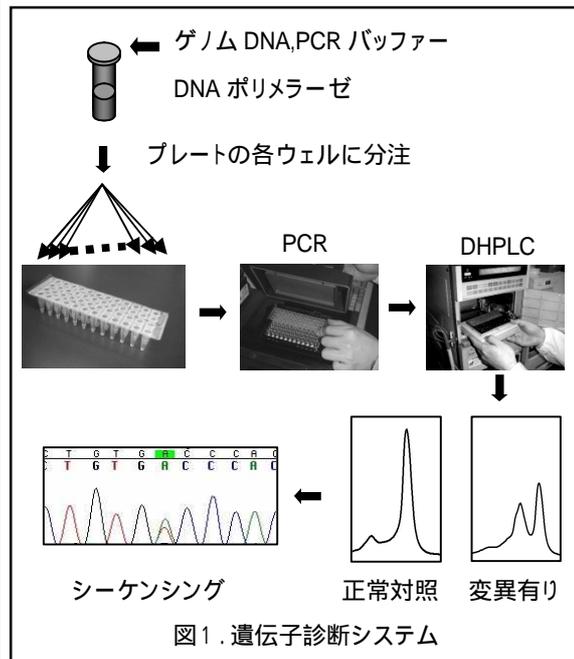
当該疾患の原因遺伝子であるATP8B1遺伝子28エクソン、ABCB11遺伝子28エクソン、ABCB4遺伝子28エクソンを同一条件下で増幅するためのプライマー対を設計した。96穴形式のPCRプレートの各穴に各エクソンを増幅するためのプライマー対を分注しておき、次にPCR増幅を行い、増幅終了後にプレートをDHPLC解析システムに移してあらかじめ決められた至適条件下で解析を進めた。最後に、DHPLC解析により異常が認められたエクソンについて、シーケンシングを行い、変異の種類と性質を決定した。上記の手順によって、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の遺伝子診断の実施方法を標準化した。（図1）

### （2）進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者検体の解析

患者もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得られた検体（末梢血）よりゲ

ノムDNAを抽出し、（1）で標準化したシステムの至適条件下で解析を進めた。DHPLC解析により異常が認められたエクソンについて、ダイレクトシーケンシングを行い、変異の種類と性質を決定した。

（3）変異体解析による感度・特異度の評価  
過去に報告されている変異を各遺伝子から数カ所選出し、この変異部位を持つ変異体をOverlap extension PCR法により作成した。その後（1）で開発したシステムで解析し、遺伝子診断システムの感度・特異度等の有用性を評価した。



## 4. 研究成果

### （1）効率的な遺伝子診断システムの開発

ATP8B1 遺伝子 28 エクソンを 24 アンプリコンに、ABCB11 遺伝子 28 エクソンを 27 アンプリコンに、ABCB4 遺伝子 28 エクソンを 27 アンプリコンにわけ、全 78 アンプリコンを増幅するプライマー対を設計した。ABCB11 遺伝子に関しては論文プライマー（Chen HL et al. J Pediatr 2008）を用いているがそのうち4つのエクソンに関しては今回の解析系のため設計し直している。その後、プライマー対を96穴プレートにそれぞれ配置し、同一条件下で増幅する解析系を作成した。

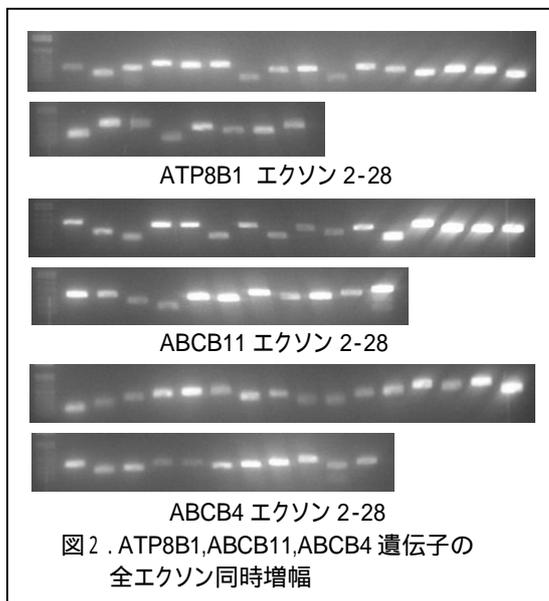
【PCR 反応液組成】ゲノム DNA 30ng/ul 1ul、2mM dNTP mixture 2ul（最終濃度 0.2mM）、50mM MgSO4 1ul（最終濃度 2.5mM）、10uM forward primer 1ul（最終濃度 0.5uM）、10uM reverse primer 1ul（最終濃度 0.5uM）、10 × High Fidelity PCR Buffer 2ul、0.5 U Platinum Taq Polymerase High Fidelity（Invitrogen）、全量が 20ul になるように調整した。

【touch-down PCR】熱変性 95 30 秒、アニーリング 61 56 30 秒（1 サイクルごとに 0.5 ずつ下げていく）伸長反応 68 30 秒×10 サイクル、熱変性 95 30 秒、アニーリング 56 、伸長反応 68 30 秒×30 サイクル

【ヘテロデュプレックス】95 25 40 秒（1 サイクルごとに 1 ずつ下げていく）×70 サイクル

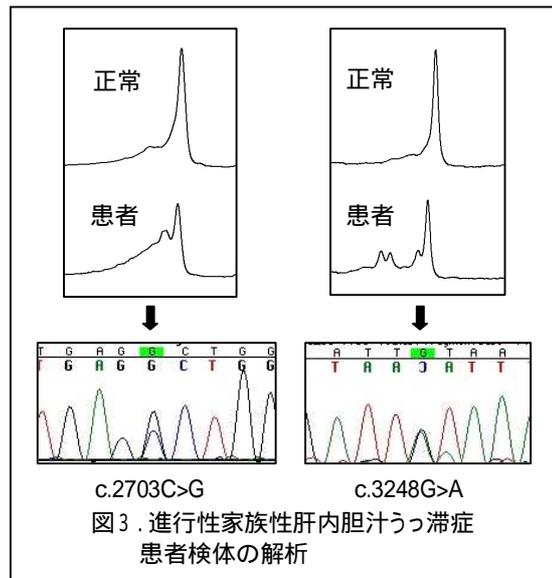
上記条件で各アンプリコンを増幅させた結果、すべてのアンプリコンを同一条件下で増幅させることが出来た。（図 2）

その後増幅産物を DHPLC 解析システムに移し至適温度条件を予測するコンピュータソフトウェア（トランスジェノミック社）によってあらかじめ作成したプログラムを用いて解析を行った。



（ 2 ）進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者検体の解析

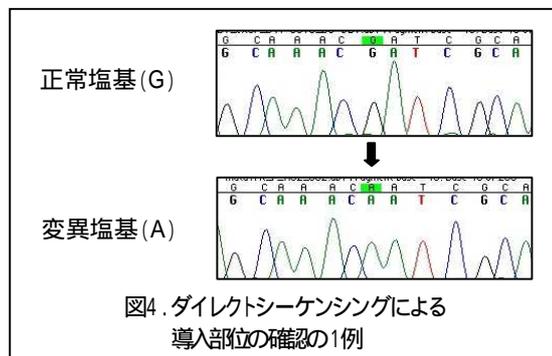
DHPLC 法による遺伝子診断システムを用いて遺伝子変異部位が判明している 2 名および遺伝子変異部位が判明していない 3 名、計 5 名の検体を解析した。その結果遺伝子変異部位が判明している（ABCB11 遺伝子 exon22 c.2703C>G p.S901R, exon25 c.3248G>A p.C1083Y）検体に関しては同部位の変異を検出することができた。（図 3）ほか 3 名に関しては変異を同定することは出来なかったがエクソン内の一塩基多型（SNP：Single Nucleotide Polymorphism）は ATP8B1 遺伝子で 3 か所、ABCB11 遺伝子で 6 か所、ABCB4 遺伝子で 3 か所検出し、従来法であるダイレクトシーケンス法による解析を行ったところ DHPLC 解析の結果と一致するデータを得ることができた。



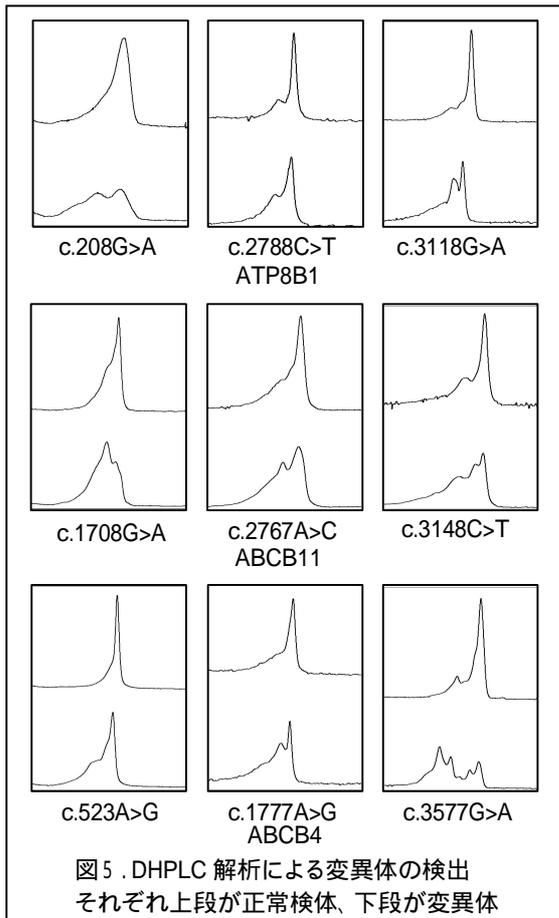
（ 3 ）変異体解析による感度・特異度の評価  
患者検体の集積が思うようにいかなかったため、過去に報告されている変異を各遺伝子 3 か所選出しこの変異部位を持つ変異体を Overlap extension PCR 法により作成した。各遺伝子における変異導入部位は以下の通りである。

ATP8B1 : exon3 c.208G>A p.D70N  
exon23 c.2788C>T p.R930X  
exon25 c.3118G>A p.G1040R  
ABCB11 : exon15 c.1708G>A p.A570T  
exon22 c.2767A>C p.T923P  
exon24 c.3148C>T p.R1050C  
ABCB4 : exon6 c.523A>G p.T175A  
exon15 c.1777A>G p.T593A  
exon27 c.3577G>A p.A1193T

変異の導入が正しく行われたかを確認するためダイレクトシーケンシングを行い変異導入部位の配列を確認した。その結果すべての変異体において正常塩基から変異塩基へと正しく置換されていた。（図 4）



その後、作成した変異体を（ 1 ）のシステムで解析した結果、すべての変異を検出することができた。（図 5）



以上のことからさらに進行性家族性肝内胆汁うっ滞症患者検体を集積し、遺伝子診断システムの評価を行っていく必要はあるものの包括的遺伝子診断システムを立ち上げることができたと考えられる。

本研究を通じて、臨床所見からは鑑別不能であった疾患が非侵襲的に確定診断できるようになると期待される。先天性肝内胆汁うっ滞症の分野では確定診断が治療方針の決定に直結することから、包括的遺伝子診断システムを実現する臨床的な意義は大きい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

鳥居 千春 (TORII CHI HARU)  
慶應義塾大学・医学部・研究員  
研究者番号：70383908

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし