

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09416

研究課題名(和文)自己免疫性肝疾患における疾患特異的T細胞受容体の高解像度解析と病態解明

研究課題名(英文)Analysis of disease specific T cell receptors in autoimmune liver diseases

研究代表者

梅村 武司 (Umemura, Takeji)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：30419345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自己免疫性肝炎の新たな疾患感受性・疾患抵抗性にそれぞれ関わる遺伝子の解明とNK細胞の受容体であるkiller cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) 遺伝子とHLA class I遺伝子の組み合わせが病態進展、肝関連死と関連することを明らかにした。原発性胆汁性胆管炎ではオートタキシンと肝線維化が関連すること、高sCD14値と高IL-8値は予後不良と関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して原因不明の難病である自己免疫性肝炎と原発性胆汁性胆管炎の患者検体を用いて幾つかの血中バイオマーカー、ケモカイン、HLAやNK細胞の受容体などの宿主因子が発症、線維化の程度、病態の進展、生命予後に関連するという新たな研究成果を発表することができた。発見した因子を診断時に測定する事で予後を予測することが可能となれば早期から集約的な治療介入を開始することで患者さんの生命予後を延長することが可能となり得る。

研究成果の概要(英文)：We revealed several genes are associated with susceptibility and resistant to AIH. Moreover, combined KIR/HLA pair and cirrhosis at diagnosis related to AIH progression. Serum autotaxin are correlated with fibrosis in PBC. High sCD14 and IL-8 levels are associated with poor outcome of PBC.

研究分野：肝臓病学

キーワード：AIH PBC HLA KIR Autotaxin sCD14 IL-8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝疾患である自己免疫性肝炎 (AIH) と原発性胆汁性胆管炎 (PBC) は自己に対する抗体等が自己組織を誤って攻撃してしまうことで生じる慢性肝疾患で適切な治療が行われないと肝硬変・肝不全へと進行する原因不明の難治性疾患である。その発症には環境因子に加えて特定の HLA 対立遺伝子が相関を示すことが報告されており、研究代表者らは、日本人では AIH と *HLA-DRB1*04:05-DQB1*04:01*、PBC と *HLA-DRB1*08:03-DQB1*06:01* が強い関連を示すことを明らかにしてきた。HLA は特定の自己ペプチドを提示して病原性の T 細胞を活性化することにより自己免疫疾患が誘導されると推測されている。しかし、AIH と PBC では発症に関与する T 細胞受容体 (TCR) やペプチドの解明はなされていない。提示されたペプチドを認識するのは T 細胞に発現している T 細胞受容体 (TCR) であり、これらと結合することで T 細胞は活性化され、免疫応答が開始される。TCR は VDJ 再構成と呼ばれるプロセスにより得られる多様性のある集団を TCR レパトアと称する。今までに明らかにしてきた疾患感受性の HLA アレルが本疾患の発症に関わる機能的意義や、特定の HLA 分子と結合する病因ペプチドは長い間不明であった。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は次世代シーケンサーを用いて、自己免疫性肝疾患における TCR レパトアの網羅的解析により、疾患特異的 TCR の同定を行う。さらに、HLA 全領域の詳細な再解析により TCR に提示された抗原ペプチドを同定し、病態の解明、新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) 次世代シーケンサーで TCR レパトアを解析する方法を開発する。AIH と PBC の疾患発症と関連のある TCR を同定する。

(2) AIH と PBC、健常対象者から採取した血中 DNA 検体を用いて次世代シーケンサーで HLA-DRB1 領域についてリシーケンシングを行い、ゲノム配列の決定を行う。

(3) 決定したゲノム配列から自己免疫肝疾患特異的な抗原ペプチドを同定する。

3. 研究の方法

(1) リシーケンシングによる HLA-DRB1 領域のゲノム配列の決定

申請者らはこれまでの研究で集積してきた検体を用いて HLA 遺伝子のうち HLA-DRB1 の全領域を申請者らが共同で開発した SS-SBT 法で解析を行う。

(2) TCR レパトア解析法の開発

TCR は通常 TCR- α 鎖と TCR- β 鎖からなるヘテロダイマーである。よって、TCR- α および TCR- β について 2 段階の PCR を施行することで、最も重要な領域である V(D)J 領域を効率よく増幅する事が可能である。本方法ではわずかにしか存在しない TCR の検出も可能となり、TCR レパトアの全体像を解析することが可能となる。

(3) AIH、PBC における TCR レパトアの解析

AIH と PBC の TCR レパトアの決定をする。具体的には V 領域と J 領域の頻度、塩基配列、最も多様性のある CDR3 の塩基配列について IGMT データベース (<http://www.imgt.org>) を使用して決定する。患者と健常者の違いを比較検討することで疾患特異的な TCR の配列、CDR3 のアミノ酸配列を同定する。

(4) HLA に提示された抗原ペプチドの同定

IGMT データベースにて DRB1 のプロモーター領域と全てのエクソン領域についてアミノ酸配列を決定し、HLA 上のポケットに提示されるペプチドを推定する。HLA-DRB1 アレル毎に推定されたペプチドについて TCR レパトア解析で明らかになった CDR3 の配列との相同性について検討を行い、AIH と PBC における疾患特異的なペプチドを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヨーロッパの GWAS で同定された SH2B3 遺伝子多型と AIH の関連性の検討

AIH についてはヨーロッパで施行されたゲノムワイド解析関連解析で Src homology 2 adaptor protein 3 (SH2B3) 遺伝子の rs3184504 が発症に関連することが報告された。そこで、日本人の AIH でも本遺伝子が疾患発症に関連するか AIH 158 名、PBC 327 名、自己免疫性膵炎 160 名、健常者 325 名について検討を行った。欧米で報告されている rs3184504 の多型は日本人では 1 例も見つからなかった。しかし、rs11065984T アレルがコントロールと比較して有意に低率であり (corrected $P = 0.025$) 疾患抵抗性であることが判明した。さらに rs11065984T を含む推定ハプロタイプは AIH と自己免疫性膵炎で同時に抵抗性に関与していることが明らかとなった。

(2) PBC の病態進展と関連するバイオマーカーの同定

PBC についてウルソデオキシコール酸治療開始前の肝生検施行時に採取された保存血清を用いて 36 種類のサイトカイン、ケモカイン、bacterial translocation に関連するバイオマーカー、さらに保険診療では測定できないが PBC に関連する 5 種類の自己抗体を網羅的に測定し、PBC の病態進展（非代償期への移行、肝関連死）の予測が可能か検討を行った。多変量解析から血清可溶性 CD14 (sCD14) と IL-8 がそれぞれ独立した予後予測因子である事が明らかとなった。 Kaplan-Meier 解析でも高 sCD14 血症、高 IL-8 血症の PBC 患者群では予後不良である事を証明した (図 1)。自己抗体では高 gp210 抗体陽性者は予後不良であった。

