

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09864

研究課題名(和文) ゲノムコホートを用いた非アルコール性脂肪肝の統合的オミックス解析

研究課題名(英文) Integrated omics analysis for non-alcoholic fatty liver disease using multiple genome cohorts

研究代表者

岩本 禎彦 (Iwamoto, Sadahiko)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232711

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)：非アルコール性脂肪肝のなかでも、遺伝的関与が強いことが予想される非肥満脂肪肝に着目し、そのゲノムワイド関連解析を、東北メディカルメガバンクとの共同研究として実施した。その結果、6番、7番、12番、13番染色体に新規候補遺伝子領域を見出した。13番染色体の候補領域近傍の4遺伝子の機能的スクリーニングによって、候補遺伝子の絞り込みに成功した。また、6番染色体の関連領域はHLA遺伝子群近傍にマップされた。大規模な腸内細菌叢解析を行った結果、脂肪肝ではコントロールに比べて腸内細菌叢の多様性が著しく低下し、糖・脂質代謝に有益な細菌種の低下が認められ、HLAリスクアレル保因者にも同様の傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病や肥満などを合併しない脂肪肝の遺伝的背景を調べることによって、新たな関連する遺伝子座、HLAを発見した。どのようにHLAが脂肪肝の易罹患性に関わるかについて、脂肪肝との深い関連が観察されている腸内細菌叢を調べた結果、脂肪肝のリスクを高めるHLAタイプを持つ人は脂肪肝を発症しやすい特徴を持つことが明らかになった。メタボリック症候群の増加に伴って脂肪肝の有病率も高まっており、病状が進行すれば肝硬変から肝癌の原因にもなる脂肪肝炎は将来、ウイルス性肝炎を凌駕する肝疾患となることが危惧されている。今回の発見によって、脂肪肝の予防や治療に新たな戦略を生み出すきっかけになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is supposed to manifest its metabolic phenotype in the liver, but it is common to have lean individuals who are diagnosed with NAFLD. metabolically healthy normal-weight NAFLD patients (n=275) were compared with non-NAFLD controls (n=1,411) adjusted for age, sex, and alcohol consumption by a genome-wide association study (GWAS). HLA in chr6, MIR548F3 in chr7, MYL2 in chr12 and GPC6 in chr13 were suggested by the GWAS, which were further assessed by SNP association analysis of whole NAFLD against non-NAFLD in 9,726 members of the general population. The lead SNP in chr6 was significantly replicated with increased NAFLD risk. Imputation based and next generation sequence-based typing of HLA showed the significant increase of the HLA-B*54:01 allele. Fecal metagenomic analysis of 3,420 members of the general population showed significant dissimilarity in beta-diversity analysis of HLA-B*54:01 allele carriers.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：非アルコール性脂肪肝 ゲノムワイド関連解析 腸内細菌叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) は心血管性疾患の独立したリスク因子であることが、明らかにされ、生活習慣の欧米化に伴い、動脈硬化を基盤とした虚血性心疾患、脳卒中による死亡が死因の第1位を占める我が国においても、NAFLD の臨床的ならびに公衆衛生学的意義を明らかにする重要性が高まっていた。NAFLD の病態には肥満、とりわけメタボリック症候群に伴うインスリン抵抗性が中心的役割を行っていると言われていたが、肥満を認めない NAFLD が、日本人には多いことが知られており [1]、インスリン抵抗性以外のメカニズムを明らかにする必要があった。これらの非肥満 NAFLD (lean-NAFLD) は、軽度の脂肪蓄積でも、NAFLD を生じやすい遺伝的背景があると考えられるが、NAFLD のゲノムワイド SNP 関連解析 (GWAS) によって明らかになった PNPLA3 や TM6SF2 遺伝子の関連 SNP では、lean-NAFLD の遺伝的背景を説明しきれなかった。

(2) 一方、NAFLD と NASH の易罹患性には、最近、我々の体内に共生する第2のゲノム、腸内細菌叢が関わるのではないかと考えられるようになってきた。特定の細菌種の増加を指摘するグループもあるが、正反対の結果を示すグループもあり、更なる大規模な集団を用いた検証の必要性和同時に、宿主側の遺伝子多型や lean-NAFLD や obese-non-NAFLD など様々な層別化を行った遺伝疫学解析の必要性が示唆されていた。

2. 研究の目的

NAFLD に関連する遺伝要因の解明と腸内細菌叢などの環境要因との相互作用を明らかにすること、NAFLD 関連新規代謝パスウェイを明らかにすることを、本研究の目的とし、それらを達成するために必要な以下の到達目標を設定した。

(1) NAFLD に関連する遺伝要因と環境要因の解明

- ① 内臓脂肪蓄積レベルと健診データ、腸内細菌叢データ、生活習慣の附随したゲノムコホート集団の構築
- ② 構築したゲノムパネルを用いた関連解析によって NAFLD の新規関連遺伝子の同定
- ③ 別の日本人ゲノムや東アジア他民族ゲノムパネルにおける遺伝的関連の検証
- ④ 腸内細菌叢と NAFLD との関連解析を行い、ホストゲノム多型との相互作用の検討

(2) 新規関連遺伝子に関わるパスウェイの解明

- ① 遺伝解析に基づいて同定された新規 NAFLD 関連遺伝子のウイルスベクターを用いた機能的検証ならびに関連する代謝パスウェイの探索
- ② 新規関連遺伝子産物が関与する分子間相互作用の探索と *in vivo* における機能的検証
- ③ 分子間相互作用する分子における遺伝子変異を複数のゲノムバンクを用いて探索

3. 研究の方法

(1) 内臓脂肪蓄積レベルと健診データ、腸内細菌叢データの附随したゲノムコホート集団の構築：自治医科大学付属病院健診センターにおいて、インフォームドコンセントを取得後、末梢血より、ゲノム DNA、RNA、血清を、便潜血サンプルより腸内細菌叢ゲノムを2年程度の期間をかけて、3,420名分離・保存した。各個人の腸内細菌叢は、イルミナ MiSeq を用いた 16s メタゲノム解析によって決定した。自治医科大学付属病院健診センター由来のゲノム DNA は、2009～11年にかけて収集したものと合わせて、5,649 サンプルであり、そのうち 785 サンプルは2回リクルートされ、経時的変化を追跡可能であった。

(2) 構築したゲノムパネルを用いた集団遺伝的関連解析：参加者の中から lean-NAFLD を抽出し、SNP アレイを用いてゲノムワイドな SNP タイピングを行い、東北メディカルメガバンクの非 NAFLD 集団とのゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施した。GWAS によってノミネートされた lead SNPs を、自治医科大学付属病院健診センター由来の 5,649 サンプルと日本全国から収集された 21,000 人のゲノムの中で脂肪肝の有無のデータが付随した 4077 サンプル、合計 9,726 サンプルを用い、全 NAFLD の case control study によって検証した。

(3) 遺伝解析に基づいて同定された脂質関連遺伝子のノックアウトマウスを用いた機能的検証ならびに関連する代謝パスウェイの探索：遺伝解析研究によって明らかになった脂質代謝ならびに NAFLD 関連遺伝子を、モデルマウスを用いた機能的検証を進めた。また、それぞれの遺伝子の発現変化をもたらした臓器における発現プロファイルを、発現アレイならびに RNAseq を用いることによって解析し、表現型と関連の深い代謝パスウェイの探索を行った。

4. 研究成果

(1) ゲノムコホート集団のクリニカルデータと脂肪肝との関連：9,726 サンプルからアルコール過剰摂取群 (>30g/day) を除いた 7,750 例のクリニカルデータを解析した結果、BMI<25 の脂肪肝であっても、BMI、腹囲、血中中性脂肪、コレステロール、HbA1c の平均値は非 NAFLD に比べて軽度だが有意に高いことが判明した。そこで、肥満指標が最も小さい NAFLD 診断例を 288 名抽出した結果、それらの指標は、非 NAFLD と差が見られなくなり (図1)、この集団を GWAS のケ

ース群とした。

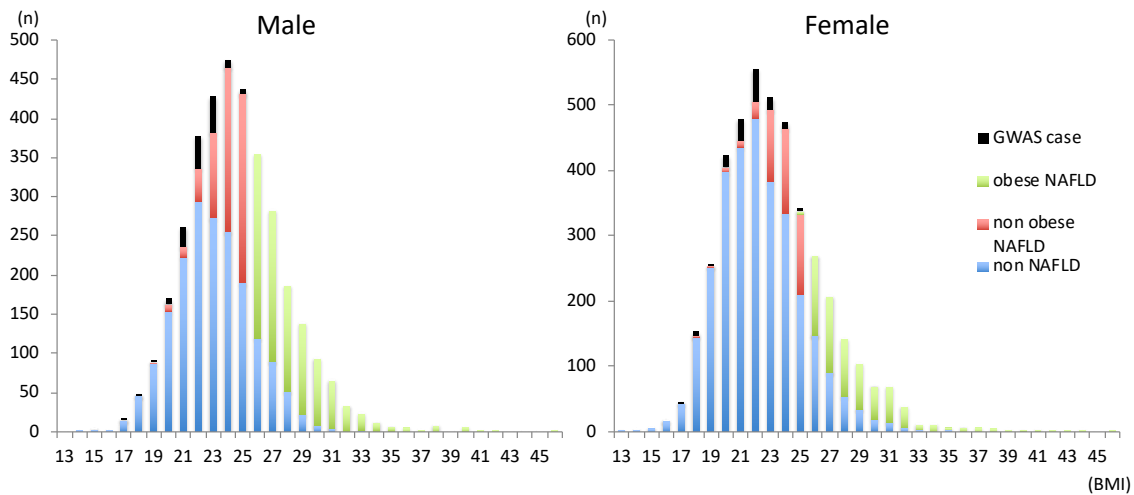


図1. 男女別 GWAS case 群、obese NAFLD 群 (BMI>25)、non-obese NAFLD 群 (BMI<25)、non NAFLD 群の BMI 分布 (積み上げヒストグラム)

(2) GWAS : 288 例の全ゲノム SNP タイピングを dish QC と PI-HAT にて評価した結果、275 例がケース群として残り、東北メディカルメガバンクの非 NAFLD 集団 1,411 例とロジスティック解析モデルによって関連を評価した。その結果、集団の階層化による補正を入れない場合には、chr6 (lead SNP:rs2076530 ($P=6.73E-08$), 候補遺伝子 *BTLN2* を含む *HLA* 遺伝子群 (図 2))、chr7 (lead SNP: rs2189883 ($P=4.25E-07$), 候補遺伝子 *MIR548F3*)、chr12 (lead SNP: rs2071629 ($P=4.39E-07$), 候補遺伝子 *MYL2-ALDH2*)、chr13 (lead SNP: rs59980018 ($P=5.43E-07$) 候補遺伝子 *GPC6*) が suggestive level ではあるものの、関連を示唆する新規遺伝子座として浮かび上がった。

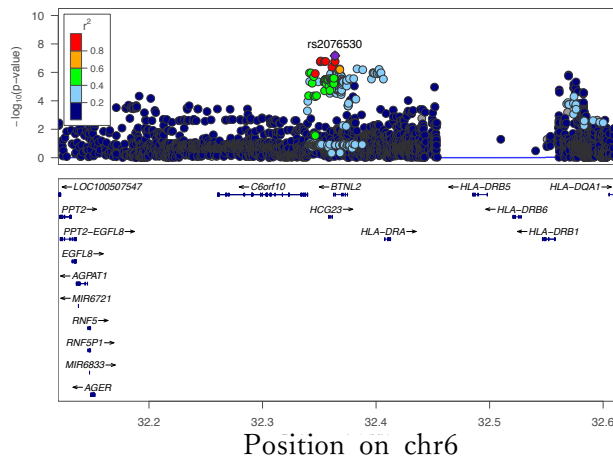


図2. GWAS において suggestive level の関連を示した chr6 遺伝子座の regional plot

(3) 全NAFLDを対象にした検証:全NAFLD と rs2076529 ($D' = 1.00$ and $r^2=0.78$ with rs2076530), rs2189883, rs2071629, rs5998001 との関連を性別と HbA1c とを説明変数に加えたロジスティック解析モデルによって関連を評価した結果、rs2076529 (OR 1.19, 95%CI 1.11-1.28, $P=2.10E-06$)と rs2189883 (OR 1.15, 95%CI 1.04-1.27, $P=6.19E-03$)の minor allele は全 NAFLD に対してもリスクファクターとなることが示された。

