

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590969

研究課題名(和文) リシークエンシングによる自己免疫性肝疾患のHLAゲノム多様性解析

研究課題名(英文) Resequencing of the entire HLA region in autoimmune liver diseases

研究代表者

梅村 武司 (UMEMURA, Takeji)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：30419345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性肝炎と原発性胆汁性肝硬変患者におけるHLAの解析を行い、自己免疫性肝炎ではHLA-DRB1\*04:05-DQB1\*04:01とDRB1\*15:01-DQB1\*06:02ハプロタイプが、原発性胆汁性肝硬変ではDRB1\*08:03-DQB1\*06:01とDRB1\*13:02-DQB1\*06:04、DRB1\*11:01-DQB1\*03:01ハプロタイプが疾患感受性、抵抗性と関連を認めた。さらに、自己免疫性肝炎では肝癌発症例、肝不全進行例と、原発性胆汁性肝硬変では肝硬変、肝移植症例と関連のあるHLAハプロタイプを確認し、HLAと両疾患の関連性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated HLA class I A, B, and C and HLA class II DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes in Japanese patients with autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cirrhosis (PBC). HLA-DRB1 DRB1\*04:05-DQB1\*04:01 haplotype was significantly associated with AIH susceptibility. Conversely, the DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 haplotype was associated with protection from both disease onset. Significant associations were found with PBC susceptibility for the DRB1\*08:03-DQB1\*06:01. There were significant protective associations with the DRB1\*13:02-DQB1\*06:04 and DRB1\*11:01-DQB1\*03:01 haplotypes. The frequency of the DRB1\*08:03-DQB1\*06:01 haplotype was significantly higher in AIH patients who developed hepatic failure. The frequency of the DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 haplotype was significantly higher in PBC patients who had received orthotopic liver transplantation. We established the role of HLA haplotypes in determining AIH and PBC susceptibility, protection and progression in the Japanese population.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：HLA 自己免疫性肝炎 原発性胆汁性肝硬変 次世代シーケンサー DNAタイピング

1. 研究開始当初の背景

ヒトの MHC (Major Histocompatibility Complex、主要組織適合遺伝子複合体) である HLA は、生体防御の最前線で、多様な病原体由来のペプチドを結合し、抗原特異的免疫応答を制御している。ヒトゲノムの中で最も多様性に富む遺伝子群であり、HLA 遺伝子 6 座 (HLA-A、-B、-C、-DR、-DQ、-DP) に計 3,600 種類の HLA 対立遺伝子が存在する。HLA は、自己タンパク由来のペプチドを結合できるものが選択され、さらに膨大な外来病原体タンパク由来のペプチドと結合でき感染防御に寄与する HLA が選択され、この HLA が、再び特定の自己ペプチドと結合して、自己免疫疾患を誘導すると推測されている。

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、これまでの内外の報告から自己免疫性肝炎(AIH)と原発性胆汁性肝硬変(PBC)の発症に HLA 遺伝子が密接な関わりを持つことは明らかであり、HLA 遺伝子領域の再解析を推進する必要がある。現在までに HLA 遺伝子領域の全体像の解明がなされていないため HLA と疾病との統計学的相関については、HLA そのものが疾患の発症に関わっているのか、あるいは特定の HLA 対立遺伝子と強い連鎖不平衡にある非 HLA 遺伝子が関与しているのか不詳である。しかも、HLA ハプロタイプ上の対立遺伝子が真の原因遺伝子か、その HLA に結合する病因ペプチドは何か、など根本的疑問が解決されておらず、相関の分子生物学的機序は不詳であり、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 領域の詳細な再解析を行い、疾患感受性遺伝子及び多型を同定し、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ことが目的である。具体的には以下の事を明らかにする。

- (1) AIH と PBC 患者、健常対照者群について HLA 遺伝子のタイピングを行う。
- (2) 関連解析を行い、疾病、病態の進行と関連のある疾患感受性 HLA 遺伝子の同定を行う。
- (3) AIH と PBC 患者群と健常対照者群において 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。

