

氏名	北本卓也
学位(専攻分野の名称)	博士(バイオサイエンス)
学位記番号	乙第913号
学位授与の日付	平成28年3月20日
学位論文題目	非アルコール性脂肪肝障害のゲノム・エピゲノム解析
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 喜田 聡 教授・農学博士 河野 友宏 准教授・博士(農学) 小川 英彦 博士(医学) 堀田 紀久子*

論文内容の要旨

非アルコール性脂肪肝障害 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease : NAFLD) は、飲酒歴がない (アルコール量 : 20g 以下/日) にもかかわらずアルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害がみられる疾患である。NAFLD には、肝細胞に脂肪が沈着するだけの単純性脂肪肝と、脂肪沈着とともに炎症や線維化を伴う重症型の非アルコール性脂肪肝炎 (Non-Alcoholic Steato-Hepatitis : NASH) が含まれる。アメリカやヨーロッパ諸国と同様に日本でも人口の 20~30% が NAFLD であり、1~3% が NASH であると推定されている。NASH はさらに肝硬変へと進展する場合があります、一部は肝がんにまで進展することが知られている。

NAFLD の発症や進展には遺伝素因が重要であることが一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) を用いたゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study : GWAS) による網羅的な解析により報告されている。いくつかの感受性領域が候補としてあげられているが、その中でも特に PNPLA3 遺伝子の SNP rs738409 が重要な役割を果たしていると考えられている。しかし GWAS で解析に用いられている SNP の数は限られており、NAFLD 感受性領域に含まれる他の多くの遺伝子多型については詳細な解析が行われていない。

また NAFLD は肥満や糖尿病、脂質代謝異常、高血圧を合併することが多く、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型だと考えられている。そのため NAFLD の発症や進展には遺伝素因だけではなくカロリー過剰摂取のような環境因子の影響も重要であり、両者が影響していると考えられている。

環境因子は DNA に対してメチル化などのエピジェネティックな変化を起こして遺伝子発現を制御することが

知られており、NAFLD 症例でも重症度と DNA メチル化レベルが関連することが報告されている。しかし、NAFLD 感受性領域を対象とした DNA メチル化の解析はこれまでに行われていない。

そこで本研究では、NAFLD 発症や進展における遺伝素因と環境因子の影響の解明を目的として、まず始めに日本人の NAFLD 症例を用いてマイクロアレイチップによる GWAS を行うことで感受性領域を見出し、さらにその感受性領域全体に対して次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスを行うことにより、NAFLD の遺伝素因を詳細に解析した。また感受性領域内の DNA メチル化と重症度との関連や、感受性領域内に存在する遺伝子の発現量と重症度との関連を解析した。

1. NAFLD の遺伝素因の探索と解析

1.1. GWAS による NAFLD 感受性領域の探索

日本人の NAFLD 症例 (NAFLD-1 : 345 人の NASH, 47 人の単純性脂肪肝) 392 人の血液から抽出した DNA を用いて、このうちの 104 人を Human660 W-Quad BeadChip により、288 人を HumanOmniExpress Bead Chip により、遺伝子型の決定を行った。NAFLD 症例との関連解析を行うコントロール群は、Illumina Human-Hap550 BeadChip によって遺伝子型が決定された 934 人の日本人一般集団のデータ (Control-1) を JSNP データベースから用いた。これら 3 種のマイクロアレイチップに共通する 295,887 箇所の SNP を決定し、このうちマイナーアレルの頻度 (Minor allele frequency : MAF) が 0.01 未満であった 31,177 箇所の SNP、成功率が 95% 未満であった 901 箇所の SNP、ハーディワインバーグ平衡から逸脱 ($p < 0.001$) していた 2,269 箇所

* 大阪大学医学部付属病院 特任講師

の SNP は除外し、261,540 箇所の SNP についてケース・コントロール関連解析を行った。その結果、22 番染色体長腕 13 領域 (chr22q13) の位置に最も有意差のあるピークがみられ、他にもいくつかのピークがみられた。閾値を 5.0×10^{-5} 未満と設定し、NAFLD 感受性候補の 56 箇所の SNP を得た。

1.2. NAFLD 感受性候補 SNP の再現性の確認

マイクロアレイチップの解析によって得られた NAFLD 感受性候補の 56 箇所の SNP について、それぞれの SNP を含む領域を特異的に増幅するような PCR プライマーと、遺伝子型を決定するためのプローブを設計した。マイクロアレイチップで用いたサンプルとは別の 172 人の NAFLD 症例 (NAFLD-2: 97 人の NASH, 4 人の単純性脂肪肝, 71 人の NAFLD) と 1012 人のコントロール群 (Control-2) の血液 DNA を用いてそれぞれ PCR プライマーで増幅した後、インバーダーアッセイにより候補 SNP の遺伝子型決定を行い、NAFLD-1, NAFLD-2, Control-1, Control-2 によるメタ解析を行った。その結果、chr22q13 の約 67 Kb の領域に特に強い関連がみられた。この領域には PNPLA3 遺伝子を含めて 3 つの遺伝子 (PNPLA3, SAMM50, PARVB) が存在していた。

NAFLD 症例はコントロール群と比べて体格指数 (Body Mass Index: BMI) が大きいので、これらの交絡因子の影響を補正するために遺伝子型、年齢、性別、BMI を説明変数として、NAFLD-1, NAFLD-2, Control-2 による多重ロジスティック回帰解析を行った。その際に、マイクロアレイチップの解析には含まれていなかった PNPLA3 遺伝子の rs738409 も含めて解析を行った。その結果、補正後も依然として chr22q13 の領域には強い関連がみられ ($P < 1.0 \times 10^{-9}$)、高いオッズ比 (1.84 - 2.05) を示した。またこの領域は連鎖不平衡が保たれていた。

1.3. NAFLD 感受性領域のターゲットリシーケンス

マイクロアレイの解析により見出された NAFLD 感受性領域は、PNPLA3 遺伝子の転写開始点 4.3 Kb 下流から、PARVB 遺伝子の転写開始点から 7.5 Kb 下流までの約 76 Kb である。マイクロアレイに搭載されている SNP の数は限られており、この領域中に存在する他の遺伝子多型の多くについては NAFLD との関連が解析されていない。そこで、NAFLD 症例でこの領域に含まれる全ての遺伝子多型を見出し、それらと NAFLD 発症や進展との関連を詳細に解析する目的で、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いたターゲットリシーケンスを行った。

NAFLD 感受性領域全体をカバーするように、約 108 Kb の領域を対象として特異的な 16 セットのプライマーを設計し、NAFLD 症例からランダムに選択した 28 人の血液 DNA を用いて Long-range PCR で増幅した。各増幅産物を等モル混合し、各サンプルを識別できるようにインデックス配列を付加してライブラリ作製を行った後、各サンプルのライブラリを等モル混合して 150 bp のペアエンドで MiSeq によるシーケンスを行った。得られたリードを、ヒトゲノム配列 (UCSC hg19) をリファレンスとして BWA (version 0.5.9rc1) でマッピングを行い、遺伝子多型を GATK (version 1.6.5-g557da77) により抽出した。得られた全ての遺伝子多型は、可視化ツールである IGV (version 1.5.65) を用いて確認した。

その結果、329 箇所の遺伝子多型が得られた。そのうちの 325 箇所の多型は dbSNP データベースに登録があるものであり、4 箇所の多型は新規 SNP であった。329 箇所の多型のうち 313 箇所が SNP であり、16 箇所が Insertion または Deletion であった。13 base の Insertion が最長の多型であった。

1.4. NAFLD 感受性領域の詳細な連鎖不平衡地図の作成

28 人の NAFLD 症例によるターゲットリシーケンスで得られた遺伝子多型から、 $MAF > 0.05$ であった 200 箇所の遺伝子多型について、540 人の NAFLD 症例と 1012 人のコントロール群の血液 DNA を用いて遺伝子型の決定を行った。遺伝子型の決定に成功したもののうち、 $MAF > 0.1$ であった 169 箇所の遺伝子多型を用いて HaploView により詳細な連鎖不平衡地図 (Linkage disequilibrium map: LD map) を作成した。その結果、NAFLD 感受性領域はさらに 4 つの LD ブロックに分かれており、1 Kb の LD ブロック 1, 21 Kb の LD ブロック 2, 48 Kb の LD ブロック 3, 2 Kb の LD ブロック 4 から構成されていることが明らかとなった。LD ブロック 1 と 2 は PNPLA3 遺伝子に存在し、LD ブロック 3 は SAMM50 遺伝子、LD ブロック 4 は PARVB 遺伝子にそれぞれ存在し、遺伝子ごとにブロック構造が分かれていることが明らかとなった。この LD ブロックの構造は、NAFLD 症例とコントロール群で同様であった。

1.5. NAFLD 感受性領域中の遺伝子多型と NAFLD との関連解析

上記により得られた 169 箇所の遺伝子多型について単純性脂肪肝と NASH に対する関連を調べた。P 値は、 3.0×10^{-4} (0.05/169 箇所の SNP) 未満の値を統計学的に有意であるとした。遺伝子型、年齢、性別、BMI、2

型糖尿病の有無を説明変数として多重ロジスティック回帰分析を行った結果、LD ブロック 4 (PARVB 遺伝子) の rs6006610 ($P=6.1 \times 10^{-5}$) と rs6006611 ($P=7.1 \times 10^{-6}$), LD ブロック 1 (PNPLA3 遺伝子) の rs2006943 ($P=5.6 \times 10^{-5}$) に、単純性脂肪肝と比較して NASH で有意に関連がみられた。単純性脂肪肝のサンプル数は $n=52$ と少ないため、単純性脂肪肝を含めた 540 人の NAFLD 症例と、単純性脂肪肝を除いた NASH 症例のみの 488 人について、それぞれコントロール群と比較した。その結果、LD ブロック 1 から 4 のほとんどの遺伝子多型が NAFLD と関連しており、またこれらの関連は NASH のみと比較することでより強くなる傾向がみられた。関連の強さは LD ブロック 2 (PNPLA3 遺伝子) が最も大きかったが、LD ブロック 4 (PARVB 遺伝子) に関しては、NAFLD と比較した場合と NASH のみで比較した場合の差が最も大きかったことから、PARVB 遺伝子は NAFLD や単純性脂肪肝よりも、より NASH (重症化) に強く関連していることが示唆された。

次に 169 箇所の遺伝子多型と組織学的所見との関連を調べた。年齢、性別、BMI、2 型糖尿病の有無により補正を行って多重線形回帰分析による解析の結果、LD ブロック 2 の rs12484700 ($P=2.2 \times 10^{-4}$) に脂肪化の程度と関連がみられた。LD ブロック 4 の rs6006610 ($P=1.9 \times 10^{-4}$) と rs6006611 ($P=4.4 \times 10^{-5}$) は脂肪様膨化との関連がみられた。また LD ブロック 2 から 4 までの多数の遺伝子多型に NAFLD 活動性スコアとの関連がみられたが、LD ブロック 4 の rs6006611 ($P=3.4 \times 10^{-6}$) が最も強く関連していた。LD ブロック 1 の rs734561 ($P=2.6 \times 10^{-4}$) と rs2006943 ($P=1.9 \times 10^{-4}$) に肝線維化の進行との関連がみられた。

最後に肝障害のマーカーである AST (Aspartate aminotransferase) や ALT (Alanine aminotransferase) レベルとの関連を調べた結果、LD ブロック 1 から 4 の多数の遺伝子多型に関連がみられたが、特に LD ブロック 2 との関連が最も強かった。

これらのことから、これまで重要だと考えられていた PNPLA3 遺伝子に加えて SAMM50 遺伝子や PARVB 遺伝子も NAFLD の発症や進展に重要な役割をもつことが示唆された。また生化学的形質や組織学的所見の項目によって、それぞれの遺伝子内の SNP との関連の程度が異なることから、NAFLD の発症や進展に対して、それぞれの遺伝子の役割が異なることが示唆された。

2. NAFLD 発症と進展に関わる DNA メチル化の解析

2.1. NAFLD 感受性領域中の CpG island のターゲットバイサルファイトシーケンス

PNPLA3, SAMM50, PARVB 遺伝子を含む領域は NAFLD の発症や進展に重要な領域であるが、この領域に対して肝臓 DNA のメチル化解析を詳細に行った報告はこれまでにない。この領域には 4 箇所の CpG island (CpG99, CpG71, CpG26, CpG101) が存在し、それぞれ PNPLA3, SAMM50, PARVB variant1, PARVB variant2 の上流に位置している。そこで、これら 4 箇所の CpG island の DNA メチル化レベルと NAFLD の重症度との関連を解析する目的で、次世代シーケンサーを用いたターゲットバイサルファイトシーケンスを行った。

