

令和元年6月20日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19327

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患における変異型蛋白質PTPRD R995Cの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of polymorphism of receptor-type tyrosin-protein phosphatase delta gene in the development of non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

中嶋 駿介(Nakajima, Shunsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80596289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の病態発症・進展に関わる新たな疾患関連遺伝子多型(SNP)としてHigh-throughput sequence法を用いて新規にPTPRD rs35929428を同定した。健常ボランティア群に対してNAFLD群では変異型が多く、変異型では肝組織への脂肪沈着およびFib-4高値例が多く、NAFLDの基本的病態に関連している可能性が考えられた。  
このSNPがコードする蛋白PTPRD R995Cを発現するベクターをヒト肝癌細胞株Huh7に導入して機能解析を行ったところ、変異型ではSTAT3を抑制することで肝脂肪化および線維化が誘導されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)に関連する疾患関連遺伝子多型(SNP)として従来からPNPLA3 rs738409が報告されていたが、海外ではその他複数のSNPが報告されており、研究開始段階では一定の見解が得られていなかった。今回日本人において新規に発見したSNPが、STAT3を介した肝脂肪化や肝線維化といったNAFLDの基本的病態と関連する可能性のあるSNPであったことは臨床的に意義のある成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed a high-throughput sequencing to identify a novel genetic variant in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). PTPRD rs35929428 was a novel single-nucleotide polymorphism (SNP) in patients with NAFLD. PTPRD rs35929428 associated with the development of NAFLD. In addition, PTPRD rs35929428 was associated with higher Fib-4 index and with hepatic fat droplets. Biochemical analysis in cultured hepatocytes and liver tissues indicated that PTPRD R995C, which was encoded PTPRD rs35929428, attenuated the pSTAT3 (Tyr 705) in the liver, thereby enhancing hepatic fibrosis and steatosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：PTPRD SNP NAFLD rs35929428

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) は、組織診断あるいは画像診断にて脂肪肝を認め、アルコール性肝障害などを除外した病態と定義され、一部は肝硬変や肝癌に進展する慢性肝疾患である。その基本病態として、遺伝的な素因を背景にアディポサイトカインの調節異常、脂肪毒性、Toll-like receptor、腸内細菌叢の以上および鉄過剰など複数の因子が複合的に関与する multiple parallel hits hypothesis が提唱されている。近年 Genome-wide association studies (GWAS) により NAFLD に関連する Single nucleotide polymorphism (SNP) が報告されてきた。そのうちの 1 つである *patatin like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3)*rs738409 C>G (I148M) が肝脂肪化、炎症、線維化および肝癌発症リスクに関与していることが報告された。*PNPLA3*rs738409 は日本人においても NAFLD のうち Matteoni 分類 Type 4 と相関があり、肝線維化との関連も示唆されている。しかし、詳細な機序については明らかではなく、海外では他にも複数の疾患関連候補 SNP が報告されていたが一定の見解はえられておらず、研究開始時点において日本人において *PNPLA3* 以外は強い相関を認める SNP の報告はなかった。そこで日本人 NAFLD 患者における病態発症や進展に関わる新規 SNP の探索を行い、新規 SNP の臨床的意義について解析することとした。

## 2. 研究の目的

我々は high-throughput sequencing 法を用いて、日本人 NAFLD 患者における病態発症や進展に関わる新規 SNP の探索を行い、同定された新規 SNP が NAFLD の病態にどのように関与するか機能解析を行うことを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

NAFLD 患者および健常ボランティア (control) 末梢血から Ficoll 遠心分離法を用いて単核球を抽出して DNA を抽出した。プライマーデザインは炎症、糖・脂質代謝異常、腫瘍性疾患および金属代謝に関連する 1,031 遺伝子 (12,609 アンプリコン) を論文検索により選出し、それらの遺伝子領域を増幅するプライマーデザインを作成した。DNA シーケンスは high-throughput シーケンサ Ion Proton™ (ThermoFisher) を用いて塩基配列を同定した。得られた塩基配列情報は human reference genome swquence (GRCh37/hg19) にマッピングされ、ゲノム解析用ソフトウェアを用いて解析した。アンプリコンシーケンスにおける有意差検定は Fisher's exact test を用い、 $P < 0.05$  かつアミノ酸置換を伴うものを候補遺伝子とした。その他のデータは Mann-Whitney U test または Fisher's exact test を用い、 $P < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。

