

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22590725  
 研究課題名（和文） 自己免疫性肝疾患の病態・治療効果・予後と遺伝子多型および発現蛋白の網羅的解析  
 研究課題名（英文） Comprehensive analysis of the relationship between gene polymorphisms and protein expression and pathology, therapeutic value and prognosis of autoimmune liver diseases.  
 研究代表者  
 吉澤 要（YOSHIZAWA KANAME）  
 信州大学・医学部・特任教授  
 研究者番号：90220615

研究成果の概要（和文）：日本人自己免疫性肝炎の長期予後の現状を解明するため、患者間および日本人の平均寿命と比較検討した。再燃を繰り返すことが、予後悪化の原因であり、適切な免疫抑制療法、特に1度再燃後の治療が重要である。病態に関しては、多くのサイトカインが複雑に関与しているが、特に、向炎症性および Th17 系細胞の関与と IL12p40 による制御性 T 細胞の抑制の関与が示された。原発性胆汁性肝硬変の疾患感受性、抵抗性に関しては、HLA-DR-DQ ハプロタイプ、およびいくつかの遺伝子多型の関与が、GWAS を含めた解析で明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The outcome of autoimmune hepatitis (AIH) over a long follow-up period compared with that of the general Japanese population as well as that among patients. Repeated relapses of AIH are significantly associated with a poorer long-term prognosis. AIH patients can expect a similar prognosis to that of the general population, provided that they are adequately managed with continuous low doses of immunosuppressive therapy, especially after the first relapse. A complex interplay of several cytokines, especially pro-inflammatory and Th17 cytokines and regulatory T cell suppression by IL-12p40 may play a pivotal role in the pathogenesis of AIH. The roles of HLA haplotypes and several gene polymorphisms in determining primary biliary cirrhosis susceptibility and progression were clarified by SNP analysis including genome-wide association study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、疾患感受性遺伝子、遺伝子多型、ゲノムワイド解析、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの全塩基配列決定が 2003 年 4 月に完了し、ゲノム研究は本格的な機能解析、応用研究の段階に入った。今後、病気と遺伝

子との関係、とりわけ、がん、糖尿病、高血圧などの生活習慣病、慢性ウイルス性疾患、自己免疫疾患など多因子遺伝疾患の遺伝要因の解明が最重要課題である。この遺伝学的

解析の鍵となるのは、ゲノム配列の個人差：単塩基多型 SNP である。すでに、自己免疫疾患では、関節リウマチ、SLE、多発性硬化症、クローン病などでもゲノムワイド遺伝子解析が報告されている。また、高血圧や糖尿病などの common disease でも同様にゲノムワイド遺伝子解析が開始されている。2009 年には nature genetics に ゲノムワイド関連解析 (GWAS: genome-wide association study) を用い、C 型慢性肝炎のペグインターフェロン+リバビリン治療の成績と IL28B SNP の関連が発表された。SNP 解析はこのように近年急速な発展を遂げている。しかしながら、多くの疾患では、遺伝要因のほか多くの環境要因が複雑に絡んで、病態の解明には膨大な時間がかかると予想されている。それに比し、自己免疫性疾患は、遺伝的な要因がかなりの比重を占めており、いくつかの関連遺伝子が同定される可能性が高い。自己免疫性肝炎の疾患感受性においては、ヒト主要組織適合性抗原複合体である HLA との強い相関が認められることを我々はすでに報告している (Gastroenterology 103: 1041-1047, 1992)。また、他の免疫関連遺伝子の多型の関与も示唆されているが、いずれも病態の解明には不十分といわざるをえない。一方、原発性胆汁性肝硬変においても、疾患感受性に HLA をはじめいくつかの免疫関連遺伝子の多型が関与していることが報告されている。われわれも HLA との関連を報告している (Hepatology 18: 73-78 1993)。しかしながら、まだ、わずかな遺伝子についての検討しかされておらず、疾患の解明には不十分である。また、発症機序などは依然として不明であり、臨床経過にもかなりの個体差が存在し、病態の解明が重要である。すなわち、比較的若年で発症し、治療に抵抗性で、肝不全となり移植適応となる症例がある一方、長期にわたって病変があまり進行しない無症候性の症例が多数存在する。このような差異の原因が解明されれば、個々の患者に対する治療方針などもオーダーメイドに決定することができる。われわれは、すでに、自己免疫性肝炎の疾患感受性については、マイクロサテライトマーカーを用いて、第 6 染色体短腕の全 HLA 領域の網羅的解析を行い、HLA-DR、DQ 領域の重要性を再度確認し報告した (J Hepatol 42: 578-584 2005)。さらに、全染色体領域まで検索を広めて、染色体を平均 10cM ごとにカバーする 400 のマイクロサテライトマーカーによるゲノムワイド遺伝子解析を行い、少なくとも 9 個の疾患感受性遺伝子と 17 個の疾患抵抗性遺伝子の存在の可能性を示唆し、また、長期にわたって蓄積した患者臨床データとの比較解析も試みた (Hepatology 45: 384-390 2007)。このような背景や、当科において蓄積された症例のデータ、検査法をも

