

令和元年6月20日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09710

研究課題名(和文)トランスジェニックマウスと細胞発現系を用いた母乳性黄疸の解明と管理法の作成

研究課題名(英文) Making of the management method for breast milk jaundice using transgenic mice

研究代表者

丸尾 良浩 (MARUO, YOSHIHIRO)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：80314160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：母乳性黄疸の安全管理のため症例解析を行いUGT1A1の変異を同定した。母乳性黄疸を起こすUGT1A1\*6 (p.G71R)多型はGilbert症候群の原因でもあった(Maruo Y. J Pediatr 2016)。低出生体重児でもUGT1A1\*6は母乳性黄疸の原因(Yanagi T. J Pediatr 2017)、核黄疸の危険因子でもあった(投稿中)。「早産児核黄疸の総括的診療ガイドラインの作成」(AMED研究、ID:17824886)に取り組んでいる。カリフォルニア大学サンディエゴ校との共同研究でp.G71Rヒト化UGT1Aマウスを作成した。今後、日本国内に導入し研究を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母乳性黄疸は後期新生児期にみられる母乳栄養に関連する遷延性高ビリルビン血症である。多くの赤ちゃんにみられ、核黄疸の危険性がある場合もある。そのため母乳性黄疸の背景を明らかにして、管理法を確立することは子育てをする家族や赤ちゃん自身の健康に寄与する。また、超早産児の核黄疸発生を予防するための研究にもつながら、社会に広く貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：For the safety management of breast milk jaundice (BMJ), I performed analysis of UGT1A1 gene in infants with BMJ. I revealed UGT1A1\*6 (p.G71R) variant which is a genetic cause of BMJ is also important cause for Gilbert syndrome (Maruo Y. J Pediatr 2016). UGT1A1\*28 which is other important variant was also the cause of Gilbert syndrome but not a cause of BMJ. UGT1A1\*6 is also the genetic cause of BMJ in low birth weight infants (Yanagi T. J Pediatr 2017) and a risk factor kernicteric in extreme preterm infants (Yanagi T. submitted). I made p.G71R-humanized UGT1A mice in collaboration with Prof. Tukey in University of California San Diego. The mice will be brought to our laboratory and I continue further study.

研究分野：小児科

キーワード：母乳性黄疸 遺伝性非抱合型高ビリルビン血症 ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素 UGT1A1 Gilbert症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 母乳性黄疸は新生児期から生後4ヶ月頃までにみられる遷延性高ビリルビン血症であり、母乳栄養に起因する。一般には治療の必要がないが、時に血清ビリルビン値が 25mg/dl 以上となり、核黄疸(ビリルビン脳症)の原因となる。近年、低出生体重児に核黄疸が多いことが明らかになり、本研究の重要性が再認識されている。母乳栄養は乳児の栄養としては大事であるが、それによる黄疸の危険性は大きな問題である。そこで、原因を明らかにし、危険因子を有する群を核黄疸から守ることは重要である。

(2) 私たちは長らく遺伝性非抱合型高ビリルビン血症の解析を行い、ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT1A1)のUGT1A1\*6(p.G71R)多型が新生児高ビリルビン血症の危険因子であること(Maruo, et al. Pediatrics 1999)、母乳性黄疸の乳児側の危険因子であることを発見してきた(Maruo, et al. Pediatrics 2000)。UGT1A1のもう一つの主要な遺伝子多型のUGT1A1\*28はどちらの黄疸にも関わっていないことを明らかにした。研究協力者である米国カリフォルニア大学サンディエゴ校(UCSD) Tukey教授(Department of Chemistry & Biochemistry and Pharmacology)との共同研究を行い、2014年にUGT1A1の遺伝子多型の中でUGT1A1\*6が母乳性黄疸の乳児側の原因であることを明らかにした(Maruo Y, et al. J Pediatr 2014)。

(3) しかし母乳中の原因物質を含む総合的な発症メカニズムは解明されていない。これまで、母乳性黄疸のモデル動物はなかったことにもよる。研究分担者の藤原が母乳性黄疸のモデルになるトランスジェニックマウス(humanized UGT1 mouse; Tg(UGT1(A1\*1))Ugt1(-/-) mice)をUCSDのTukey教授のもとで作成し、母乳性黄疸のモデルを報告した(Fujiwara R et al. Proc Natl Sci U S A. 2010)。また、研究代表者も平成23年1月より5月にかけて、Tukey教授の研究室に滞在し、臓器特異性発現のtransgeneの作成を行い、臓器特異的(肝臓、小腸)UGT1A1発現のトランスジェニックマウス作成中である。もう少しで母乳性黄疸の発症メカニズムを総合的に解明できると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 母乳性黄疸症例において、臨床像とUGT1A1の変異の検索を行い、母乳性黄疸をひきおこす児側の要因(UGT1A1の多型や変異など)を検索する。

