

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791058

研究課題名(和文) 母乳性黄疸の発症予防のための遺伝子転写機構の解明のための研究

研究課題名(英文) Investigation into the cause of breast milk jaundice and the mechanism of UGT1A1

研究代表者

松井 克之 (Matsui, Katsuyuki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60595924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：健康な生後1か月の乳児50人を対象として血液検査とUGT1A1遺伝子解析を行った。血清総ビリルビン値(TB)は母乳哺育で上昇していたが、完全母乳でない場合は母乳摂取割合による差は認めなかった。TBの平均±SDは完全母乳では 8.71 ± 3.77 mg/dL、完全母乳でない場合は 4.31 ± 2.58 mg/dLであり、完全母乳であるか否かがTBに影響を与えることが判明した。

UGT1A1遺伝子の遺伝子解析も含めた解析を行った結果、完全母乳とp.G71Rのヘテロでは、それぞれでそうでない場合の約2倍にTBが上昇することがわかった。また胆道系肝機能にも大きく影響を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：At an obligatory neonatal health check at 1 month of age, a random population of 50 Japanese newborn had a blood test and a genetic test of UGT1A1. Though higher rate of breast milk in total milk intake was related to higher concentration of serum total bilirubin (TB), rate of breast milk excluding exclusive breast-fed (EBF) infants was not related to concentration of TB. Mean concentration of TB in EBF infants was higher than that in other infants (mean \pm SD; 8.71 ± 3.77 mg/dL vs. 4.31 ± 2.58 mg/dL, $p < 0.001$). Exclusive breast-feeding was considered as an important factor of hyperbilirubinemia.

Analyses of blood test and a genetic test of UGT1A1 revealed that hetero p.G71R UGT1A1 raised TB 2.0-fold higher than wild type. The impact was as same as that of EBF. Additionally, biliary function was positively correlated to TB. Biliary function had a comparable impact for TB as EBF infants and hetero p.G71R.

研究分野：体質性黄疸

キーワード：母乳性黄疸 UGT1A1

1. 研究開始当初の背景

乳児期に見られる遷延性黄疸の原因としては母乳性黄疸がもっとも多いが、他にも先天性胆道閉鎖症や溶血性貧血などが原因となることがある。母乳性黄疸が強ければ核黄疸を起こし、神経学的後遺症を残すため光線療法などの治療が必要となることがある。治療が必要でなくても症状の変化をみるために頻回の医療機関への受診が必要となる。鎮静・抗てんかん剤であるフェノバルビタールの投与や、母乳の断乳により黄疸が改善することも知られているが、より安全に母乳性黄疸を治療、さらには予防することが望まれている。

母乳性黄疸の小児側の原因としては肝細胞におけるビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) によるビリルビン代謝が不十分であるため生じることが判明している。私たちのグループは UGT1A1 遺伝子の変異により母乳性黄疸が引き起こされることを明らかとした (Maruo Y, Pediatrics 2000)。

また母乳中に含まれるプレグナンジオールにより UGT1A1 の抱合能が野生型と比して p.G71R 多型をもつ変異型では低下し、母乳性黄疸の一因となっていることも明らかとした (Ota Y, Pediatric research 2011)。しかし同時にそれだけでは十分な説明がつかず、プレグナンジオール以外にも原因となりうる物質が存在する可能性が示唆された。

UGT1A1 は出生直前直後には成人の 1% 弱しか発現していないが、生後数か月で成人のレベルに近づくことが知られている (Onishi S, Biochem J. 1979, Kawade N, Biochem J. 1981)。このときの発現増加の機構は十分とは解明されていなし。また、Gilbert 症候群は思春期以降に発症しやすくなるが、このときの変化の機構も解明されていない。これらの変化をもたらす機構と母乳性黄疸が引き起こされる機構はある程度共通していると予測される。

新生児期と思春期はともにホルモンの分泌が変化する時期であることから、これらのホルモンと UGT1A1 遺伝子の転写調節に関連している可能性が高いが、これらを解析した研究はなかった。

また黄疸増強の要因としては母乳栄養であることと UGT1A1 の p.G71R 多型を持つことが知られているが、それぞれがどの程度の影響を持つのかを直接比較した研究もなかった。

2. 研究の目的

母乳性黄疸、Gilbert 症候群などの遺伝性非抱合型高ビリルビン血症の原因遺伝子であるビリルビン UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) の発現領域および転写調節領域の遺伝子多型と各種ホルモンの関連を解析し、血清ビリルビン値に与える影響を調べる。また各種ホルモンや内因性物質、外因性物質による転写への影響を in vitro の点からも明らかとする。

新生児期および思春期における遺伝子の発現機構の変化を解明、母乳性黄疸の治療法および予防法を確立する。

3. 研究の方法

母乳性黄疸のメカニズム解明のため生後 1 か月の乳児 50 人を対象として血液検査と UGT1A1 遺伝子解析を行った。当研究は滋賀医科大学倫理委員会の承認を得て行った。対象者の保護者に事前にインフォームド・コンセントを行い、了承を得た。

実際には当院での出生時の入院期間中に本研究についての説明を保護者に行い、1 か月健診時に同意が得られた児を対称とした。

除外の基準として、溶血性貧血や肝機能障害など他に黄疸の原因となる疾患の罹患患者、明らかな基礎疾患を有するもの、全身状態が著しく悪いもの、採血困難者としたが該当する者はいなかった。

採血量は生後 1 か月児であることから必要最小限の量とし、6.0ml とした (副腎皮質ホルモン途中産物 1ml、黄疸関連遺伝子 0.5ml、アディポネクチン 1ml、肝機能・ビリルビン・電解質 0.5ml、血算 0.5ml、甲状腺機能 1ml、25OH ビタミン D1ml、PTH0.5ml)。

