

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06908

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変の病態進展に関連する遺伝要因の探索

研究課題名(英文) Searching for the genetic factors predisposing to PBC

研究代表者

川嶋 実苗 (KAWASHIMA, Minae)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員

研究者番号：00396706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：中年女性に好発し、肝不全に至ると肝移植以外には救命方法が無い難病として知られる原発性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis:PBC)の発症メカニズムや病態の進展に関連する遺伝要因を、大規模な対象に対してゲノムワイドに探索することで、診断や予後予測、治療の対象となり得る要因を検出することを目的に研究を実施してきた。ゲノムワイド関連解析において検出されたPBCの発症に関連する遺伝要因(PRKCB遺伝子、HLAアリル、ORMDL3とGSDMB発現を変えるバリエーション)や、層別化解析によって検出された病態の進展に関連する遺伝要因(NELFC-CTS領域)を報告した。

研究成果の概要(英文)：Primary biliary cholangitis (PBC) is a chronic and progressive cholestatic liver disease, presumably caused by autoimmune reactions against biliary epithelial cells, leading to liver cirrhosis and hepatic failure. The incidence and prevalence of PBC range from 0.33 to 5.8 and from 2 to 40 per 100,000 inhabitants, respectively, in different geographical areas. Additionally, it is much more common in women, with a sex ratio of at least 7:1 female to male. The high concordance rate in monozygotic twins compared to dizygotic twins and familial clustering of PBC patients indicates the involvement of strong genetic factors in the development of PBC. For the identification of susceptibility genetic factors for pathology, progression, and pathology of PBC, a genome-wide association study (GWAS) and classification analyses were performed in a large number of Japanese individuals (1381 PBC cases and 1505 healthy controls). Functional analyses in vivo and in silico were also performed.

研究分野：Human Genetics

キーワード：PBC 遺伝要因探索 ゲノムワイド関連解析 replication study 層別化解析 国際共同研究

## 1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis: PBC) は中年女性に好発する胆汁うっ滞性肝疾患で (日本人一般集団において 2,000 人に 1 人程度) 進行すると全身の掻痒感、食道静脈瘤、腹水、黄疸、脳症が出現し、肝不全に至ると肝移植以外には救命方法が無い難病である。自己免疫的機序により肝臓内の小型胆管の破壊が起こると考えられているが、詳細については不明であり、根治的治療法も開発されていない。PBC は家族内集積性が高いこと ( $s = 10.5$ )、一卵性双生児一致率が高いこと (60%) から、遺伝要因の関与が示唆されている (PBC の診療ガイドライン, 2012, 厚生省)。

ヒトゲノムプロジェクトや HapMap プロジェクト以降、様々な疾患において一塩基変異 (single nucleotide variants: SNVs) によるゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) が行なわれてきた。遺伝要因の関与が示唆される PBC においても例外ではなく、ヨーロッパ系集団を用いた GWAS によって新規疾患感受性遺伝子 (IL12A、IL12RB2) が 2009 年に報告されたのを皮切りに、イタリア・カナダ・イギリスからメタ解析を含む GWAS による感受性遺伝子同定の報告が相次ぎ、2011 年までにヨーロッパ系集団の感受性遺伝子が合計 21 か所報告された (Hirshfield et al., 2009, N Engl J Med; Hirshfield et al., 2010, Nat Genet; Liu et al., 2010, Nat Genet; Mell et al., 2011, Nat Genet)。同定された疾患感受性遺伝子の多くは T 細胞の活性化、T 細胞・B 細胞の分化や成熟、TNF-NFkB シグナル伝達などの炎症や免疫応答に関連した分子をコードする遺伝子であった。

日本人集団においては、連携研究者の中村先生を中心として、2010 年 10 月より国立病院機構ネットワーク研究班 (32 施設) や厚生労働省難治性疾患克服研究事業 (28 施設) など全国規模で血液検体の収集が行なわれ、同じく連携研究者である東京大学徳永先生のチーム (申請者および西田先生含む) が SNP アレイ (60 万 SNVs) を用いた遺伝子型決定を実施した。最終的には PBC 患者 487 名および対照健康者 476 名のゲノム DNA を用いた GWAS および PBC 患者 787 名および対照健康者 615 名のゲノム DNA を用いた Replication Study を行ない、ヨーロッパ系集団では報告されていなかった新規の感受性遺伝子 2 つ (TNFSF15、POU2AF1) を 2012 年に報告するに至った (図 1) (Nakamura et al., 2012, Am J Hum Genet)。また、既にヨーロッパ系集団において関与が報告された 21 か所の内、10 か所 (CD80, IKZF3, IL7R, NFKB1, STAT4, TNFAIP2, CXCR5, MAP3K71P1, rs6974491, DENND1B) が日本人においても感受性遺伝子 (領域) であることが確認され (図 1) ヨーロッパ系集団と日本人集団では異なる遺伝子であるが同じシグナル伝達系や

リンパ球の分化・成熟の経路に存在する遺伝子であり、“パスウェイ”として捉えていくことの重要性が明らかになった (図 2)。

PBC では、約 9 割の症例において観察される抗ミトコンドリア抗体 [anti-mitochondrial antibody: AMA]をはじめ、抗 gp210 抗体・抗セントロメア抗体・抗 sp100 抗体といった抗核抗体の出現および他の自己免疫疾患の合併率が高いことが特徴である。これらの自己抗体や合併症は PBC の病態進展と大きくかかわっており、生命予後予測因子としても有用である。PBC の病型は大きく分けて 3 型あるが (緩徐進行型、門脈圧亢進症先行型、黄疸肝不全型) 抗 gp210 抗体は黄疸肝不全型において、また、抗セントロメア抗体は門脈圧亢進症先行型において高率に陽性化する。これらの要因に関連する遺伝要因を探索することは、PBC の病態メカニズムを理解する上で非常に重要なことであり、関連する遺伝子が特定されることで、予防・早期診断・治療法の選択のエビデンスとなる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の発症メカニズムや病態の進展に関与する遺伝要因を探索し、診断や予後予測、治療の対象となりうる要因を検出することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 対照群と比較して PBC 患者群において頻度に差のある変異が集積しているパスウェイを決定する。Luo et al. が 2010 年に発表した Linear Combination Test (LCT) を Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) や BioCarta database に登録されているパスウェイを対象として、日本人 PBC の GWAS について実施し、対照群と比較して頻度が異なる変異が集積するパスウェイを決定する。また、そのパスウェイが他集団においても観察されたか確認する (Kar et al., 2013, Genes and Immun)。

(2) 抗 gp210 抗体の有無に関連する遺伝子多型を同定する。約 60 万 SNVs の遺伝子型決定を行なった 1,389 名の PBC 患者群を、抗 gp210 抗体陽性群と陰性群に分けて比較し (418 陽性例 vs 982 陰性例) 抗 gp210 抗体の有無に関連する遺伝子多型を同定する。

## 4. 研究成果

2012 年に我々が報告した日本人 GWAS において用いた PBC 患者集団は 487 名であり、層別化解析を進めるためには統計学的なパワーが低いと、寄与度が小さい遺伝要因を逃してしまうことが懸念された。そのため、以前と同じ SNP アレイを用いた遺伝子型決定を更に PBC 患者 902 名に対しても行ない、合計 1,389 名の PBC 患者集団の遺伝子型決定し、拡大 GWAS (PBC 患者群: 1381、対照健

常者群: 1505) を実施したところ、新規の PBC 関連遺伝子を 1 つ (PRKCB 遺伝子) 見つけることに成功した (発表論文)。また、様々な集団において関連が検出されているものの、強い連鎖不平衡状態 ( $r^2 > 0.6$ ) が 200kb 以上に渡って続き、4 つの遺伝子が領域内に存在しているために真に関与している変異の特定が困難な PBC の発症に関連する領域 (17q12-21) について、以下の詳細な *in silico* / *in vivo* 解析を実施することで、当該領域において一義的に関与する遺伝要因を同定することに成功した (研究成果)。

当該領域の High-density association mapping を実施。これにより、GWAS では検出されなかった、更に強い関連を示す変異 (rs163800) を検出することができた ( $OR = 2.16$ ,  $95\% CI = 1.62-2.87$ ,  $P = 8.57 \times 10^{-8}$ )。

Regulome DB を用いた *in silico* 解析により、rs163800 周辺に存在する強い連鎖不平衡状態 ( $r^2 > 0.8$ ) にある 4 つの変異が transcriptional regulatory elements の中に存在し、疾患群において高頻度で観察されたアリルが遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性について DNase hypersensitivity cluster analyses や転写因子の結合部位予測、eQTL 解析によって絞り込まれた。GTEx portal database により、mRNA 発現に影響を及ぼす変異探索を行った。*in silico* 解析により絞り込まれた変異に対してルシフェラーゼレポーターアッセイを実施することにより、転写活性への影響を確認した。Hi-C database 解析により Chromatin interaction を検出した。

様々な集団において強い関連が見られるものの、こちら強い連鎖不平衡により解析がそれほど進んでいなかった Human Leukocyte antigen (HLA) 領域の詳細な解析も実施した (研究成果)。これまで HLA-A、-B、-DRB1、-DQA1、-DQB1、-DPA1、-DPB1 遺伝子について genotype を決定した 1200 名の PBC 患者さんと 1196 名の関連解析およびハプロタイプ解析を行うことで、DQB1\*06:04 アリル及び DQB1\*03:01 アリルが疾患抵抗性に寄与していることが分かったと共に、これらのアリルによって補正すると、DPB1\*02:01 アリルが関与することも新たに分かった。

