

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08239

研究課題名(和文) 超早産児の赤血球の生化学的特徴の解明と遷延性重症黄疸感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Biochemical characteristics of erythrocytes in extremely preterm infants and identification of loci conferring susceptibility to prolonged severe hyperbilirubinemia

研究代表者

森岡 一郎 (MORIOKA, Ichiro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：80437467

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)：臍帯血(CB)中赤血球のflow cytometric osmotic fragility(FCM-OF)およびEosin 5'-Maleimide(EMA)結合能の値を測定して基準値を作成し、成人血(AP)中赤血球の値と比較した。また、遷延性重症黄疸と関連する遺伝子を同定するため、先天性溶血性貧血症例を対象に63の標的遺伝子からなる次世代シーケンサーパネルで評価した。CBとAPではFCM-OFおよびEMAの測定値に有意な差があり、CBの基準値を作成した。次世代シーケンサー解析により1歳までに溶血性貧血が自然寛解した児の中にPIEZO1に臨床的意義不明のバリエーションを有する児が存在する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから「特発性新生児黄疸」という疾患名が定着し、新生児の黄疸は原因が不明であることが一般的になっている。また、赤血球関連特殊検査の多くの項目に新生児の基準値がなかった。本研究で初めて、臍帯血の赤血球関連特殊検査のflow cytometric osmotic fragility(FCM-OF)およびEosin 5'-Maleimide(EMA)結合能の基準値を作成できた。PIEZO1の変異が一過性の溶血により重症の新生児黄疸を引き起こす可能性があることを明らかにし、原因不明だった重症新生児黄疸の原因や病態解明ができた。

研究成果の概要(英文)：Values of flow cytometric osmotic fragility(FCM-OF) and Eosin 5'-Maleimide(EMA) binding capacity of erythrocytes in cord blood(CB) were measured to generate reference values and compared with those of erythrocytes in adult blood(AP). To identify genes associated with prolonged severe hyperbilirubinemia, a next-generation sequencing panel of 63 target genes was evaluated in infants with congenital hemolytic anemia. There were significant differences in FCM-OF and EMA measurements between CB and AP. The reference values for CB were established. Next-generation sequencing analysis revealed that among children with spontaneous remission of hemolytic anemia by 1 year of age, there were those with variant of uncertain significance in PIEZO1.

研究分野：新生児医学

キーワード：赤血球 遷延性重症黄疸 臍帯血

## 1. 研究開始当初の背景

新生児黄疸を引き起こすビリルビンは、神経毒性を有し、アトーゼ型脳性麻痺や難聴を引き起こす(ビリルビン脳症と呼ぶ)。この早産児のビリルビン脳症は知的障害を有し、誤嚥性肺炎、ジストニア重積、横紋筋融解などの合併症のため小児期に約 10%が死亡する予後不良な疾患である。代表者らは、初めて全国調査を行い、我が国の早産児において毎年少なくとも 10 人以上が慢性ビリルビン脳症を発症していることを明らかにした。重症新生児黄疸の治療法は確立しているにも関わらず、発症する患者は年々増え続けている。さらに、申請者らは、ビリルビン脳症を発症した児の原因を解析したところ、早産の中でも極めて在胎週の小さい 23~26 週での超早産の出生児で発症していること、その 9 割以上の児が血中総ビリルビンの頂値が生後 2 週間以降であったこと、患者の 6 割以上はその黄疸の発症原因が不明であったことを明らかにした。つまり、超早産児の重症黄疸の多くは、原因がわからず、黄疸が長期間続く遷延性黄疸である。この遷延性重症黄疸の発症を予防するためには、従来と異なる発想での病因の解明が必要であった。

代表者は、以前よりビリルビンの産生と代謝の個人差、すなわち、ビリルビンの産生側(ヘムオキシゲナーゼ)と排泄側(UDP グルコニルトランスフェラーゼ)の主要な酵素の遺伝子多型に着目し、重症黄疸の発症の遺伝子変異の関連について研究してきた。最近、今まで重症黄疸の原因がわからなかったビリルビン脳症を発症した患者を解析し、約 3 割に UDP グルコニルトランスフェラーゼ遺伝子のホモ接合体変異を有することを世界で初めて明らかにした。しかしながら、残りは依然として、原因は不明のままであった。

本研究では、最新の赤血球特殊検査として、定量的赤血球浸透圧脆弱性試験(flow cytometric osmotic fragility: FCM-OF)と Eosin 5'-Maleimide (EMA) 結合能検査に着目した。臍帯血(umbilical cord blood: CB)を用いた検査は、赤血球の特徴の把握や遷延性重症黄疸の発症予測マーカーとして期待できるが、これまでに CB を用いた FCM-OF、EMA 結合能検査の新生児基準値に関する報告はなかった。先天性溶血性貧血(congenital hemolytic anemia: CHA)は、まず重度の新生児高ビリルビン血症として現れ、その後ビリルビン脳症に至ることがある。CHA は、赤血球膜異常、酵素異常、ヘモグロビン異常など、いくつかの既知の病原体によって引き起こされる。しかし、赤血球の形態、浸透圧脆化、酵素活性、ヘモグロビン電気泳動などの日常的な検査では、CHA の病態を特定することは困難な場合が多かった。

## 2. 研究の目的

遷延性重症黄疸の発症予測マーカーを開発するために、最新の赤血球特殊検査と網羅的遺伝子解析技術を用いて早産児の赤血球の特徴や遺伝学的背景を明らかにすることであった。本研究では、特に、CB 中赤血球の FCM-OF および EMA 結合能検査の値を測定して基準値を作成し、成人末梢静脈血(adult peripheral blood: AP)中赤血球の値と比較した。採血後の両検査の測定値の経時的な変化も比較検討した。また、遷延性重症黄疸と関連する遺伝子を同定するため、CHA 症例を対象に 63 の標的遺伝子からなる次世代シーケンサーパネルを開発し評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) CB 中赤血球の FCM-OF および EMA 結合能検査基準値の作成

帝王切開で出生した日本人新生児の CB と AP を EDTA 管に採取し、4℃ で静置保存した。検体採取日を day1 とし、day1、2、3、4、7、10、14 に FCM-OF と EMA 結合能検査を施行した。

### (2) 63 の標的遺伝子からなる次世代シーケンサーパネルの開発研究

重症新生児黄疸、胎児性貧血、早期発症新生児黄疸、新生児溶血性疾患の病歴を有する生後 12 ヶ月未満の患者を対象に詳細な検査を実施した。直接抗グロブリン試験で診断された免疫性溶血性疾患を有する乳児は除外した。ルーチンの形態学、FCM-OF、赤血球酵素分析を実施した。さらに、赤血球酵素 17、赤血球膜 13、先天性赤血球減少性貧血 5、ヘモクロマトーシス 6、非定型溶血性尿毒症症候群 13、血栓性血小板減少性紫斑病 1、その他 8 を含む 63 遺伝子次世代シーケンサースクリーニングパネルを使って同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) CB 中赤血球の FCM-OF および EMA 結合能検査基準値の作成

CB 53 名(正期産児 39 名、早産児 14 名)、AP 32 名の検体を収集した。正期産の中で 1 か月健診までに貧血・黄疸を認めた児 3 名を除外し、残りの 36 名を CB 群として基準値作成

を行った。

#### FCM-OF

FCM-OF の測定値は、どの測定日においても CB 群が AP 群より有意に高値だった (図 1)。両群とも day1 から day4 の値に差は認めなかったが、day7 以降は有意に低下した (図 3)。

#### EMA 結合能

EMA 結合能の測定値は、day1、2 は AP 群が有意に高値だったが、day10、14 は CB 群が有意に高値だった (図 2)。CB 群では day1 から day3、AP 群では day1 から day7 の値に差を認めなかった (図 3)。

FCM-OF、EMA 結合能検査ともに、CB 50 名の中で性別、在胎週数、体格、仮死の有無、NICU 入院による合併症治療の有無について比較した結果、いずれの項目にも有意差を認めなかった。

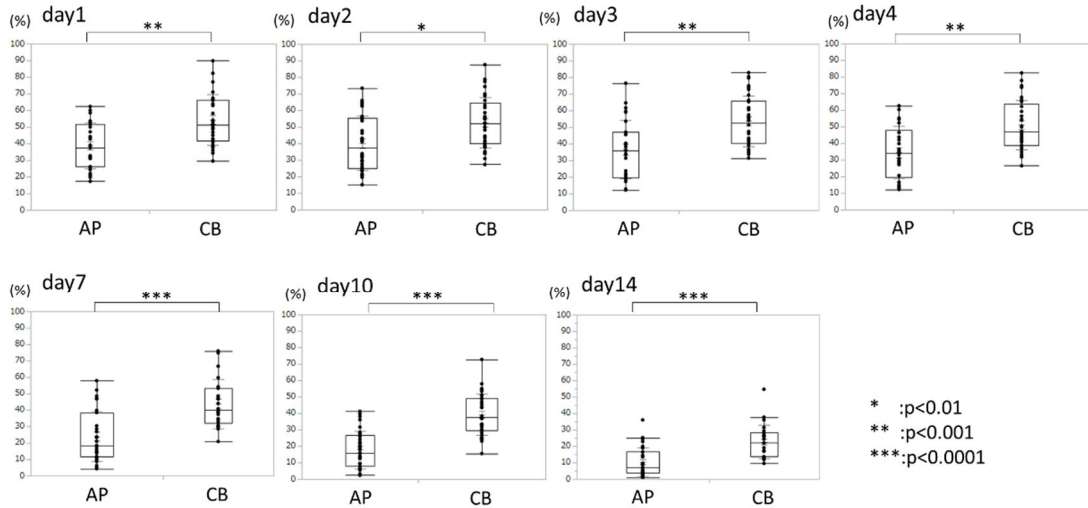


図 1. CB 中赤血球と AP 中赤血球の FCM-OF の測定値 (%RRC) の比較

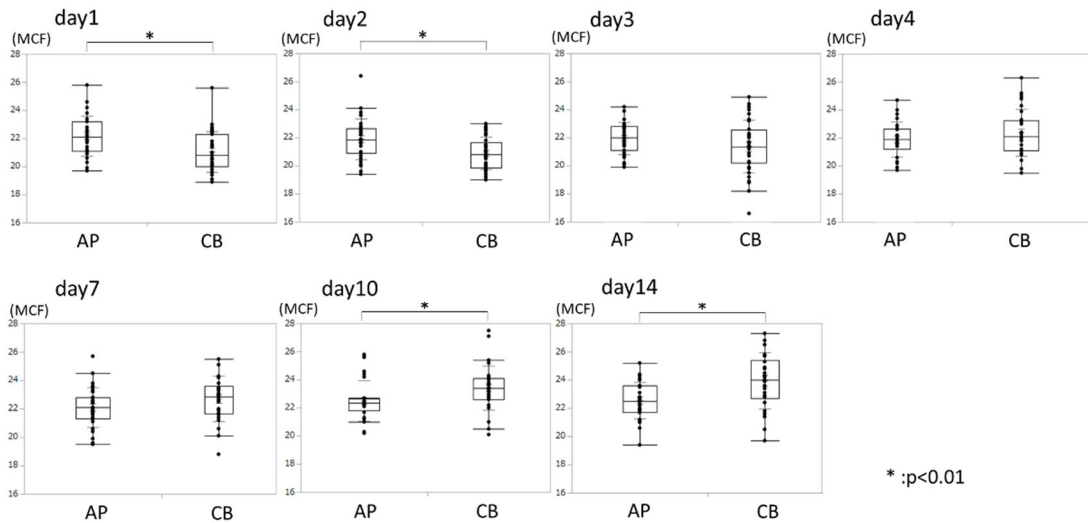
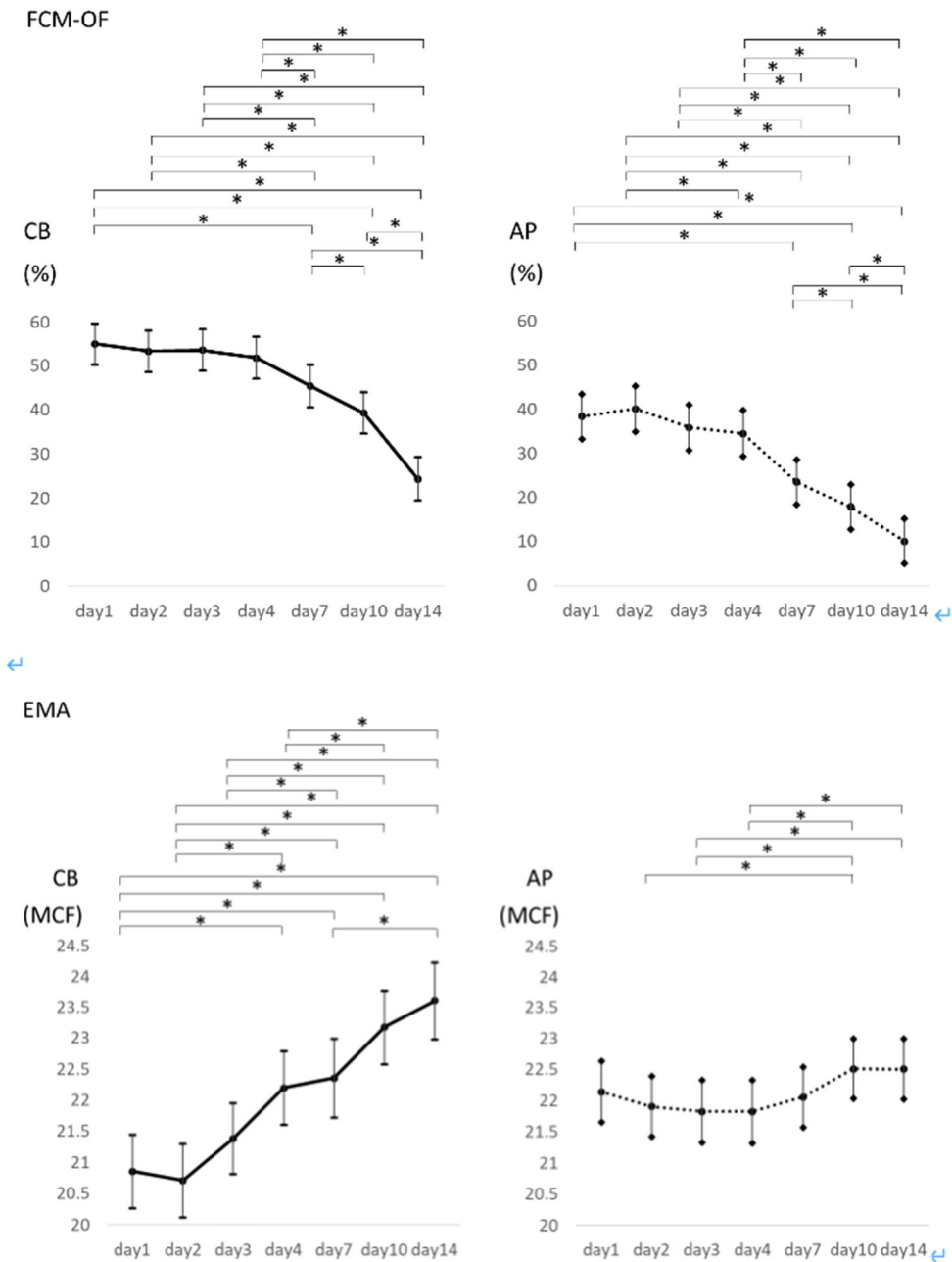


図 2. CB 中赤血球と AP 中赤血球の EMA 結合能検査の測定値 (MCF 値) の比較



\* :p<0.05

図 3. FCM-OF と EMA 結合能検査の経時的変化

(2) 63 の標的遺伝子からなる次世代シーケンサーパネルの開発研究

56 名のうち、31 名 (55%) はルーチン検査で診断され、22 名 (39%) が赤血球膜異常、4 名 (7%) が赤血球酵素異常、2 名 (4%) が不安定なヘモグロビン、3 名 (5%) がその他の原因であると判明した。残りの 25 名の原因不明の児のうち、13 名は FCM-OF テストにより浸透圧抵抗の増加を示した。5 名は 1 歳までに溶血性貧血が自然寛解した。5 名のうち 2 名では、その後の次世代シーケンサー解析により、*Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (PIEZO1)* 遺伝子に意義不明のバリエーションがあることが判明した。我々の 63 遺伝子次世代シーケンサー解析により、1 歳までに溶血性貧血が自然寛解した児の中に、*PIEZO1* に臨床的意義不明のバリエーションを有する児が存在することが明らかとなった。*PIEZO1* の変異が一過性の溶血により重症の新生児黄疸を引き起こす可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakahara E, Yamamoto KS, Ogura H, Aoki T, Utsugisawa T, Azuma K, Akagawa H, Watanabe K, Muraoka M, Nakamura F, Kamei M, Tatebayashi K, Shinozuka J, Yamane T, Hibino M, Katsura Y, Nakano-Akamatsu S, Kadowaki N, Maru Y, Ito E, Ohga S, Yagasaki H, Morioka I, Yamamoto T, Kanno H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Variant spectrum of PIEZO1 and KCNN4 in Japanese patients with dehydrated hereditary stomatocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-023-00235-y	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中原衣里菜, 菅野 仁, 山本俊至, 谷ヶ崎 博, 森岡一朗
2. 発表標題 新生児溶血性疾患の迅速な鑑別診断法～定量的赤血球浸透圧脆弱性検査法の確立～
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 中原衣里菜, 菅野 仁, 山本俊至, 谷ヶ崎 博, 森岡一朗
2. 発表標題 臍帯血赤血球を用いた赤血球膜異常症のスクリーニング法
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原衣里菜, 山本圭子, 青木貴子, 小倉浩美, 槍澤大樹, 森岡一朗, 山本俊至, 菅野 仁
2. 発表標題 Significance of comprehensive genetic testing in the diagnosis of congenital hemolytic anemia
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原衣里菜, 藤田 浩, 中原美千代, 源川 結, 伊東正剛, 吉橋知邦, 三澤正弘, 菅野 仁, 谷ヶ崎 博, 森岡一朗
2. 発表標題 Donath-Landsteiner抗体検出により早期診断と安全な寒冷暴露制限解除ができたPCHの一例
3. 学会等名 第68回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2020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	菅野 仁  (KANNO Hitoshi)  (70221207)	東京女子医科大学・医学部・特任教授   (32653)	
研究分担者	谷ヶ崎 博  (YAGASAKI Hiroshi)  (90378141)	日本大学・医学部・准教授   (32665)	

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