(4) HLA 座とアレルとの関連解析 : chr6 の lead SNP rs2076529 は、*HLA-B* と *-DRB1* の中間に位置し、minor allele は Butyrophilin Like 2 (*BTLN2*) 遺伝子の premature truncation SNP であるとともに、サルコイドーシスや 1 型糖尿病など様々な疾患の感受性遺伝子の候補とされてきた。また、HLA と chr7 の関連領域は先行する GWAS 研究において脂質異常症や肥満とも関連を示すことが明らかにされており [2, 3]、これらの領域が脂肪肝にも関連していることが示唆された。巨大な連鎖不平衡ブロックを形成する HLA 領域の中で高度な多様性を示す *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*, *-DPB1* と、lean NAFLD との関連を imputation を用いたタイピングによって検討した結果、*HLA-B* ($P=0.028$)、*-DRB1* ($P=0.0005$)、*-DQB1* ($P=0.0065$) に明らかなアレル頻度分布の偏りが観察され、*HLA-B*40:01*, *-B*54:01*, *HLA-C*03:04*, *HLA-DRB1*04:04*, *-DRB1*04:05*, *-DRB1*12:02*, *HLA-DQB1*04:01* のアレル頻度に明らかな差が見出された。これを検証するために、自治医科大学付属病院健診センター由来の 5,649 サンプルの *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DQB1*, *-DPB1*

(*DRB1*は偽遺伝子のためタイピングできず)をMiSeqを用いてタイピングし、NAFLD群と非NAFLD群間で比較した。その結果、HLA-B座のアレル頻度分布に偏りが認められ、*HLA-B*54:01*がリスクアレル候補であることが明らかになった。

(5) NAFLDと関連アレルにおける腸内細菌叢解析：*HLA*は免疫関連疾患だけではなく肥満や脂質異常症などの生活習慣病にも関連を示す。しかし、そのメカニズムは全く明らかにはなっていない。HLAの獲得免疫応答の司令塔としての重要な役割と、NAFLDでは腸内細菌叢のdysbiosisが重要なリスクとなっていると言われていたことから、NAFLDと関連アレルにおける腸内細菌叢の解析を行った。その結果、lean NAFLDはobese NAFLDと同様に、明らかに α 多様性が低下していることが初めて明らかになった。また、rs2076529と*HLA-B*54:01*のNAFLDリスクアレルキャリアにおける腸内細菌叢を検討した結果、 β 多様性に明らかな違いが認められるとともに、ムチナーゼを持ち、肥満や糖・脂質代謝の改善機能があるのではないかとされている *p_Verrucomicrobia/g_Akkermansia* の[4]有意な減少が認められた。これらの結果から、lean NAFLDのGWASから見出された*HLA*リスクアレルは、腸内細菌叢のdysbiosisを介してNAFLDの易罹患性に関与している可能性が示唆された。GWASと腸内細菌叢に関するデータは、2020年4月オンラインジャーナルHepatology Communicationsに受理された[5]。

(6) 13番染色体に示唆された脂質関連遺伝子のノックアウトマウスを用いた機能的検証ならびに関連する代謝パスウェイの探索：chr13のlead SNP, rs59980018周辺には既知のNAFLD関連遺伝子はなく、上下流200kbに存在している4遺伝子をAAVベクターを用いてマウス肝臓でそれぞれノックダウンスクリーニングした結果、1つの遺伝子の発現低下がコリンメチオン調整食による脂肪肝を低減することが明らかになった。CRISPR/Casシステムを用いて、候補遺伝子をノックアウトしたマウスを作製し、高脂肪食を負荷した結果、肥満に抵抗性を示すことが明らかになった。この遺伝子の機能的関連はさらに解析中である。