更に、PBC 患者計 1893 名を対象とした層別化解析 (PBC 患者において観察される自己抗体 [抗 gp210 抗体陽性 vs 陰性、など] や重症度 [Stage 1-3] により比較) を実施した。その結果、PBC 患者集団における抗 gp210 抗体保有の有無に関する明確な遺伝要因の検出には至らなかったものの、PBC の進展 (重症度 [Stage 1 vs Stage 3]) に影響を及ぼしていることが示唆される遺伝要因 (NELFCD 遺伝子と CTSZ 遺伝子領域) を検出することに成功した。また、PBC の重症度と強い関連のある変異の genotype による発現量の違いも検出することができ、当該領域で一義的に影響を及ぼす変異を同定することができた (発表

論文: 2018 年 5 月に公開済み)。今後は、検出力を更に上げるべく PBC 患者集団の数を増やし、他の phenotype (抗ミトコンドリア抗体 [anti-mitochondrial antibody: AMA]、抗セントロメア抗体、抗 sp100 抗体といった PBC 患者集団において観察される抗核抗体の有無や他の免疫性疾患の合併 [シェーグレン症候群、関節リウマチ、橋本病など]、肝機能検査値 [アルブミン、総ビリルビン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼなど]、薬剤応答性) についても、寄与度が小さい遺伝要因を引き続き探索する予定である。

パスウェイ解析については 2013 年に報告された Linear Combination Test を、遺伝子内の TOP HIT、連鎖不平衡の状態、統計解析手法の選択、どの程度の有意差まで重み付けに加えるか等、条件を振って実施したが、新規パスウェイの明らかな関与は検出されなかった。同様に、DEPICT によるパスウェイ解析も試みたが、予想通り自己免疫応答関係のパスウェイの関連を検出したが、単点解析以上に強い関連を見出すことはできなかった。

国際共同研究を英国ケンブリッジ大学、伊国 Humanitas 大学、米国アルバート大学、中国山東大学等と以下の解析について実施している。PBC は女性の罹患率が高いことから、各大学で実施した SNP アレイ解析に対して同じ方法で QC、補正、関連解析を行った上で、X 染色体についてメタ解析を実施。SNP アレイ解析により Genotype を決定した全染色体上の変異を対象として、同じ方法により Imputation を実施し、メタ解析を実施。TNFSF15 遺伝子領域内の変異の関連が報告されている PBC、クローン病、ハンセン病について、その発症メカニズムへの影響の違いについて検討。SNP アレイデータを使用した Haplotype 解析。この成果は、2016 年 8 月および 2018 年 5 月に公開済み。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

Yasunami M, Nakamura H, Tokunaga K, Kawashima M, Nao Nishida, Yuki Hitomi & Minoru Nakamura, Principal contribution of HLA-DQ alleles, DQB1\*06:04 and DQB1\*03:01, to disease resistance against primary biliary cholangitis in a Japanese population., Scientific Reports, 査読有, 7, 2017, 11093-11103  
doi:10.1038/s41598-017-11148-6

Hitomi Y, Kojima K, Kawashima M, Yosuke Kawai, Nao Nishida, Yoshihiro Aiba, Michio Yasunami, Masao Nagasaki, Minoru Nakamura & Katsushi Tokunaga, Identification of the functional variant driving ORMDL3 and GSDMB expression in human chromosome 17q12-21 in primary biliary cholangitis.,

Scientific Reports, 査読有, 7, 2017, 2904-2914,  
doi:10.1038/s41598-017-03067-3

Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, et al. (計 88 名), Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population., Hum Mol Genet., 査読有, 3, 2017, 650-659  
doi: 10.1093/hmg/ddw406.

Hitomi Y, Kawashima M, Aiba Y, Nishida N, Matsushashi M, Okazaki H, Nakamura M, Tokunaga K, Human primary biliary cirrhosis-susceptible allele of rs4979462 enhances TNFSF15 expression by binding NF-1., Hum Genet., 査読有, 134, 2015, 737-747,  
doi: 10.1007/s00439-015-1556-3

〔学会発表〕(計 13 件)

M. Kawashima, NELFCD and CTSZ loci are associated with jaundice-stage progression in primary biliary cholangitis in the Japanese population., American Society of Human Genetics (ASHG), 2017

M. Kawashima, Genome-wide association study identifies PRKCB as a novel genetic factor for primary biliary cirrhosis in the Japanese population., ASHG, 2016

〔図書〕(計 1 件)

川嶋 実苗 他、羊土社、実験医学、2017 年、227 頁中 16 頁

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.humgenet.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川嶋 実苗 (KAWASHIMA, Minae)  
東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員  
研究者番号：00396706

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中村 稔 (NAKAMURA, Minoru)  
長崎医療センター・臨床研究センター・客員研究員  
研究者番号：40217906

徳永 勝士 (TOKUNAGA, Katsushi)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40163977

西田 奈央 (NISHIDA, Nao)  
国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・上級研究員  
研究者番号：50456109