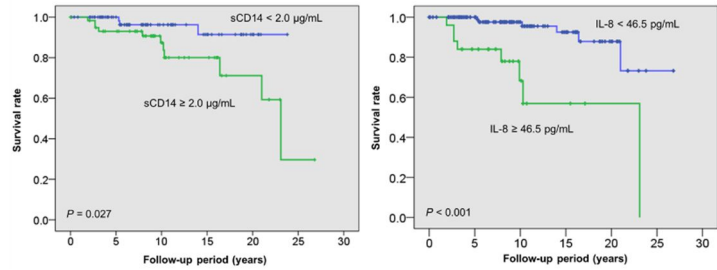


図 1 高sCD14血症と高IL-8血症を呈するPBC患者の死亡率は高い

(3) PBC における新規肝線維化マーカー：オートタキシンの有用性の検討

PBC についてウルソデオキシコール酸治療開始前の肝生検施行時に採取された保存血清を用いて新しい肝線維化マーカーであるオートタキシンを測定し、PBC の肝線維化との相関、さらにはウルソデオキシコール酸投与 1 年後の変化を検討した。血中のオートタキシンは男性・女性で検討すると Nakanuma 分類の肝病理学的所見と有意な相関を示していることを証明した。さらに、治療開始後 1 年の時点では血中 ALP、GTP は有意に改善していた。肝線維化マーカーである M2BPGi は治療前後で有意に低下していたがオートタキシンは有意な低下を認めなかった。以上よりオートタキシンは PBC においても肝線維化マーカーとして有効であることを明らかにした。

(4) HLA-DPB1 SNP と AIH の関連

HLA-DPB1 の発現に関連している rs9277534 は今までに B 型肝炎の治療、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の発症に関連することが報告されている。本研究では HLA-DPB1 のアリルを決定した AIH 146 名と健常人 326 名についてアリルと rs9277534 の関連性、日本人における HLA-DPB1 の発現量について検討を行った。日本人でも rs9277534 は HLA-DPB1 の発現に関連していた。さらに、rs9277534 ジェノタイプは HLA-DPB1 アリルと強い連鎖不平衡を示した。HLA-DPB1 アリルは AIH の疾患感受性と関連性は認めなかったが rs9277354G アリルは有意に AIH と関連していることを証明し、ロジスティック回帰分析から HLA-DRB1*04:05 アリルと独立した疾患感受性を持つことが明らかとなった。

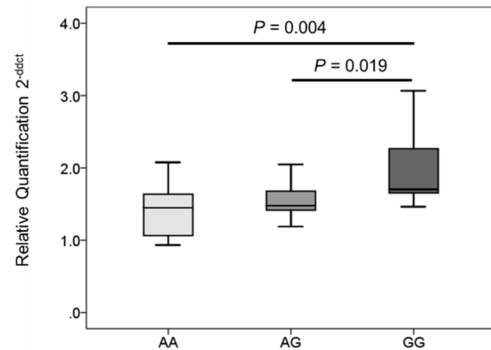


図2 rs9277534 はHL-DPB1の発現に関連している

(5) Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) と HLA の組み合わせと AIH の関連性

HLA class I と class II アリルと KIRs 遺伝子のタイピングを行った。KIR 遺伝子、HLA-Bw 遺伝子、HLA-C 遺伝子について KIR と HLA の組み合わせについて検討を行った。すると、以前から私達のグループが報告している HLA-DRB1*04:05-DQB1*04:01 ハプロタイプに加えて KIR3DL1/HLA-B Bw4-80Ile が自己免疫性肝炎の疾患感受性に関連することは明らかになった。さらに、KIR3DL1/HLA-B Bw4-80Thr と KIR2DL1/HLA-C2 は疾患抵抗性に関わる事を示した。病態進展（肝不全への移行）肝関連死との関係性について多変量解析と Kaplan-Meier 法を用いて解析すると KIR3DL1/HLA-B Bw4 陰性かつ診断時肝硬変の自己免疫性肝炎は肝不全への進展率と肝関連死亡率が有意に高率である事が証明された。

