

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870489

研究課題名(和文) 新生児・乳児胆汁うっ滞に対する新しい診断ストラテジーの確立

研究課題名(英文) Molecular Genetic Dissection and Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis Using Targeted Next-Generation Sequencing

研究代表者

杉浦 時雄 (SUGIURA, Tokio)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10381881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代高速シーケンサーを用いて、胆汁うっ滞の網羅的遺伝子システムを構築した。胆汁うっ滞を示す児、全109例を解析した。28例(26%)で分子遺伝学的診断がついた。内訳はAlagille症候群12例(JAG1 11例, NOTCH2 1例)、新生児Dubin-Johnson症候群5例(ABCC2 5例)、シトリン欠損症による新生児肝内胆汁うっ滞 5例(SLC25A13 5例)、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症/良性反復性肝内胆汁うっ滞症 6例(ATP8B1 2例, ABCB11 4例)であった。我々の遺伝子パネルを用いた遺伝子解析手法は、胆汁うっ滞の分子遺伝学的診断確定に有用である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 109 patients with cholestasis (“genetic cholestasis,” 31 subjects; “unknown with complications” such as prematurity, 46 subjects; “unknown without complications,” 32 subjects), and a molecular genetic diagnosis was made for 28 subjects (26%). The rate of positive genetic diagnosis in each category was 22 of 31 (71%) for the “genetic cholestasis” group, 2 of 46 (4.3%) for the “unknown with complications” group, and 4 of 32 (12.5%) for the “unknown without complications” group. The grouping of the molecular diagnoses in the group with genetic cholestasis was as follows: 12 with Alagille syndrome, 5 with neonatal Dubin-Johnson syndrome, 5 with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency, and 6 with progressive familial intrahepatic cholestasis or benign recurrent intrahepatic cholestasis with low gamma-glutamyl transpeptidase levels.

研究分野：小児科

キーワード：胆汁うっ滞

1. 研究開始当初の背景

新生児・乳児胆汁うっ滞は比較的頻度の高い病態である。1970年代まで多くは原因不明の新生児肝炎と診断されてきたが、その後 Alagille 症候群(ALGS)、シトリン欠損症による新生児肝内胆汁うっ滞(NICCD)、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症/良性反復性肝内胆汁うっ滞症(PFIC/BRIC)などの遺伝性疾患が新生児肝炎から独立した。さらに過去20年間にそれらの責任遺伝子が発見され、遺伝学的多様性が明らかとなった。欧米では新生児・乳児胆汁うっ滞の約25%が遺伝性肝内胆汁うっ滞症(以下本症)とされている。しかし日本人における本症患者に対し包括的な遺伝学的解析を行った報告はなく、現状は不明である。新生児肝炎と診断されたものや原因不明の胆汁うっ滞例の中に本症患者が存在する可能性がある。一方、近年、次世代高速シーケンサー(Next-generation sequencer, NGS)やバイオインフォマティクスの普及により、短時間・安価に遺伝子解析が可能となった。

2. 研究の目的

新生児・乳児肝内胆汁うっ滞症患者に対して、NGSを用いた網羅的遺伝子解析により分子遺伝学的診断を試みる。そのうち本症の遺伝子型と表現型の関連を分析する。

3. 研究の方法

2013年4月から2015年8月に、全国から以下の方法で日本人対象患者を募った。1)胆汁うっ滞、2)新生児・乳児期に発症、3)2010年1月から2014年12月に出生、4)過去に遺伝学的診断がなされていない、以上全てを満たす患者とし、肝外胆汁うっ滞症例(胆道閉鎖症など)と染色体異常症例は除外した。胆汁うっ滞は直接ビリルビン(D.Bil)

1.0mg/dL(総ビリルビン(T.Bil)5.0mg/dLにおいてはD.Bil/T.Bil 0.2)とした。患者は臨床診断をもとに、1)本症の臨床診断がついた群(genetic cholestasis群)、2)原因不明であるが胆汁うっ滞の原因となり得る合併症をもつ群(unknown etiology with complications)、3)原因不明で合併症のない群(unknown etiology without complications)に分類した。NGSはIon Personal Genome Machineを使用して対象18遺伝子の塩基配列を解読し、2種類の解析ツール(CLC Genomics Workbench、Ion Reporter)によりバイオインフォマティクスを用いて分子遺伝学的診断を行った。対象遺伝子の塩基解読領域はIon Ampliseq designerによりカスタムメイドした。