3. 研究の方法

(1) AIH、PBC 患者における HLA 領域のタイピング

集積してきた AIH 156 例、PBC 229 例の検体を用いて、HLA 遺伝子 6 座 (HLA-A、-B、-C、

-DR、-DQ、-DP) のタイピングを行う。方法としては Luminex xMAP テクノロジーでタイピングを施行し、sequence-based typing 法で HLA genotype を決定する。各患者と健常対照者における HLA ハプロタイプを同定する。さらに、HLA DRB1 遺伝子の DR 鎖アミノ酸配列を IMGT/HLA データベースより解析して疾患感受性と関連のあるアミノ酸配列の検討を行う。

(2) 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。

(3) AIH、PBC においてリシーケンシングを行い、ゲノム配列の決定

AIH と PBC20 症例ずつ次世代シーケンサーを使用して HLA 領域と非 HLA 領域についてリシーケンシングを行い、直接塩基配列決定法を用いてゲノム配列の決定をする。

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。健常対照者と比較した場合、HLA DRB1\*04:05-DQB1\*04:01 ハプロタイプは AIH の疾患感受性 遺伝子であり (30% vs. 11%,  $P = 1.2 \times 10^{-10}$ ; odds ratio [OR] = 3.51)、血清 IgG 高値 (3042 vs. 2606 mg/dL,  $P = 0.041$ )、抗平滑筋抗体陽性 (77% vs. 34%,  $P = 0.00006$ ) と強い関連を示した。HLA A\*24:02 と C\*01:02 アリルもそれぞれ疾患感受性と有意に関連していたが ( $P_c = 0.0053$ 、 $0.036$ ) 何れも DRB1\*04:05-DQB1\*04:01 ハプロタイプと連鎖しているためであった。HLA DP で発症と有意な関連性を示すアリルは見つからなかった。一方、DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 ハプロタイプは疾患抵抗性 (5% vs. 13%,  $P = 0.00057$ ; OR = 0.38) と強く関連を示し、肝癌発症 (25% vs. 5%,  $P = 0.017$ ; OR = 6.81) に有意な関連を示した。さらに、DRB1\*08:03-DQB1\*06:01 ハプロタイプは肝不全発症例に高率 (22% vs. 6%,  $P = 0.034$ ; OR = 4.38) であった。

表 1 AIH と健常人における HLA ハプロタイプの違い

Allele at each locus		Patients with AIH	Healthy subjects	P value
<i>DRB1</i>	<i>DQB1</i>	2n = 312	2n = 402	
*04:05	*04:01	30%	11%	$1.2 \times 10^{-10}$
*15:01	*06:02	5%	13%	0.00057

DR 鎖のアミノ酸配列の検討では 11 番、13 番、57 番が valine-histidine-serine の場合 AIH 患者で有意に高率である事を明らかにした(P = 1.7 × 10<sup>-11</sup>; OR = 3.52)。これらの結果は本邦の AIH における疾患抵抗性、病態進行と関連する HLA ハプロタイプの存在を報告した初めての研究である。

### (2) PBC と HLA ハプロタイプの検討

229 例の PBC 症例について HLA class I と class II の解析を施行した。健常対照者と比較した場合、PBC では DRB1\*08:03-DQB1\*06:01(13% vs. 6%, P = 0.00025; OR = 2.22) と DRB1\*04:05-DQB1\*04:01 ハプロタイプ(17% vs. 13%, P = 0.044; OR = 1.38)が患者で有意に高率に保有していることが明らかとなった。DRB1\*13:02-DQB1\*06:04 ハプロタイプ(2% vs. 5%, P = 0.00093; OR = 0.27) と DRB1\*11:01-DQB1\*03:01 ハプロタイプ(1% vs. 4%, P = 0.03; OR = 0.37)が疾患抵抗性と有意な関連を認めた。

表 2 PBC と健常人における HLA ハプロタイプの違い

Allele at each locus		Patients with PBC	Healthy subjects	P value
DRB1	DQB1	2n = 458	2n = 1032	
*08:03	*06:01	13%	6%	0.00025
*04:05	*04:01	17%	13%	0.044
*13:02	*06:04	2%	5%	0.00093
*11:01	*03:01	1%	4%	0.03

