

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11516

研究課題名(和文)胆道閉鎖症とアラジール症候群の早期鑑別システムの確立

研究課題名(英文) Combined genetic analyses can achieve efficient diagnostic yields for subjects with Alagille syndrome

研究代表者

杉浦 時雄 (Sugiura, Tokio)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：10381881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アラジール症候群(ALGS)の臨床診断基準の5項目中3項目以上の対象をALGS群、2項目の対象を非定型ALGS群、また、術中胆道造影で胆道が造影されない対象を胆道閉鎖症(BA)群とした。全ての対象にJAG1ならびにNOTCH2を含む新生児・乳児胆汁うっ滞の原因となる18遺伝子に対するNGS解析、MLPA解析、CGHアレイ解析を行った。

ALGS群30症例、非定型ALGS群9症例、BA群17症例に遺伝学的解析を行った。ALGS群では24症例(80%)、非定型ALGSでは4症例(44.4%)に病原性変異を同定した。BA群では遺伝子変異を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症とアラジール症候群の鑑別は難しい。胆道閉鎖症では、生後2ヶ月以内の葛西手術が必要となる。一方、アラジール症候群では、葛西手術を施行すると予後が悪化する可能性がある。我々はアラジール症候群の責任遺伝子であるJAG1とNOTCH2を含めた既知の原因遺伝子18個を搭載する遺伝子解析パネルを作成した。さらにMLPA、CGHアレイを組合せた包括的遺伝子解析により、胆道閉鎖症とアラジール症候群の早期鑑別システムを確立した。胆道閉鎖症とアラジール症候群の早期鑑別に遺伝子解析は有用である。

研究成果の概要(英文)：We evaluated combined genetic analyses with targeted next-generation sequencing

(NGS), multiplex ligation probe amplification (MLPA) of Jagged1 (JAG1) genes and microarray comparative genomic hybridisation (CGH) in subjects with Alagille syndrome, incomplete clinical features of Alagille syndrome and biliary atresia. We analysed 30 subjects with Alagille syndrome, nine with incomplete Alagille syndrome and 17 with biliary atresia and detected pathogenic mutations in JAG1 or NOTCH2 in 24/30 subjects with Alagille syndrome and in 4/9 subjects with incomplete Alagille syndrome. No pathogenic mutations were detected in subjects with biliary atresia. The frequency of JAG1 mutations was as follows: single nucleotide variants (51.9%), small insertion or deletion (29.6%) and gross deletion (18.5%). Combined genetic analyses achieved efficient diagnostic yields for subjects with Alagille syndrome and incomplete Alagille syndrome.

研究分野：小児科

キーワード：アラジール症候群 胆道閉鎖症 次世代シーケンサー マイクロアレイCGH MLPA解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2012年4月から全国すべての母子手帳に、便のカラーカードが収載された。これは胆道閉鎖症などの疾患を、早期発見するためのスクリーニング検査である。胆汁うっ滞では、脂溶性のビタミンK欠乏により、出血傾向を示す。重症例では頭蓋内出血を来し、後遺症を残したり、死亡する例もある。便のカラーカードスクリーニングの導入により胆汁うっ滞の早期発見が進んだ。直接ビリルビン 2mg/dL 以上を示す胆汁うっ滞は、まず胆道閉鎖症と新生児肝炎症候群に大別される。胆道閉鎖症では、生後2ヶ月を過ぎると葛西術後の減黄率が低下する。タイムリミットがあるため、確定診断には試験開腹+術中胆道造影が必要となる。

近年、分子レベルでの病態解明が進み、多くの疾患が新生児肝炎症候群から独立した。アラジール症候群(ALGS; Alagille syndrome, 責任遺伝子 *JAG1*, *NOTCH2*)、シトリン欠損症(NICCD; neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency, *SLC25A13*)、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC; progressive familial intrahepatic cholestasis, *ATP8B1*, *ABCB11*)などがあげられる。遺伝子解析は確定診断のみならず、予後予測、治療法の選択、ドナー選択にも重要となる。

