

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19314

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変の感受性遺伝子多型に起因する発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of the molecular mechanisms of pathogenesis caused by PBC susceptibility polymorphisms

研究代表者

人見 祐基 (Hitomi, Yuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：10525819

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)：原発性胆汁性胆管炎(PBC)は、慢性進行性の胆汁鬱滞性肝疾患であり、胆管上皮細胞に対する自己免疫反応の関与が示唆されている一方で、その発症・進展機序は未だ不明なままである。本研究では、疾患の罹りやすさに関連する遺伝子を網羅的に探索するゲノムワイド関連解析(GWAS)を用いて、合計8カ所のPBC感受性遺伝子領域を同定した。さらに、インビュテーション解析・in silico解析・in vitro機能解析などを駆使し、それぞれの遺伝子領域において、発症に直接寄与する機能的遺伝子多型(causal variant)の同定、および、causal variantに起因するPBC発症機序の解明に至った。

研究成果の概要(英文)：Primary biliary cholangitis (PBC) is a chronic and cholestatic liver disease that is caused by the autoimmune destruction of bile ducts. In this study, we identified eight susceptibility gene loci for PBC by genome-wide association study (GWAS). Additionally, disease causal variants in these loci and their molecular mechanisms for disease susceptibility in PBC were clarified using Single Nucleotide Polymorphism (SNP) imputation analysis, in silico analysis, and in vitro functional analysis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ゲノムワイド関連解析 原発性胆汁性胆管炎 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性胆管炎 (PBC) は、慢性進行性の胆汁鬱滞性肝疾患であり、胆管上皮細胞に対する自己免疫の関与が示唆されている一方で、その発症や進展機序は未だ不明なままである。一卵性双生児一致率は60%に達し、他の自己免疫疾患と比較しても極めて高率であることに加え、家族集積性も見られることから、PBCの発症には遺伝要因の強い関与が示唆されている。

近年のゲノム解析技術の進歩により、疾患感受性に関連する遺伝子多型を、全ゲノムにわたり網羅的に探索する遺伝統計学的手法である、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施することが可能となり、様々な疾患において感受性遺伝子領域が続々と同定されている。申請者らの研究グループも含め、PBCを対象としたGWASも複数発表された (Nakamura *et al*, *Am J Hum Genet* 2012 など)。

その一方で、GWASによって明らかとなるのは「疾患感受性遺伝子領域」のみであり、PBC発症に直接寄与する機能的な遺伝子多型 (primary functional variant) の同定、および、それに起因する発症メカニズム解明に関しては、未だ世界中のいずれのグループからも報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、データベースを利用した *in silico* 解析や、細胞や患者検体を利用した機能解析および発現解析を駆使することによって、それぞれの日本人PBC感受性遺伝子領域内の primary functional variant の同定に加え、primary functional variant に起因するPBC発症メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイド関連解析 (GWAS)

894例のPBC患者および1,029例の日本人健常者を用いたGWASを実施した。Replication setとして512例のPBC患者および6,512例の日本人健常者を用いた。

(2) PBC感受性遺伝子領域内の遺伝子多型の網羅的検出

共同研究機関である東北大学メディカル・メガバンク機構 (ToMMo) が保有している全ゲノムシーケンズリファレンスパネル (1KJPN) を参照配列として、上記GWASデータを用いた全ゲノムインピュテーション解析および high-density association mapping (ヒトゲノム中の全遺伝子多型を対象とする症例対照関連解析) を実施した。そこから、日本人PBC感受性遺伝子として同定

された *TNFSF15*, *PRKCB*, chromosome17q12-21 を対象にデータを抽出した。

(3) Primary functional variant の選定・発症メカニズムの解明

上記解析にてPBC感受性との強い関連を示した遺伝子多型を対象に、RegulomeDBやUCSC genome browserにおけるDNase high sensitivity siteやH3K27Acなどのデータを利用し、発現制御に寄与する可能性がある遺伝子多型を、primary functional variantの候補として抽出した。