最初に、NAFLD 症例 32 人分の肝臓 DNA と 29 人分の血液 DNA のバイサルファイト処理を行った (1st セット)。バイサルファイト処理後の DNA 配列に特異的なプライマーセットを設計し、4 箇所の CpG island を PCR で増幅した。ターゲットリシーケンスのときと同様な方法でライブラリを作製し、100bp のペアエンドで MiSeq によるランを行った。得られたシーケンス配列を、ヒトゲノム配列 (UCSC hg19) をリファレンスとして Bismark (v0.8.3) でマッピングを行い、各 CpG サイトのメチル化レベルを算出した。117 箇所 (CpG99), 66 箇所 (CpG71), 42 箇所 (CpG26), 124 箇所 (CpG101) の合計 349 箇所の CpG サイトを解析に用いた。

2.2. 肝線維化ステージと DNA メチル化レベルとの関連解析

1st セットの NAFLD 症例の肝臓 DNA を、肝線維化ステージにより軽度群 (mild) と進行群 (advanced) の 2 群に分け、4 箇所の CpG island のメチル化レベルとの関連を解析した。その結果、advanced NAFLD において CpG99 内の 4 箇所の CpG サイトが高メチル化状態であった ($p<0.05$)。一方、CpG26 内の 25 箇所の CpG サイトが低メチル化状態であった ($p<0.05$)。CpG71 と CpG101 には 2 群間で有意な差はみられなかった。

肝線維化ステージと肝臓 DNA のメチル化レベルとの関連を再確認するために、さらに NAFLD 症例 33 人分の肝臓 DNA (2nd セット) を追加し、1st セットで有意差がみられた CpG99 と CpG26 についてメタ解析を行った。その結果、advanced NAFLD において CpG99 は同様に高メチル化状態であり CpG26 は同様に低メチ

ル化状態であった (Q values<0.05)。

これらの肝線維化ステージによるメチル化レベルの違いは、血液 DNA ではみられなかったことから、肝臓 DNA に特異的な違いであることが示唆された。

PNPLA3 遺伝子の SNP rs738409 (I148M : M はリスクアレル) は NAFLD 感受性の SNP として最も重要であると考えられている。そこで、rs738409 の遺伝子型ごとの肝臓 DNA のメチル化レベルを解析した。1st セットと 2nd セットを 2 つの遺伝子型グループに分けて (MM vs IM+II), mild と advanced NAFLD の肝臓 DNA メチル化レベルを比較した。その結果、CpG99 では 4 箇所の CpG サイトが MM グループでのみ、advanced NAFLD で高メチル化状態であった。IM+II グループでは mild と advanced の NAFLD でメチル化レベルの違いはみられなかった。このことから、rs738409 の遺伝子型が CpG99 のメチル化状態に影響することが示唆された。一方、CpG26 では MM と IM+II グループの両方で advanced NAFLD で低メチル化状態であり、遺伝子型による影響はみられなかった。

2.3. C 型慢性肝炎症例の肝臓 DNA のメチル化解析

肝線維化は NAFLD だけではなく様々な肝疾患により起こることから、肝臓での CpG99 と CpG26 のメチル化状態の違いが NAFLD 特異的であるかどうかを調べるために、C 型慢性肝炎症例の肝臓 DNA のメチル化レベルを同様に解析した。その結果 CpG99 では、advanced NAFLD で高メチル化状態であった 4 箇所を含む 9 箇所の CpG サイトが、肝線維化が進行した C 型慢性肝炎症例でも同様に高メチル化状態であった (Q values<0.05)。CpG26 では 26 箇所の CpG サイトが、肝線維化が進行した C 型慢性肝炎症例で advanced NAFLD と同様に低メチル化状態であった (Q values<0.05)。これらの結果から、肝臓での CpG99 と CpG26 のメチル化状態の違いは、NAFLD に特異的なものではなく、肝線維化の進行に関連していることが示唆された。

