

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業  
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究  
分担研究報告書

GWAS とトランスクリプトームの統合解析による原発性胆汁性胆管炎の病態解明

研究協力者 中村 稔 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専  
攻肝臓病学講座/長崎医療センター臨床研究センター 教授/客員研究員  
研究協力者 小森 敦正 長崎医療センター臨床研究センター 難治性疾患研究部長

研究要旨：我々は PBC の病態解明、新しい病型分類・治療標的の同定を目指して日本人 PBC の長期観察研究を行っている。今年度は、日本人 PBC-GWAS (PBC 1920 症例、コントロール 1770 例) データと肝生検組織のトランスクリプトーム (PBC 36 症例、正常肝 5 例) データを統合して、PBC 肝病変部で実際に働いている PBC 疾患発症経路の解析を行った。IPA 解析ソフトにより推測された疾患発症経路は、いずれのデータセットにおいても自然免疫、獲得免疫に関わるものであったが、それらに共通した最も有意な上流因子は IFNG と CD40L であった。また、トランスクリプトームの Hierarchical clustering により、PBC は疾患活動性の高い群と低い群に分類され、疾患活動性の高い群の上流解析で最も有意な因子は IFNG と CD40L であった。以上から、IFNG と CD40L は PBC の発症と活動性に関わる鍵分子であることが示唆され、その下流解析から、B 細胞に発現している TNFRSF13C が治療標的候補として同定された。

共同研究者

相葉 佳洋 長崎医療センター臨床研究センター  
人見 祐基 星薬科大学薬学部微生物学教室  
植野 和子 国立国際医療研究センター研究所

A．研究目的

欧米人、日本人、中国人の原発性胆汁性胆管炎 (PBC) のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、現在まで 40 か所以上の疾患感受性遺伝子領域が同定されている。しかし、これらの領域にコードされている遺伝子から予測される疾患発症経路と肝組織のトランスクリプトームから予測される疾患発症経路との比較検討は十分になされていない。

今回、日本人 PBC-GWAS データとトランスクリプトームデータを統合して、PBC 肝病変で実際に働いている疾患発症経路、上流・下流因子の同定、治療標的の探索を行った。

B．研究方法

GWAS データセットは、GWAS (日本人 PBC 1920 症例、コントロール 1770 例) 解析で  $P\text{-value} < 0.00001$  を示した 6760 SNPs の中から SNP 領域にアノテーションされた 261 遺伝子を選択した。トランスクリプトームデータセットは、肝生検組織の mRNA マイクロアレイ発現解析 (PBC 36 症例、正常肝 5 例) で正常肝に比べて発現が 2 倍以上変化している 1574 遺伝子 ( $P < 0.05$ ) を選択した。疾患発症経路、上流・下流因子は IPA 解析ソフト

を用いて解析した。肝臓を構成する種々の細胞特異的遺伝子発現情報は、published data (Nat Commun 2018;9:4383)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究の遺伝子解析に関しては、“日本人原発性胆汁性肝硬変の発症・進展に関わる網羅的遺伝子解析(Genome-wide association study: GWAS)(承認日2010.10.4、承認番号22064)”、“原発性胆汁性胆管炎の病態解明のためのゲノムワイド関連解析 1,000症例の追加解析 (承認日2017.10.2 承認番号 29081)”で当長崎医療センター及び各参加施設での倫理審査委員会の承認を得た。検体は、各施設で連結可能匿名化された後に当長崎医療センターに提供されたが、当センターにも個人情報管理者をおき、患者情報の取り扱い、保護、管理には細心の注意を払った。研究計画の開示、研究協力の任意性と撤回の自由、解析結果の開示、カウンセリングなどは、各施設の“ヒトゲノム研究を含む遺伝子解析研究計画”の倫理指針に従った。

C . 研究結果

GWAS データセットとトランスクリプトームデータセットに共通した疾患感受性遺伝子は 27 遺伝子( HLA, IKZF3, PRKCB, etc. ) 共通した疾患発症経路は 10 経路 ( Th1, Th2 pathways, etc. ) 共通した上流因子は 149 因子 ( IL27, EBI3, etc. ) であり、PBC 肝組織で発現変動している最も有意な上流因子は IFNG と CD40L であった。トランスクリプトームデータの Hierarchical clustering により、PBC は疾患活動性の高い症例と低い症例に分類され、両群で有意に発現が異なる 195 遺伝子の上流解析で最も有意な因子は IFNG と CD40L であった。IFNG と CD40L の下流解析から、B細胞に発現している TNFRSF13C