それらの遺伝子多型を対象に、EMSAおよびLuciferase assayを用いて、それぞれの疾患感受性遺伝子領域における primary functional variant を同定した。

さらに、TRANSFACデータベースおよびSuper-shift assayにて、primary functional variantにて結合の強さが変わる転写因子を同定した。

最後に、発現量的遺伝子座 (eQTL) 解析データベースのGTExを利用し、primary functional variantによって遺伝子発現量が制御される遺伝子 (effector gene) を同定した。

4. 研究成果

(1) GWAS

日本人PBCを対象としたGWASにて、*HLA*, *TNFSF15*, *POU2AF1*, *IL7R*, *PRKCB*, *NFKB1/MANBA*, chromosome 17q12-21, *ETS1* を、疾患感受性遺伝子領域として同定した (図1, Kawashima *et al*. *Hum Mol genet* 2017)。これらの遺伝子領域のうち、*PRKCB*はPBC感受性遺伝子として初めて同定された。

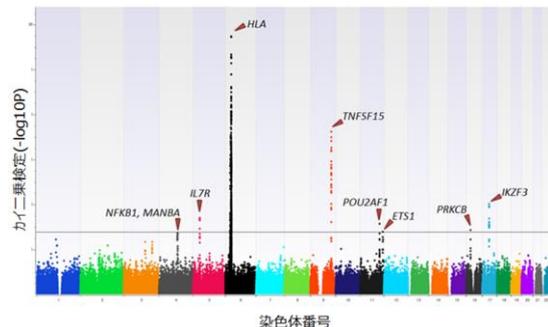


図1 日本人PBCを対象としたGWAS (横軸はマーカーとなるSNPが存在する染色体上の位置、縦軸はPBCとの関連の強さを示し、縦軸の高い位置にあるSNPほど、疾患との関連が強い)

(2) *TNFSF15*

GWASにて*TNFSF15*領域において最も強い疾患感受性との関連を示したrs4979462、および、このSNPと連鎖不平衡 ($r^2 > 0.8$) の関係にある31か所のSNPsを対象にした*in silico*解析の結果、rs4979462、rs56211063、

rs55768522 が最終的な primary functional variant の候補として残った。これらの SNPs を対象にした *in vitro* 機能解析の結果、rs4979462 を primary functional variant として同定した。

この SNP によって、転写因子 NF-1 の結合における allele 間の差が認められた。また、effector gene は *TNFSF15* であった。(図 2、Hitomi Y *et al.* Hum Genet 2015)

以上の知見により、疾患感受性アリルを有する集団においては、*TNFSF15* 発現亢進によりヘルパーT 細胞のバランスが乱れることにより胆管に対する自己免疫反応が惹起されやすいということが想定される。

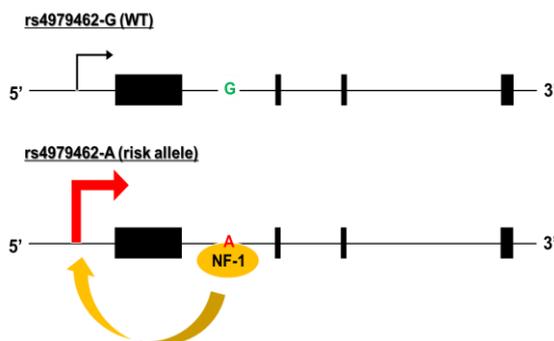


図 2 rs4979462 の疾患感受性アリルでは、NF-1 が結合することで、*TNFSF15* 発現量を亢進させる。

(3) *PRKCB*

GWAS にて *PRKCB* 領域において最も強い疾患感受性との関連を示した rs7404928 と連鎖不平衡 ($r^2 > 0.9$) の関係にある 11 か所の SNPs を対象にした *in silico* 解析の結果、rs7404928 および rs35015313 が最終的な primary functional variant の候補として残った。

これらの SNPs を対象にした *in vitro* 機能解析の結果、rs35015313 を primary functional variant として同定した。また、effector gene は *PRKCB* であった。(Kawashima M *et al.* Hum Mol genet 2017)

