

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：22701
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：26860516
研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎におけるPARVB遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Role of PARVB gene in NASH

研究代表者

馬渡 弘典(MAWATARI, Norihiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00600206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎における病気の進行にかかわる遺伝子を検索した結果PARVB遺伝子が同定された。PARVB遺伝子はその発現がメチル化などで制御されており、しかも発現量は極めて微量であった。NASHでは線維化の進展に伴いこの遺伝子の発現の増加を認めたことから線維化進展に重要な役割をしていると考えられた。さらにこの遺伝子の機能解析を行い肝硬変への進展に重要な役割をしていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the genes associated to the onset and progression of Non Alcoholic Steato-Hepatitis(NASH), and identified PARVB gene is strongly associated to NASH. We further clarify the role of this gene and finally showed that this gene plays an important role for the development of chirossis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪肝 NASH NAFLD

1. 研究開始当初の背景

GWAS(Genome-Wide Association Study)は、ゲノム全体をほぼカバーするような、50 万個以上の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) の遺伝子型を決定し、主に SNP の頻度 (対立遺伝子や遺伝子型) と、疾患や量的形質との関連を統計的に調べる方法論である。非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) は飲酒習慣がないにもかかわらず病理学的にアルコール性肝障害に類似した組織像を呈し、慢性肝炎 (NASH) から肝硬変、肝臓がんに至る疾患である。多くは肥満、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病を背景にして発症する。最近の統計では糖尿病患者の 8 人に一人は肝疾患で死亡し糖尿病死因の第一位に肝臓疾患が位置するようになり本疾患のわが国における対策は喫緊の課題であると考えられる。

NASHにおける世界初のGWAS解析はRomeoらによる *PNPLA3* (Patatin-like phospholipase domain-containing 3) の I148M variant (148 番目のアミノ酸であるイソロイシン(I)がメチオニン(M)に置換した変異 rs738409) が脂肪化と強く相関するとするものであったが(1)、その後この変異は炎症、線維化、発癌にわたる NAFLD の全てのステージに相関することが示された。我々も京都大学の堀田博士らとの共同研究を行い、日本人においても *PNPLA3* の I148M は NAFLD の疾患感受性遺伝子であることを 2010 年に報告しており(2)、最近では岡上先生らも本邦の患者で GWAS 解析を行い *PNPLA3* との相関を報告している(3)。GWAS 解析で最も重要なのは同定された遺伝子の機能解析である。*PNPLA3* に関しては動物実験などでその欠損マウス、過剰発現マウスなどで種々の検討がなされてきたが、脂肪肝の増悪などの特別な表現型を呈することがなく肝臓におけるその病的意義は不詳である(4)。また I148M の遺伝子異常を肝臓で過剰発現させた場合、脂肪化が有意にみられることが報告されているが、過剰発現で軽度の脂肪蓄積をおこすことに病的意義があるかどうかは疑問である(5)。

我々のグループは京都大学の堀田先生と共同で 392 人の NAFLD 患者と 934 人のコントロール患者のゲノムで詳細な GWAS 解析を行って *PNPLA3* 以外に *SAMM50* (sorting and assembly machinery component 50) と *PARVB* (parvin) を新たな NAFLD の疾患感受性遺伝子として発表した(6)。この 3 つの遺伝子は連鎖不均衡 (LD: Linkage Disequilibrium) の関係にあり、*PNPLA3* が最もよく調べられているのであたかもそれが原因と考えられているが、上記のようにその機能解析が混沌としている以上連鎖不均衡にある別の遺伝子が原因である可能性が高いとも考えられる。GWAS 研究の結果が出る前から、同じ連鎖不平衡内に複数の遺

伝子があれば、それ以上詰めることは遺伝統計学的には不可能であると言われており、今後は我々が今回同定したリスクアレルの機能解析が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景から研究代表者らはこの 3 つの遺伝子を含む領域の targeted resequencing (7) および、遺伝子の後天的変化であるメチル化を検討するべく targeted bisulfite resequencing を行った(8)。また、NAFLD 分子メカニズムを解明するべく、全トランスクリプトームを解析できる RNA シークエンスを行い NAFLD の線維化に関連する新たな遺伝子を見出している (未発表データ)。

3. 研究の方法

Targeted resequencing(7):