が治療標的候補として同定された。

D . 考察

GWAS とトランスクリプトームの統合解析により、PBC において疾患発症および活動性に中心的役割を果たしている上流因子( IFNG, CD40L)が同定でき、それらの下流に位置する治療標的を B 細胞上に同定できた。

E . 結論

本研究で確立した post-GWAS の解析手法は、今後の“科学的根拠に基づく PBC の病型分類と治療標的の同定”を目的とした臨床研究に重要な基盤を提供すものと思われる。

F . 研究発表

1. 論文発表

1 Kazuko Ueno, Yoshihiro Aiba, Yuki Hitomi, Shinji Shimoda, Hitomi Nakamura, Olivier Gervais, Yosuke Kawai, Minae Kawashima, Nao Nishida, Seik-Soon Kohn, Kaname Kojima, Shinji Katsushima, Atsushi Naganuma, Kazuhiro Sugi, Tatsuji Komatsu, Tomohiko Mannami, Kouki Matsushita, Kaname Yoshizawa, Fujio Makita, Toshiki Nikami, Hideo Nishimura, Hiroshi Kouno, Hirotaka Kouno, Hajime Ohta, Takuya Komura, Satoru Tsuruta, Kazuhiko Yamauchi, Tatsuro Kobata, Amane Kitasato, Tamotsu Kuroki, Seigo Abiru, Shinya Nagaoka, Atsumasa Komori, Hiroshi Yatsuhashi, Kiyoshi Migita, Hiromasa Ohira, Atsushi Tanaka, Hajime Takikawa, Masao Nagasaki, Katsushi Tokunaga, and Minoru Nakamura, PBC-GWAS Consortium in Japan. Integrated GWAS and mRNA Microarray Analysis Identified IFNG and CD40L as the Central Upstream Regulators

in Primary Biliary Cholangitis.  
*Hepatology Communications*, vol 0, 1-15,  
2020

**2** Hitomi Y, Ueno K, Kawai Y, Nishida N, Kojima K, Kawashima M, Aiba Y, Nakamura H, Kouno H, Kouno H, Ohta H, Sugi K, Nikami T, Yamashita T, Katsushima S, Komeda T, Ario K, Naganuma A, Shimada M, Hirashima N, Yoshizawa K, Makita F, Furuta K, Kikuchi M, Naeshiro N, Takahashi H, Mano Y, Yamashita H, Matsushita K, Tsunematsu S, Yabuuchi I, Nishimura H, Shimada Y, Yamauchi K, Komatsu T, Sugimoto R, Sakai H, Mita E, Koda M, Nakamura Y, Kamitsukasa H, Sato T, Nakamuta M, Masaki N, Takikawa H, Tanaka A, Ohira H, Zeniya M, Abe M, Kaneko S, Honda M, Arai K, Arinaga-Hino T, Hashimoto E, Taniai M, Umemura T, Joshita S, Nakao K, Ichikawa T, Shibata H, Takaki A, Yamagiwa S, Seike M, Sakisaka S, Takeyama Y, Harada M, Senju M, Yokosuka O, Kanda T, Ueno Y, Ebinuma H, Himoto T, Murata K, Shimoda S, Nagaoka S, Abiru S, Komori A, Migita K, Ito M, Yatsushashi H, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M POGlut1, the putative effector gene driven by rs2293370 in primary biliary cholangitis susceptibility locus chromosome 3q13.33.  
*Sci Rep* 9(1), 102, 2019

**3** Hitomi Y, Nakatani K, Kojima K, Nishida N, Kawai Y, Kawashima M, Aiba Y, Nagasaki M, Nakamura M, Tokunaga K NFKB1 and MANBA Confer Disease Susceptibility to Primary Biliary Cholangitis via Independent Putative Primary Functional Variants.  
*Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7(3), 515-532, 2019

**4** 中村 稔 特集 自己免疫性肝疾患 II 基礎 遺伝子 日本臨床 第78巻第1号 P16-26, 2020, 日本臨床社(東京)

## 2. 学会発表

**1** Aiba Y, Ueno K, Hitomi Y, Kawashima M, Nishida N, Kawai Y, Komori A, Yatsushashi H, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M and PBC-GWAS consortium in Japan. The role of PRKCB in the development of primary biliary cholangitis. AASLD THE LIVER MEETING 2019. Hynes Convention Center, Boston, MA. 2019.11.08.

