

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

国際 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：我々とケンブリッジ大学の主導で、欧米人と東アジア人（PBC 患者 10,516 症例、健常対照者 20,772 例）の PBC-GWAS-国際メタ解析を実施し、新規疾患感受性遺伝子領域 20 ヶ所を含む計 60 ヶ所の PBC 疾患感受性遺伝子領域を同定した。また、ミラノ大学との共同研究で、X 染色体の PBC-GWAS-国際メタ解析を実施し、女性に自己免疫疾患が高頻度に発症することの原因となる super enhancer 領域を同定した。PBC 疾患感受性遺伝子は、集団（人種）間である程度の相違はあるものの、そのほとんどは自然免疫～抗原提示細胞～T 細胞～B 細胞の活性化に関連する共通した免疫経路上に存在することも確認された。同定された疾患感受性遺伝子を用いた in silico drug efficiency screening により、ベザフィブラートを含む複数の既存の治療薬が候補薬剤として選択されたが、PBC に最も有効とされているウルソデオキシコール酸は、この方法では候補薬剤としては選択されず、ウルソデオキシコール酸は、上記疾患発症経路上には治療標的が存在しないことが示唆された。また、ゲノム編集などの最新の分子生物学的手法を用いて、各々の疾患感受性遺伝子領域の中に多数存在する一塩基多型 (SNP) の中から、実際に PBC 発症に関与する causal variant と、causal variant により遺伝子の発現変化が生じる effector gene を同定した。

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 唐津赤十字病院  
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) - GWAS の国際共同研究、post-GWAS 解析から、遺伝因子を介した PBC の疾患発症の分子機構、疾患発症経路の全貌を明らかとする。また、トランスクリプトームとの統合解析により、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 約 3,000 症例の GWAS データ、欧米人約 8,000 症例、中国人約 1,200 症例の GWAS 頻度情報、日本人 PBC 肝生検組織 (PBC 100 症例、CHC 20 症例、健常人 5 例) のトランスクリプトーム情報、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、*in silico* drug efficiency screening, 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・進展に関す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④)。

・同定された疾患感受性遺伝子を用いた *in silico* drug efficiency screening により、ベザフィブラートを含む複数の既存の治療薬が候補薬剤として選択されたが、PBC に最も有効とされているウルソデオキシコール酸は、この方法では候補薬剤としては選択されず、ウルソデオキシコール酸は、前記疾患発症経路上には治療標的が存在しないことが示唆された (論文④)。

・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が示唆された (論文⑤)。

・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⑥)。

・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、chr. 6q27 領域の疾患感受性遺伝子 rs9459874 と rs1012656 が順に *CCR6*, *FGFR10P* の causal variant であることが明らかとなった (論文①⑦)。

#### D. 考察

世界最大規模のPBC-GWAS国際共同研究により、PBCの発症や進展に関連したX染色体を含む多数の遺伝子領域（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の同定も可能となった。これらの解析データと公開データベースの情報とを統合することにより、PBCの疾患発症経路、治療標的が明らかとなった。

今後は、PBC症例の経時的臨床情報、GWAS情報、肝生検組織及び末梢血のトランスクリプトーム（RNA-seq）情報を統合して、①分子病態に基づくPBCの新たな病型分類の確立、②現在の標準的治療法に抵抗して肝硬変、肝不全に進行する予後不良症例の治療標的の同定、③PBCの発症や予後予測に関する数理モデルの作成、などを目的として国内外での多施設共同研究を継続する予定である

#### E. 結論

本、難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班の協力により、PBC-GWAS国際共同研究の成果が実りつつあり、今後は、さらなるPBC病態の解明、治療標的の同定が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

①Hitomi Y, Aiba Y, Ueno K, Nishida N, Kawai Y, Kawashima M, Yasunami M, Gervais O, Ito M, Cordell HJ, Mells GF, Nagasaki M, Tokunaga K, Tsuiji M, Nakamura M. rs9459874 and rs1012656 in CCR6/FGFR10P confer susceptibility to primary biliary cholangitis. *J Autoimmun.* 2022 Jan; 126:102775.

②Kakuta Y, Iwaki H, Umeno J, Kawai Y, Kawahara M, Takagawa T, Shimoyama Y, Naito T, Moroi R, Kuroha M, Shiga H, Watanabe K, Nakamura S, Nakase H, Sasaki M, Hanai H, Fuyuno Y, Hirano A, Matsumoto T, Kudo H, Minegishi N, Nakamura M, Hisamatsu T, Andoh A, Nagasaki M, Tokunaga K, Kinouchi Y; MENDEL study group, Masamune A. Crohn's disease and early exposure to thiopurines are independent risk factors for mosaic chromosomal alterations in patients with inflammatory bowel diseases. *J Crohn's Colitis.* 2021 Nov 9; jjab199. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjab199. Online ahead of print. PMID: 34751398

③Aibara N, Ohyama K, Nakamura M, Nakamura H, Tamai M, Kishikawa N, Kawakami A, Tsukamoto K, Nakashima M, Kuroda N. Investigation of immune complexes formed by mitochondrial antigens containing a new lypoylated site in sera of primary biliary cholangitis patients. *Clin Exp Immunol.* 2021 Jun; 204(3):335-343.

④Cordell HJ, Fryett JJ, Ueno K, Darlay R, Aiba Y, Hitomi Y, Kawashima M, Nishida N, Khor SS, Gervais O, Kawai Y, Nagasaki M, Tokunaga K, Tang R, Shi Y, Li Z, Juran BD, Atkinson EJ, Gerussi A, Carbone M, Asselta R, Cheung A, de Andrade M, Baras A, Horowitz J, Ferreira MAR, Sun D, Jones DE, Flack S, Spicer A, Mulcahy VL, Byan J, Han Y, Sandford RN, Lazaridis KN, Amos CI, Hirschfield GM, Seldin MF, Invernizzi P, Siminovitch KA, Ma X, Nakamura M, Mells GF; PBC Consortia; Canadian PBC

Consortium; Chinese PBC Consortium; Italian PBC Study Group; Japan-PBC-GWAS Consortium; US PBC Consortium; UK-PBC Consortium. An international genome-wide meta-analysis of primary biliary cholangitis. Novel risk loci and candidate drugs. *J Hepatol*, 2021 Sep; 75(3):572-581.

⑤Asselta R, Paraboschi EM, Gerussi A, Cordell HJ, Mellis 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 M, Hirschfield G, Siminovitch KA; Canadian-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*. 2021 Jun; 160(7):2483-2495

⑥Gervais 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*. 2021 Aug; 29(8):1282-1291.

⑦Hitomi Y, Aiba Y, Kawai Y, Kojima K, Ueno K, Nishida N, Kawashima M, Gervais O, Khor SS, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M, Tsuiji M. rs1944919 in chromosome 11q23.1 and its effector genes *COLCA1/COLCA2* confer susceptibility to primary biliary cholangitis. *Sci Rep*, 2021 Feb25;

11(1):4557

## 2. 学会発表

- ①Ueno K, Hitomi Y, Aiba Y, Olivier Gervais, Kawai Y, Seik-Soon Khor, Kawashima M, Nishida N, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Transcriptome and GWAS identified rs2238678 as a critical SNP for eosinophilia in primary biliary cholangitis. ASHG2021. Web, 2021.10.18-21.
- ②Olivier Gervais, Ueno K, Kawai Y, Hitomi Y, Aiba Y, Ueta M, Nakamura M, Tokunaga K, Nagasaki M. Applying the regional heritability mapping method to primary biliary cholangitis in the Japanese population. ASHG2021. Web, ASHG2021. 2021.10.18-21.
- ③Hitomi Y, Aiba Y, Kawai Y, Kojima K, Ueno K, Nishida N, Kawashima M, Olivier Gervais, Seik-Soon Khor, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M, Tsuiji M. rs1944919 on human chromosome 11q23.1 and its effector genes *COLCA1* and *COLCA2* confer susceptibility to primary biliary cholangitis. ASHG2021. Web, 2021.10.18-21.
- ④Hitomi Y, Aiba Y, Kawai Y, Kojima K, Ueno K, Nishida N, Kawashima M, Olivier Gervais, Seik-Soon Khor, Nagasaki M, Tokunaga K, Tsuiji M, Nakamura M. *COLCA1* and *COLCA2*, the effector genes driven by rs1944919 in primary biliary cholangitis (PBC) susceptibility locus chromosome 11q23.1 in the Japanese population. APASL STC 2021. 大阪(Web), 2021.09.02-03.
- ⑤Hitomi Y, Aiba Y, Tsuiji M, Nakamura

M. Identification of the primary functional variants in primary biliary cholangitis susceptibility gene

CCR6/FGFR10P. 第 50 回日本免疫学会総会. 奈良, 2021. 12. 08-10.

⑥相葉佳洋, 植野和子, 人見祐基, 伊東正博, 小森敦正, 橋元 悟, 戸次鎮宗, 阿比留正剛, 長岡進矢, 八橋 弘, 中村 稔. 肝組織アレイデータに基づいた日本人原発性胆汁性胆管炎の疾患感受性遺伝子 POU2AF1 とその関連遺伝子の解析. 第 58 回日本消化器免疫学会総会. 京都, 2021. 07. 02.

⑦相葉佳洋, 植野和子, 人見祐基, 西田奈央, 下田慎治, 小森敦正, 橋元 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おける疾患感受性遺伝子 POU2AF1 とその関連遺伝子の解析. 第 57 回日本肝臓学会総会. 札幌, 2021. 06. 18.

#### 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