肝病理組織による検討は、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、Matteoni 分類および Brunt 分離による評価を行った。肝脂肪沈着を 0 (<5%)、1 (5-10%)、2 (10-34%)、3 (34-67%)、4 (>67%) の 5 群に分類して評価した。免疫組織化学染色は Rabbit polyclonal anti-PTPRD と Rabbit monoclonal anti-phospho Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (pSTAT3) (Tyr705) を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 候補遺伝子の探索

NAFLD 患者 36 名および control 群 27 名より抽出したゲノム DNA のアンプリコンシーケンスにおいて Fisher's exact test により  $P < 0.05$  かつアミノ酸置換を伴う SNP を 7 つ同定した (図 1)。これら 7 つの SNP に対して Taqman SNP genotyping assay を行い、Cohen's kappa 係数 0.8 以上の一致率が高い SNP を 4 つ抽出した (*EXO1* rs1047840、*PTPRD* rs35929428、*IFNAR2* rs2229207、*FAM3B* rs111988437)。次に PROVEAN prediction によりアミノ酸置換が蛋白質機能に影響しているか検討したところ、*PTPRD* rs35929428 (R995C) のみが機能異常ありと判定された。

Gene	Chr/Position	SNPID	Base substitution	Amino acid substitution	Effect Freq NAFLD (%)	Effect Freq controls (%)	P-value	Cohen's kappa
EXO1	Chr1/242042301	rs1047840	G to A	E589K	16/36 (47.2)	6/27 (22.2)	0.036	1.00
PTPRD	Chr9/8485834	rs35929428	G to A	R995C	14/36 (38.9)	3/27 (11.1)	0.013	1.00
IFNAR2	Chr21/34614250	rs2229207	T to C	F8S	14/36 (36.1)	4/27 (11.1)	0.022	0.88
FAM3B	Chr21/42720579	rs111988437	G to A	M221I	7/36 (19.4)	0/27 (0.0)	0.015	1.00
CPOX	Chr3/98307696	rs1131857	T to G	N272H	8/36 (22.2)	1/27 (3.7)	0.038	0.63
IL23R	Chr1/67633812	rs1884444	G to T	G3H	18/36 (50.0)	5/27 (18.5)	0.009	0.41
IL10RA	Chr11/117864846	rs2228055	A to G	I224V	25/36 (69.4)	11/27 (40.7)	0.021	0.66

Chr/Position, the chromosome and position; Effect Freq control, frequency of the effect allele in controls; Effect Freq NAFLD, frequency of the effect allele in NAFLD; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease.

### 図 1. NAFLD における遺伝子多型の探索結果

#### (2) PTPRD 多型頻度の検討

*PTPRD* rs35929428 の多型頻度を NAFLD 群 53 例、control 群 41 例で Taqman SNP genotyping assay にて検討したところ *PTPRD* rs35929428 の GA 群は NAFLD 群の方が control

群よりも有意に多かった ( $P=0.015$ 、OR=5.00、95%CI: 1.33-18.70)。

### (3) 肝線維化と脂肪沈着との関連

NAFLD 群 53 例のうち *PTPRD* rs35929428 の GG 群(38 例)と GA 群(15 例)を比較したところ、肝線維化の指標である Fib-4 index の値が GA 群では 1.45 以上の症例が有意に多く (図 2a) (34.9% vs 7.1%)、肝生検組織標本における脂肪沈着の程度も GA 群の方が GG 群と比べて強く認めた (図 2b)。