(4) Chromosome17q12-21

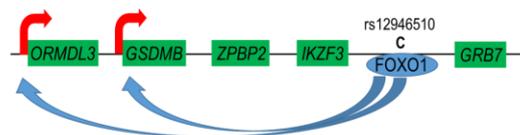
GWAS にて Chromosome17q12-21 領域において強い疾患感受性との関連 ($P < 1.0 \times 10^{-8}$) を示した 23 か所の SNPs を対象にした *in silico* 解析の結果、rs9303277、rs113897057、rs2313430、rs12946510 が最終的な primary functional variant の候補として残った。これらの SNPs を対象にした *in vitro* 機能解析の結果、rs12946510 を primary functional variant として同定した。

この SNP によって、転写因子 FOXO1 の結合における allele 間の差が認められた。また、effector gene は、rs12946510 近傍の *IKZF3* ではなく、rs12946510 から約 200kb 離れた *ORMDL3* および *GSDMB* であった。(Hitomi Y *et al.* Sci Rep 2017)

以上の知見により、疾患感受性アリルを有

する集団では、Th2 細胞への分化に重要だと報告されている *ORMDL3* 発現量が比較的少なく Th1 細胞や Th17 細胞優位になることから、胆管に対する自己免疫反応が惹起されやすいということが想定される。

抵抗性アリル



感受性アリル



図 3 rs12946510 の疾患感受性アリルでは、FOXO1 の結合が減弱することで、*ORMDL3* および *GSDMB* 発現量が減弱している。

(5) 総括

本研究においては、GWAS・次世代シーケンサー・機能解析の組み合わせにより、PBC 発症に直接寄与する遺伝子多型を感受性遺伝子領域中から絞り込む方法を開発した。さらに、複数の PBC 感受性遺伝子多型による発症メカニズムを、世界で初めて明らかにすることができた。

本研究で得られる成果を手がかりとして、モデルマウスなどを用いた個体レベルでの病因・病態研究に加え、遺伝子多型の情報を元に新規に開発された薬剤や「発症予測キット・副作用予測キット」の実用性・安全性を検証するための、臨床研究等へと発展することが期待される。

<引用文献>

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, Yatsushashi 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* 91: 721-8, 2012.
doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.010.

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 6 件)

- ① Kawashima M (#), Hitomi Y (#), Aiba Y (#), Nishida N (#), Kojima K (#), Kawai Y, Nakamura H, Tanaka A, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Abe M, Nakao K, Yamagiwa S, Kaneko S, Honda M, Uemura T, Ichida T, Seike M, Sakisaka S, Harada M, Yokosuka O, Ueno Y, Senju M, Kanda T, Shibata H, Himoto T, Murata K, Miyake Y, Ebinuma H, Tani ai M, Joshita S, Nikami T, Ota H, Kouno H, Kouno H, Nakamura M, Kohjima M, Komatsu T, Komeda T, Ohara Y, Muro T, Yamashita T, Yoshizawa K, Kamitsukasa Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Sugi K, Ario K, Takesaki E, Naganuma A, Mano H, Yamashita H, Matsushita K, Yamauchi K, Makita F, Nishimura H, Furuta K, Takahashi N, Masaki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Komori A, Migita K, Ito M, Nagaoka S, Abiru S, Yatsushita H, Yasunami M, Shimoda S, Harada K, Egawa H, Maehara Y, Uemoto S, Kokubo N, Takikawa H, Ishibashi H, Chayama K, Mizokami M, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Genome-wide association studies identify *PRKCB* as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. (#Equally contributed) (査読有り) *Hum Mol Genet* 26(3): 650-659, 2017.
doi: 10.1093/hmg/ddw406.
- ② Hitomi Y, Kojima K, Kawashima M, Kawai Y, Nishida N, Aiba Y, Yasunami M, Nagasaki M, Nakamura M, Tokunaga K. Identification of the functional variant driving *ORMDL3* and *GSDMB* expression in human chromosome 17q12-21 in primary biliary cholangitis. (査読有り) *Sci Rep* 7: 2904, 2017.
doi: 10.1038/s41598-017-03067-3.
- ③ Yasunami M, Nakamura H, Tokunaga K, Kawashima M, Nishida N, Hitomi Y, Nakamura M. Principal contribution of HLA-DQ alleles, DQB1*06:04 and DQB1*03:01, to disease resistance

against primary biliary cholangitis in a Japanese population. (査読有り) *Sci Rep* 7: 11093, 2017.
doi: 10.1038/s41598-017-11148-6.

- ④ Sun YH, Irwanto A, Toyo-oka L, Hong MH, Liu H, Andiappan AK, Choi HC, Hitomi Y, Yu GQ, Yu YX, Bao FF, Wang C, Fu X, Yue ZH, Wang HL, Zhang HM, Kawashima M, Kojima K, Nagasaki M, Nakamura M, Yang SK, Ye BD, Denise Y, Rotzschke O, Song KY, Tokunaga K, Zhang FR, Liu JJ. Fine-mapping analysis revealed complex pleiotropic effect and tissue-specific regulatory mechanism of *TNFSF15* in primary biliary cholangitis, Crohn's disease and leprosy. (査読有り) *Sci Rep* 6: 31429, 2016.
doi: 10.1038/srep31429.
- ⑤ Hitomi Y, Kawashima M, Aiba Y, Nishida N, Matsushita M, Okazaki H, Nakamura M, Tokunaga K. Human primary biliary cirrhosis susceptible allele of rs4979462 enhances TNFSF15 expression by binding NF-1. (査読有り) *Hum Genet* 134: 737-747, 2015.
doi: 10.1007/s00439-015-1556-3.
- ⑥ Aiba Y, Yamazaki K, Nishida N, Kawashima M, Hitomi Y, Komori A, Kubo M, Tokunaga K, Nakamura M. Disease susceptibility genes shared by primary biliary cirrhosis and Crohn's disease in the Japanese population. (査読有り) *J Hum Genet* 60(9): 525-31, 2015.
doi: 10.1038/jhg.2015.59.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 人見祐基、相葉佳洋、中村稔、徳永勝士
「Identification of the disease causal variants in human primary biliary cholangitis (PBC) susceptibility gene loci NFKB1/MANBA」日本免疫学会、2017年12月(口頭発表)
- ② 安波道朗、中村仁美、徳永勝士、川嶋実苗、西田奈央、人見祐基、中村稔
「Principal contribution of HLA-DQ alleles, DQB1*06:04 and DQB1*03:01, to disease resistance against primary biliary cholangitis in a Japanese population」日本免疫学会、2017年12月(口頭発表)
- ③ 人見祐基、仲谷健、小島要、西田奈央、河合洋介、川嶋実苗、相葉佳洋、長崎正朗、中村稔、徳永勝士「Identification

of the primary functional variants in primary biliary cholangitis susceptibility gene loci NFKB1/MANBA] 日本人類遺伝学会、2017年11月(口頭発表)

- ④ Hitomi Y, Nakatani K, Kojima K, Nishida N, Kawai Y, Kawashima M, Aiba Y, Nagasaki M, Nakamura M, Tokunaga K. “Identification of the primary functional variants in primary biliary cholangitis susceptibility gene loci NFKB1/MANBA.” American Society of Human Genetics, Oct 2017. (ポスター発表)
- ⑤ Kawashima M, Nishida N, Hitomi Y, Kojima K, Kawai Y, Aiba Y, Nakamura H, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. “NELFCD and CTSZ loci are associated with jaundice-stage progression in primary biliary cholangitis in the Japanese population.” American Society of Human Genetics, Oct 2017. (ポスター発表)
- ⑥ Gervais O, Ueno K, Kojima K, Aiba Y, Kawashima M, Kawai Y, Hitomi Y, Tokunaga K, Nakamura M, Nagasaki M. “GWAS polygenic model approach applied to primary biliary cholangitis (PBC) in a Japanese population.” American Society of Human Genetics, Oct 2017. (ポスター発表)
- ⑦ 人見祐基、西田奈央、相葉佳洋、安波道郎、中村稔「日本人原発性胆汁性胆管炎(PBC)感受性遺伝子領域 Chr. 17q12-21における機能的遺伝子多型(causal variant)の同定」日本肝臓学会、2017年6月(口頭発表)
- ⑧ 人見祐基、相葉佳洋、中村稔、徳永勝士「Identification of the causal variants in human primary biliary cirrhosis (PBC) by the combination of a genome-wide association study, whole-genome sequencing, and in silico/ in vitro functional analyses」日本免疫学会、2016年12月(口頭発表)
- ⑨ Hitomi Y, Kojima K, Kawashima M, Kawai Y, Nishida N, Aiba Y, Yasunami M, Nagasaki M, Nakamura M, Tokunaga K. “Identification of the primary functional variants for primary biliary cirrhosis (PBC) susceptibility loci by high-density association mapping and in silico/ in vitro functional analyses.” American Society of Human Genetics, Oct 2016. (ポスター発表)
- ⑩ Kawashima M, Hitomi Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Nakamura H, Yasunami M, Chayama K, Aiba Y, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M, PBC Consortium in Japan (PBCCSJ). “Genome-wide association study identifies PRKCB as a novel genetic factor for primary biliary cirrhosis in the Japanese population” American Society of Human Genetics, Oct 2016. (ポスター発表)
- ⑪ 人見祐基、中村稔「日本人原発性胆汁性肝硬変(PBC)の発症と関連する機能的遺伝子多型(causal variant)の同定」日本肝臓学会、2016年5月(口頭発表)
- ⑫ Hitomi Y, Kojima K, Kawashima M, Kawai Y, Nishida N, Aiba Y, Yasunami M, Nagasaki M, Nakamura M, Tokunaga K. “Imputation analysis using reference panel of 1,070 Japanese individuals (1KJPN) and in silico / in vitro functional analyses identified functional variants for primary biliary cirrhosis (PBC) susceptibility” International Congress of Human Genetics, Apr 2016. (口頭発表)
- ⑬ Irwanto A, Sun Y, Hitomi Y, Toyo-oka L, Choi H, Zhang F, Song K, Tokunaga K, Liu JJ, Andiappan AK, Rotzschke O. “Fine-mapping analysis of TNFSF15 across leprosy, Crohn’s disease and primary biliary cirrhosis” . International Congress of Human Genetics, Apr 2016. (口頭発表)
- ⑭ Yasunami M, Nakamura H, Tokunaga K, Kawashima M, Nishida N, Hitomi Y, Nakamura M. “Dissection of HLA class II in Japanese primary biliary cirrhosis: epistasis of protective HLA-DQ allele and additional contribution of HLA-DP allele.” American Society of Human Genetics, Oct 2015. (ポスター発表)
- ⑮ 安波道郎、中村仁美、徳永勝士、川嶋実苗、西田奈央、人見祐基、中村稔「ゲノムワイド関連解析から同定された日本人原発性胆汁性肝硬変発症に抑制的なHLAハプロタイプの効果」日本人類遺伝学会、2015年10月(口頭発表)

- ⑩ 人見祐基、相葉佳洋、中村稔「原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 感受性遺伝子 TNFSF15 に存在する rs4979462 は、NF-1 結合を介した TNFSF15 発現量の亢進に寄与する」日本肝臓学会、2015 年 5 月 (口頭発表)
- ⑪ 相葉佳洋、川嶋実苗、西田奈央、人見祐基、小森敦正、茶山一彰、安波道郎、徳永勝士、中村稔「日本人原発性胆汁性肝硬変の新規疾患感受性遺伝子 PRKCB, ETS1 の同定」日本肝臓学会、2015 年 5 月 (口頭発表)

[その他]

ホームページ等

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室ホームページ

(研究内容・設備/1. 疾患関連研究/1-3. 原発性胆汁性胆管炎)

www.humgenet.m.u-tokyo.ac.jp/research/1-3.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 祐基 (HITOMI, Yuki)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10525819