

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460996

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスによる自己免疫性肝疾患の原因となる新規遺伝子の同定

研究課題名(英文) Whole-exome sequencing identifies a novel genetic susceptibility locus 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次の2点について明らかにした。1)本邦の自己免疫性肝疾患(自己免疫性肝炎と原発性胆汁性胆管炎)における疾患感受性・抵抗性遺伝子の候補としてHLA遺伝子、PTPN22遺伝子、PRKCB遺伝子が関連している。2)長期に経過観察している原発性胆汁性胆管炎患者から非侵襲的な肝線維化予測、予後予測因子として血清中のMac-2結合タンパク、細胞死、可溶性CD14、IL-8の値が有用であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The key findings in this study were: (1) HLA, PTPN22, and PRKCB genes are significantly associated with susceptibility and resistance to autoimmune liver diseases (autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis) in Japan; (2) Serum Mac-2-binding protein, cell death, soluble CD14, and IL-8 levels were simple, and reliable noninvasive surrogate marker of liver fibrosis and prognosis in patients with primary biliary cholangitis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：AIH PBC HLA PTPN22 sCD14 IL-8 M2BP 細胞死

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肝疾患である。その発症には環境因子に加えて遺伝素因の強い関与が推定されている。特定の HLA 対立遺伝子が、自己免疫疾患と相関を示すことが報告されており、研究代表者らは、日本人における AIH と HLA-DR4、PBC と HLA-DRB1*08:03-DQB1*06:01 の相関を明らかにした。さらに非 HLA 遺伝子との関連についても報告した。しかし、疾患感受性、さらには病態の進行と関連する遺伝子領域の特定には至っておらず、その解明による新しい医療の開発が課題である。

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 HLA 全領域と HLA 遺伝子を除いたゲノム上遺伝子における全エクソン領域の詳細な解析 (遺伝子構造の相違や多型) をし、疾患感受性遺伝子を同定し、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) AIH と PBC 患者群と健康対照者群において次世代シーケンサーを用いて HLA 領域とその周辺の非 HLA 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。

(2) 関連解析を行い、疾病と関連のある疾患感受性 HLA 遺伝子ならびに HLA と連鎖不平衡にある非 HLA 遺伝子を同定する。

(3) AIH と PBC 患者群と健康対照者群において全エクソン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。

(4) 疾病と関連のある疾患感受性・病態関連遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) リシーケンシングによる全 HLA 領域のゲノム配列の決定

研究代表者らのこれまでの研究で HLA は自己免疫性肝疾患と相関があることがわかった。集積してきた AIH 150 例、PBC 300 例の検体を用いて、HLA 遺伝子 6 座 (HLA-A、-B、-C、-DR、-DQ、-DP) の全領域について、我々が開発した次世代シーケンサーを使用してリシーケンシングを行う Super high resolution for single molecule-sequence-based typing (SS-SBT 法) で解析を行う。SS-SBT 法の特徴は 3'-UTR と

5'-UTR にプライマーを設定することによりエクソンのみならずイントロン、プロモーター/エンハンサー領域を含めた全 HLA 遺伝子の解析が可能な画期的な方法であり、直接塩基配列決定法を用いてゲノム配列の決定をする。健常者対照群については既に東海大学医学部基礎医学系分子生命科学講座の猪子英俊、椎名隆両博士のグループが日本人のコントロールデータを決定、解析されているためこのデータを使用する。

(2) 疾患感受性 HLA 遺伝子ならびに連鎖不平衡にある非 HLA 遺伝子の同定

患者群と健常者対照者群において決定された全 HLA 領域のゲノム配列、HLA ハプロタイプについての膨大なデータについてそれぞれ比較検討を行う。そこで頻度の異なる HLA ハプロタイプ、SNP、稀少多型、変異を抽出する。HLA 近傍に存在する非 HLA 遺伝子は多数存在し、感染症、自己免疫疾患などとの関連性が多数報告されている。よって、HLA 遺伝子と連鎖不平衡にある非 HLA 遺伝子の解析も行い、同定を行う。