とに研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では自己免疫性肝疾患である、自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変を、その関連遺伝子をゲノムワイドに、さらに発現蛋白を包括的に検索して、疾患の発症機序や病態、さらに治療法を探求する。

## 3. 研究の方法

### 1) 自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変患者のデータ収集

1974 年から 2008 年（その後さらに追加）までに当院および関連施設にて診断し、詳細なデータ蓄積があり、倫理委員会の承認のもとに白血球、組織より DNA の解析の可能な患者（自己免疫性肝炎 110 名、原発性胆汁性肝硬変 250 名）の肝機能、自己抗体、合併症、治療、経過、予後を解析する。特に、良好な経過をたどるものと、治療抵抗例や、予後不良例とを分類し、下記の解析結果と照合し、分析する。

### 2) 自己免疫性肝炎疾患感受性遺伝子の構造解析

ゲノムワイド解析結果から得られた有意差のあるマイクロサテライトマーカーの近傍に存在する遺伝子を Map Viewer にて検出した後、その遺伝子構造を国際ヒトゲノム解読共同研究体 (IHGSC) や、ヒトゲノムについて蓄積された公共データベースから読み取り、これらの遺伝子のうち、機能や遺伝子配列より選択し、各エクソン、プロモーターについて SNP 構造を検索する。SNP は、サンプル DNA の long-ranged PCR で得た PCR 産物について Direct Sequencing を行い確認する。

### 3) 原発性胆汁性肝硬変の病態と遺伝子多型のゲノムワイド解析

治療抵抗性で、肝不全となり移植適応となる症例と、長期にわたって病変が進行しない無症候性の症例が存在する。これら重症症例と無症候患者を対象にした。自己免疫性肝炎と同様な手法を用いる。

### 4) サイトカイン・ケモカインの包括的測定

蛍光マイクロビーズアレイシステム LABScan™ 100 with XYP (One Lambda) を用い、自己免疫性肝炎発症時と治療後の患者血清中の 30 種類以上のサイトカイン・ケモカインを同時測定し、発症の免疫学的機序の解明を目指す。

## 4. 研究成果

### 1) 自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変患者のデータ収集

自己免疫性肝炎に関しては、症例 203 例の長期予後、治療経過、合併症、遺伝因子、自己抗体、再燃の有無を解析し、Hepatology 2012 (文献 10) に発表した (発表 5、8、9、

13). 本邦における自己免疫性肝炎の長期予後は一旦ステロイド治療で寛解すれば良好であることを示した (図 1)。さらに、2 回以上の再燃が、肝関連死に有意であり (図 2)、また、肝がんの発症にも有意に関連していた (図 3)。診断時の肝線維化の重症度、年齢や男女、HLA-DR などは予後には関連が見られなかった。再燃を繰り返さないためには、長期ステロイド治療が必要であり、1 度目の再燃後はステロイド減量も慎重に行い、長期に維持することの重要性を示した。長期ステロイド治療による副作用も、慎重な観察や適切な投薬によりある程度防げることも示した。