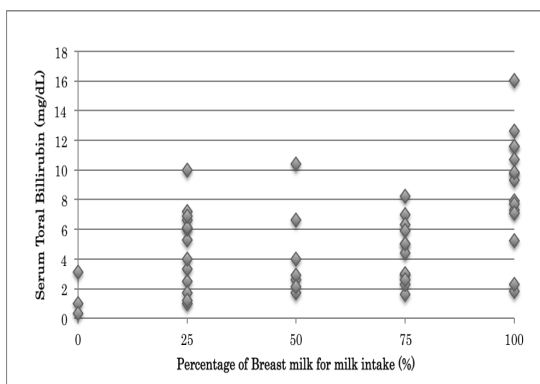
UGT1A1 の発現領域および転写調節領域の遺伝子多型の解析には PCR 法およびダイレクトシーケンス法を用いた。

母乳摂取割合 (0%、25%、50%、75%、100% の 5 段階で評価) 総ビリルビン、補正総ビリルビン (完全母乳の有無と p.G71R 多型の有無で補正) 性別、分娩形式、母体年齢、母体の出産前入院期間、在胎週数、出生時体重、4 生日の総ビリルビン値、検査時の日齢、体重増加率、ヘマトクリット、ナトリウム、カリウム、イオン化カルシウム、AST、ALT、LDH、ALP、GGTP、総胆汁酸、LAP、遊離 T4、アディポネクチン、25 水酸化ビタミン D、コルチゾール、副腎皮質ホルモン途中産物 (LC-MS/MS の一斉分析法) UGT1A1 の遺伝子

多型にて相関分析および重回帰分析を行った。解析には SPSS 22.0.1J を用いた。

4. 研究成果

血清総ビリルビン値 (TB) は母乳哺育で上昇していた。しかし完全母乳でない場合には母乳摂取割合と TB との相関性は認めなかった。そこで完全母乳であるか否かで TB を比較した。TB の平均 (±SD) は完全母乳の場合は 8.71 (±3.77) mg/dL、完全母乳ではない場合は 4.31 (±2.58) mg/dL であった。この結果から、完全母乳であるか否かが TB に影響を与えることが判明した。このことから人工乳中に黄疸軽快物質が存在する可能性が示唆された。



完全母乳の有無と UGT1A1 遺伝子の各遺伝子多型 (p.G71R、(TA)₇、c.-3279T>G) の有無で総ビリルビン値との関連性を評価した。完全母乳の有無は総ビリルビン値上昇に有意な関連があったが、UGT1A1 遺伝子の各遺伝子多型の中では p.G71R 多型のみが TB 上昇に関連していた。そこで完全母乳の有無と UGT1A1 遺伝子 p.G71R 多型の有無のみで TB に与える影響を解析した結果、TB は完全母乳群ではそうでない群の 2.1 倍に、p.G71R 多型がヘテロで存在する群では存在しない群の 1.8 倍となることが判明した。

さらに他の黄疸増悪因子を評価するため完全母乳と p.G71R 多型の存在の有無で TB を補正した補正血清総ビリルビン値 (CTB) を用いて解析を行った。CTB は 25 水酸化ビタミン D、甲状腺ホルモンやコルチゾール、副腎皮質ホルモン途中産物などのホルモンやアディポネクチンとは相関は認めなかったが、胆道系酵素 (ALP、LAP、GTP) と正の相関を示していた。総胆汁酸やその他肝臓機能 (AST、ALT、LDH) ヘマトクリットとは相関性を認めなかった。出生時体重や検査時体重、出生時の母体年齢や母体の状況にも関連は認めなかった。胆道系酵素 (ALP、LAP、GTP) の中ではステップワイズ法により LAP が最も有用な指標であることが判明した。

また CTB は検査時の日齢には関連はなく、出生時の在胎週数には関連があった。

1 か月乳児での LAP の平均 (SD) は 81.4 (±13.7) U/L であり、LAP が +2SD 値 (基準上限値) であれば総ビリルビン値は 1.6 倍に増加することが判明した。これから胆道系機能は TB に対して完全母乳や p.G71R に匹敵する影響があるということが判明した。また予定日よりも 1 週間出生が始まる毎に総ビリルビン値は 1.2 倍に増加することも判明した。

これらの結果から母乳性黄疸には完全母乳であることや UGT1A1 遺伝子の p.G71R 多型を持つことの影響が大きいものの、胆道系機能や出生時の在胎週数にも大きく影響を受けることが明らかとなった。

また完全母乳でない場合には母乳摂取割合と TB との相関関係がないことより、母乳中の物質が黄疸を増強させるわけではなく、人工乳中の物質により黄疸が軽減する可能性が示唆された。

母乳中の黄疸増悪物質だけでなく人工乳中の黄疸経過物質について物質の特定や転写活性および酵素活性に与える影響についてのさらなる調査が必要である。

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 2 件)

Maruo Y, Morioka Y, Fujito H, Nakahara S, Yanagi T, Matsui K, Mori A, Sato H, Tukey RH, Takeuchi Y.
Bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase variation is a genetic basis of breast milk jaundice.
J Pediatr. 2014 Jul;165(1):36-41.e1.
doi: 10.1016/j.jpeds.2014.01.060.
Epub 2014 Mar 17. 査読有

丸尾良浩, 中原小百合, 松井克之
【先天代謝異常症候群(第 2 版)(下)
- 病因・病態研究、診断・治療の進歩 -】
ビリルビン・胆汁酸代謝異常 遺伝性黄疸、ビリルビン代謝異常 高間接型ビリルビン血症 ジルベール(Gilbert)症候群、日本臨床別冊先天代謝異常症候群(下), 343-347, 2012 査読無

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松井 克之 (MATSUI, Katsuyuki)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60595924