

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17019

研究課題名（和文）消化器病自己免疫性疾患発症と細胞膜上HLA抗原発現量多様性の解析

研究課題名（英文）Analysis of gastrointestinal autoimmune diseases onset and the diversity of HLA antigen expression.

研究代表者

山崎 智生（YAMAZAKI, TOMOO）

信州大学・医学部附属病院・助教（診療）

研究者番号：90795684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：消化管領域において何らかの免疫学的機序により発症する疾患の代表として炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease：IBD）が知られている。今回我々は顕著な多型性を示すヒト白血球型抗原（Human Leukocyte Antigen：HLA）とその発現量を規定する染色体上の遺伝子座であるexpression quantitative trait loci（eQTL）に着目し、eQTL上の特定の一塩基多型が疾患発症に関与し、且つ末梢血リンパ球におけるHLA-C発現を制御していることを明らかにした。この多型が将来的な疾患発症予測に役立つ可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は1990年代以降、本邦で急激に患者数が増え続けている消化管領域の自己免疫疾患である。その代表疾患である潰瘍性大腸炎は20万人、クローン病は7万人の患者が存在すると言われている。その明らかな原因や根本的治療は確立されておらず、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに難病指定をうけている。今回我々は免疫遺伝学的アプローチでヒト白血球型抗原とその発現量に着目し、疾患発症との関連を見出した。今回検討した遺伝子多型が疾患発症リスクや重症化予測因子となる可能性を秘めており、臨床的にも重要な知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD) is known as a typical disease caused by some immunological mechanism in the gastrointestinal tract. In this study, we focused on human leukocyte antigen (HLA), which shows remarkable polymorphism, and expression quantitative trait loci (eQTL), which are chromosomal loci that regulate the expression level of HLA. We found that a specific single nucleotide polymorphism, rs9264942, on the eQTL is involved in disease pathogenesis and regulates HLA-C expression in peripheral blood lymphocytes. This polymorphism may be useful for predicting future disease onset.

研究分野：消化器内科学

キーワード：自己免疫疾患 炎症性腸疾患 HLA eQTL

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管領域において何らかの免疫学的機序により発症する疾患の代表として炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) が知られている。IBD は急性および慢性-再発性の炎症性疾患の総称であり、潰瘍性大腸炎 Ulcerative Colitis (UC) とクローン病: Crohn's Disease (CD) という2疾患に大別される。その明確な病因は不明であり、環境因子や宿主因子などがこれまで検討されているが、一定の見解を得るには至っていない。顕著な多型性を示すヒト白血球型抗原 (Human Leukocyte Antigen: HLA) は、多くの自己免疫疾患や感染症疾患と感受性・抵抗性の関連を示すことが知られている。特定の HLA 分子構造を規定する HLA アレルと疾患発症との関連についてはこれまで複数の報告があり、我々もこれまでに AIH および PBC に特定の HLA アレルが疾患感受性を有することを報告してきた。しかし細胞表面上に発現している HLA 分子量の違いが免疫反応誘導に関わっているか否かについては明らかになっていない。今回我々は遺伝子発現量という量的形質に対して影響を与える染色体上の遺伝子座である expression quantitative trait loci (eQTL) およびその領域における一塩基多型 (SNP) に着目し、IBD 発症リスクとの関連を検討することとした。

以下 HLA 関連の付随した研究として報告する。

(2) ナチュラルキラー (NK) 細胞は腫瘍細胞やウイルス感染細胞に対して、自然免疫系を介し、それらの細胞を殺傷する役割を持つ。しかし、肝細胞癌 (HCC) においては NK 細胞の機能低下がこれまでに報告されている。NK 細胞の表現型は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) とヒト白血球抗原 (HLA) クラス I との結合によって部分的に媒介される。本研究では HCV による HCC 発症リスクと KIR-HLA ペアの関連について検討した。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、遺伝子発現量という量的形質に対して影響を与える染色体上の遺伝子座である eQTL 上の SNP が日本人の HLA-C の発現を制御しているかどうかを明らかにし、更に特定の HLA ハプロタイプの強い連鎖不平衡にある SNP と UC および CD 感受性との関係を分析することである。

(2) 肝硬変は HCV を原因とする HCC 発症の最も強い危険因子の一つである。本研究の目的は、肝硬変患者の KIR-HLA ペアに基づく HCC リスクを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患 (UC 160 名、CD 275 名) 患者から DNA 検体を採取した。rs9264942 と rs2395471 の2つの eQTL SNP は、過去の報告に基づいて選択した。HLAC\*12:02-B\*52:01-DRB1\*15:02 のハプロタイプと強い LD を示す rs2270191, rs3132550, rs6915986 の Tree SNPs も以前の報告に基づいて採用した。上記 SNPs のジェノタイピングを TaqMan5 exonuclease assay を使用し決定した。また Haploview version 4.255,56 を使用して、rs2270191, rs3132550, rs9264942, rs6915986 の4つの SNP のハプロタイプ構造を評価し、日本人における IBD 発症との関連性を検討した。さらに患者末梢血リンパ球検体を用いてフローサイトメトリー法で Genotype ごとの CD3e+ および CD8a+ リンパ球の発現量を検討した。

(2) 1991年1月から2013年12月までの間に当院を受診した HCV による肝硬変患者 211 例をレトロスペクティブに抽出した。HCC サーベイランスは6か月ごとに行われ、血中腫瘍マーカー検査、腹部超音波検査、CT/MRI によって総合的に診断した。対象患者の全血試料から全ゲノム DNA を抽出し、Luminex マルチアナライザープロファイリングシステムと LABType SSO タイピングキット (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) を用いて HLA-A タイピングを行った。配列特異的プライマーを用いた PCR によって HLA-Bw4, HLA-C1, HLA-C2 および KIR 遺伝子のタイピングを行った。HLA タイピングと KIR 型別は、予測される KIR-リガンド相互作用と結合親和性に従って患者を層別化するため用いた。HLA, KIR, KIR-HLA ペアと HCC 発症との関連性を、Cox 比例ハザードモデルで評価した。

## 4. 研究成果

( 1 ) CD3e+CD8a+リンパ球における HLA-C の発現は、rs9264942 の TT 遺伝子型よりも CC または CT 遺伝子型の方が有意に高いことが明らかになった。さらに 4 つの SNP のうち TACC ハプロタイプは、潰瘍性大腸炎(UC)発症と関連し、クローン病(CD)とは関連しなかった。また CGTT ハプロタイプでは、UC に対する有意な防御能を有したが、CD に対する防御能は有意ではなかった。一方、CGCT ハプロタイプでは UC に対する防御能の有意差は消失し、CD に対する防御能は有意であった。以上の結果から、日本人において、eQTL SNP である rs9264942 が HLA-C の発現を制御していることが示唆された。また、強い連鎖不平衡状態にある 4 つの SNP は、IBD の感受性と疾患の転帰に関連する特定の HLA ハプロタイプ ( HLA-C\*12:02-B\*52:01~DRB1\*15:02 ) の代理マーカー候補である可能性が示唆された ( Suzuki, Joshita, Yamazaki et al. Sci Rep. 2020 )