最近、次世代シーケンサー(NGS: next generation sequencer)の登場により短時間で多量の塩基解読が可能となった。我々はNGSを用い、胆汁うっ滞の患児に対し18種類の遺伝子を網羅的に解析することに成功した。胆汁うっ滞を認めた場合、ターゲットシーケンスを行い、アラジール症候群、Dubin-Johnson症候群(DJS, *ABCC2*)、NICCD、PFICなどを診断する系を確立した。(Togawa T, Sugiura T, et al. J. Pediatr. 2016) 109例中10例で *JAG1*、1例で *NOTCH2* に遺伝子変異を認めた。そのうち1例は葛西手術が行われていた。葛西手術後も胆汁うっ滞が改善せず、生体肝移植となった。

アラジール症候群は胆汁うっ滞、心奇形、特徴的顔貌、眼の奇形、椎骨異常の5徴候をはじめ多彩な臨床症状を認める。5徴候のうち3徴候を認めると臨床的にアラジール症候群と診断されるが、2徴候のみの非典型例も存在する。

胆道閉鎖症は生後2ヶ月以内の葛西手術が必要となる。一方、アラジール症候群では、葛西手術を施行すると、かえって予後が悪化する可能性がある。アラジール症候群では肝外胆管だけでなく、肝内胆管の異常のために、逆行性胆管炎のリスクが高くなると考えられる。しかし、乳児期には特徴的な顔貌を診断するのは困難である。さらに胆道閉鎖症の中にも心奇形等他の合併症を有する症例があり、実際には鑑別が難しい。胆道閉鎖症とアラジール症候群の合併例も存在する。アラジール症候群があらかじめ診断できれば、予後が悪化する可能性のある葛西手術を回避することができる。

2. 研究の目的

これまでのNGSを用いた18遺伝子のターゲットシーケンス網羅的遺伝子解析に加え、新たに Multiplex Ligation-dependent probe amplification (MLPA)、array comparative genomic hybridization (aCGH)を組合せ、アラジール症候群の新しい包括的遺伝子診断システムを確立する。アラジール症候群だけでなく、胆道閉鎖症の症例を対象に包括的遺伝子解析を行い、胆道閉鎖症とアラジール症候群の早期鑑別システムを確立する。

3. 研究の方法

本研究では、胆汁うっ滞を認め、胆道閉鎖症、アラジール症候群、非典型例アラジール症候群が疑われる症例を対象とする。患者と同胞、両親から採取した血液、または肝臓組織からDNAを抽出する。我々は既にNGSを用い、胆汁うっ滞の患児に対し *JAG1*, *NOTCH2* を含む18種類の遺伝子を網羅的に解析するシステムを確立した。また、典型的なアラジール症候群であっても、既存の方法では、*JAG1*, *NOTCH2* に変異を認めない症例も存在する。さらに診断率を上げるためには、新たなアプローチが必要となる。そこでMLPA、全ゲノムを対象としたaCGHとより包括的な遺伝子解析を組み合わせる(図1)。

まず胆道閉鎖症、アラジール症候群が疑われる症例にNGSを用いた網羅的遺伝子解析を行う。

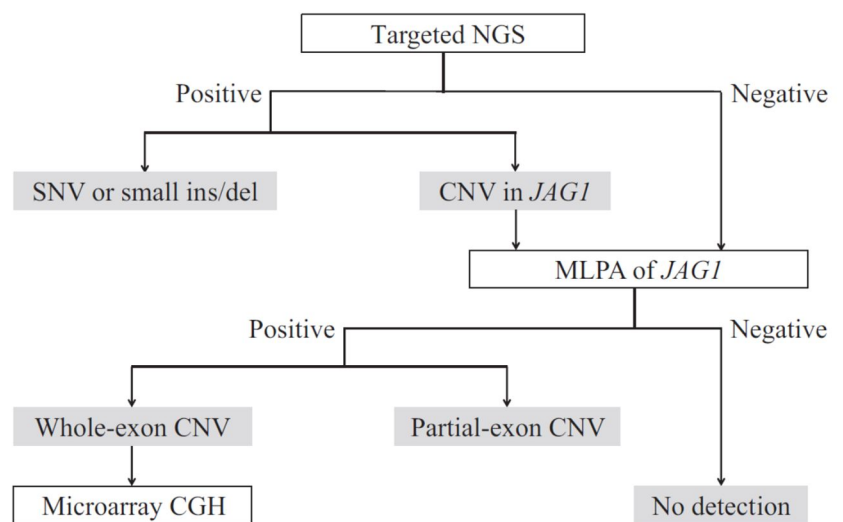


Figure 1 Flow diagram of the genetic analyses. NGS, next-generation sequencing; SNV, single nucleotide variant; ins/del, insertion/deletion; CNV, copy number variation; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; CGH, comparative genomic hybridisation.