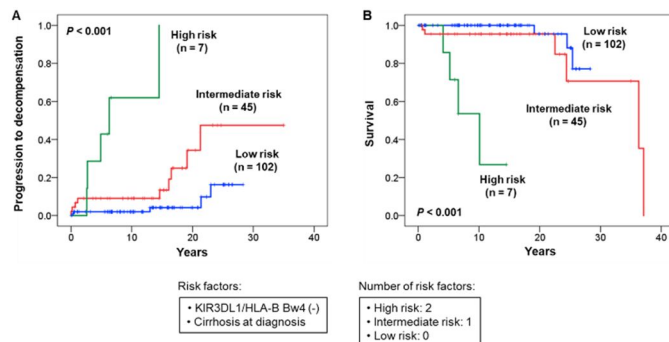


図3 AIHではKIR3DL1/HLA-B Bw4陰性と肝硬変は予後不良因子である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Joshita, S. Umemura, T. Tanaka, E. Ota, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetics and epigenetics in the pathogenesis of primary biliary cholangitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-017-0799-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Joshita, S. Umemura, T. Usami, Y. Yamashita, Y. Norman, G. L. Sugiura, A. Yamazaki, T. Fujimori, N. Kimura, T. Matsumoto, A. Igarashi, K. Yoshizawa, K. Ota, M. Tanaka, E.	4. 巻 8
2. 論文標題 Serum Autotaxin Is a Useful Disease Progression Marker in Patients with Primary Biliary Cholangitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26531-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Joshita, S. Yoshizawa, K. Umemura, T. Ohira, H. Takahashi, A. Harada, K. Hiep, N. C. Tsuneyama, K. Kage, M. Nakano, M. Kang, J. H. Koike, K. Zeniya, M. Yasunaka, T. Takaki, A. Torimura, T. Abe, M. Yokosuka, O. Tanaka, A. Takikawa, H. Japan Autoimmune Hepatitis Study, Group	4. 巻 53
2. 論文標題 Clinical features of autoimmune hepatitis with acute presentation: a Japanese nationwide survey	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 1079-1088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-018-1444-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki, T. Umemura, T. Joshita, S. Yoshizawa, K. Tanaka, E. Ota, M.	4. 巻 8
2. 論文標題 A cis-eQTL of HLA-DPB1 Affects Susceptibility to Type 1 Autoimmune Hepatitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30406-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hitomi, Y. Ueno, K. Kawai, Y. Nishida, N. , Umemura, T. et al	4. 巻 9
2. 論文標題 POGLUT1, the putative effector gene driven by rs2293370 in primary biliary cholangitis susceptibility locus chromosome 3q13.33	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36490-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umemura, T. Sekiguchi, T. Joshita, S. Yamazaki, T. Fujimori, N. Shibata, S. Ichikawa, Y. Komatsu, M. Matsumoto, A. Shums, Z. Norman, G. L. Tanaka, E. Ota, M.	4. 巻 37
2. 論文標題 Association between serum soluble CD14 and IL-8 levels and clinical outcome in primary biliary cholangitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 897-905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/liv.13316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Umemura, T. Joshita, S. Hamano, H. Yoshizawa, K. Kawa, S. Tanaka, E. Ota, M.	4. 巻 62
2. 論文標題 Association of autoimmune hepatitis with Src homology 2 adaptor protein 3 gene polymorphisms in Japanese patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Human genetics	6. 最初と最後の頁 963-967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jhg.2017.74	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito, H. Hirayama, A. Umemura, T. Joshita, S. Mukawa, K. Suga, T. Tanaka, E. Ota, M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between KIR-HLA combination and ulcerative colitis and Crohn's disease in a Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0195778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Joshita, S. Umemura, T. Tanaka, E. Ota, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetics and epigenetics in the pathogenesis of primary biliary cholangitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-017-0799-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakabayashi Shun-ichi, Kimura Takefumi, Tanaka Naoki, Joshita Satoru, Kawata Kazuhito, Umemura Takeji, Hiroshima Yuki, Mori Hiromitsu, Kobayashi Hikaru, Wada Shuichi, Tanaka Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Emergence of anti-mitochondrial M2 antibody in patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 302 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-018-0831-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Hiromi, Umemura Takeji, Joshita Satoru, Yamazaki Tomoo, Fujimori Naoyuki, Kimura Takefumi, Komatsu Michiharu, Matsumoto Akihiro, Tanaka Eiji, Ota Masao	4. 巻 9