2.4. NAFLD 症例の肝臓における PNPLA3, SAMM50, PARVB 各遺伝子 mRNA レベルの測定

ゲノム DNA を抽出した肝生検サンプルと同じ切片からトータル RNA を抽出した。qPCR により PNPLA3, SAMM50, PARVB variant1 と variant2 それぞれの mRNA レベルを測定し、肝線維化ステージとの関連を調べた。その結果、PNPLA3 の mRNA レベルは ad-

vanced NAFLD で有意に低かった (P=0.0076)。NAFLD 症例を 2 つの遺伝子型グループに分けたとき (MM vs IM+II), PNPLA3 の mRNA レベルは MM グループでのみ、advanced NAFLD で有意に低かった (P=0.0081)。PARVB variant1 は発現量が非常に少ないため定量ができなかったが、SAMM50 と PARVB variant2 の mRNA レベルは mild と advanced NAFLD で有意差がみられなかった。

このことから、rs738409 の遺伝子型は肝臓において CpG99 のメチル化状態に影響し、下流に位置する PNPLA3 遺伝子の mRNA 発現に影響することが示唆された。

総括

日本人の NAFLD 症例を用いて、マイクロアレイチップによる全ゲノムにわたる遺伝素因の探索を行い、chr22q13 の位置に NAFLD 感受性領域を見出した。この領域には NAFLD 感受性遺伝子として知られている PNPLA3 遺伝子が含まれていた。さらに NAFLD 症例でこの領域全体に含まれる遺伝子多型を次世代シーケンサーにより探索し、NAFLD との関連や、肝臓の組織学的所見、肝障害マーカーとの関連を詳細に解析した結果、これまでに知られていた PNPLA3 遺伝子に加えて SAMM50 遺伝子や PARVB 遺伝子も NAFLD の発症や進展に関与することを示唆した。

NAFLD 感受性領域に含まれる 4 箇所の CpG island (CpG99, CpG71, CpG26, CpG101) のメチル化レベルを次世代シーケンサーにより解析することで、肝線維化の進行と、CpG99 の高メチル化や CpG26 の低メチル化が関連していることを見出した。また、肝線維化の進行と CpG99 の高メチル化により、CpG99 の下流に位置する PNPLA3 遺伝子の mRNA レベルが低下していることを示した。この関連は PNPLA3 遺伝子上の SNP である rs738409 の MM 遺伝子型グループ (リスクアレルのホモ型) のみでみられたことから、rs738409 の遺伝子型が CpG99 のメチル化状態と PNPLA3 mRNA の発現レベルに影響を及ぼすことが示唆された。CpG99 の高メチル化と CpG26 の低メチル化が、NAFLD 発症や進展の原因なのか結果なのか、またその分子メカニズムはさらなる解析を待たなければならないが、本研究により NAFLD 発症と進展におけるゲノム (遺伝素因) とエピゲノム (DNA メチル化) の影響の一端を明らかにした。

審査報告概要

非アルコール性脂肪肝障害 (NAFLD) の発症や進展には遺伝素因 (ゲノム) と環境因子 (エピゲノム) が関与するが、不明な点が多いのが現状である。本研究では遺伝素因と環境因子を明らかにするため、以下の実験を行った。日本人 NAFLD 症例を用いたゲノムワイド関連解析により染色体 22 番に 3 つ (PNPLA3-SAMM50-PARVB) の遺伝子を含む感受性領域を見出した。ターゲットリシーケンスにより感受性領域全体に含まれる遺伝子多型を探索して詳細に関連を解析し、3 つの遺伝子が NAFLD の発症や進展に関与することを示唆した。次に感受性領域中の CpG 領域のメチル化を次世代シーケンサーにより解析し、線維化が進行した肝臓では CpG99 の高メチル化、CpG26 の低メチル化、PNPLA3 遺

伝子 mRNA レベルの低下がみられた。さらに CpG99 のメチル化状態と PNPLA3 遺伝子 mRNA レベルは rs738409 の遺伝子型の影響を受けることを示唆した。以上、本研究において NAFLD 発症や進展に関わる遺伝素因と環境因子の影響の一端を明らかにした。

主査および副査から審査報告がなされ、専攻内可否を審議した。その結果、学位請求者の経歴や学術業績が学位記申請の要項を満たしていること、外国語を含む最終試験に合格していること、学位請求論文の研究内容や発表会での質疑応答の内容が十分であることが認められた。

よって、審査員一同は博士 (バイオサイエンス) の学位を授与する価値があると判断した。