さらに、DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 ハプロタイプは肝移植患者(33% vs. 11%, P = 0.0012; OR = 3.96)、肝硬変患者(23% vs. 10%, P = 0.0043; OR = 2.51)で有意に高率であり、病態の進展度と関連がある可能性が高い事が明らかとなった。特に DR 部位のアミノ酸配列の検討では 13 番、16 番、47 番、57 番、74 番のアミノ酸配列が PBC 患者で有意な関連を明らかにした。さらに、9 番 Lysine、11 番 Aspartic acid、26 番 Tyrosine、28 番 Histidine、30 番 Glycine、78 番 Valine は DRB1\*09:01 アリルのみに関連が強いアミノ酸配列であり病態進行と関連がある可能性が示唆された。

これらの結果は Hepatology に報告し、PBC と HLA の関連性を強く示唆するものとして高い評価を受けた。

以上より HLA ハプロタイプと AIH、PBC の間には疾患感受性、疾患抵抗性、さらには病態進展について強い関連が示唆されるため 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と考えられる。

### (3) HLA リシークエンシング

AIH と PBC について肝硬変、肝不全、移植例など病態進行例を含めたそれぞれ 20 症例ずつ選び、次世代シーケンサーを使用して全

HLA 領域のリシークエンシングを施行している。現在解析中であり、疾患特異的、病態進行に関連のある遺伝子変異が HLA 領域に認められるか検討中である。

### 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 6 件)

Umamura T, Ota M (9 名, 9 番) Human leukocyte antigen class II haplotypes affect clinical characteristics and progression of type 1 autoimmune hepatitis in Japan. PLOS ONE 査読あり 印刷中

Joshita S, Umamura T, Ota M(13 名, 13 番) STAT4 gene polymorphisms are associated with susceptibility and ANA status in primary biliary cirrhosis. Disease markers 査読あり Epub 727393 (2014). doi: 10.1155/2014/727393

Morita, S, Joshita S, Umamura T, Ota M (12 名, 12 番) Association analysis of Toll-like receptor 4 polymorphisms in Japanese primary biliary cirrhosis. Human Immunology 査読あり 74 219-222 (2013).

Umamura T, Ota M(7 名, 7 番) HLA class II molecules confer both susceptibility and progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Hepatology 査読あり 55 506-511 (2012).

Yoshizawa K, Umamura T(13 名, 4 番), Ota M(13 名, 9 番) Long-term outcome of Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. Hepatology 査読あり 56 668-676 (2012).

Shiina T, Umamura T(17 名, 8 番), Ota M(17 名, 15 番) Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. Tissue Antigens 査読あり 80 305-316 (2012).

#### [学会発表](計 7 件)

梅村武司、太田正穂(10 名, 10 番) SS-SBT 法による AIH および PBC 疾患感受性遺伝子 HLA-DRB1、-DQB1 の遺伝子タイピング 第 22 回 日本組織適合性学会大会 2013.9.14~15 福島

梅村武司、城下智、田中榮司 SS-SBT 法による AIH および PBC 疾患感受性遺伝子 HLA-DRB1 の遺伝子タイピング 第 49 回 日本肝臓学会総会 2013.6.6~7 東京  
Joshita S, Umamura T, Ota M(7 番, 7 名). Signal transducer and activator

of transcription 4 gene polymorphisms are associated with production of antinuclear antibody in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012.11.9~13 Boston, USA

Umemura T, Ota M (6 番, 6 名)

HLA-DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 haplotype is associated with progression of primary biliary cirrhosis. The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012.11.9~13 Boston, USA

勝山善彦、尾崎有紀、梅村武司、太田正穂(7 名, 7 番) SS-SBT 法による AIH および PBC 疾患感受性遺伝子 HLA-DRB1 の遺伝子タイピング 第 21 回 日本組織適合性学会大会 2012.9.22~23 東京

梅村武司、太田正穂(9 名, 9 番) 自己免疫性肝炎疾患感受性遺伝子の検索 第 21 回 日本組織適合性学会大会 2012.9.22~23 東京

Umemura T. The future of Gastroenterology in Asia. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19~21 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅村 武司 (UMEMURA, Takeji)

信州大学・医学部・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・医学部・准教授

研究者番号 : 50115333