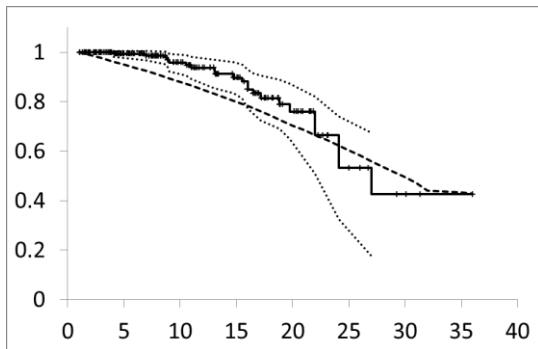


図 1 生存曲線：実線は自己免疫性肝炎患者、破線は日本人の平均余命をもとにした生存曲線 (文献 10)

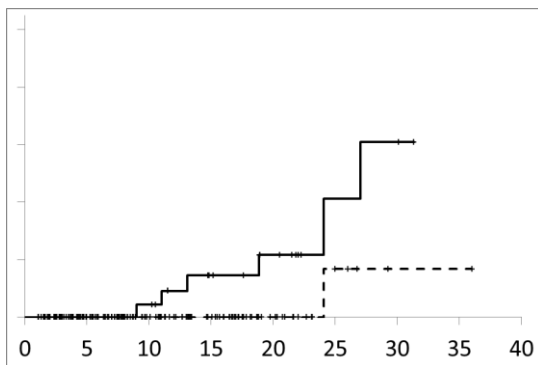


図 2 肝疾患関連死亡率：実線は 2 回以上再燃した患者、破線は 1 回再燃あるいは再燃なし患者 (文献 10)

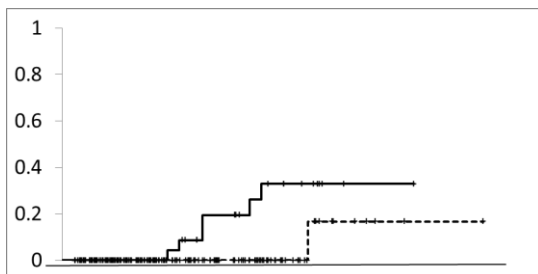


図 3 肝がん発症率：実線は 2 回以上再燃した患者、破線は 1 回再燃あるいは再燃なし患者 (文献 10)

原発性胆汁性肝硬変における HLA 領域の疾

患関連研究においては未だ十分に解析されたとはいえない。229 名の患者において、HLA class I, class II 領域を検索し、ハプロタイプ DRB1\*08:03-DQB1\*06:01 および DRB1\*04:05-DQB1\*04:01 が疾患感受性に関連していた。さらに、ハプロタイプ DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 が肝移植症例で有意に頻度が高かった (文献 9 発表 10)。

#### 2) 自己免疫性肝炎疾患感受性遺伝子の構造解析

信州大学の症例でのゲノムワイド解析 (GWAS) を行い、論文執筆中である。GWAS の結果により、長期に蓄積されたデータや DNA からさらに詳細な遺伝子解析が進むものと期待される。自己免疫性肝炎疾患感受性遺伝子 (文献 3 発表 2)、また、IgG4 関連疾患 (文献 4 発表 3) に関しては、われわれの研究成果をレビューし、発表した。

