

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

日本人 PBC-GWAS consortium の進捗状況

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

研究要旨：2010年10月から開始した“日本人PBCの発症・進展に関わる網羅的遺伝子解析（GWAS）”を継続し、2021.3.31までに日本人PBC 2,700症例のGWAS-genotypingを完了した。今年度は、これらのgenotyping dataを用いて、①同定した疾患感受性遺伝子のcausal variantとeffector geneの同定、②欧米、中国との共同研究によるPBC-GWASの国際メタ解析、③X染色体上の疾患感受性遺伝子の同定のための国際共同研究、④新たな解析手法（Regional Heritability Mapping法；RHM）を用いた疾患感受性遺伝子の同定、などを実施した。これらのPBC遺伝子研究から、新たに常染色体上に20ヶ所、X染色体上に数か所の疾患感受性遺伝子領域が同定されるとともに、疾患感受性遺伝子を介した疾患発症の分子機構、疾患発症経路の全貌、新たな分子標的候補が明らかになりつつある。

共同研究者

小森敦正 長崎医療センター臨床研究センター
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
長崎正朗 京都大学学際融合教育推進センター
徳永勝士 国立国際医療研究センター研究所
下田慎治 九州大学臨床教育センター
国立病院機構肝疾患ネットワーク（NH0肝ネット）参加32施設

A. 研究目的

原発性胆汁性胆管炎（primary biliary cholangitis；PBC）のpost-GWAS解析、国

際メタ解析から、遺伝因子を介した疾患発症の分子機構、疾患発症経路の全貌を明らかとし、現在の標準的治療に抵抗性で肝不全に至る予後不良症例の新たな分子標的を同定する。

B. 研究方法

日本人PBC-GWAS consortiumに登録されたPBC 2,721症例のGWASデータ（国立病院機構1,627症例、全国大学病院肝臓内科860症例、移植外科136症例）、欧米7,706症例、中国1,118症例のGWAS頻度情報、日本人PBC肝生検組織のトランスクリプトーム情報（PBC 80症例、CHC 20症例、健常人5例）、種々の公開データベース（eQTL, splicingQTL, methylationQTL, TWAS, EWAS, MWAS）情報、*in vitro* ゲノム編集技術などを駆使して、疾患感受性遺伝子領域の網羅的同定、causal variantとeffector geneの同定、遺伝因子を介した疾患発症の分子機構の解析、疾患発

症経路上の分子標的の同定などを試みた。

(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後、当センターで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はらった。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

・国際メタ解析により、新たに20ヶ所のPBC疾患感受性遺伝子領域を同定でき、疾患感受性遺伝子領域は60ヶ所となった。そのほとんどは免疫関連分子(サイトカイン、サイトカイン受容体、細胞内シグナル伝達分子、転写因子など)であり、APC, TH1, TFH, TH17, B, TREG, 細胞内のシグナル伝達経路上に複数の分子標的候補が同定できた(論文投稿中)。

・日本人PBC 1953症例と一般集団3690人のゲノムデータに対して、ポリジェニック効果を考慮した手法である領域内遺伝率推定法 (Regional Heritability Mapping 法;RHM) によるゲノム解析を行い、日本人の新たな疾患感受性遺伝子(STAT4, ULK4, KCNH5)を同定した(論文1)。

・X染色体に新規疾患感受性遺伝子領域 rs705904, $P=9.93 \times 10^{-8}$ *GRIPAP1*, *TIMM17B*, *PQP1*, *PIM2*, *SLC35A2*, *OTUD5* 遺伝子座が存

在)を同定した。この遺伝子領域にはこれらの遺伝子の発現だけでなく、*FOXP3* 遺伝子発現を制御するスーパーエンハンサー

(GH0XJ048933)が存在し、X染色体を介する重要な免疫調整機構の存在を見出した(論文2)。

・eQTL解析や*in vitro*ゲノム編集を用いた解析により、chr. 11q23.1領域の疾患感受性遺伝子のcausal variantとeffector geneが*COLCA1*/*COLCA2*であることが明らかとなった(論文3)。

D. 考察

GWASを基盤とした世界規模の共同研究により、PBCの発症や進展に関連したX染色体を含む多くの遺伝子領域(疾患関連遺伝子)が同定された。post-GWASの解析手法を駆使することにより、causal variant, effector geneの同定も可能となり、遺伝因子を介する新たな疾患発症機構、分子標的が明らかとなりつつある。

E. 結論

今後は、肝生検組織のRNAseq解析データ、環境因子などを含めて、GWASを基盤とした総合的解析を世界規模ですすめる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gervais O, Ueno K, Kawai Y, Hitomi Y, Aiba Y, Ueta M, Nakamura M, Tokunaga K, Nagasaki M. Regional heritability mapping identifies several novel loci (*STAT4*, *ULK4*, and *KCNH5*) for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Eur J Hum Genet.* in press 2021

2. Asselta R, Paraboschi EM, Gerussi A, Cordell HJ, Mells GF, Sandford RN, Jones DE, Nakamura M, Ueno K, Hitomi Y, Kawashima M, Nishida N, Tokunaga K, Nagasaki M, Tanaka A, Tang R, Li Z, Shi Y, Liu X, Xiong

Ma, Hirsschfield G, Shiminovitch KA, Canada-US PBC consortium, Italian PBC Genetics Study Group, UK-PBC consortium, Japan PBC-GWAS consortium, Carbone M, Cardamone G, Duga S, Gershwin ME, Seldin MF, Invernizzi P. X chromosome contribution to the genetic architecture of primary biliary cholangitis.

Gastroenterology in press, 2021,

3. Hitomi Y, Aiba Y, Kawai Y, Kojima K, Ueno K, Nishida N, Kawashima M, Gervais O, Khor S-S, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M and Tsuiji M. rs1944919 on chromosome 11q23.1 and its effector genes *COLCA1/COLCA2* confer susceptibility to primary biliary cholangitis. *Sci Rep 11:4557, 2021*

4. 中村 稔. 原発性胆汁性胆管炎. 特集 難病研究の進歩 II 消化器. 増大特集 難病の進歩、生体の科学 p428-429, Vol 71 No5, 2020. 医学書院、東京

5. 人見祐基、中村 稔. PBC の疾患感受性遺伝子と病態の関連性. 特集 胆道疾患 UPDATE:毛細胆管から乳頭部まで. 肝胆膵 Vol. 80 No. 6, 965-974, 2020

2. 学会発表

1. Ueno K, Aiba Y, Hitomi Y, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Transcriptome and GWAS identified androgen receptor as a central regulator for eosinophilia in primary biliary cholangitis. ASHG annual meeting, San Diego, USA, 2020. Oct 27-30.

2. Aiba Y, Ueno K, Hitomi Y, Gervais O, Kawai Y, Kawashima M, Nishida N, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. The analysis of POU2AF1 and its related molecules in the pathogenesis of primary biliary cholangitis by using GWAS and transcriptome datasets. ASHG annual

meeting, San Diego, USA, 2020. Oct 27-30.

3. Ueno K, Aiba Y, Hitomi Y Shimoda S, Nakamura H, Gervais OH, Kawai Y, Kawashima M, Nishida N, Khor S-S, Kojima K, Komori A, Yatsushashi H, Tanaka A, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M and PBC-GWAS consortium in Japan. Integrated GWAS and mRNA Microarray Analysis Identified IFNG and CD40L as the Central Upstream Regulators in Primary Biliary Cholangitis. Annual meeting of EASL, London, UK, 2020, April 27-29

4. 人見祐基、相葉佳洋、河合洋介、小島 要、植野和子、西田奈央、川嶋実苗、Olivier Gervais, Seik-Soon Khor, 長崎正朗、徳永勝士、中村 稔、築地 信. COLCA1/COLCA2, the effector genes in primary biliary cholangitis susceptibility locus chromosome 11q23.1. 日本人類遺伝学会, 名古屋 (web 開催) 2020. 11. 18

5. 下田慎治、原田憲一、中村 稔. 原発性胆汁性胆管炎におけるバイオマーカーと治療標的分子の探索. 第56回日本肝臓学会総会. 大阪国際会議場、2020. 5. 21

6. 人見祐基、中村 稔. 日本人原発性胆汁性胆管炎感受性遺伝子領域 11 番染色体長腕 23.1 に位置する causal variant およびエフェクター遺伝子の同定. 第56回日本肝臓学会総会. 大阪国際会議場、2020. 5. 21

7. 植野和子、中村 稔. 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. 第56回日本肝臓学会総会. 大阪国際会議場、2020. 5. 22

8. 相葉佳洋、植野和子、人見祐基、小森敦正、橋本 悟、戸次鎮宗、阿比留正剛、長岡進矢、八橋弘、中村 稔. 原発性胆汁性胆管炎に關与する遺伝子の共発現ネットワーク解析. 第56回日本肝臓学会総会. 大阪国際会議場、2020. 5. 22

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