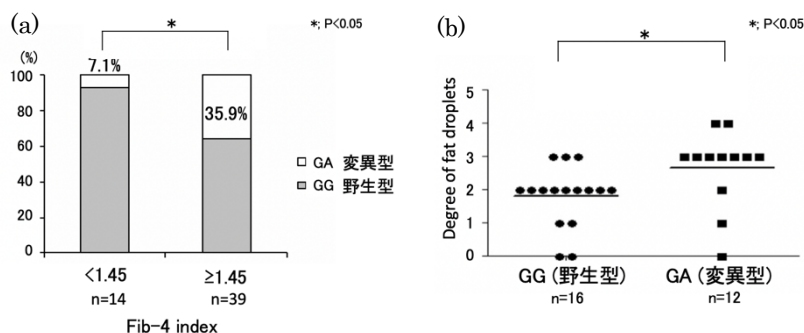


図 2. *PTPRD* rs35929428 野生型(GG 群)と変異型(GA 群)と肝線維化、脂肪化の比較

### (4) *PTPRD* rs35929428 R995C 蛋白の機能解析

ヒト肝癌細胞株 (Huh7) に *PTPRD* rs35929428 がコードする蛋白 *PTPRD* R995C を発現させ、STAT3 のリン酸化に与える影響について検討した。その結果 wild type *PTPRD* を導入した Huh7 では IL-6 刺激により STAT3 のリン酸化が亢進しているのに対し、*PTPRD* R995C を導入した Huh7 では STAT3 のリン酸化が減弱していた (図 3a, 3b)。次に NAFLD 患者の肝組織において 16 例の *PTPRD* GG 群と 9 例の GA 群で免疫組織化学染色を行い STAT3 のリン酸化を評価したところ、GG 群の方が GA 群よりも肝細胞核に強くリン酸化 STAT3 (pSTAT3) を認め、pSTAT3 陽性細胞数は GA 群が GG 群より減少していた (図 3c)。

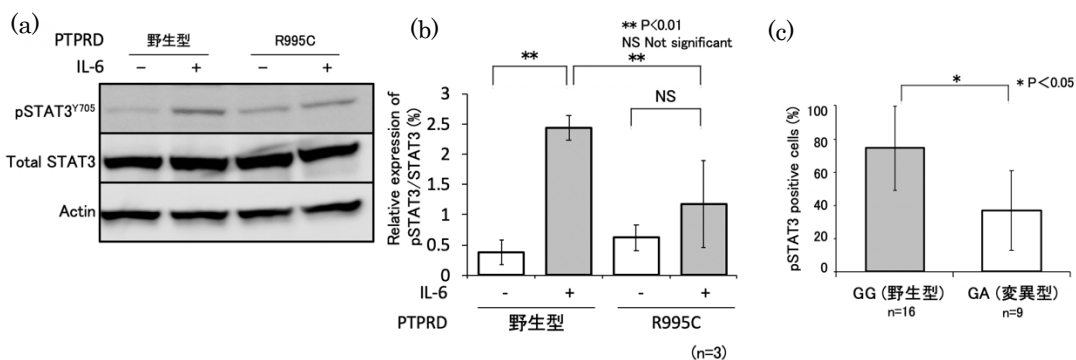


図 3. *PTPRD* R995C と STAT3 のリン酸化

今回の研究の結果、日本人 NAFLD 患者における疾患感受性遺伝子多型として新規に *PTPRD* rs35929428 を同定した。*PTPRD* rs35929428 は肝組織における STAT3 のリン酸化を減弱させることにより肝線維化および肝脂肪化に関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Nakajima S, Tanaka H, Sawada K, Hayashi H, Hasebe T, Abe M, Hasebe C, Fujiya M, Okumura T. Polymorphism of receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta gene in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 33(1), 2018, 283-290. DOI: 10.1111/jph.13820.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Nakajima S, Tanaka H, Sawada K, et al. Genetic polymorphism of *PTPRD* (rs35929428) and risk of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. The International Liver Congress 2017. 2017 年 4 月 19 日~23 日. アムステルダム
- ② 中嶋駿介, 田中宏樹, 澤田康司, 林秀美, 長谷部拓夢, 阿部真美, 長谷部千登美, 奥村利勝. ゲノム解析を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患関連遺伝子多型の探索. 第 20 回日本肝臓学会大会. 2016 年 11 月 3 日~6 日. 神戸.
- ③ 中嶋駿介, 澤田康司, 奥村利勝. NASH/NAFLD 新規遺伝子多型 *PTPRD* rs35929428 の同

定と機能解析の検討. 第 42 回日本肝臓学会東部会. 2016 年 12 月 7 日～8 日. 東京.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。