サブ解析として分子遺伝学的診断のついた患者の在胎週数、出生体重、発症月齢、血液生化学データ(T.Bil、D.Bil、AST、ALT、GGT、総コレステロール、総胆汁酸)を疾患群間で多重比較を行った。血液データは乳児期のD.Bil頂値の頃に統一した。検定には

GraphPad Prism 6.05 を使用し、Kruskal-Wallis nonparametric one-way analysis of variance の後 Dunn' multiple comparison test を行った。p 値 0.05 未満を有意とした。

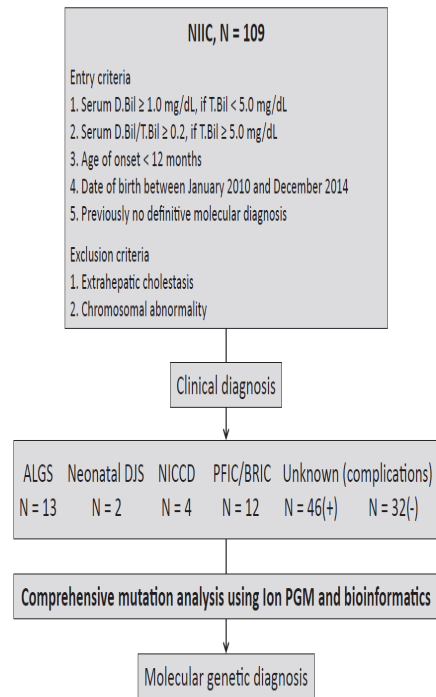


Figure 1. Flow diagram of the study and study subjects.

Table 1. The panel of 18 targeted genes

Gene name	Disorder/function	No. exons	No. amplicons	Total no. targeted bases	% of coverage of target sequence
JAG1	ALGS	26	35	3657	99.9
NOTCH2	ALGS	35	63	7602	97.9
ABO22	DJS	32	44	4638	99.7
SLC25A13	NICCD	19	28	2116	99.1
AT7B1	PFIC1/BRIC1	27	45	3756	99.1
ABO11	PFIC2/BRIC2	27	43	3966	99.0
ABO34	PFIC3	28	44	4068	97.6
TJP2	PFIC4, FHCA	27	38	4158	95.6
HSD17B7	BAS	7	9	1170	100
AKR1D1	BAS	10	12	999	99.6
CYP7B1	BAS	6	17	1521	92.6
VP333B	ARCS1	23	23	1854	100
BAAT	FHCA	3	10	1257	100
EPHX1	FHCA	8	15	1368	100
SLC10A1	NTCP	5	10	1050	98.7
ABO1	MDR1	27	46	3843	99.2
SLC4A2	A2	24	38	3759	98.6
SLC01A2	OATP-1	14	26	2013	96.9
Total		348	546	52795	99.5

A2: anion exchange protein 2; ARCS1: arthropodosis, renal dysfunction and cholestasis syndrome-1; BAS: bile acid synthetic defect; FHCA: familial hypercholesterolemia; MDR1: multidrug resistance protein 1; No., number; NTCP, Na(+)/taurocholate transport protein; OATP-1, organic anion transporting polypeptide 1.

4. 研究成果

全 109 例を解析した .Genetic cholestasis 群は 31 例で、臨床診断は ALGS 13 例、新生児 Dubin-Johnson 症候群(DJS) 2 例、NICCD 4 例、PFIC/BRIC 12 例であった。Unknown etiology with complications 群 46 例、unknown etiology without complications 群 32 例であった。Unknown etiology with complications 群の主な合併症は、周産期異常(31 例)、感染症(7 例)などであった。