次に NGS 解析で変異を認めなかった症例、もしくは *JAG1*, *NOTCH2* の欠失が疑われた症例に MLPA を行う。更に MLPA で *JAG1* の全エクソン欠失が同定された症例に aCGH を行う。

4. 研究成果

アラジール症候群(ALGS)の臨床診断基準の 5 項目中 3 項目以上の対象を ALGS 群、2 項目の対象を非定型 ALGS 群、また、術中胆道造影で胆道が造影されない対象を胆道閉鎖症(BA)群とした。最初に全ての対象に *JAG1* ならびに *NOTCH2* を含む新生児・乳児胆汁っ滞の原因となる 18 遺伝子に対する NGS 解析を行った。次に NGS 解析で変異を認めなかった対象、もしくは *JAG1* の欠失が疑われた対象に *JAG1* の MLPA 解析を行った。更に MLPA 解析で *JAG1* の全エクソン欠失が同定された対象に aCGH 解析を行った。

ALGS 群 30 症例、非定型 ALGS 群 9 症例、BA 群 17 症例に遺伝学的解析を行った。ALGS 群では 24 症例 (80%)、非定型 ALGS では 4 症例 (44.4%)に病理性変異を同定した(表)。

変異の種類は、ALGS 群では *JAG1* のミスセンス変異 4 症例、ノンセンス変異 6 症例、スプライス部位の変異 2 症例、微細な挿入もしくは欠失 7 症例、単一エクソンの欠失 1 症例、全エクソンの欠失 3 症例、*NOTCH2* のミスセンス変異 1 症例、また、非典型 ALGS 群では *JAG1* のミスセンス変異 1 症例、ノンセンス変異 1 症例、微細な挿入 1 症例、単一エクソンの欠失 1 症例であった。全エクソンの欠失の 3 症例中 1 症例は ALGS の症状のみとされる範囲内であったが、2 症例はその領域の範囲外に及ぶ欠失であった。これまでの報告と比較すると、各群における病理性変異の同定率はほぼ同程度、同定された病理性変異の種類は、エクソン単位の欠失が多かった。本解析では NGS 解析で変異が同定されなかった全対象に MLPA 解析を行っており、エクソン単位の欠失の同定に有効であったと考えられた。aCGH 解析において欠失範囲が ALGS 以外の症状を呈するとされる範囲に欠失が及んでいた症例では、合併症の出現の有無に関して慎重に観察する必要があると示唆された。

胆道閉鎖症とアラジール症候群の鑑別には、包括的遺伝子解析が有用である。

Table 2 Frequency and type of *JAG1* and *NOTCH2* mutations

	ALGS (n = 30)	Incomplete ALGS (n = 9)
<i>JAG1</i>		
Missense mutation	4 (13.3%)	1 (11.1%)
Nonsense mutation	6 (20.0%)	1 (11.1%)
Splice-site mutation	2 (6.7%)	0
Insertion	2 (6.7%)	1 (11.1%)
Deletion	5 (16.7%)	0
Single-exon deletion	1 (3.3%)	1 (11.1%)
Whole-exon deletion	3 (10.0%)	0
<i>NOTCH2</i>		
Missense mutation	1 (3.3%)	0
Total	24 (80.0%)	4 (44.4%)

ALGS = Alagille syndrome.