日本人におけるUGT1A1の遺伝的背景と

(2) 培養細胞を用いた発現実験を行い、UGT1A1を強制発現させ、様々な母乳中に含まれる物質を用いUGT1A1のビリルビン抱合活性を阻害するものをスクリーニングする。

(3) 得られた疑義物質を藤原(研究分担者)の持つhumanized UGT1 miceに投与し、実際に黄疸をきたすかの検討を行う。

(4) 母乳性黄疸の乳児側の原因としてUGT1A1\*6アレルが重要である。このアレルをもつhumanized UGT1 miceはまだ存在しない。そこで、臓器特異的発現をするTg(UGT1(A1\*6))Ugt1(-/-) mice 研究協力者の米国UCSD、Tukey教授との共同で作成する(すでに作成にとりかかっている)。得られたマウスに原因物質を投与し、児側の要因であるUGT1A1の多型変異と、母乳中の原因物質の影響を解析し、総合的に母乳性黄疸の発症メカニズムを解明する。このマウスの作成は重要であり、研究期間以降も、継続してTukey教授との共同研究をつづけてゆく必要があると考えている。

(5) 母乳性黄疸の乳児側の原因と、母乳側の原因を明らかにすることにより、著しい黄疸の危険因子を明らかにして、安全な管理ができるように提言してゆく。

## 3. 研究の方法

(1) 母乳性黄疸症例における遺伝的原因となるUGT1A1の変異の検索を行う

(2) 培養細胞を用いた発現実験系を用い、UGT1A1を強制発現させ、母乳中物質のUGT1A1のビリルビン抱合の阻害実験

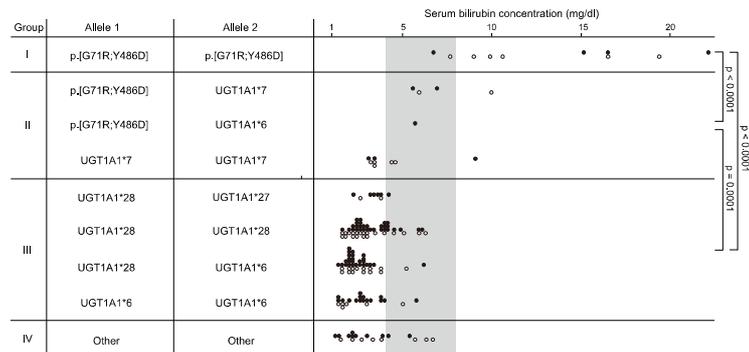
(3) ヒト化 UGT1 マウスを用いた、in vivo における母乳性黄疸誘発物質の検討

(4) 臓器特異的に UGT1A1 を発現するヒト化 UGT1 マウスの作成

#### 4. 研究成果

(1) 母乳性黄疸の安全な管理のため母乳性黄疸症例のビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の解析を行い UGT1A1 の変異を多数同定した。新規の変異を同定した。また、日本人における UGT1A1 のアレルと小児期以降にみられる同じ UGT1A1 の変異により生ずる Gilbert 症候群および Crigler-Najjar 症候群 2 型の症例の変異とを比較したところ、UGT1A1\*6 と UGT1A1\*28 の各々ホモ接合体および UGT1A1\*6 と UGT1A1\*28 の複合ヘテロ接合体の症例は小児期以降は同じように軽症の高ビリルビン血症、Gilbert 症候群を起こすことが判明した。UGT1A1\*6 は東アジア固有の変異で、UGT1A1\*28 は日本人だけでなく白人、黒人にも多型として存在する。これまでの

研究では新生児期は UGT1A1\*6 のみが新生児期の黄疸に関与したが、乳児期以降においては Gilbert 症候群として UGT1A1\*6 と UGT1A1\*28 が関与し、Gilbert 症候群の頻度は日本人、白人、黒人では差がなく、乳児期には UGT1A1\*6 をもつ東アジア人



Maruo Y, et al. J Gastroenterol Hepatol 2016  
III群のGilbert症候群においてはUGT1A1\*28,のUGT1A1\*6の各々ホモ接合体とUGT1A1\*28,とUGT1A1\*6の複合ヘテロ接合体がいずれも同等の軽症の高ビリルビン血症を示す。