**2** Shimoda S, Harada K, Nakamura M, M Eric Gershwin. Identification of novel biliary epithelial cell biomarkers in primary biliary cholangitis (PBC). AASLD THE LIVER MEETING 2019. Hynes Convention Center, Boston, MA. 2019.11.08.

**3** Ueno K, Aiba Y, Hitomi Y, Shimoda S, O Gervais, Kawai Y, Kawashima M, Nishida N, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Integrated analysis of GWAS and mRNA expression array identified IFNG and CD40L as the most significant upstream-regulators in primary biliary cholangitis. The 69th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics (ASHG 2019). The George R. Brown Convention Center, Houston, TX. 2019.10.15-19.

**4** Nakamura M. Genetics of Autoimmune Liver Disease. APASL STC Tokyo 2019. Keio Plaza Hotel, Tokyo. 2019.04.19.

**5** Ueno K, Aiba Y, Hitomi Y, Shimoda S, Tanaka A, Olivier Gervais, Kawai Y, Kawashima M, Nishida N, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M, PBC-GWAS

consortium in Japan. Pathway-Analysis Using Datasets of GWAS and mRNA Expression Array Identified IFNG as the Most Significant Upstream-Regulator in Primary Biliary Cholangitis. APASL STC Tokyo 2019. Keio Plaza Hotel, Tokyo. 2019.04.19.

6 Hitomi Y, Ueno K, Kawai Y, Nishida N, Kojima K, Kawashima M, Aiba Y, Shimoda S, Tanaka A, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M, PBC-GWAS Consortium in Japan. POGlut1, The Effector Gene Driven by rs2293370 in Primary Biliary Cholangitis (PBC) Susceptibility Locus Chromosome 3q13.33 in the Japanese Population. APASL STC Tokyo 2019. Keio Plaza Hotel, Tokyo. 2019.04.19.

7 Ueno K, Aiba Y, Hitomi Y, Shimoda S, O Gervais, Kawai Y, Kawashima M, Nishida N, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M and PBC-GWAS Consortium in Japan.

Integrated analysis of GWAS and mRNA microarray identified IFNG and CD40L as the central upstream-regulators in primary biliary cholangitis. The International Liver Congress 2019 (ILC2019). Reed Messe Wien Exhibition & Congress Center, Vienna, Austria. 2019.04.10-14.

8 Aiba Y, Hitomi Y, Ueno K, Nakamura M. Role of PRKCB in the development of primary biliary cholangitis. The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology. Act City Hamamatsu President, Hamamatsu. 2019.12.13.

9 人見祐基, 河合洋介, 植野和子, 西田奈央, 川嶋実苗, 相葉佳洋, Olivier Gervais, Seik-Soon Khor, 築地 信, 長崎正朗, 中村 稔, 徳永勝士. 原発性胆汁性胆管炎 (PBC)

感受性遺伝子領域に起因する発症機序の解明におけるゲノム編集技術の応用. 日本人類遺伝学会第 64 回大会. 長崎ブリックホール, 長崎. 2019.11.07.

10 下田慎治, 原田憲一, 中村 稔. 新たな PBC 治療標的分子の同定と治療へのアプローチ. 第 55 回日本肝臓学会総会. 京王プラザホテル, 東京. 2019.05.31.

11 人見祐基, 中村 稔. 日本人原発性胆汁性胆管炎 (PBC) 感受性遺伝子領域 3 番染色体長腕 13.33 に位置する causal variant およびエフェクター遺伝子 POGlut1 の同定. 第 55 回日本肝臓学会総会. 京王プラザホテル, 東京. 2019.05.31.

12 相葉佳洋, 西田奈央, 人見祐基, 小森敦正, 八橋 弘, 中村 稔. 原発性胆汁性胆管炎の肝組織網羅的遺伝子発現データを用いた疾患感受性遺伝子ならびに疾患関連 pathway の解析. 第 55 回日本肝臓学会総会. 京王プラザホテル, 東京. 2019.05.31.

13 下田慎治, 原田憲一, 中村 稔. PBC 診断・治療バイオマーカーと新たな治療標的分子の確立. 第 105 回日本消化器病学会総会. 石川県立音楽堂, 金沢. 2019.05.11.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし