



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1524号
学位記番号	第1095号
氏名	戸川 貴夫
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Molecular genetic dissection and neonatal/infantile intrahepatic cholestasis using targeted next-generation sequencing (新生児・乳児肝内胆汁うっ滞症に対する次世代高速シーケンサーを用いた分子遺伝学的解析)</p> <p>The Journal of Pediatrics (in press)</p>
論文審査担当者	<p>主査： 田中 靖人 副査： 杉浦 真弓, 齋藤 伸治</p>

論 文 内 容 の 要 旨

【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。

【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。

【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) $\geq 1.0\text{mg/dL}$ (総ビリルビン (T. Bil) $\geq 5.0\text{mg/dL}$ においては $D. Bil/T. Bil \geq 0.2$) 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.

【結果】

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).

【考察】

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.

論文審査の結果の要旨

【目的】 新生児・乳児肝内胆汁うっ滞症患者に対して、次世代高速シーケンサー（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。そのうち遺伝子型と表現型の関連を分析する。

【方法】 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, 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。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, 血液生化学データを疾患群間で多重比較を行った。

【結果】 全109例を解析した。Genetic cholestasis 群は31例で, 臨床診断は Alagille 症候群 (ALGS) 13例, 新生児 Dubin-Johnson 症候群 (DJS) 2例, シトリン欠損による新生児胆汁うっ滞 (NICCD) 4例, 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) / 良性反復性肝内胆汁うっ滞症 (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。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, 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, 新生児DJSは早期発症し, D.Bil高値, AST/ALT低値であった。NICCDは発症が遅く, D.Bil低値であった。PFIC/BRICはGGT低値であった。

【結論】 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。

【審査の内容】 約20分間のプレゼンテーションの後に, 主査の田中靖人教授, 第一副査の杉浦真弓教授から質問を行った。次世代シーケンサーの機種による特性, ALGSにおける病原性変異と表現型の関係, ALGSの責任遺伝子 *JAG1* の分子学的機序, 解析対象とした18遺伝子の選択理由, 胆汁うっ滞と高ビリルビン血症の病態生理, ヒト遺伝子解析についての倫理指針を中心に19項目の質問がされた。齋藤教授からは新生児胆汁うっ滞疾患の臨床的な鑑別方法, 今回の解析対象遺伝子における遺伝カウンセリングの注意点などに関して5項目の質問がなされた。いずれの質問も概ね満足のごく回答が得られ, 学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は, 日本人新生児・乳児胆汁うっ滞患者に対して初めて網羅的遺伝子解析を行い, 臨床・研究両面において意義のある結果の得られた研究である。以上をもって本論文の著者には博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 田中 靖人 副査 杉浦 真弓 齋藤 伸治