<引用文献>

1. Shi Y, Wang Q, Sun Y, Zhao X, Kong Y, Ou X, et al. The Prevalence of Lean/Nonobese Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. J. Clin. Gastroenterol. 2019;00:1.
2. Wen W, Kato N, Hwang JY, Guo X, Tabara Y, Li H, et al. Genome-wide association studies in East Asians identify new loci for waist-hip ratio and waist circumference. Sci. Rep. 2016;6:2-10.
3. Teslovich TM, Musunuru K, Smith A V., Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature. 2010;466:707-713.
4. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013;110:9066-9071.
5. Yoshida K, Yokota K, Kutsuwada Y, Nakayama K, Watanabe K, Matsumoto A, Miyashita H, Khor S, Tokunaga K, Kawai Y, Nagasaki M, Iwamoto S. Genome-wide association study of lean non-alcoholic fatty liver disease suggests HLA as a novel candidate locus. In press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Watanabe K, Yoshida K, Iwamoto S.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Kbtbd11 gene expression in adipose tissue increases in response to feeding and affects adipocyte differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 in print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/jdi.12995.	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 Nakayama K, Iwamoto S.	4. 巻 36
2. 論文標題 An adaptive variant of TRIB2, rs1057001, is associated with higher expression levels of thermogenic genes in human subcutaneous and visceral adipose tissues.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Physiol Anthropol.	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s40101-017-0132-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 Nakayama K, Ohashi J, Watanabe K, Munkhtulga L, Iwamoto S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Evidence for Very Recent Positive Selection in Mongolians.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Biol Evol.	6. 最初と最後の頁 1936-1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/molbev/msx138.	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 該当する
1. 著者名 Nakayama K, Saito S, Watanabe K, Miyashita H, Nishijima F, Kamo Y, Tada K, Ishizuka S, Niwa T, Iwamoto S, Shimizu H.	4. 巻 81
2. 論文標題 Influence of AHRH Pro189Ala polymorphism on kidney functions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 1120-1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/09168451.2017.1292838.	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 Fennell K, Hoffman R, Yoshida K, Iwamoto S, Govender L, Vather K, Sookraj A, Jentsch U, Pambrun C, McAuley C, Keller MA, Ochoa-Garay G.	4. 巻 57
2. 論文標題 Effect on gene expression of three allelic variants in GATA motifs of ABO, RHD, and RHCE regulatory elements.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 2804-2808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/trf.14299.	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 該当する

1. 著者名 Boonvisut S, Yoshida K, Nakayama K, Watanabe K, Miyashita H, Iwamoto S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Identification of deleterious rare variants in MTTP, PNPLA3, and TM6SF2 in Japanese males and association studies with NAFLD.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lipids Health Dis.	6. 最初と最後の頁 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12944-017-0570-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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 吉田健、横田万葉、渡邊和寿、松本歩、宮下洋、岩本禎彦。
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患とHLAの関連解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本歩、後藤昌英、宮内彰彦、神保恵理子、岩本禎彦、永田浩一、山形崇倫。
2. 発表標題 自閉性障害の概日リズム異常と病因遺伝子解析。
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida K, Nakayama K, Watanabe K, Iwamoto S, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M.
2. 発表標題 Genome-wide association study of non-obese NAFLD in Japanese.
3. 学会等名 International Conference on Fatty Liver (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwamoto S, Boonvisut S, Yoshida K, Watanabe K, Nakayama K.
2. 発表標題 Rare variants in MTTP, PNPLA3 and TM6SF2 genes associated with NAFLD in Japanese general population.
3. 学会等名 International Conference on Fatty Liver (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口琢磨、吉田健、横田万葉、渡邊和寿、中山一大、岩本禎彦
2. 発表標題 便潜血検体を用いた腸内マイクロバイオーーム解析の検討.
3. 学会等名 第38回日本肥満学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横田万葉、岩本禎彦、渡邊和寿、山口琢磨、吉田健
2. 発表標題 非肥満非アルコール性脂肪肝のゲノムワイド関連解析と機能的検証.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第62回大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sadahiko Iwamoto,	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ELSEVIER	5. 総ページ数 470
3. 書名 The Molecular Nutrition of Fats	

〔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
研究 分担者	渡邉 和寿 (Watanabe Kazuhisa) (60724416)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究 分担者	宮下 洋 (Miyashita Hiroshi) (90301449)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	