(3) リシーケンシングによる全エクソン領域のゲノム配列の決定

初年度に HLA ハプロタイプを決定した AIH 10 例と PBC 10 例を選び、次世代シーケンサーを使用して全エクソン領域についてリシーケンシングを行い、直接塩基配列法を用いてゲノム配列の決定をする。具体的には 150~400bp のショートリードを基準となるリファレンス配列にマッピングさせ、対象の塩基配列を解読する方法である。

(4) 疾患感受性遺伝子の検出ならびにターゲットシーケンシング

全エクソン領域のゲノム配列についての膨大なデータについてそれぞれ比較検討を行う。1 例につき約 20,000~50,000 個/検体の遺伝子変異が検出されることが予想される。偽陽性を除くために、クオリティー値やバリエーション率を各種報告などを参考に適宜設定する必要がある。そこで頻度の異なる SNP、稀少多型、変異を抽出する。最終的にはアミノ酸置換の起こる non-synonymous、スプライス部位の変異である splice site mutation、DNA 配列の挿入/欠失である indel を候補として決める。それぞれの多型、変異については残りの AIH 140 例、PBC 290 例にて TaqMan プローブ法を用いた解析を行い詳細な DNA タイピングおよび関連解析を行い、最終的に疾患感受性を規定する多型・変異を同定する。

(5) 疾患感受性遺伝子多型の臨床的意義の検討

本研究で特定される AIH、PBC の疾患感受性遺伝子の臨床面でどのように役に立つの

かさらに検討を加える。具体的には本研究で同定された多型を今まで使用されていた診断基準に加えることにより診断能が向上するか検討をする。さらに、治療に抵抗性で再燃を繰り返す症例、若年で肝不全、肝移植となる予後不良の症例を拾い出すことが可能かなど、治療や予後を規定する因子となり得るかについても解析を行う。研究代表者は長期的に経過観察している患者のデータを保有しており十分な解析が可能である。

4. 研究成果

(1) AIHとHLAハプロタイプの検討

156例のAIH症例についてHLA class Iとclass IIの解析を施行した。健常者と比較してHLA DRB1*04:05-DQB1*04:01ハプロタイプはAIHの疾患感受性があり($P=1.2 \times 10^{-10}$; OR=3.51)、血清IgG高値($P=0.041$)、抗平滑筋抗体陽性($P=0.000006$)と強い相関を示した。一方、DRB1*15:01-DQB1*06:02ハプロタイプは疾患抵抗性($P=0.00057$; OR=0.38)と肝がん発症例($P=0.017$; OR=6.81)で強い相関を示した。さらに、DRB1*08:03-DQB1*06:01ハプロタイプは肝不全発症例で高率であることを明らかにした($P=0.034$; OR=4.38)。

以上よりHLAはAIHの疾患感受性、抵抗性、さらには病態進展について強い相関が示唆されるためHLA領域のリシークエンシングを行い、真の疾患感受性遺伝子とその多型・変異を特定し、臨床応用へと展開することは重要である。

(2) 自己免疫性肝疾患と非HLA領域の遺伝子多型の検討

AIH症例とPBC症例、さらに健常者について欧米で他の自己免疫性疾患の疾患感受性遺伝子として報告のあるPTPN22遺伝子多型について検討を行った。9カ所の遺伝子多型について検査を施行したところ欧米人で最も関連性の高いミスセンス遺伝子多型は日本人では多型が見つからなかった。しかし、AIHでは5カ所の遺伝子多型の頻度が健常者と比較して有意に低率であることが明らかとなった。さらに、推定ハプロタイプの検討を行うとAIH($P=0.0067$)だけでなくPBC($P=0.0048$)でも共通したハプロタイプが有意に疾患抵抗性と関連していることが明らかとなった。

以上より、PTPN22遺伝子は日本人における自己免疫性肝疾患の発症に重要な役割を果たしている可能性がある。

(3) PBCにおける肝線維化、予後予測因子の同定

PBCのうち診断時(肝生検を施行され、ウルソデオキシコール酸の内服開始前)の血清を用いて非侵襲的な肝線維化、予後が予測できるマーカーが見つかるとその後の治療計画、経過観察の頻度なども含めて臨床的に

有用な情報となり得る。そこで保存血清を使用し最長20年以上経過観察されているPBC患者群について、Mac-2-binding protein 2(M2BP)、細胞死のマーカーであるサイトケラチン18フラグメント、M65、M65ED、さらには33種類のサイトカインとケモカインに加えて腸内細菌に関連する可溶性CD14、I-FABP、EndoCAbを網羅的に測定して様々な検討を行った。

M2BPはC型肝炎の肝線維化の非侵襲的なマーカーとして開発され、PBCでの有用性を検討した。線維化ステージとは有意な相関を示すこと($r=0.90$, $P<0.001$)、他の今まで報告されているFIB-4 index, APRI, Forn's index等と比較しても優れている事を明らかにした。本研究の最も重要な発見は診断時にM2BPが2.0 C.O.I以上の場合には経過観察中に有意に肝不全の発症と肝関連死と関連することを明らかにした(log-rank test それぞれ $P<0.0001$)。よって、世界で初めてM2BPがPBCの肝線維化の侵襲的なマーカーとして有用であり、予後の予測にも応用できる可能性を報告した。

細胞死のマーカーとしてのサイトケラチン18フラグメント、アポトーシスのマーカーであるM65、M65EDについてはC型肝炎や非アルコール性脂肪肝炎での線維化や病態との関連性が示唆されており今回PBCでも検討を行った。診断時のM65EDが672 U/L以上を示す症例では生存率が有意に低下することが明らかとなった(log-rank test $P=0.001$)。

最近、腸内細菌が様々な疾患の病態に関与していることが報告されている。本研究ではmicrobial translocationに関連する可溶性CD14、I-FABP、EndoCAb IgMに加えて33種類のサイトカインとケモカインを網羅的に測定し病態との関連性について検討を行った。さらに、本試験ではPBCの病態に関連があると報告されている自己抗体についても併せて検討した。診断時に非代償期への進展と肝関連死が予測できるかどうかを研究目的とした。

多変量解析では可溶性CD14とIL-8が非代償期、肝関連死の予測因子として残ってきた。さらに、log-rank testでは可溶性CD14 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上、IL-8 45.5 pg/mL 以上の時に有意に予後不良であることを証明した。さらに、抗gp210抗体陽性群も予後不良であることを改めて証明した。

以上よりM2BP、M65ED、可溶性CD14、IL-8はPBCの肝線維化、さらには予後予測因子となり得る可能性がある。今後は症例数を増やしてこれらのマーカーだけで注目してさらなる検討を行っていく予定である。

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9件)

- Umemura T, Ota M.(13番、13名) Association between serum soluble CD14 and IL-8 levels and clinical outcome in primary biliary cholangitis. *Liver International* 査読あり 37 897-905 (2017).
- Kwashima M, Umemura T.(18番、78名) Nakamura M. Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Human Molecular Genetics* 査読あり 26 650-9 (2017).
- Joshita S, Umemura T, Tanaka E, Ota M. Genetic Contribution to the Pathogenesis of Primary Biliary Cholangitis. *Journal of Immunology Research* 査読あり 3073504 (2017).
- Yoshizawa K, Joshita S, Matsumoto A, Umemura T, Tanaka E, Morita S, Maejima T, Ota M. Incidence and prevalence of autoimmune hepatitis in the Ueda area, Japan. *Hepatology Research* 査読あり 46 878-83 (2016).
- Umemura T, Ota M.(8番、8名) Genetic Association of PTPN22 Polymorphisms with Autoimmune Hepatitis and Primary Biliary Cholangitis in Japan. *Scientific Reports* 査読あり 6 29770 (2016).
- Umemura T, Ota M. Genetic factors affect the etiology, clinical characteristics and outcome of autoimmune hepatitis. *Clinical Journal of Gastroenterology* 査読あり 8 360-6 (2015).
- Umemura T, Ota M.(9番、10名) Serum *Wisteria floribunda* Agglutinin-Positive Mac-2-Binding Protein Level Predicts Liver Fibrosis and Prognosis in Primary Biliary Cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology* 査読あり 110 857-64 (2015)
- Sekiguchi T, Umemura T, Ota M.(11番、11名) Serum cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and poor prognosis in primary biliary cirrhosis. *PLOS ONE* 査読あり 10 e0131658 (2015)
- Umemura T, Ota M.(9番、9名) Human leukocyte antigen class II haplotypes affect clinical characteristics and progression of type 1 autoimmune hepatitis in Japan. *PLOS One* 査読あり 9 e100565 (2014)

〔学会発表〕(計13件)

- 城下智、梅村武司、田中榮司 原発性胆汁性胆管炎の線維化進行と病態進展における IL-33/ST2 pathway の役割、第41回日本肝臓学会東部会 2016.12.8-9 東京
- 城下智、梅村武司、太田正穂(10番、10名)PTPN22 遺伝子多型は自己免疫性肝疾患の疾患抵抗性と関連する 第25回日本組織適合性学会大会 2016.10.22.-24 札幌
- 梅村武司、城下智、田中榮司 自己免疫性肝疾患における PTPN22 遺伝子多型の検討 第52回日本肝臓学会総会 2016.5.19-20 千葉
- 城下智、梅村武司、吉澤要、田中榮司 無症候性および症候性原発性胆汁性肝硬変の予後解析 第113回日本内科学会講演会 2016.4.15-17 東京
- Yamazaki T, Joshita S, Umemura T, Tanaka E, Ota M. Association of PTPN22 haplotype with autoimmune liver disease in the Japanese population *Digestive Disease Week 2016* 2016.5.22-24 San Diego USA
- Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Tanaka E Asymptomatic and symptomatic states are independent risk factors predicting PBC long-term outcome *Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016* 2016.2.20.-24. Tokyo
- 梅村武司、関口智裕、田中榮司 原発性胆汁性肝硬変の進展に関連する因子の解析 第19回日本肝臓学会大会 2015.10.8-9 東京
- 関口智裕、梅村武司、田中榮司 原発性胆汁性肝硬変と血中 sCD14, EndoCABlgM, I-FABP の関係について 第19回日本肝臓学会大会 2015.10.8-9 東京
- 梅村武司、太田正穂(10番、10名)SS-SBT法を用いた HLA-DNA タイピング結果(64検体について) 第24回日本組織適合性学会大会 2015.9.10-12 水戸
- 梅村武司、城下智、関口智裕、田中榮司 原発性胆汁性肝硬変における血中サイトカイン・ケモカインの網羅的検討 第51回日本肝臓学会総会 2015.5.21-22 熊本
- 関口智裕、梅村武司、田中榮司 原発性胆汁性肝硬変の病態と関連するバイオマーカーの検討~サイトケラチン 18とその断片~ 第51回日本肝臓学会総会 2015.5.21-22 熊本
- 梅村武司、城下智、田中榮司 原発性胆汁性肝硬変における WFA+-M2BP の臨床的意義の検討 第101回日本消化器病学会総会 2015.4.23-25 仙台
- 吉澤要、梅村武司、他3名 自己免疫性

肝炎の病態と抗アクチン IgG 抗体、抗
Chromatin 抗体との関連 第 50 回日本
肝臓学会総会 2014.5.29-30 東京

〔図書〕(計 2 件)

Umemura T. IgG4-related autoimmune
hepatitis: Autoimmune liver disease
perspectives from Japan. Springer 305
137-43 (2014)
Yoshizawa K, Matsumoto A, Umemura T.
Epidemiology and natural history in
Japan: Autoimmune liver disease
perspectives from Japan. Springer 305
37-44 (2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 武司 (MEMURA, Takeji)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：30419345

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

太田 正穂 (OTA, Masao)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：50115333

(4) 研究協力者

()