28 例(26%)で分子遺伝学的診断がついた。内訳は ALGS 12 例(JAG1 11 例,NOTCH2 1 例)、新生児 DJS 5 例(ABCC2 5 例)、NICCD 5 例(SLC25A13 5 例)、PFIC/BRIC 6 例(ATP8B1 2 例, ABCB11 4 例)であった。サブグループ別にみると、genetic cholestasis 群 22/31 (71%; ALGS 11 例、新生児 DJS 2 例、NICCD 4 例、PFIC/BRIC 5 例)、unknown etiology with complications 群 2/46(4.3%; ALGS 1 例、PFIC/BRIC 1 例)、unknown etiology without complications 群 4/32(12.5%; 新生児 DJS 3

例,NICCD 1 例)で分子遺伝学的診断がついた。

診断のついた 4 疾患群間で統計学的検討を行うと、在胎週数、出生体重、発症月齢、D.Bil、AST、ALT、GGT で有意差を認めた。ALGS は AST/ALT、GGT で高値(272/196 IU/L,645 IU/L)、新生児 DJS は早期発症し(0 ヶ月)、D.Bil 高値(11 mg/dL)、AST/ALT 低値(25/16 IU/L)であった。NICCD は発症が遅く(4 ヶ月)、D.Bil 低値(2.6 mg/dL)であった。PFIC/BRIC は GGT 低値(17 IU/L)であった(括弧内中央値)。

Genetic cholestasis 群において、分子遺伝学的診断がついた 22 例は全て臨床診断と一致していた。これは本症において臨床診断の重要性を示すが、一方で 6 例の原因不明患者が分子遺伝学的解析をもとに正確な診断を得ることができた。この 6 例のうち 3 例は、DJS 責任遺伝子 ABCC2 の病原性変異をもち新生児 DJS と診断された。DJS は従来稀な疾患であると考えられてきた。しかし、本研究で同定された病原性変異の日本人保因率を計算すると約 1/54 人であった。両アレル性に病原性変異を持つ日本人は約 1/12,000 人である。本邦では原因不明の胆汁うっ滞とされている患者の中に DJS 患者が存在する可能性がある。

我々の遺伝子パネルと NGS を用いた遺伝子解析手法は、本症患者の分子遺伝学的診断確定に有用である。臨床診断のなされた本症患者はもとより、原因不明の胆汁うっ滞例についても分子遺伝学的所見を考慮した診断を行うべきである。

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 6 件)

Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Ohashi K, Negishi Y, Kudo T, Ito R, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Saitoh S. Molecular Genetic Dissection and Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis Using Targeted Next-Generation Sequencing. *J Pediatr.* 171:171-7; 2016 査読有.10.1016/j.jpeds.2016.01.006.

Ito S, Hayashi H, Sugiura T, Ito K, Ueda H, Togawa T, Endo T, Tanikawa K, Kage M, Kusahara H, Saitoh S. Effects of 4-phenylbutyrate therapy in a preterm infant with cholestasis and liver fibrosis. *Pediatr Int.* 58:506-509; 2016 査読有.10.1111/ped.12839

Kawase K, Sugiura T, Nagaya Y, Yamada T, Sugimoto M, Ito K, Togawa T, Nagasaki R, Kato T, Kouwaki M, Koyama N, Saitoh S. Single nucleotide polymorphisms in AGTR1, TFAP2B, and TRAF1 are not associated with the incidence of patent ductus arteriosus

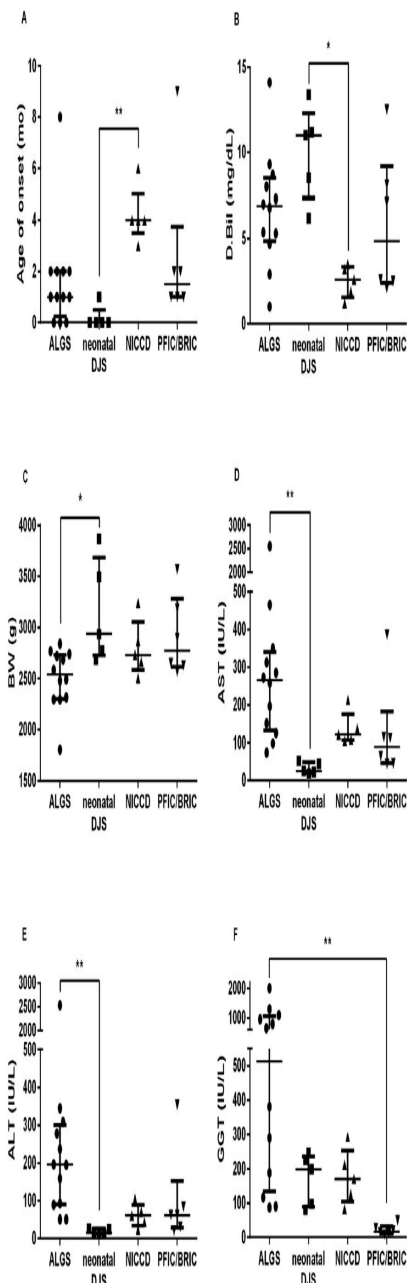


Figure 2. A, The age of onset; B, serum D.Bil; C, birth weight (BW); D, AST; E, ALT; and F, GGT were compared for the indicated groups of subjects. Kruskal-Wallis nonparametric one-way ANOVA followed by Dunn multiple comparison test were performed. *P < .05; **P < .01; error bars, IQR.

in Japanese preterm infants. *Pediatr Int.* 58:461-6;2016 査読有.10.1111/ped.12861

Goto T, Sugiura T, Awaya R, Ueda H, Mizutani E, Ito K, Nagasaki R, Kato T, Saitoh S. Survival of fetuses with severe oligohydramnios. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 43:341-4; 2016 査読有.

大江雅美子, 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 齋藤伸治. 高ウイルス量妊婦へのテノビル投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. *日本周産期・新生児医学会雑誌.* 52:874-8; 2016 査読有.

河崎翔太, 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 加藤丈典, 齋藤伸治. B 型肝炎ウイルス母子感染予防の新方式は周知されているか? *日本周産期・新生児医学会雑誌.* 52:874-8; 2016 査読有.

〔学会発表〕(計 8 件)

若野泰宏, 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 齋藤伸治, 田中靖人, 高野智子, 田尻仁, 鈴木光幸. 高ウイルス量妊婦への核酸アナログ投与による B 型肝炎ウイルス母子感染予防. 第 43 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2016.9.18 つくば国際会議場. 茨城県・つくば市

河崎翔太, 杉浦時雄, 遠藤剛, 伊藤孝一, 加藤丈典, 齋藤伸治. B 型肝炎ウイルス母子感染予防の新方式は周知されているか? 第 43 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2016.9.18 つくば国際会議場. 茨城県・つくば市

Sugiura T, Kawasaki S, Endo T, Ito K, Kato T, Saitoh S. Implementation of a new protocol to prevent mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection in Japan. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2016.10.5-8 Montreal, Canada

Ito S, Sugiura T, Togawa T, Endo T, Ito K, Saitoh S. Clinical and laboratory features in molecular genetically confirmed patients with progressive familial intrahepatic cholestasis/benign recurrent intrahepatic cholestasis. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2016.10.5-8 Montreal, Canada

Wakano Y, Sugiura T, Endo T, Ito K, Tanaka Y, Saitoh S. Tenofovir disoproxil fumarate treatment during pregnancy successfully prevented mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection. The 5th

World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2016.10.5-8 Montreal, Canada

Endo T, Ito K, Sugiura T, Hattori A, Saitoh S. Fatal hepatic hemorrhage by peliosis hepatis in a child with myotubular myopathy. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2016.10.5-8 Montreal, Canada

Ito K, Honda S, Endo T, Togawa T, Sugiura T, Saitoh S. Bilateral hypoplasia of the internal carotid artery in two Japanese patients with Alagille syndrome. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2016.10.5-8 Montreal, Canada

Kawasaki S, Ito K, Endo T, Sugiura T, Miyake Y, Saitoh S. Successful pegylated interferon therapy for chronic hepatitis B in 5-year-old child patient. The 5th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 2016.10.5-8 Montreal, Canada

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 時雄 (SUGIURA, Tokio)

名古屋市立大学大学院医学研究科 講師
研究者番号: 10381881