#### 3) 原発性胆汁性肝硬変の病態と遺伝子多型のゲノムワイド解析

マイクロサテライトマーカーを用いた疾患感受性遺伝子の解析から、ataxin 2-binding protein 1 の遺伝子多型が関連していることを報告した (文献 1 発表 1、4)。さらに、欧米において疾患感受性が示唆されている CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) の遺伝子多型 rs5742909 のハプロタイプ 1 (CGGA) が日本人原発性胆汁性肝硬変の疾患感受性に関連していた。しかし、抗ミトコンドリア抗体産生や肝移植への病状の進行とは関連していなかった (文献 2 発表 6、11、12)。CTLA4 ハプロタイプ 2 (ACAG) は病態の進行に関連、ハプロタイプ 3 は抗 gp210 抗体産生に関連していた (文献 6 発表 15)。また、同報告で、SLCA4A2 (solute carrier family 4 anion exchanger, member 2) ハプロタイプ 2 は病態の進行に、ハプロタイプ 2 は抗セントロメア抗体産生に関連していた。

#### 4) サイトカイン・ケモカインの包括的測定

自己免疫性肝炎の発症の免疫学的解析を行うため、28 種類のサイトカイン・ケモカインを網羅的に発症時と治療後の安定した状態で測定、比較検討した。その結果、interleukin (IL) 12p40 (図 4), IL17F (図 5), IL18 (図 6), interferon- $\gamma$ -inducible protein (IP)-10, macrophage inflammatory protein (MIP) 1 $\alpha$ , 1 $\beta$  が有意に発症時に高値で、治療後に低下していた (文献 5 発表 7)。これらから、自己免疫性肝炎発症には、Th1, Th17 細胞の関与と IL12p40 による制御性 T 細胞の抑制が重要であることを示した。

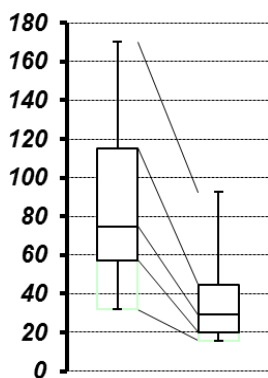


図 4. IL12p40 治療前後 (pg/ml)

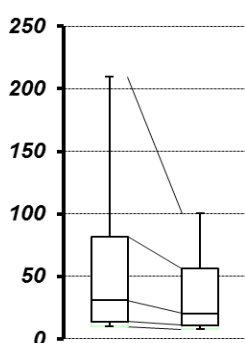


図 5. IL17F 治療前後 (pg/ml)

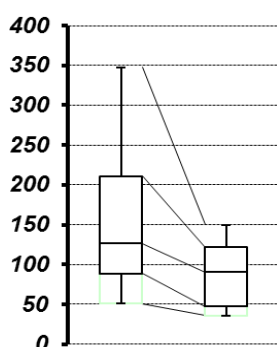


図 6. IL18 治療前後 (pg/ml)

#### 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 12 件)

1. Morita S, Joshita S, Umemura T, Katsuyama Y, Kimura T, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kamijo A, Yamamura N,

Tanaka E, Ota M. Association analysis of toll-like receptor 4 polymorphisms in Japanese primary biliary cirrhosis. Hum Immunol. 2013;74:219-22. 査読あり

2. Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamuta M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, Honda M, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Taniai M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsuhashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. Genome-wide association study identifies TNFSF15 and POU2AF1 as susceptibility loci for primary biliary cirrhosis in the Japanese population. Am J Hum Genet. 2012;91:721-8. 査読あり
3. Yoshizawa K, Matsumoto A, Ichijo T, Umemura T, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Tanaka E, Ota M, Katsuyama Y, Kiyosawa K, Abe M, Onji M. Long-term outcome of Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. Hepatology. 2012;56:668-76. 査読あり
4. Umemura T, Joshita S, Ichijo T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Ota M; Shinshu PBC Study Group. Human leukocyte antigen class II molecules confer both susceptibility and progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Hepatology. 2012 Feb;55:506-11. 査読あり
5. Tanaka A, Harada K, Ebinuma H, Komori A, Yokokawa J, Yoshizawa K, Abe M, Miyake Y, Kikuchi K, Ohira H, Zeniya M, Yamamoto K, Ishibashi H, Onji M, Nakanuma Y, Tsubouchi H, Takikawa H. Primary biliary cirrhosis - Autoimmune hepatitis overlap syndrome: A rationale for corticosteroids use based on a nation-wide retrospective study in Japan. Hepatol Res. 2011 Sep;41:877-886. 査読あり
6. Ota M, Ito T, Umemura T, Katsuyama Y, Yoshizawa K, Hamano H, Kawa S.