に新生児期の黄疸が多いことが明らかになった。

(2) 日本人の低出生体重児においても成熟児と同じように UGT1A1\*6 が母乳性黄疸の発症の乳児側の重要な原因であることが判明した (Yanagi T, et al. J Pediatr 2017)。この結果をもとに低出生体重児の新生児期の黄疸管理を提唱している。

(3) 超早産児の核黄疸症例の研究より、UGT1A1\*6 が核黄疸症例に有意に高く、超早産児の核黄疸の危険因子であることが判明した (Yanagi T, et al. 投稿中)。現在、この結果をもとに超早産児の黄疸管理法の開発を AMED (奥村班) で研究しており、超早産児の核黄疸 (アトーゼ型脳性麻痺) の発症を予防することを試みている。

(4) カリフォルニア大学サンディエゴ校, Tukey 教授との共同研究で p.G71R ヒト化 UGT1A1 マウスを作成した。このマウスは新生児期より黄疸をきたし、また終生軽度の高ビリルビン血症をきたすため新生児黄疸、母乳性黄疸および Gilbert 症候群のモデルになることを確認できた。日本国内に導入し、母乳性黄疸の安全な管理法の確立に使用する。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8件)

Fujiwara R, Maruo Y, Chen S, Tukey RH. Role of extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1: Advances in understanding breast milk-induced neonatal hyperbilirubinemia. Toxicol Appl Pharmacol. 2015 289(1):124-32.

Maruo Y, Nakahara S, Yanagi T, Nomura A, Mimura Y, Matsui K, Sato H, Takeuchi Y. Genotype of UGT1A1 and phenotype correlation between Crigler-Najjar syndrome type II

and Gilbert syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31:403-8.

Nomura A, Maruo Y, Taga T, Takeuchi Y. Contribution of UGT1A1 variations to chemotherapy-induced unconjugated hyperbilirubinemia in pediatric leukemia patients. *Pediatr Res.* 2016;80:252-7.

Maruo Y, Nagasaki K, Matsui K, Mimura Y, Mori A, Fukami M, Takeuchi Y. Natural course of congenital hypothyroidism by dual oxidase 2 mutations from the neonatal period through puberty. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):453-63.

Maruo Y, Mori A, Morioka Y, Sawai C, Mimura Y, Matui K, Takeuchi Y. Successful every-other-day liothyronine therapy for severe resistance to thyroid hormone beta with a novel THRB mutation; case report. *BMC Endocr Disord.* 2016;16:1.

Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Dec;138(6):1672-1680.e10.

Yanagi T, Nakahara S, Maruo Y. Bilirubin Uridine Diphosphate-glucuronosyltransferase Polymorphism as a Risk Factor for Prolonged Hyperbilirubinemia in Japanese Preterm Infants. *J Pediatr.* 2017 Nov;190:159-16.

Aiso M, Yagi M, Tanaka A, Miura K, Miura R, Arizumi T, Takamori Y, Nakahara S, Maruo Y, Takikawa H. Gilbert Syndrome with Concomitant Hereditary Spherocytosis Presenting with Moderate Unconjugated Hyperbilirubinemia. *Intern Med.* 2017;56(6):661-664.

〔学会発表〕(計 5件)

Yoshihiro Maruo, Takahide Yanagi, Robert H. Tukey. Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase Variation Is a Genetic Basis of Breast Milk Jaundice. Pediatric Academic Societies, annual Meeting, April 25<sup>th</sup>-28<sup>th</sup>, 2015, San Diego (USA)

丸尾良浩 . 新生児期の黄疸とビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) . 第14回新生児黄疸管理研究会 . 平成27年10月3日、高槻市 特別講演

Yoshihiro Maruo, Keisuke Nagasaki, Katsuyuki Matsui, Yu Mimmura, Asami Mori, Maki Fukami, Yoshihiro Takeuchi. Natural course of congenital hypothyroidism by dual oxidase 2 mutations from the neonatal period through puberty. The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th, 2016, Kyoto (Japan). 口演、一般

丸尾良浩 . ビリルビンUDP-グルクロン酸転移酵素と新生児黄疸 . 第5回大阪小児科医会総会・教育セミナー . 平成30年5月26日 大阪市 . 特別講演

丸尾良浩 . 新生児の高ビリルビン血症 . 第12回新生児内分泌研究会 . 平成30年9月22日 京都市、特別講演

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤原 亮一

ローマ字氏名：Ryouichi Fujiwara

所属研究機関名：北里大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40631643

研究分担者氏名：松井 克之

ローマ字氏名：Katsuyuki Matsui

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60595924

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Robert H Tukey

ローマ字氏名：Robert H Tukey

研究協力者氏名：柳 貴英

ローマ字氏名：Takahide Yanagi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。