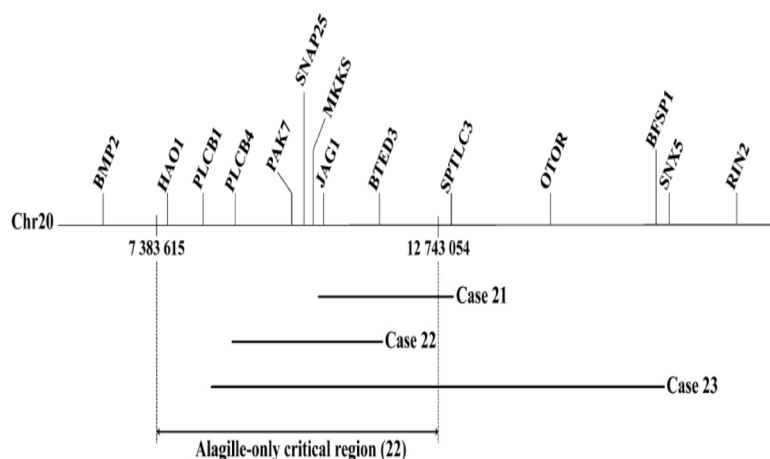


Figure 2 Map of the deletion region of each subject and the Alagille syndrome-only critical region.

< 引用文献 >

Ohashi K, Togawa T, Sugiura T, et al. Combined Genetic Analyses Can Achieve Efficient Diagnostic Yields for Subjects With Alagille Syndrome and Incomplete Alagille Syndrome. *Acta Paediatr.* 2017;106:1817-1824.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 0件）

1. 著者名 Wakano Y, Sugiura T, Endo T, Ito K, Suzuki M, Tajiri H, Tanaka Y, Saitoh S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Antiviral therapy for hepatitis B virus during second pregnancies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 566-569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.13540.	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 Nagara S, Kouwaki M, Togawa T, Sugiura T, Okada M, Koyama N.	4. 巻 59
2. 論文標題 Neurodevelopmental outcomes at 3 years old for infants with birth weights under 500 g.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Neonatol.	6. 最初と最後の頁 274-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pedneo.2017.09.005.	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 Togawa T, Mizuochi T, Sugiura T, Kusano H, Tanikawa K, Sasaki T, Ichinose F, Kagimoto S, Tainaka T, Uchida H, Saitoh S.	4. 巻 196
2. 論文標題 Clinical, Pathologic, and Genetic Features of Neonatal Dubin-Johnson Syndrome: A Multicenter Study in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr.	6. 最初と最後の頁 161-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpeds.2017.12.058.	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 田中元、杉浦時雄、須田裕一郎、渡部珠生、河辺義和、吉田忠雄	4. 巻 71
2. 論文標題 内耳髄液漏により肺炎球菌性髄膜炎を4回繰り返した幼児例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児科臨床	6. 最初と最後の頁 1071-1076
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 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 Ohashi K, Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Negishi Y, Kudo T, Ito R, Saitoh S.	4. 巻 106
2. 論文標題 Combined genetic analyses can achieve efficient diagnostic yields for subjects with Alagille syndrome and incomplete Alagille syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Paediatr.	6. 最初と最後の頁 1717-1824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apa.13981.	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 Nagara S, Kouwaki M, Togawa T, Sugiura T, Okada M, Koyama N.	4. 巻 Sep
2. 論文標題 Neurodevelopmental outcomes at 3 years old for infants with birth weights under 500 g.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Neonatol	6. 最初と最後の頁 S1875-9572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pedneo.2017.09.005.	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 Wakano T, Sugiura T, Endo T, Ito K, Suzuki M, Tajiri H, Tanaka Y, Saitoh S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Antiviral therapy for hepatitis B virus during second pregnancies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 566-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13540.2017	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 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、三善陽子、鈴木光幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第272回日本小児科学会東海地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第34回日本小児肝臓研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦時雄, 伊藤孝一, 加藤丈典, 齋藤伸治
2. 発表標題 HTLV-1(human T-cell leukemia virus type1)非流行地域における偽陽性の問題
3. 学会等名 第53回日本周産期・新生児医学会学会集會
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦時雄
2. 発表標題 見逃さないで！胆汁うっ滞
3. 学会等名 第19回京都MEK研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦時雄、大橋圭、戸川貴夫、伊藤孝一、遠藤剛、齋藤伸治
2. 発表標題 アラジール症候群と胆道閉鎖症に対する体系的遺伝学的解析
3. 学会等名 第44回日本小児栄養消化器肝臓学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sugiura T, Endo T, Ito K, Suzuki M, Tajiri H, Tanaka Y, Saitoh S
2. 発表標題 Antiviral therapy during pregnancy successfully prevented mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection.
3. 学会等名 North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	戸川 貴夫 (Togawa Takao) (10792814)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	田井中 貴久 (Tainaka Takahisa) (30378195)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	