PNPLA3, *SAMM50*, *PARVB* の 3 つの遺伝子領域を 28 人の NAFLD 患者のゲノムを用いて次世代シーケンサーを用いて Targeted resequencing を行い、540 人の NAFLD 患者、1012 人の健常対照群 fine mapping を施行した。

targeted bisulfite resequencing(8): *PNPLA3*, *SAMM50*, *PARVB* の 3 つの遺伝子領域の 4 つの CpG アイランド (CpG99, CpG71, CpG26, CpG101) のメチル化を、線維化軽度症例 (線維化 stage0、1) と線維化進行例 (線維化 stage2-4) の症例で targeted bisulfite resequencing を行い検討した。これらの研究では NAFLD 患者ゲノムを用いて次世代シーケンサーで Targeted resequencing および fine mapping、targeted bisulfite resequencing を行い臨床データとの相関重要性を確認したうえで *PARVB* 遺伝子に焦点を絞って機能解析を行ったものである。

4. 研究成果

Targeted resequencing(7):

この解析で *PNPLA3* と同様に *PARVB* は NAFLD の病態に相関しているが、*PARVB* は肝生検病理組織との対比で線維化と最も強く相関していることを見出した。

targeted bisulfite resequencing(8):

PARVB の遺伝子領域に存在する CpG26 が線維化進行群で低メチル化、*PNPLA3* の遺伝子領域に存在する CpG99 が線維化進行群で高メチル化していることを見出した。

NASH/NAFL の病態は依然不詳であるが、我が国を含め先進国ではその患者数は急増しておりその解明は急務である。近年 C 型肝炎においては我が国の研究成果により GWAS 研究が治療効果の予測など大きな臨床的成果を上げている。しかるに NASH 分野では *PNPLA3* の機能解析が混沌としておりいまだ未解決である。もっとも重要な研究は *PNPLA3* の機能解析であることは疑う余地がないがこれまで国内外の多くの研究者

が機能解析において何ら意義ある知見を見いだせてない。したがって現在の世界的知見を俯瞰した場合、より重要な真のリスクアリルは *PNPLA3* と連鎖不均衡にある別の遺伝子や、今までに報告のない遺伝子である可能性が考えられる。

今回我々が本邦の多数例の患者で行った GWAS 解析で同定された NAFLD の疾患感受性遺伝子である *PARVB* は肝細胞のバルーニングや NAS スコアでは、*PNPLA3* よりも強い疾患相関性を認めている。また、*PNPLA3* と *PARVB* の後天的遺伝子変化であるメチル化も NAFLD における線維化とも強い相関を認めた。この点で現状の我々は当該疾患の遺伝子解析では世界先端に位置していると考えている、また、近年の分子生物学手法の発達により、より素早く、より安価に様々な解析方法が可能となっている。現在、NAFLD 患者における全トランスクリプトーム解析を行うことが可能な RNA シーケンスを行っており、新規の NAFLD 線維化に多大な関与を持つと考えられる遺伝子はいくつか見出している。この点で我々はこれまでの成果から世界的に優位性・独創性があるものと確信している。*PARVB* や新規の遺伝子が肝臓の線維化促進をきたす機序を解明していくことが今後の目標である。

<引用文献>

1. Romeo S, et al. Nat Genet 40:1461-1465
2. Hotta K, Yoneda M, Nakajima A et al. Med Genet 11:172
3. Kawaguchi T, et al. PLoS One 7:e38322
4. Basantani MK. J Lipid es. 2011 Feb;52(2):318-29.
5. Li JZ et al. J Clin Invest. 2012 Nov 1;122(11):4130-44.
6. Kitamoto T, Nakajima A et al. Hum Genet. 2013 Jul;132(7):783-92.
7. Kitamoto T, Nakajima A, et al, J Hum Genet. 2014, 59, 5, 241-246.
8. Kitamoto T, Yoneda M, Nakajima A, et al. J hepetology, 2015, 63, 2, 292-502.

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)

Tomeno W, Kawashima K, Yoneda M, Saito S, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Saito S, Hirayasu Y, Nakajima A. Nonalcoholic fatty liver disease comorbid with major depressive disorder: the pathological features and poor therapeutic efficacy. J Gastroenterol Hepatol. 査読有. 2015 Jun;30(6):1009-14.doi:10.1111/jgh.12897.

Imajo K, Hyogo H, Yoneda M, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Taguri M, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Saito S, Sumida Y, Ono M, Wada K, Nakajima A, Eguchi Y. LDL-Migration Index (LDL-MI), an Indicator of Small Dense Low-Density Lipoprotein (sdLDL), Is Higher in Non-Alcoholic Steatohepatitis than in Non-Alcoholic Fatty Liver: A Multicenter Cross-Sectional Study. PLoS One. 査読有. 2014 Dec 26;9(12):e115403. doi: 10.1371/journal.pone.0115403. eCollection 2014.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬渡 弘典 (MAWATARI, Hironori)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00600206

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()