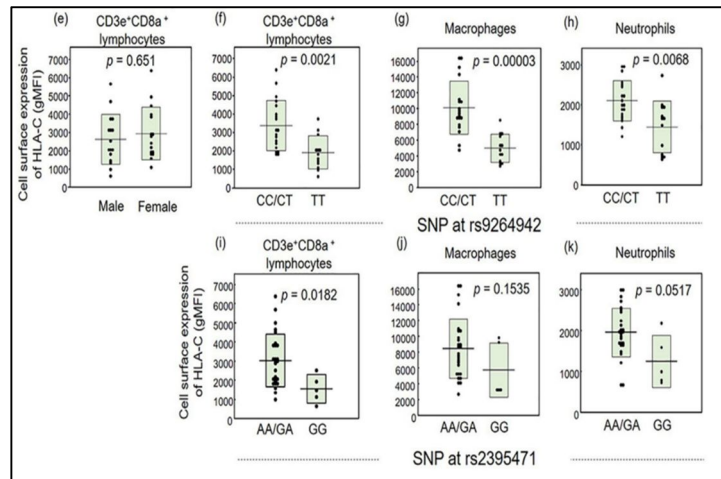


図 1. eQTL SNP genotype ごとにみた末梢血リンパ球における HLA-C の発現量

( 2 ) 中央値 6.6 年の追跡期間中に、患者の 69.7% が HCC を発症した。HLA-Bw4 および KIR3DL1 + HLA-Bw4 ペアの比率は、HCC を発症した患者において有意に高かった ( 78.9% vs. 64.1%、オッズ比 (OR) -2.10、95% 信頼区間 (CI) -1.10-4.01、 $p = 0.023$ 、76.2% vs. 60.9、オッズ比-2.05、 $p = 0.024$  )。多変量解析では、男性 (hazard ratio (HR)-1.56、95% CI-1.12-2.17;  $p = 0.009$ ), -fetoprotein > 5.6 ng/mL (HR-1.56、95% CI-1.10-2.10;  $p = 0.011$ ), そして KIR3DL1 + HLA-Bw4 (HR-1.69、95% CI-1.15-2.48;  $p = 0.007$ ) が HCC 発症の独立した危険因子として抽出された。KIR3DL1 + HLA-Bw4 を有する患者における HCC の累積発症率は、有さない患者に比べ、有意に高かった ( log-rank 検定;  $p = 0.013$  )。以上より、HLA-Bw4 に加えて、KIR3DL1 + HLA-Bw4 は、HCV 肝硬変の HCC 発症に関連する可能性のある新しい KIR-HLA ペアであることが示唆された ( Umemura, Yamazaki et al. Cancers (Basel). 2021 Jun 29;13(13):3267. )

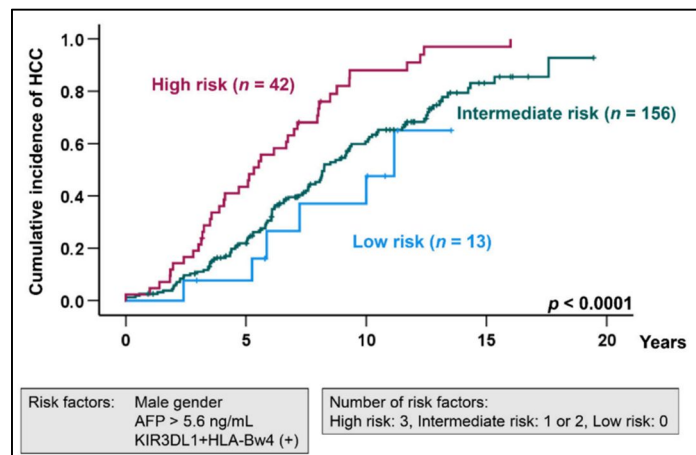


図 2. HCC 累積発症リスクの層別化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Hiroshi, Joshita Satoru, Hirayama Atsuhiko, Shinji Akihiro, Mukawa Kenji, Sako Minako, Yoshimura Naoki, Suga Tomoaki, Umemura Takeji, Ashihara Norihiro, Yamazaki Tomoo, Ota Masao	4. 巻 10
2. 論文標題 Polymorphism at rs9264942 is associated with HLA-C expression and inflammatory bowel disease in the Japanese	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69370-8	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, Joshita S, Saito H, Wakabayashi SI, Kobayashi H, Yamashita Y, Sugiura A, Yamazaki T, Ota M	4. 巻 13
2. 論文標題 Investigation of the Effect of KIR-HLA Pairs on Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Virus Cirrhotic Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 3267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13133267.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城下智、山下裕騎、杉浦亜弓、山崎智生、梅村武司
2. 発表標題 原発性胆汁性胆管炎の非侵襲的病期診断法の臨床的有用性
3. 学会等名 第117 回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎智生、城下智、梅村武司
2. 発表標題 M2BPGiおよびAutotaxinは薬物性肝障害における組織学的炎症を反映し得るか
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoo Yamazaki, Satoru Joshita, Takeji Umemura
2. 発表標題 Liver injury mechanism and histological findings at onset of drug-induced liver injury using cytokeratin-18-related cell death markers, JDDW 2020, Kobe, Japan.
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎智生、城下智、梅村武司
2. 発表標題 予後・病型・成因ごとにみた急性肝不全におけるM2BPGiの臨床的意義の検討
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------