2. 論文標題 KIR2DL2 combined with HLA-C1 confers risk of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in younger patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 19650 ~ 19661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Hiromi, Hirayama Atsuhiko, Umemura Takeji, Joshita Satoru, Mukawa Kenji, Suga Tomoaki, Tanaka Eiji, Ota Masao	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between KIR-HLA combination and ulcerative colitis and Crohn's disease in a Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0195778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hitomi Yuki, Ueno Kazuko, Kawai Yosuke, Umemura Takeji et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 POGLUT1, the putative effector gene driven by rs2293370 in primary biliary cholangitis susceptibility locus chromosome 3q13.33	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36490-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Honda Akira, Tanaka Atsushi, Kaneko Tetsuji, Komori Atsumasa, Abe Masanori, Inao Mie, Namisaki Tadashi, Hashimoto Naoaki, Kawata Kazuhito, Takahashi Atsushi, Ninomiya Masashi, Kang Jong Hon, Arakawa Mie, Yamagiwa Satoshi, Joshita Satoru, Umemura Takeji et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 Bezafibrate Improves GLOBE and UK PBC Scores and Long Term Outcomes in Patients With Primary Biliary Cholangitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 2035 ~ 2046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joshita Satoru, Umemura Takeji, Yamashita Yuki, Sugiura Ayumi, Yamazaki Tomoo, Fujimori Naoyuki, Matsumoto Akihiro, Tanaka Eiji	4. 巻 49
2. 論文標題 Biochemical and plasma lipid responses to pemafibrate in patients with primary biliary cholangitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1236 ~ 1243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joshita Satoru, Yamashita Yuki, Sugiura Ayumi, Uehara Takeshi, Usami Yoko, Yamazaki Tomoo, Fujimori Naoyuki, Matsumoto Akihiro, Tanaka Eiji, Umemura Takeji	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical utility of FibroScan as a non invasive diagnostic test for primary biliary cholangitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemura Takeji, Joshita Satoru, Saito Hiromi, Yoshizawa Kaname, Norman Gary L., Tanaka Eiji, Ota Masao	4. 巻 1
2. 論文標題 KIR/HLA genotypes confer susceptibility and progression in patients with autoimmune hepatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JHEP Reports	6. 最初と最後の頁 353 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhepr.2019.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 梅村武司、他
2. 発表標題 自己免疫性肝疾患におけるKIR-HLAの検討
3. 学会等名 第27回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅村武司、山崎智生、城下智、田中榮司
2. 発表標題 自己免疫性肝炎におけるHLA-DPB1の遺伝子多型とHLA-DP発現量の検討
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅村武司、城下智、田中榮司
2. 発表標題 次世代シーケンサーによるHLAゲノム解析：自己免疫性肝疾患における検討
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Umemura T
2. 発表標題 Clinical significance of M2BPGi in patients with autoimmune liver disease
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver STC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umemura T
2. 発表標題 Noninvasive Prediction of Liver Fibrosis in Autoimmune Liver Disease
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver STC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅村武司、関口智裕、城下智、田中榮司
2. 発表標題 ウルソデオキシコール酸治療開始前の血清IL-8とsCD14は原発性胆汁性胆管炎の予後予測因子である
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 城下智、梅村武司、田中榮司
2. 発表標題 原発性胆汁性胆管炎における血中Autotaxinの臨床的意義の検討
3. 学会等名 第21回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Joshita S, Umemura T, Usami Y, Sugiura A, Yamazaki T, Fujimori N, Komatsu M, Matsumoto A, Igarashi K, Ota M, Tanaka E
2. 発表標題 Association of Serum Autotaxin Levels with Disease Stages in Patients with Primary Biliary Cholangitis in Japanese patients
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Week (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Umemura T,
2. 発表標題 Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors/Human Leukocyte Antigen Genotypes Confer Susceptibility and Progression in Patients with Autoimmune Hepatitis
3. 学会等名 AASLD 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考