Polymorphism in the KCNA3 gene is associated with susceptibility to autoimmune pancreatitis in the Japanese population. Dis Markers. 2011;31:223-9. 査読あり

7. Aiba Y, Nakamura M, Joshita S, Inamine T, Komori A, Yoshizawa K, Umemura T, Horie H, Migita K, Yatsushashi H, Nakamuta M, Fukushima N, Saoshiro T, Hayashi S, Kouno H, Ota H, Muro T, Watanabe Y, Nakamura Y, Komeda T, Shimada M, Masaki N, Komatsu T, Yagura M, Sugi K, Koga M, Tsukamoto K, Tanaka E, Ishibashi H; PBC Study Group in NHOSLJ. Genetic polymorphisms in CTLA4 and SLC4A2 are differentially associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. J Gastroenterol. 2011;46:1203-12. 査読あり
8. Kamijo A, Yoshizawa K, Joshita S, Yoneda S, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Ota M, Tanaka E. Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients. Hepatol Res. 2011 Apr;41:350-7. 査読あり
9. Umemura T, Zen Y, Hamano H, Joshita S, Ichijo T, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Ota M, Kawa S, Nakanuma Y, Tanaka E. Clinical significance of immunoglobulin G4-associated autoimmune hepatitis. J Gastroenterol. 2011;46 Suppl 1:48-55. 査読あり
10. Yoshizawa K, Umemura T, Ota M. Genetic background of autoimmune hepatitis in Japan. J Gastroenterol. 2011;46 Suppl 1:42-7. 査読あり
11. Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Ota M; Shinshu PBC Study Group. A2BP1 as a novel susceptible gene for primary biliary cirrhosis in Japanese patients. Hum Immuno l. 2010;71:520-524. 査読あり
12. Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Nakamura M, Ishibashi H, Ota M; The Shinshu PBC Study Group. Association analysis of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. J Hepatol. 2010;53:537-541. 査読あり

[学会発表] (計 17 件)

1. Joshita S, Umemura T, Nakamura M, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Shibata S, Okuhara S, Nozawa Y, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Tanaka E, Ota M. Signal transducer and activator of transcription 4 gene polymorphisms are associated with

production of anti-nuclear antibody in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. アメリカ肝臓学会 AASLD 2012 2012.11.2 Boston, USA

2. Umemura T, Joshita S, Katsuyama Y, Shibata S, Kimura T, Morita S, Komatsu M, Matsumoto A, Yoshizawa K, Tanaka E, Ota M HLA DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 Haplotype is associated with progression of Primary Biliary Cirrhosis. アメリカ肝臓学会 AASLD 2012 2012.11.2 Boston USA
3. 相葉 佳洋、安波道郎、小森敦正、右田清志、八橋 弘、中牟田誠、福嶋伸良、太田 肇、石田仁也、平田啓一、渡部幸夫、小松達司、矢倉道泰、高野弘嗣、室豊吉、島田昌明、米田俊貴、山下晴弘、竹崎英一、古賀満明、小林正和、杉 和洋、正木尚彦、吉澤 要、蒔田富士雄、高木 均、西村英夫、石橋大海、中村 稔 日本人原発性胆汁性肝硬変の病態形成に関与する HLA-A, -B, -DP, -DR 遺伝子多型と CTLA-4, SLC4A2, IL12A, IRF5 遺伝子多型の検討 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7 金沢
4. 中村 稔、西田奈央、川嶋実苗、田中 篤、中牟田誠、太田 肇、竿代丈夫、高野弘嗣、吉澤 要、小森敦正、梅村武司、銭谷幹男、恩地森一、橋本悦子、大平弘正、山本和秀、金子周一、山際 訓、中尾一彦、市田隆文、滝川 一、前原喜彦、上本伸一、国土典宏、坪内博仁、溝上雅史、徳永勝士、中沼安二、石橋大海 日本人原発性胆汁性肝硬変のゲノムワイド解析 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7 金沢
5. 吉澤 要、松本晶博、梅村武司、一條哲也、城下 智、小松通治、田中栄司、清澤研道、阿部雅則、恩地森一 自己免疫性肝炎の長期予後 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7 金沢
6. Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Okuhara S, Ichikawa Y, Kimura T, Morita M, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Ota M, Tanaka E. Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. アメリカ肝臓学会 AASLD 2011 2011.11.8 San Francisco USA
7. 梅村武司、城下 智、吉澤 要 原発性胆汁性肝硬変における HLA の検討 JDDW 2011 2011.10.20 福岡
8. Joshita S, Umemura T, Nakamura M, Yoshizawa K, Ota M, Ishibashi H, Tanaka E Association analysis of

- cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, and overlap syndrome in Japanese patients. アジア太平洋消化器病週間 APDW 2011.10.1 Singapore
9. 吉澤 要、松本晶博、一條哲也、城下智、木村岳史、市川雪、森田進、上條敦、小松通治、梅村武司、田中榮司、阿部雅則、恩地森一 長期経過からみた自己免疫性肝炎からの肝発癌 第 47 回日本肝臓学会 2011.7.28 静岡
  10. 梅村武司、一條哲也、吉澤 要 自己免疫性肝炎からの肝発癌の実態第 38 回肝臓学会東部会 2010.12.3 東京
  11. 上條 敦、吉澤 要、城下 智、梅村武司、一條哲也、松本晶博、田中榮司 自己免疫性肝炎におけるサイトカインの動向と病態との関連 第 38 回肝臓学会東部会 2010.12.3 東京
  12. 城下 智、梅村武司、吉澤 要 Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 遺伝子多型と日本人の原発性胆汁性肝硬変発症に関する検討 第14回肝臓学会大会 2010.10.14 横浜
  13. 吉澤 要、松本晶博、一條哲也、梅村武司、城下 智、小松通治、上條 敦、米田 傑、森田 進、松本晶博、田中榮司、清澤研道 自己免疫性肝炎の長期予後に及ぼす因子 第 46 回肝臓学会総会 2010.5.27 山形
  14. 城下 智、梅村武司、吉澤 要、森田 進、米田 傑、上條 敦、小松通治、一條哲也、松本晶博、田中榮司 ataxin2-binding protein 1 遺伝子多型は原発性胆汁性肝硬変の疾患感受性と相関する 第 46 回肝臓学会総会 2010.5.27 山形
  15. Yoshizawa K. Genetic background of autoimmune hepatitis in Japan. 日本消化器病学会 The 2<sup>nd</sup> International Forum 2010.4.24 Niigata
  16. Umemura T. Clinical significance of immunoglobulin G4-associated autoimmune hepatitis. 日本消化器病学会 The 2<sup>nd</sup> International Forum 2010.4.24 Niigata
  17. Joshita S, Umemura T, Morita S, Kamijo A, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Tanaka E, Ota M. Ataxin 2-binding protein 1 as a novel susceptible gene for primary biliary cirrhosis in Japanese patients. ヨーロッパ肝臓学会 EASL 2010.4.16 Wien Austria

[図書] (計 1 件)

1. 吉澤 要 共著: 編集 田中榮司他 肝

疾患クリニカルスタンダード (自己免疫性肝炎他) 文光堂 2010 9-13, 71-77, 113-118, 127-130, 190-191

2.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 要 (YOSHIZAWA KANAME)  
信州大学・医学部・特任教授  
研究者番号: 90220615

(2) 研究分担者

太田 正穂 (OTA MASAO)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50115333

梅村 武司 (UMRMURA TAKEJI)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30419345

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: