

非アルコール性脂肪肝障害のゲノム・エピゲノム解析

北本 卓也

目次

第一章	背景	3
第二章	NAFLD の遺伝素因の探索と解析	5
第一節	方法	5
第一項	症例と臨床情報	5
第二項	NAFLD の診断と除外基準	8
第三項	DNA 精製とマイクロアレイチップによる遺伝子型決定	9
第四項	マイクロアレイチップのクオリティコントロール	9
第五項	Multi-Plex PCR とインバーダーアッセイ	10
第六項	ターゲットリシーケンス	14
第七項	統計解析	19
第二節	結果	20
第一項	GWAS による NAFLD 感受性領域の探索	20
第二項	NAFLD 感受性候補 SNP の再現性の確認	23
第三項	各遺伝子の SNP ハプロタイプと NAFLD との関連解析	31
第四項	NAFLD 感受性領域のターゲットリシーケンス	33
第五項	NAFLD 感受性領域の詳細な連鎖不平衡地図の作成	36
第六項	NAFLD 感受性領域中の遺伝子多型と NAFLD との関連解析	40
第三節	考察	47
第三章	NAFLD 発症と進展に関わる DNA メチル化の解析	49
第一節	方法	49
第一項	症例と臨床情報	49
第二項	ターゲットバイサルファイトシーケンス	53
第三項	RNA 精製と Quantitative PCR (qPCR)	59
第四項	Multi-Plex PCR とインバーダーアッセイ	61
第五項	統計解析	61

第二節	結果.....	62
第一項	CpG99、CpG71、CpG26、CpG101 のバイサルファイトシーケンス	62
第二項	肝線維化ステージと肝臓 DNA メチル化レベルとの関連解析	63
第三項	C 型慢性肝炎症例の肝臓 DNA のメチル化解析	72
第四項	その他の組織学的所見との関連解析	72
第五項	肝線維化ステージと血液 DNA メチル化レベルとの関連解析	73
第六項	肝臓 DNA と血液 DNA のメチル化レベルの比較	73
第七項	NAFLD 症例の肝臓における PNPLA3、SAMM50、PARVB mRNA レベル測定	75
第三節	考察.....	79
総括	83
謝辞	84
参考文献	85
補足資料	91

第一章 背景

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 : 20 g 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 (simple steatosis) 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 steatohepatitis : NASH) が含まれる。近年、NAFLD は増加してきており、大きな問題となっている[1,2,3]。

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、NASH は 1~3%であると推定されている[3,4]。NASH はさらに肝硬変へと進展する場合があります、一部は肝がんに至る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おり[5,6,7,8]、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 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) 遺伝子を含む領域が重要な役割を果たしていると考えられている。

現在では非常に多くの遺伝子多型が dbSNP データベース (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi) に登録されているが、GWAS で解析に用いられているものはそのなかの一部の SNP である。そのため、NAFLD 発症や進展の遺伝素因を明らかにするためには、感受性領域に含まれる他の多くの遺伝子多型についても NAFLD との関連を解析する必要があると考えられる。

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いことから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[3]。そのため、発症や進展には遺伝素因に加えてカロリー過剰摂取のような生活習慣（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[9]。

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いるが、NAFLD 症例においてもインシュリン抵抗性と PPARGC1A 遺伝子プロモーターのメチル化レベルが関連することが報告されている[10]。またマイクロアレイチップを用いた解析では、NAFLD 症例で多くの領域のメチル化レベルが変化していることが報告されている[11,12]。しかし、NAFLD 感受性領域を対象とした詳細な DNA メチル化の解析を行った報告はこれまでにない。NAFLD の発症や進展には遺伝素因と環境因子の相互作用が考えられていることから、感受性領域の DNA メチル化状態が NAFLD 症例では変化していることが考えられた。

そこで本研究では NAFLD の発症や進展における遺伝素因（ゲノム）と環境因子（エピゲノム）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 NAFLD 感受性領域を探索した。次に次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスにより感受性領域全体の遺伝子多型を探索し、NAFLD の遺伝素因を詳細に解析した。また感受性領域の DNA メチル化レベルや遺伝子発現レベルと NAFLD の重症度との関連を解析した。

第二章 NAFLD の遺伝素因の探索と解析

NAFLD 発症や進展の遺伝素因を明らかにする目的で、まず始めに日本人 NAFLD 症例を用いたマイクロアレイチップによる全ゲノムの網羅的探索を行った。さらに見出した NAFLD 感受性領域全体に対して、次世代シーケンサーを用いて遺伝子多型を抽出し、それらの遺伝子多型と NAFLD との関連や、生化学的指標、組織学的所見との関連を詳細に解析した。

第一節 方法

第一項 症例と臨床情報

GWAS には 392 人の日本人 NAFLD 症例 (NAFLD-1 : 345 人の NASH、47 人の単純性脂肪肝) を用いた。コントロール群は、JSNP データベースの 934 人の日本人集団のデータ (Control-1) を用いた (IMS-JST: Institute of Medical Science-Japan Science and Technology Agency Japanese SNP database, <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)。

GWAS の結果の再現性確認には、GWAS に用いた被験者とは別の 172 人の日本人 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) を用いた (表 1)。

NAFLD-1 の全ての被験者と、NAFLD-2 の被験者のうちの 101 人は肝生検を行っており、NAFLD-2 の被験者の残りの 71 人は CT (Computed Tomography) と MRI (Magnetic Resonance Imaging) を行った。GWAS により見出した NAFLD 感受性領域の次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスに

は、NAFLD 症例からランダムに選択した 28 人を用いた。

NAFLD 症例のターゲットリシーケンスにより見出した遺伝子多型による関連解析には、NAFLD-1 と NAFLD-2 を含む、肝生検を行った 540 人の日本人 NAFLD 症例 (NAFLD-3 : 488 人の NASH、52 人の単純性脂肪肝) と 1012 人のコントロール群 (Control-2) を用いた。

臨床情報については、体重と身長は軽装で靴を脱いで測定した。12 時間の夜間絶食後に採血を行い、空腹時血糖値 (fasting plasma glucose : FPG)、ヘモグロビン A1c (Hb.A1c)、総コレステロール (total cholesterol : T.Chol.)、HDL-コレステロール (HDL-C)、中性脂肪 (Triglycerides)、AST (Aspartate aminotransferase)、ALT (Alanine aminotransferase)、フェリチン (Ferritin)、ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid)、4 型コラーゲン 7s (Type IV collagen 7s) の測定を行った。生化学的形質の測定は従来法を用いた。

表 1 GWAS とその再現性確認に用いたサンプルの臨床情報

	GWAS		再現性確認	
	NAFLD-1 (n = 392)	Control-1 (n = 934)	NAFLD-2 (n = 172)	Control-2 (n = 1012)
No. of NASH	345	-	97	-
Men/Women	199/193	-	95/77	500/512
Age (year)	49.9 ± 14.8	-	53.5 ± 13.8	53.1 ± 15.3
BMI (kg/m ²)	28.0 ± 5.0	-	27.4 ± 4.6	22.7 ± 3.2
FPG (mg/dL)	118.8 ± 37.3	-	114.8 ± 36.8	98.2 ± 19.0
Hb.A1c (%)	6.4 ± 1.3	-	6.3 ± 1.1	5.5 ± 0.7
T.Chol. (mg/dL)	213.7 ± 41.4	-	205.0 ± 39.6	208.5 ± 36.2
Triglycerides (mg/dL)	172.2 ± 120.6	-	153.3 ± 74.4	110.0 ± 88.5
HDL-C (mg/dL)	52.9 ± 15.7	-	53.8 ± 12.7	62.7 ± 15.5
SBP (mmHg)	127.5 ± 15.0	-	129.6 ± 14.0	124.5 ± 19.1
DBP (mmHg)	78.0 ± 11.7	-	81.1 ± 9.4	76.3 ± 11.6
AST (IU/L)	51.3 ± 31.5	-	47.9 ± 25.4	23.0 ± 10.2
ALT (IU/L)	84.3 ± 60.2	-	75.4 ± 53.6	20.3 ± 11.8
Ferritin (ng/ml)	237.1 ± 225.0	-	229.1 ± 227.3	-
Hyaluronic acid (ng/dL)	44.5 ± 70.2	-	74.8 ± 208.2	-
Type IV collagen 7s (ng/dL)	4.4 ± 1.3	-	6.2 ± 12.8	-
Steatosis grade (1-3)	1.6 ± 0.7	-	1.5 ± 0.8*	-
Lobular inflammation (0-3)	1.2 ± 0.8	-	1.5 ± 0.6*	-
Hepatocyte ballooning (0-2)	1.1 ± 0.7	-	1.2 ± 0.5*	-
NAS (0-8)	4.0 ± 1.7	-	4.2 ± 1.3*	-
Fibrosis stage (0-4)	1.6 ± 1.0	-	2.0 ± 1.0*	-

*, n = 101, DBP, diastolic blood pressure(拡張期血圧); SBP, systolic blood pressure(収縮期血圧); NAS, NAFLD activity score(NAFLD 活動性スコア); BMI, Body mass index(体格指数)

第二項 NAFLD の診断と除外基準

ウイルス性肝炎（B 型、C 型、Epstein.Barr ウイルス）、自己免疫性肝炎（autoimmune hepatitis）、原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis）、硬化性胆管炎（sclerosing cholangitis）、ヘモクロマトーシス（hemochromatosis）、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠乏症（ $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency）、ウィルソン病（Wilson's disease）、薬剤性肝炎（drug-induced hepatitis）、アルコール性肝炎（alcoholic hepatitis：アルコール摂取量 20g/日以上）をもつ症例は本研究から除外した。全ての症例で、肝代償不全（hepatic decompensation）（肝性脳症（hepatic encephalopathy）、腹水（ascites）、静脈瘤出血（variceal bleeding）、正常値上限の 2 倍を超えるビリルビン濃度）は認められなかった。

肝生検組織は、hematoxylin-eosin、reticulin 染色と Masson's trichrome 染色を行った。標準的な基準によって NAFLD を診断した[13]。肝細胞の大滴性の脂肪化が 5%以上の肝細胞に認められた場合、NAFLD と診断し、肝細胞の脂肪化に加えて、炎症（inflammation）、風船様膨化（hepatocyte ballooning）が認められた場合、NASH と診断した[14,15]。脂肪化の程度（steatosis grade）は Burnt の基準に基づき、grade 0 から 3 に分類した[16]。NAFLD 活動性スコア（NAFLD activity score：NAS）は、脂肪化（0 から 3）、実質炎症（lobular inflammation）（0 から 3）、風船様膨化（0 から 2）の値の合計であり、0 から 8 の値をとる[17]。肝線維化ステージ（fibrosis stage）は Burnt の分類に従い、0（なし）から 4（肝硬変）の値で示した[16]。

全ての対象者から書面によるインフォームドコンセントを得て、研究は京都大学、横浜市立大学、広島大学および久留米大学の倫理委員会の承認を受けた（倫理委員会承認番号：G364）。

第三項 DNA 精製とマイクロアレイチップによる遺伝子型決定

血液 DNA は、Genomix (Talent Srl, Trieste, Italy) を用いて精製した。マイクロアレイによる遺伝子型決定は、NAFLD-1 症例のうちの 104 人を Illumina Human660 W-Quad BeadChip を用いて、288 人を Illumina HumanOmniExpress BeadChip を用いて、プロトコルに従って行った。コントロール群は、JSNP データベースから Illumina Human Hap550 BeadChip によって遺伝子型決定された 934 人の日本人一般集団の 515,286 箇所の SNP 頻度データ (Control-1) を用いた。これら 3 種のマイクロアレイチップ (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) によるケースコントロール関連解析を行うため、共通する常染色体の 295,887 箇所の SNP を決定した。

第四項 マイクロアレイチップのクオリティコントロール

マイクロアレイチップの SNP は主に欧米人の頻度情報をもとに選択されているため、日本人では SNP ではないものや、マイナーアレルの頻度 (Minor allele frequency : MAF) が非常に低い SNP も多く含まれている。そこで、MAF が 0.01 未満であった 31,177 箇所の SNP を解析から除外した。また、遺伝子型決定の成功率が 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 箇所の SNP も除外し、最終的に 261,540 箇所の SNP を統計解析に用いた。

NAFLD 症例 (NAFLD-1 : 392 人) のサンプルが日本人集団であることを確認するために、HapMap データベース (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) のフェーズ II および III の JPT (日本の東京由来の 113 人)、HCB (中国の北京の漢民族由来の 137 人)、CEU (ユタ州の北ヨーロッパ及び西ヨーロッパ由来の

71 人) のデータを用いて、データベースと共通する 256,869 箇所の SNP により層別化 (multi-dimensional scaling : MDS) 解析を行った。また、NAFLD 症例の同祖性 (identity-by-descent) の推定を行った (PI_HAT)。

第五項 Multi-Plex PCR とインベーターアッセイ

目的の遺伝子多型を含む領域を増幅するようなプライマーをそれぞれの遺伝子多型に対して設計した。プライマーの配列は、(1) 同一 2 塩基の 3 回以上の繰り返し、(2) 任意の塩基の 5 回以上の繰り返し、(3) プライマー末尾の 3 塩基が同一の塩基、(4) 同一 3 塩基の 2 回以上の繰り返し、(5) 任意の塩基が 1 塩基おきに 4 回以上の繰り返し、の 5 つの条件全てを避けるように設計を行い、増幅効率を高めるように考慮した。

プライマー長は全て 21 nt に固定し、 T_m 値は、 $T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{number of (G + C)}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{number of (A + T)})$ の方法で計算を行い、対象となる全てのプライマーが 58°C から 66°C の範囲で、可能であれば 62°C 以下になるように設計し、増幅効率を揃えるように考慮した。

プライマー配列上に遺伝子多型が存在することにより、PCR 増幅の失敗や、片側アレルのみの増幅、2 つのアレルの増幅効率の違い、などが生じる可能性がある。片側アレルのみの増幅が起こった場合には、ヘテロ接合体の遺伝子多型がホモ接合体の結果となり、遺伝子型決定に誤りが生じる原因となる。また 2 つのアレルの増幅効率が極端に異なる場合にも、ホモ接合体とヘテロ接合体の分離がうまく行われずに、遺伝子型決定に誤りが生じる原因となる。そのため、NCBI の dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) (build132) を参照し、配列上に遺伝子多型が存在しないようなプライマーを選択することで、成功率と精度を高めるように考慮した。

またプライマーの配列が、染色体上の目的の場所以外にも同じ配列が存在した場合、目的以外の断片の増幅が起こり、同様に遺伝子型決定の失敗や誤りが生じる可能性がある。全く同じ配列ではなくてもプライマーの 3'側がほとんど同じ場合には同様に遺伝子型決定の失敗や誤りが生じる可能性がある。そのため、ヒト全ゲノム配列を対象として、目的の場所以外には完全一致する配列が存在せず、染色体上の他のどの位置に対しても必ず 1 塩基以上は異なる配列を選択した。その際に、プライマー配列の 3'側半分 (11 nt 以内) の位置が必ず 1 塩基以上異なるようにすることで PCR の成功率や遺伝子型決定の精度を高めるように考慮した。

上記を確認後、それぞれのプライマーセット単独で PCR 増幅のテストを行い、全てのプライマーセットが単一のバンドで増幅することを電気泳動で確認した。その後、全てのプライマーセットを等モル混合し、Multi-plex PCR 法によって目的の領域全てを一度に増幅した[18]。

Multi-plex PCR は以下の条件で行った (表 2)。

表 2 Multi-plex PCR の反応液組成と反応条件

反応液組成

Genome(10 ng/μL)	1.4 μL
10× Vogelstein Buffer	1.4 μL
78 mM MgCl ₂	0.84 μL
25 mM dNTPs	0.84 μL
100 μM Primer Forward	0.0175 (×plex) μL
100 μM Primer Reverse	0.0175 (×plex) μL
5 U/μL Taq polymerase(+Ab)	0.5 μL
Distilled water	Variable
Total	14.0 μL

25 mM dNTPs (タカラバイオ株式会社)

5 U/μL Taq polymerase(+Ab) (タカラバイオ株式会社)

100 μM Primer (シグマアルドリッチジャパン)

反応条件

95°C	5 min	
95°C	15 sec	40 cycles
60°C	45 sec	
72°C	3 min	
72°C	3 min	
4°C	∞	

Multi-plex PCR には GeneAmp 9700 PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いた。

全てのサンプルを Multi-plex PCR 法により増幅後、Distilled water で 15 倍希釈し、そのうちの 3 μL を対象とする遺伝子多型の数だけ 384 well plate に分注して乾燥させた。遺伝子型を決定するためのインバーダープローブ (Third Wave Technologies, Madison, WI, USA) を設計し、PCR 産物を分注して乾燥させた 384 well plate に 3 μL 分注してインバーダーアッセイを行った。インバーダーアッセイの反応液組成と反応条件を下記に示した (表 3)。

表 3 インバーダーアッセイの反応液組成と反応条件

反応液組成

Buffer	0.15 μL
FRET	0.15 μL
Cleavase	0.15 μL
Probe mixture	0.15 μL
Distilled water	2.4 μL
Total	3.0 μL

反応条件

95°C	5 min
63°C	30 – 120 min

インバーダーアッセイの反応には GeneAmp 9700 PCR System を用いた。

インバーダーアッセイは、まず 63°C で 30 min の反応を行い、反応時間が不足している場合にはさらに 30 min 追加というように、最大で 120 min の反応を行った。

反応後、サファイア（テカンジャパン株式会社）で FAM（励起波長 495 nm、蛍光波長 520 nm）、VIC（励起波長 526 nm、蛍光波長 550 nm）、ROX（励起波長 580 nm、蛍光波長 610 nm）の蛍光値を測定し、FAM と VIC の値を ROX の値でそれぞれ補正してプロットすることで遺伝子型を決定した。

第六項 ターゲットリシーケンス

NAFLD 症例からランダムに選択した 28 人分の血液 DNA を用いて、PNPLA3 遺伝子、SAMM50 (SAMM50 Sorting And Assembly Machinery Component) 遺伝子、PARVB (Parvin, Beta) 遺伝子を含む NAFLD 感受性領域全体 (22 番染色体のポジション 44,317,888 から 44,425,903 の領域) を、特異的な 16 セットのプライマーを設計して Long-range PCR (TOYOBO, Osaka, Japan) で増幅した。プライマーの配列、増幅産物の長さ、PCR 反応時の伸長時間を補足表 1 に示した。

プライマーの設計は、配列については第五項と同様の条件とした。プライマー長は全て 25 nt に固定し、T_m 値は最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method) により計算し、65°C 以上となるように設計した。第五項と同様にプライマー配列上に遺伝子多型が存在しないようなプライマーを選択した。

Long-range PCR は通常の PCR に比べて non-specific な増幅が起りやすいため、プライマーの特異性が非常に重要であると考えられる。そこで、ヒト全ゲノム配列 (UCSC hg19) を対象として、目的の場所以外には完全一致する配

列が存在せず、染色体上の他のどの位置に対しても必ず 2 塩基以上は異なる配列を選択した。その際に、プライマー配列の 3'側 (21 nt 以内) の位置が必ず 1 塩基以上は異なるようにすることで、Long-range PCR の成功率や増幅の特異性を高めるように考慮した。

Long-range PCR による増幅反応は、下記の条件で行った (表 4)。PCR の伸長時間は、増幅産物長が 9 Kb までのときは 5 min とし、それ以上のときは 8 min とした。

表 4 Long-range PCR の反応液組成と反応条件

反応液組成

Genome(50 ng/μL)	0.6 μL
2× PCR Buffer for KOD FX Neo	7.0 μL
2 mM dNTPs	2.8 μL
5 μM Primer Forward	0.84 μL
5 μM Primer Reverse	0.84 μL
(1 U/μL)KOD FX Neo	0.28 μL
Distilled water	1.64 μL
Total	14.0 μL

5 μM Primer (シグマアルドリッチジャパン)

反応条件

94°C	2 min	
98°C	10 sec	35 cycles
68°C	5 – 8 min	
4°C	∞	

Long-range PCR の反応には GeneAmp 9700 PCR System を用いた。

16 個全ての PCR 増幅産物はアガロースゲル(日本ジェネティクス株式会社)による電気泳動で単一のピークであることを確認し、各増幅産物のモル濃度は Agilent DNA 12000 Kit and 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により測定した。サンプル (28 人) ごとに 16 個の増幅産物

を等モル混合した後、Total Volume を 50 μ L として Covaris E210 (COVARIS, Woburn, MA, USA) を用いて以下の条件下で混合した増幅産物の断片化を行った (表 5)。

表 5 Covaris による断片化条件

Duty cycle	10%
Intensity	5.0
Cycles per burst	200
Duration	40 sec
frequency sweeping mode	

Covaris E210 による断片化後、TruSeq DNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプロトコルに従い、次世代シーケンス用ライブラリの作製を行った。その際、シーケンス後に各サンプルを識別できるように Dual index を用いた。ライブラリ作製後、28 人のサンプルライブラリを等モル混合し、アガロースゲル電気泳動により 400 bp~500 bp の範囲のサイズを切り出した。切出し後、MinElute (株式会社キアゲン) で精製を行い、25 μ L の Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) で溶出した。

その後、Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Ames, IA) でライブラリのサイズ分布と平均サイズを確認し、Kapa Library Quantification Kit (日本ジェネティクス) によりライブラリ濃度を測定した。得られた平均サイズと濃度から、Kapa Library Quantification Kit の計算式に従って補正を行い、Resuspension Buffer (RSB) (Illumina, Inc., San Diego, CA,

USA) で希釈して 2 nM のライブラリを作製した。ライブラリをアルカリ変性後、Hybridization Buffer (HT1) で希釈して 10.5 pM のライブラリを作製した。

MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA) により 150-bp paired-end リードでシーケンスを行った。出力されたシーケンスリード (fastq ファイル) はヒトゲノム (UCSC hg19) をリファレンスとして、BWA (version 0.5.9rc1; <http://www.bio-bwa.sourceforge.net/>) [19]によりマッピングを行った。マッピングを行う際に、リファレンスゲノムのインデックス作成を行った。BWA による hg19 へのマッピング後、Picard (version 1.72; <http://www.picard.sourceforge.net>) により ReadGroup の追加を行った。マッピングデータの変換、ソート、インデックス作成は SAMtools (version 0.1.17; <http://www.samtools.sourceforge.net/>) [20]と Picard (version 1.72; <http://www.picard.sourceforge.net>) を用いた。SNP や insertion/deletions は GATK (version 1.6-5-g557da77; <http://www.broadinstitute.org/gatk/>) [21]により抽出した。得られた遺伝子多型に対するアノテーションの付記は ANNOVAR (version 2012-05-25; <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) [22]を用いた。これらの操作を 28 人のサンプルに対してそれぞれ行った。

得られた遺伝子多型は、可視化ツールである IGV (version 1.5.65, <http://www.broadinstitute.org/igv/>) [23,24]により確認した。

第七項 統計解析

GWAS とその再現性の確認は、コクランアーミテージの傾向検定により行った。また、GWAS の結果と再現性確認の結果によるメタ解析は、Fisher's combined probability test により行った。

遺伝子型、年齢、性別、BMI、2型糖尿病 (Type 2 diabetes) の有無で補正した NAFLD との関連やオッズ比は多重ロジスティック回帰分析により求めた。また、生化学的指標や組織学的所見との関連は、遺伝子型、年齢、性別、BMI、2型糖尿病の有無で補正して多重線形回帰分析により求めた。多重ロジスティック回帰分析と多重線形回帰分析の際に、リスクアレルの数により遺伝子型をそれぞれ 0、1、2 と変換し、BMI、AST、ALT の値に対して log 変換を行った。

これらの統計計算は、R software (<http://www.r-project.org/>) と PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) [25]を用いて行った。

ハーディワインバーグ平衡は、 χ^2 -test により評価した [26]。層別化 (MultiDimensional Scaling: MDS) 解析と同祖性の推定 (PI_HAT) は、PLINK 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) [25]を用いた。マンハッタンプロットと連鎖不平衡地図は、HaploView により作図した [27]。

ハプロタイプごとの NAFLD との関連解析は、Haplo.Stats (http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm) を用いた。

第二節 結果

第一項 GWAS による NAFLD 感受性領域の探索

MDS 解析により、NAFLD-1 は HapMap JPT（日本の東京由来の 113 人）と同じ位置にクラスタリングされることから、日本人の集団であることを確認した（図 1）。PI_HAT の値は 0.05 未満であった。

マイクロアレイチップにより決定した遺伝子型のデータに対してクオリティチェックを行った後、261,540 箇所の SNP を対象として NAFLD-1 と Control-1 によるケース・コントロール関連解析を行った。その結果からマンハッタンプロットを作成したところ、最も高いピークが 22 番染色体長腕 13 領域(chr22q13)の位置にみられた。その他の領域にもいくつかのピークがみられた（図 2）。まず初めに P 値の閾値を 5.0×10^{-5} 未満と設定することで、NAFLD 感受性候補の 56 箇所の SNP を得た。

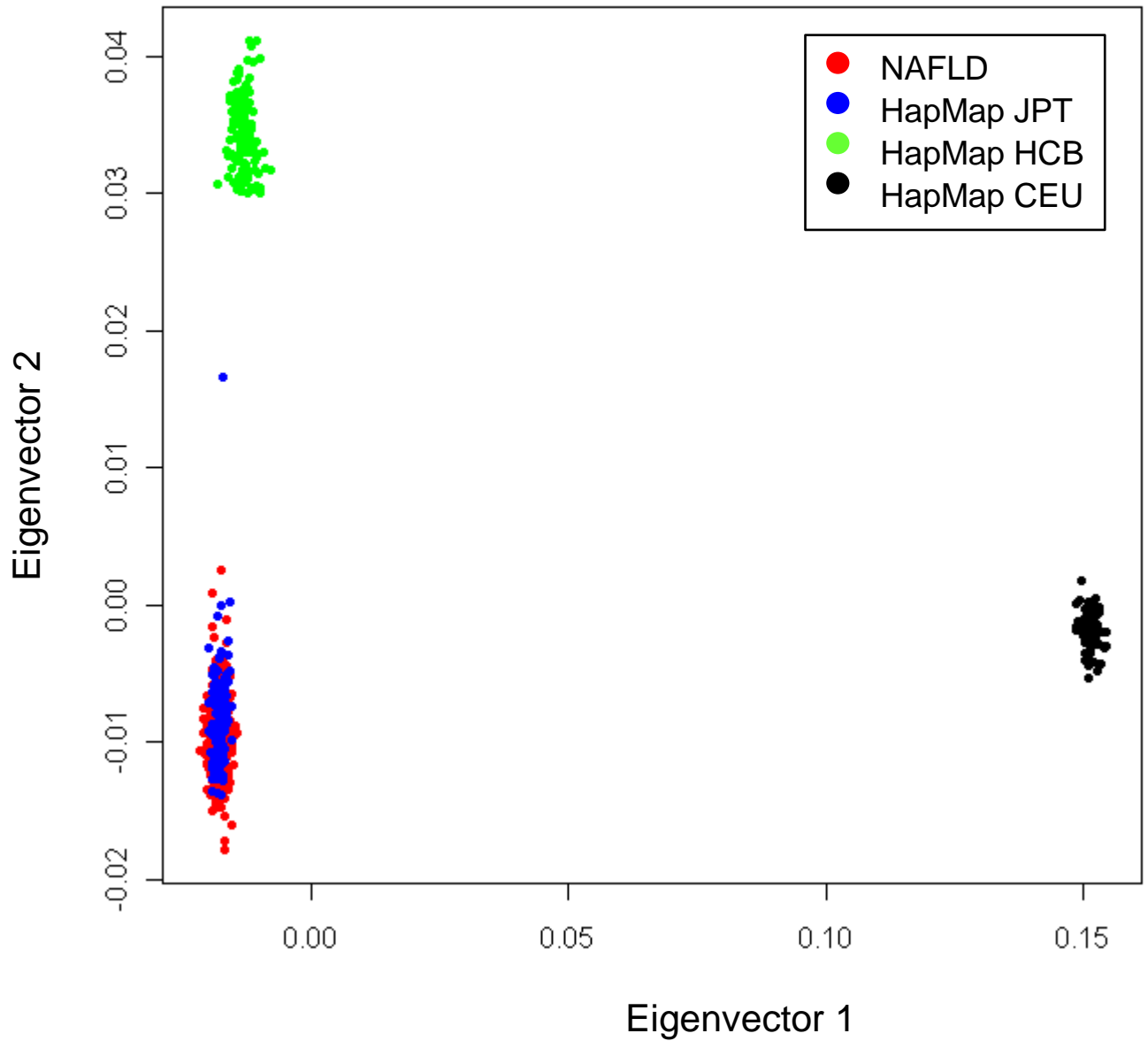


図1 MDS解析

NAFLD (NAFLD-1の392人)、HapMap JPT (日本の東京由来の113人)、HapMap HCB (中国の北京の漢民族由来の137人)、HapMap CEU (ユタ州の北ヨーロッパ及び西ヨーロッパ由来の71人)

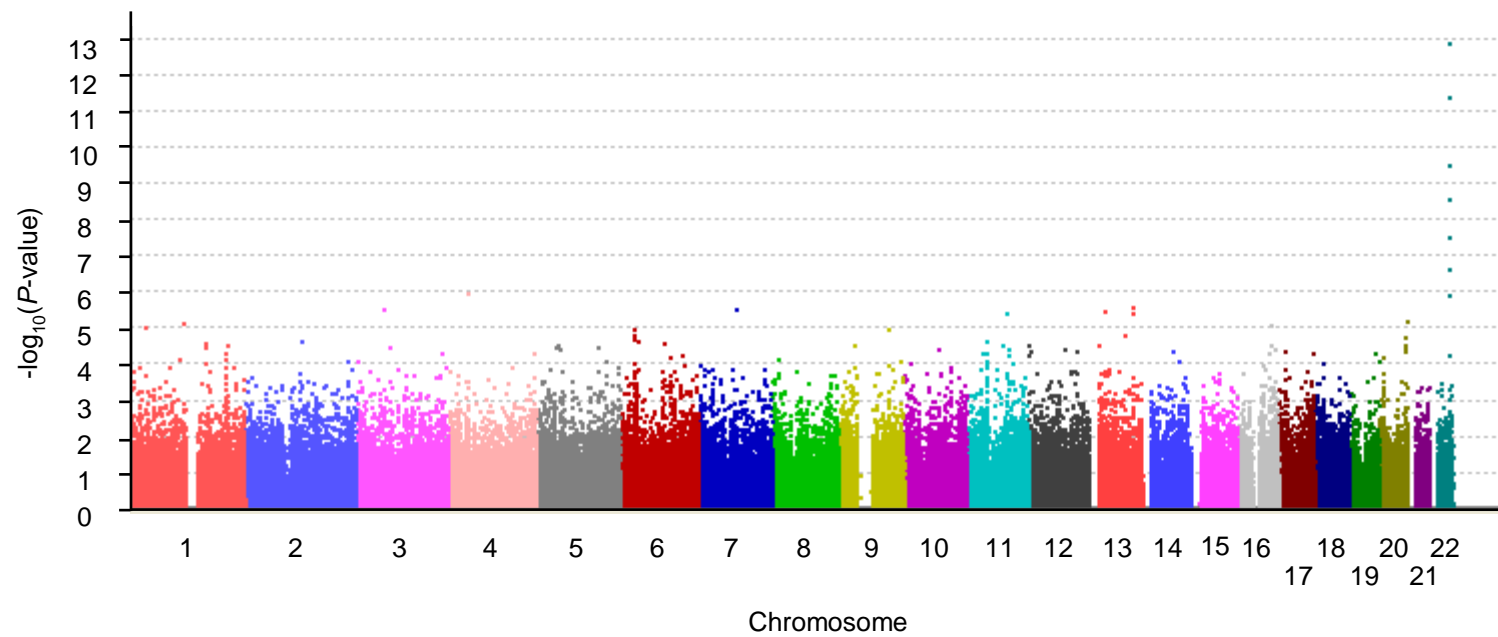


図2 マンハッタンプロット

NAFLD-1 と Control-1 による 261,540 箇所の SNP を対象としたケース・コントロール関連解析の結果

第二項 NAFLD 感受性候補 SNP の再現性の確認

GWAS によって得られた NAFLD 感受性候補の 56 箇所の SNP について、GWAS に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) からの血液 DNA の、合計 1184 人のサンプルを用いてインベーターアッセイにより遺伝子型決定を行い、再度ケース・コントロール関連解析を行うことで再現性を確認した。また、GWAS の精度を確認するために NAFLD-1 症例についてもインベーターアッセイにより遺伝子型決定を行い、GWAS との一致率が 99%以上の SNP についてさらなる解析に用いた。GWAS との一致率が 99%未満であった 13 箇所の SNP については除外した。

NAFLD-1 と Control-1 による GWAS の結果と、NAFLD-2 と Control-2 による再現性の確認の結果によるメタ解析では、12 箇所の SNP の P 値が 1.0×10^{-5} 未満であった。これらのうち、特に chr22 上の 8 箇所の SNP (rs2896019、rs3810622、rs738491、rs3761472、rs2143571、rs6006473、rs5764455、rs6006611) については、非常に強い関連がみられた ($P < 1.0 \times 10^{-9}$, 表 6)。

これら chr22 上の SNP は約 67 Kb の範囲に存在し、連鎖不平衡が保たれていた (図 3)。この領域は、NAFLD 感受性領域として報告がある、PNPLA3 遺伝子を含む領域であった[5,7,8,28]。

この領域には 3 つの遺伝子 (PNPLA3、SAMM50、PARVB) が存在し、8 箇所の SNP のうちの 2 箇所 (rs2896019、rs3810622) は PNPLA3 遺伝子に、4 箇所 (rs738491、rs3761472、rs2143571、rs6006473) は SAMM50 遺伝子とその近傍に、2 箇所 (rs5764455、rs6006611) は PARVB 遺伝子に存在していた。また今回のマイクロアレイチップによる解析には含まれていないが、NAFLD 感受性 SNP として最もよく知られている PNPLA3 遺伝子の rs738409

が、rs2896019 から約 9 Kb 上流に存在していた。よって、rs738409 についてもインバーダーアッセイによる遺伝子型決定を行い、これを含めて解析を行った。

表 6 GWAS の結果と再現性確認の結果によるメタ解析 ($P < 1.0 \times 10^{-5}$)

dbSNP ID	Chr	BP (Build36.3)	Nearby genes	Allele 1/2	GWAS			Replication				Combined <i>P</i> -value	
					Genotype		<i>P</i> -value	OR (95%CI)	Genotype		<i>P</i> -value		OR (95%CI)
					(risk allele frequency)				(risk allele frequency)				
					NAFLD-1	Control-1			NAFLD-2	Control-2			
rs6691847	1	30,038,239	<i>PTPRU</i>	T/C*	11/106/275 (0.84)	48/355/531 (0.76)	7.2×10^{-6}	1.63 (1.31 - 2.03)	8/46/116 (0.82)	47/366/599 (0.77)	0.063	1.32 (0.98 - 1.77)	7.3×10^{-6}
rs7552722	1	115,722,878	<i>NGF</i>	A*/G	70/180/142 (0.41)	100/390/444 (0.32)	7.9×10^{-6}	1.49 (1.26 - 1.78)	22/84/66 (0.37)	124/394/490 (0.32)	0.059	1.27 (1.00 - 1.61)	7.2×10^{-6}
rs2051090	13	35,352,193	<i>DCLK1</i>	A/G*	4/108/280 (0.85)	51/328/555 (0.77)	1.6×10^{-6}	1.72 (1.38 - 2.16)	2/52/118 (0.84)	40/299/669 (0.81)	0.27	1.19 (0.88 - 1.62)	7.1×10^{-6}
rs2896019	22	42,665,027	<i>PNPLA3</i>	T/G*	75/155/162 (0.61)	290/453/191 (0.45)	1.3×10^{-13}	1.94 (1.64 - 2.30)	23/83/66 (0.63)	300/509/202 (0.45)	2.5×10^{-9}	2.02 (1.60 - 2.56)	1.6×10^{-20}
rs3810622	22	42,669,467	<i>PNPLA3</i>	A*/G	208/141/43 (0.71)	291/470/172 (0.56)	3.9×10^{-12}	1.90 (1.59 - 2.27)	92/63/17 (0.72)	314/517/180 (0.57)	1.0×10^{-7}	1.95 (1.52 - 2.51)	1.7×10^{-17}
rs738491	22	42,685,444	<i>SAMM50</i>	A*/G	162/170/60 (0.63)	266/448/220 (0.52)	1.2×10^{-6}	1.54 (1.30 - 1.83)	66/87/19 (0.64)	247/506/258 (0.49)	1.0×10^{-6}	1.79 (1.41 - 2.27)	3.9×10^{-11}
rs2073082	22	42,691,340	<i>SAMM50</i>	A/G*	28/142/221 (0.75)	102/419/413 (0.67)	5.0×10^{-5}	1.48 (1.22 - 1.78)	11/66/95 (0.74)	140/457/412 (0.63)	1.0×10^{-4}	1.67 (1.29 - 2.17)	1.0×10^{-7}
rs3761472	22	42,699,455	<i>SAMM50</i>	T/C*	80/186/126 (0.56)	326/430/178 (0.42)	3.0×10^{-10}	1.74 (1.47 - 2.06)	33/86/53 (0.56)	328/515/168 (0.42)	1.5×10^{-6}	1.74 (1.38 - 2.19)	1.5×10^{-14}

rs2143571	22	42,723,019	<i>SAMM50</i>	A*/G	124/185/81 (0.56)	184/427/323 (0.43)	3.9×10^{-9}	1.68 (1.42 - 1.99)	53/86/33 (0.56)	171/518/323 (0.42)	2.9×10^{-6}	1.71 (1.36 - 2.15)	3.5×10^{-13}
rs6006473	22	42,724,408	<i>SAMM50</i> , <i>PARVB</i>	A*/G	163/170/59 (0.63)	274/446/214 (0.53)	3.6×10^{-6}	1.96 (1.65 - 2.32)	67/86/19 (0.64)	257/506/248 (0.50)	3.4×10^{-6}	1.74 (1.38 - 2.21)	3.2×10^{-10}
rs5764455	22	42,729,857	<i>PARVB</i>	T*/C	115/180/97 (0.52)	164/422/348 (0.40)	3.0×10^{-8}	1.63 (1.38 - 1.93)	47/90/35 (0.53)	155/495/362 (0.40)	1.5×10^{-6}	1.74 (1.38 - 2.19)	1.6×10^{-12}
rs6006611	22	42,732,031	<i>PARVB</i>	A/G*	51/167/174 (0.66)	187/471/276 (0.55)	2.4×10^{-7}	1.58 (1.33 - 1.88)	17/72/83 (0.69)	213/502/296 (0.54)	2.3×10^{-7}	1.90 (1.49 - 2.43)	1.8×10^{-12}

*, リスクアレル OR, オッズ比 CI, 信頼区間

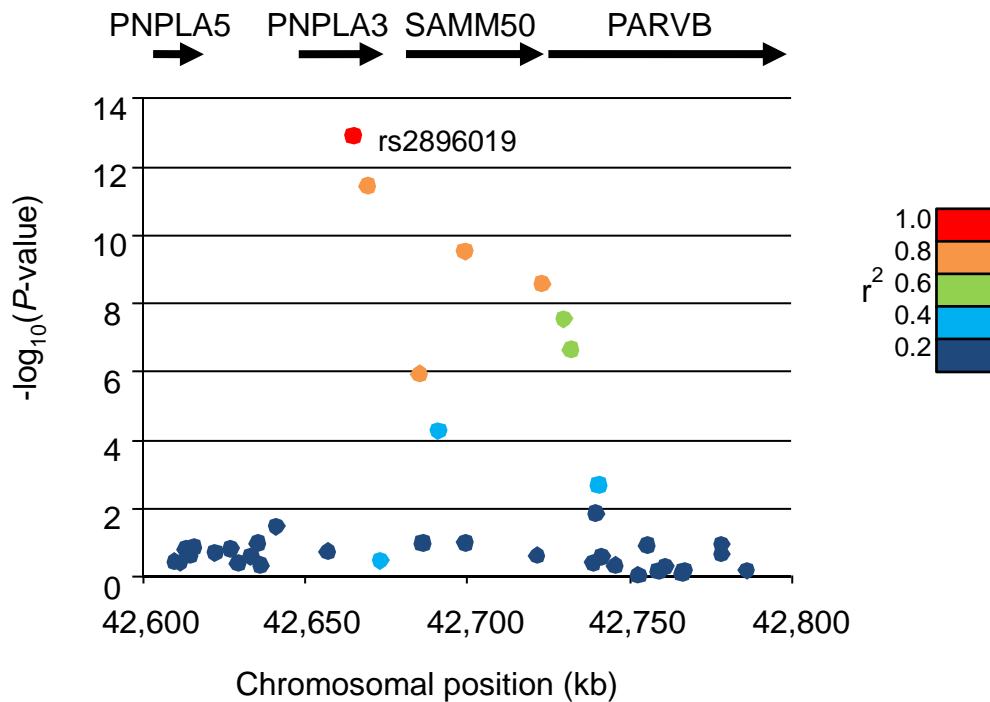


図3 GWASでNAFLDと有意な関連が見られたchr22q13領域のSNPと連鎖不平衡係数

NAFLD症例はコントロール群と比べてBMIの値が大きいので(表1)、BMIやその他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、メタ解析によってNAFLDとの関連がみられたSNPにrs738409を含めて多重ロジスティック回帰分析を行った。JSNPデータベースのControl-1は頻度情報のデータであり、年齢、性別、BMIなどの情報は存在しないため、NAFLD-1、NAFLD-2、Control-2のデータを用いて解析を行った。その結果、chr22以外のSNPにはほとんど関連がみられなくなったが、chr22のPNPLA3、SAMM50、PARVB遺伝子を含む領域は交絡因子による補正後も依然として強い関連がみられ、また高いオッズ比(OR 1.78–2.05)を示した(表7)。特にこのうちの9箇所のSNPには $P < 1.0 \times 10^{-9}$ の非常に強い関連がみ

られた (OR 1.84–2.05)。

次に rs738409 も含めて chr22 の約 76 Kb の領域の連鎖不平衡を解析した。その結果、異なる連鎖不平衡係数 (D' 、 r^2) のどちらにおいても、領域全体にわたって連鎖不平衡が保たれていた (図 4)。

表 7 補正前と補正後（年齢、性別、BMI）の NAFLD との関連

dbSNP ID	Chr	Nearby genes	Allele 1/2	Genotype (risk allele frequency)		Unadjusted <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value [†]	Adjusted OR (95%CI) [†]
				NAFLD	Control			
				rs6691847	1			
rs7552722	1	<i>NGF</i>	A*/G	92/264/208 (0.40)	124/394/490 (0.32)	1.8×10 ⁻⁵	4.1×10 ⁻⁴	1.39 (1.16-1.66)
rs2051090	13	<i>DCLK1</i>	A/G*	6/160/398 (0.85)	40/299/669 (0.81)	0.012	0.13	1.20 (0.94-1.54)
rs738409	22	<i>PNPLA3</i>	C/G*	96/241/227 (0.62)	300/513/199 (0.45)	2.1×10 ⁻¹⁸	6.8×10 ⁻¹⁴	2.05 (1.70-2.47)
rs2896019	22	<i>PNPLA3</i>	T/G*	98/238/228 (0.62)	300/509/202 (0.45)	8.3×10 ⁻¹⁸	1.8×10 ⁻¹³	2.02 (1.67-2.43)
rs3810622	22	<i>PNPLA3</i>	A*/G	300/204/60 (0.71)	314/517/180 (0.57)	1.3×10 ⁻¹⁵	1.7×10 ⁻¹¹	1.95 (1.60-2.36)
rs738491	22	<i>SAMM50</i>	A*/G	228/257/79 (0.63)	247/506/258 (0.49)	2.1×10 ⁻¹³	2.3×10 ⁻¹¹	1.90 (1.57-2.29)
rs2073082	22	<i>SAMM50</i>	A/G*	39/208/316 (0.75)	140/457/412 (0.63)	3.6×10 ⁻¹⁰	1.5×10 ⁻⁸	1.78 (1.46-2.17)
rs3761472	22	<i>SAMM50</i>	T/C*	113/272/179 (0.56)	328/515/168 (0.42)	1.1×10 ⁻¹³	2.3×10 ⁻¹¹	1.91 (1.58-2.31)
rs2143571	22	<i>SAMM50</i>	A*/G	177/271/114 (0.56)	171/518/323 (0.42)	1.4×10 ⁻¹²	1.8×10 ⁻¹⁰	1.85 (1.53-2.24)
rs6006473	22	<i>SAMM50</i> <i>PARVB</i>	A*/G	230/256/78 (0.63)	257/506/248 (0.50)	3.1×10 ⁻¹²	1.2×10 ⁻¹⁰	1.85 (1.53-2.23)
rs5764455	22	<i>PARVB</i>	T*/C	162/270/132 (0.53)	155/495/362 (0.40)	4.4×10 ⁻¹²	1.4×10 ⁻¹⁰	1.84 (1.53-2.21)
rs6006611	22	<i>PARVB</i>	A/G*	68/239/257 (0.67)	213/502/296 (0.54)	9.7×10 ⁻¹²	4.2×10 ⁻¹¹	1.89 (1.56-2.28)

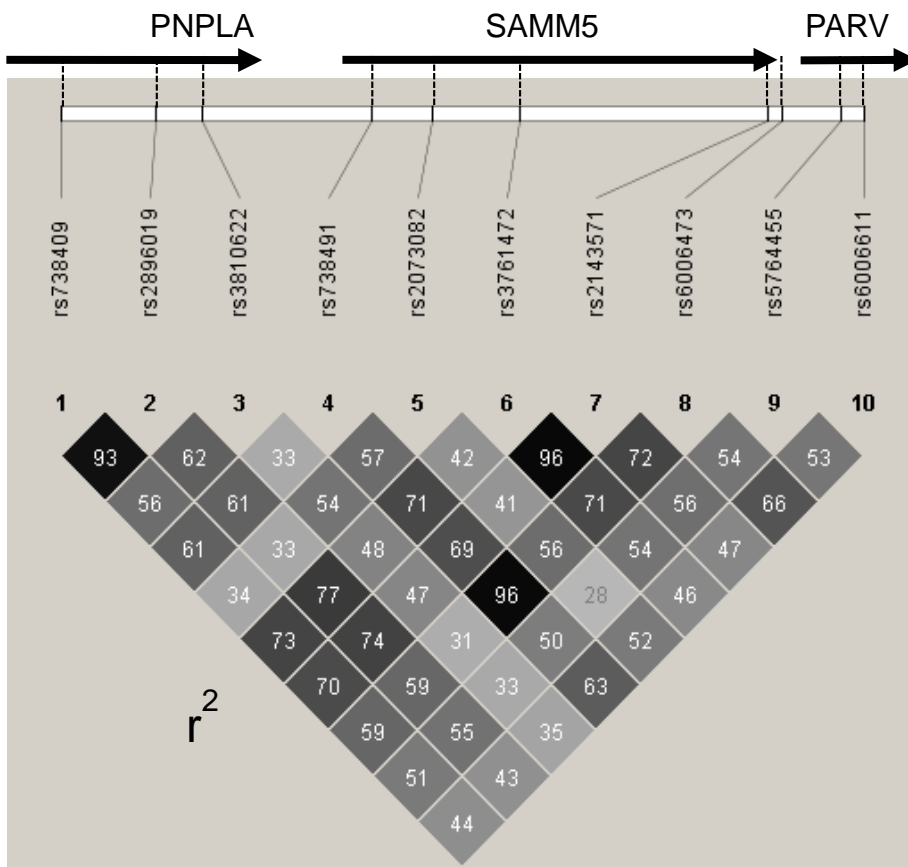
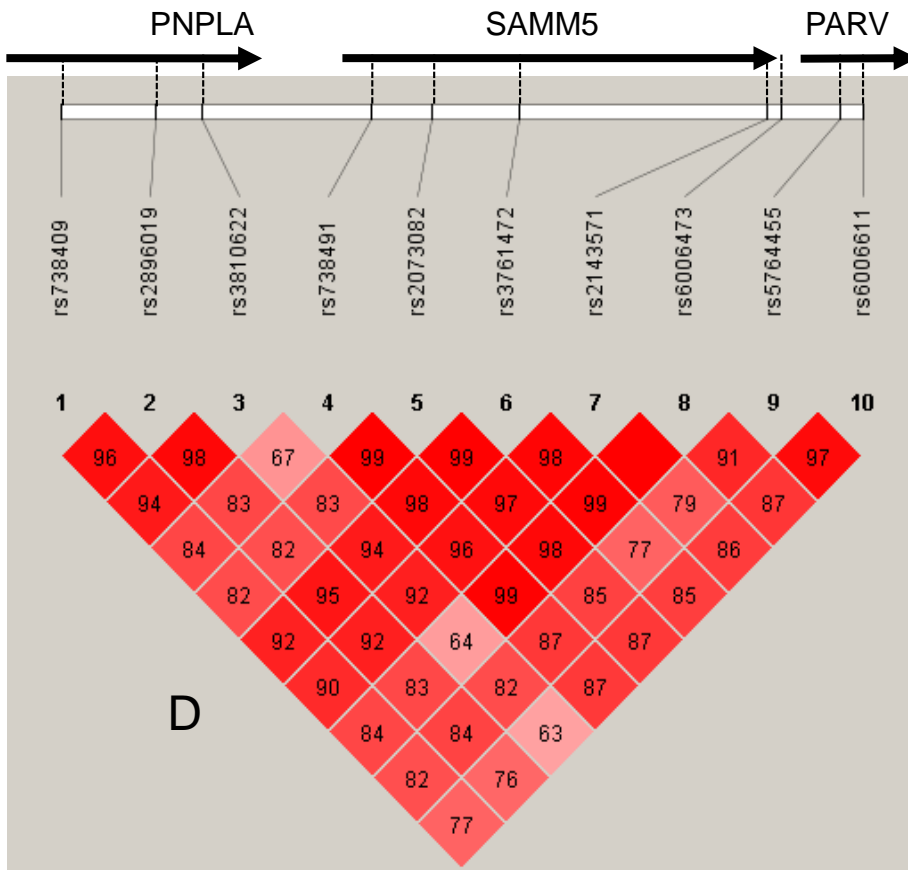


図 4 *PNPLA3*, *SAMM50*, *PARVB* 遺伝子上の SNP の連鎖不平衡係数

第三項 各遺伝子の SNP ハプロタイプと NAFLD との関連解析

PNPLA3 遺伝子の rs738409 を含めた 3 箇所の SNP (rs738409、rs2896019、rs3810622)、SAMM50 遺伝子とその近傍の 4 箇所の SNP (rs738491、rs3761472、rs2143571、rs6006473)、PARVB 遺伝子の 2 箇所の SNP (rs5764455、rs6006611) それぞれによるハプロタイプと、NAFLD との関連を、NAFLD-1、NAFLD-2、Control-2 を用いて調べた。

その結果、PNPLA3 遺伝子のハプロタイプ GGA ($P = 1.3 \times 10^{-13}$ 、OR = 2.19)、SAMM50 遺伝子のハプロタイプ ACAA ($P = 1.3 \times 10^{-11}$ 、OR = 1.99)、PARVB 遺伝子のハプロタイプ TG ($P = 5.0 \times 10^{-12}$ 、OR = 2.06) に、NAFLD との強い関連がみられた (表 8)。

表 8 ハプロタイプと NAFLD との関連

Gene	SNPs	Haplotype	Frequency		Unadjusted	Adjusted	Adjusted OR
			NAFLD	Control	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value*	(95% CI)*
<i>PNPLA3</i>	rs738409	GGA	0.603	0.440	8.1×10^{-18}	1.3×10^{-13}	2.19 (1.79 - 2.7)
	rs2896019	CTG	0.275	0.423	4.2×10^{-16}	Reference	Reference
	rs3810622	CTA	0.100	0.118	0.15	0.095	1.32 (0.95 - 1.82)
<i>SAMM50</i>	rs738491	ACAA	0.551	0.413	1.3×10^{-13}	1.3×10^{-11}	1.99 (1.63 - 2.43)
	rs3761472	GTGG	0.363	0.496	1.6×10^{-12}	Reference	Reference
	rs2143571						
	rs6006473	ATGA	0.078	0.077	0.95	0.037	1.45 (1.02 - 2.06)
<i>PARVB</i>		TG	0.521	0.394	9.2×10^{-12}	5.0×10^{-12}	2.06 (1.68 - 2.52)
	rs5764455	CA	0.328	0.455	8.5×10^{-12}	Reference	Reference
	rs6006611	CG	0.146	0.147	0.94	0.0042	1.49 (1.14 - 1.97)

第四項 NAFLD 感受性領域のターゲットリシーケンス

今回行った日本人集団による GWAS で見出された NAFLD 感受性領域は、PNPLA3 遺伝子 (NM_025225.2) の転写開始点 4.3 Kb 下流から PARVB 遺伝子 (NM_001003828.2) の転写開始点から 7.5 Kb 下流の約 76 Kb である。マイクロアレイチップに搭載されている SNP の数は限られているため、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 との関連が調べられていない。そこで、NAFLD 症例でこの領域に含まれる全ての遺伝子多型 (common variant) 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、NAFLD 症例 28 人を用いて感受性領域全体を含んだ約 108 Kb の領域 (PNPLA3 の転写開始点 1.7 Kb 上流から PARVB variant 1 の転写開始点から 30 Kb 下流まで) を Long-range PCR で増幅し、MiSeq によりターゲットリシーケンスを行った。用いた NAFLD 症例の臨床的特徴を表 9 に示した。得られたシーケンスリードによる感受性領域全体の平均カバレッジはサンプルにより 387×から 652×であり、遺伝子多型や構造変化を正確に判定するために十分な量のデータが得られた。シーケンスに用いた PCR 増幅産物の電気泳動による確認と、シーケンスリードをリファレンスゲノム (UCSC hg19) にマッピングして IGV で表示した例を図 5 に示した。観察された全ての遺伝子多型を補足表 2 に記載した。シーケンスの結果、329 箇所の遺伝子多型が観察され、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 箇所の多型は新規の SNP (ss831884188、ss831884189、ss831884190、ss831884191) であった。329 箇所の遺伝子多型のうち 313 箇所が SNP であり、16 箇所が Insertion または Deletion であった。13 nt の insertion が最長の多型 (rs140963094) であり、それ以上の大きな構造変化はみられなかった。

表 9 ターゲットリシークェンスに用いた NAFLD 症例の臨床的特徴

	Subjects
n	28
Men/Women	8/20
Type2 diabetes (%)	12 (42.9%)
Age (year)	55.9 ± 11.8
BMI (kg m ⁻²)	27.7 ± 6.1
Plasma glucose (mg dL ⁻¹)	114.9 ± 22.4
Hb.A1c (%)	6.3 ± 0.9
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	221.7 ± 46.7
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	144.9 ± 74.1
HDL-cholesterol (mg dL ⁻¹)	58.4 ± 14.6
SBP (mmHg)	135.6 ± 11.4
DBP (mmHg)	84.4 ± 12.5
AST (IU L ⁻¹)	49.1 ± 19.8
ALT (IU L ⁻¹)	71.9 ± 31.8
Steatosis grade (1-3)	1.8 ± 0.8
Lobular inflammation (0-3)	1.4 ± 0.6
Hepatocyte ballooning (0-2)	1.1 ± 0.7
NAS (0-8)	4.4 ± 1.3
Fibrosis stage (0-4)	1.7 ± 0.9

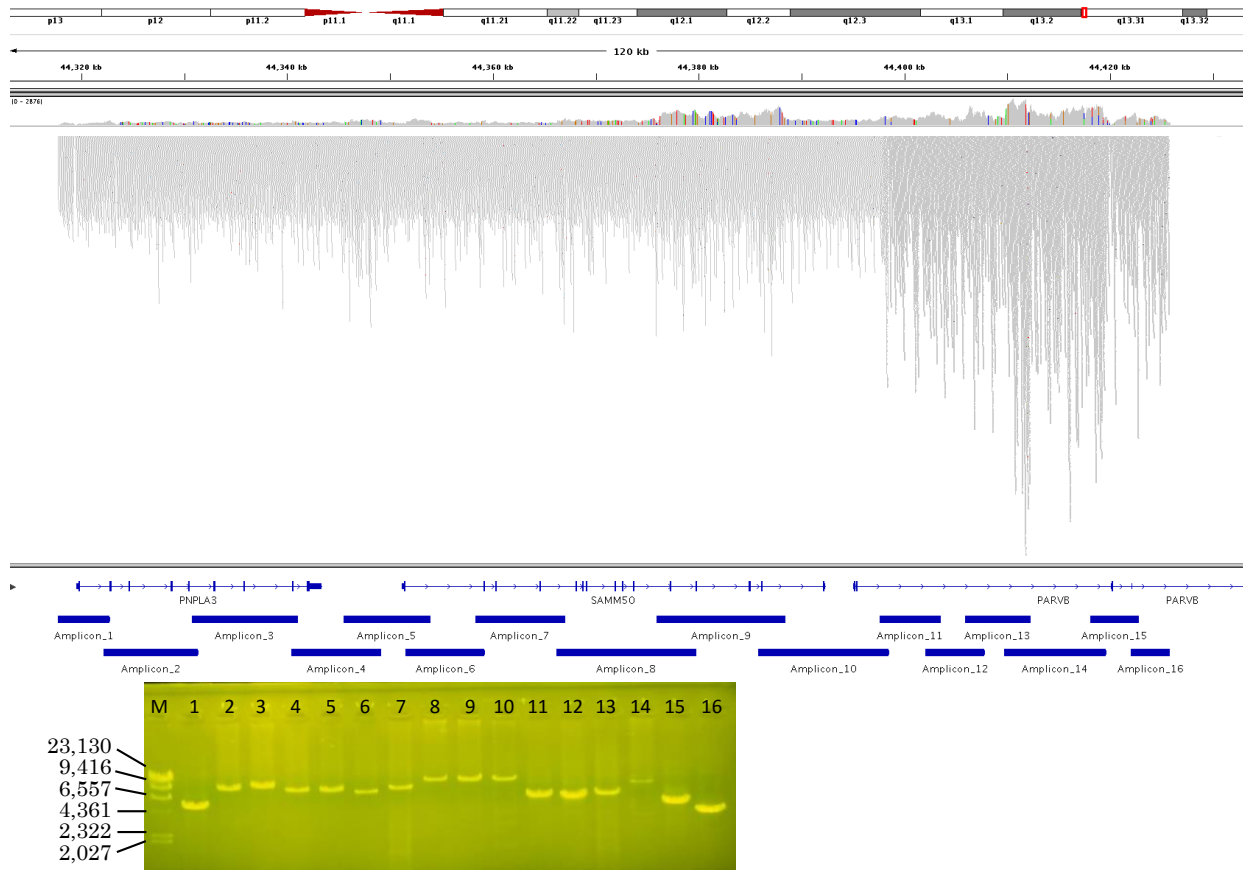


図 5 Miseq によるシーケンスのマッピング例 (IGV による表示) と、用いた PCR 増幅産物の電気泳動写真

第五項 NAFLD 感受性領域の詳細な連鎖不平衡地図の作成

HapMap データベースによれば、NAFLD 感受性領域全体の詳細な連鎖不平衡地図 (Linkage disequilibrium map : LD map) を作成するために必要な範囲は、rs58002102 (chr22 : 44,321,410) から rs135114 (chr22 : 44,417,970) の範囲である (human genome build : GRCh37.p13)。次世代シーケンサーによる 28 人の NAFLD 症例を用いた解析では、この領域中に 281 箇所の遺伝子多型が存在した。このうち MAF >0.05 であった 201 箇所の遺伝子多型 (192 箇所の SNP と 9 箇所の insertion/deletions) についてインバーダープローブの設計を行った。プローブ設計ができなかった 1 箇所の insertion/deletion (rs67877195) を除いた 200 箇所の多型について、540 人の NAFLD 症例 (52 人の単純性脂肪肝と 488 人の NASH : NAFLD-3) と 1012 人のコントロール群 (Control-2) の血液 DNA を用いてインバーダーアッセイによる遺伝子型決定を行った。インバーダーアッセイに用いたサンプルの臨床的特徴を表 10 に示した。

表 10 インベーターアッセイに用いたサンプルの臨床的特徴

	Simple Steatosis	NASH	Control
n	52	488	1012
Men/Women	21/31	264/224	500/512
Type2 diabetes (%)	22 (42.3%)	228 (46.7%)	66 (6.5%)
Age (year)	51.4 ± 15.6	50.5 ± 14.1	53.1 ± 15.3
BMI (kg m ⁻²)	25.1 ± 3.5	28.4 ± 5.0	22.7 ± 3.2
Plasma glucose (mg dL ⁻¹)	115 ± 32	118.9 ± 36.5	98.2 ± 19.0
Hb.A1c (%)	6.3 ± 1.3	6.4 ± 1.3	5.5 ± 0.7
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	213.4 ± 39.5	212.3 ± 39.3	208.5 ± 36.2
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	158.5 ± 80.3	167.9 ± 107.6	110.0 ± 88.5
HDL-cholesterol (mg dL ⁻¹)	55.5 ± 14.8	52.6 ± 14.8	62.7 ± 15.5
SBP (mmHg)	125.5 ± 15.5	128.6 ± 14.5	124.5 ± 19.1
DBP (mmHg)	76.6 ± 12.8	78.9 ± 11.3	76.3 ± 11.6
AST (IU L ⁻¹)	29.8 ± 11.9	52.3 ± 30.4	23.0 ± 10.2
ALT (IU L ⁻¹)	43.9 ± 23.8	84.9 ± 57.3	20.3 ± 11.8
Steatosis grade (1-3)	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.7	—
Lobular inflammation (0-3)	—	1.4 ± 0.7	—
Hepatocyte ballooning (0-2)	—	1.2 ± 0.6	—
NAS (0-8)	—	4.3 ± 1.4	—
Fibrosis stage (0-4)	—	1.9 ± 0.9	—

その結果、180 箇所 (90%) の遺伝子多型 (173 箇所の SNP と 7 箇所の insertion/deletions (rs5845621、rs71218095、rs71313378、rs140963094、rs10656207、rs76409096、rs34505405)) について遺伝子型決定に成功した。この 180 箇所の遺伝子多型の遺伝子型決定の成功率は >99%であり、シーケンズデータとの一致率は >99.4%であった。遺伝子型決定をした遺伝子多型とアレル頻度を補足表 2 に示した。このうちの MAF >0.1 であった 169 箇所の遺伝子多型 (162 箇所の SNP と 7 箇所の insertion/deletions) を用いて HaploView により詳細な LD map を作成した。540 人の NAFLD 症例による 169 箇所の遺伝子多型の詳細な LD map を図 6 に示した。また NAFLD 症例と Control 群の r^2 値 (連鎖不平衡係数) を補足図 1 に示した。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 (rs738407–rs2006943)、21 Kb の LD ブロック 2 (rs139051–rs13054885)、48 Kb の LD ブロック 3 (rs7289329–rs1007863)、2 Kb の LD ブロック 4 (rs5764455–rs6006611) から構成されていることが明らかとなった。また、これらのブロックのうち LD ブロック 1 と 2 は PNPLA3 遺伝子、LD ブロック 3 は SAMM50 遺伝子、LD ブロック 4 は PARVB 遺伝子の領域にそれぞれ位置し、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 (図 6)。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 (補足図 1)。7 箇所の insertion/deletions もこれらの LD ブロックに含まれていた。遺伝子ごとにブロック構造が分かれていることから、NAFLD 発症や進展に対するそれぞれの遺伝子の影響を解析できると考えられた。

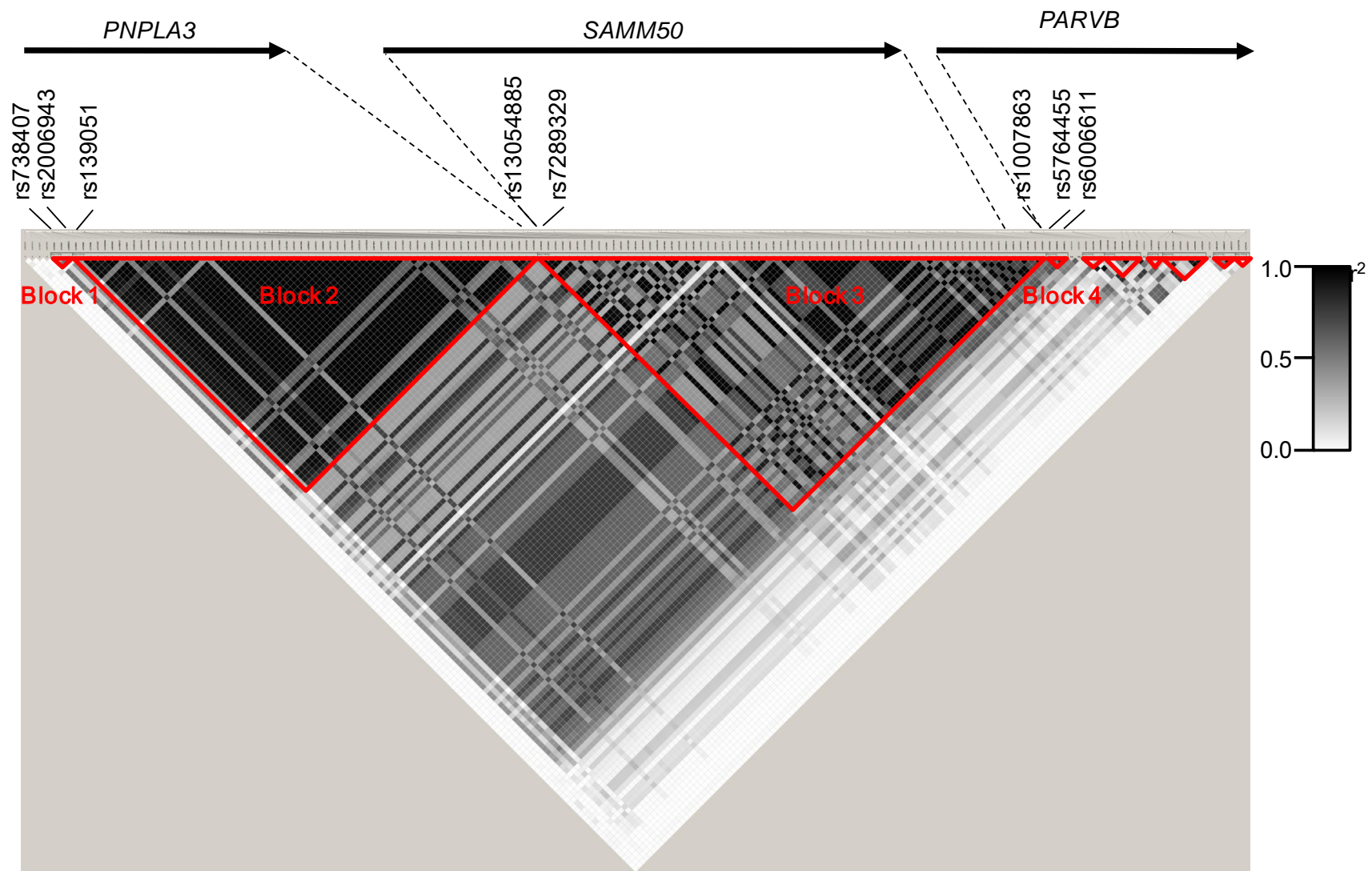


図6 NAFLD感受性領域の詳細な連鎖不平衡マップ解析

第六項 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 箇所の遺伝子多型を関連解析の対象とし、P 値は 3.0×10^{-4} (0.05/169) 未満を統計的に有意であるとした。まず単純性脂肪肝と NASH を比較した。単純性脂肪肝と NASH 症例の臨床的特徴を表 10 に示した。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 2 箇所の SNP (rs6006610 (P = 6.1×10^{-5})、rs6006611 (P = 7.1×10^{-6})) と LD ブロック 1 (PNPLA3) の rs2006943 (P = 5.6×10^{-5}) に、単純性脂肪肝と比較して NASH で有意に関連がみられ (図 7A, 補足表 3)、また比較的高いオッズ比が観察された: rs6006611, 2.68 (1.74-4.12); rs6006610, 2.37 (1.55-3.62); rs2006943, 2.54 (1.62-4.00) (OR (95% confidence interval))。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 と関連していた (図 7B, 補足表 3)。またこれらの関連は NASH と比較することでより強くなる傾向がみられた (図 7C, 補足表 3)。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 で比較した場合の差が最も大きかった。単純性脂肪肝と NASH を比較した場合には LD ブロック 4 (PARVB 遺伝子) の関連が最も強かったことから (図 7A)、PARVB 遺伝子の多型は、より NASH (重症化) に強く関連していることが示唆された。

NASH vs. simple steatosis

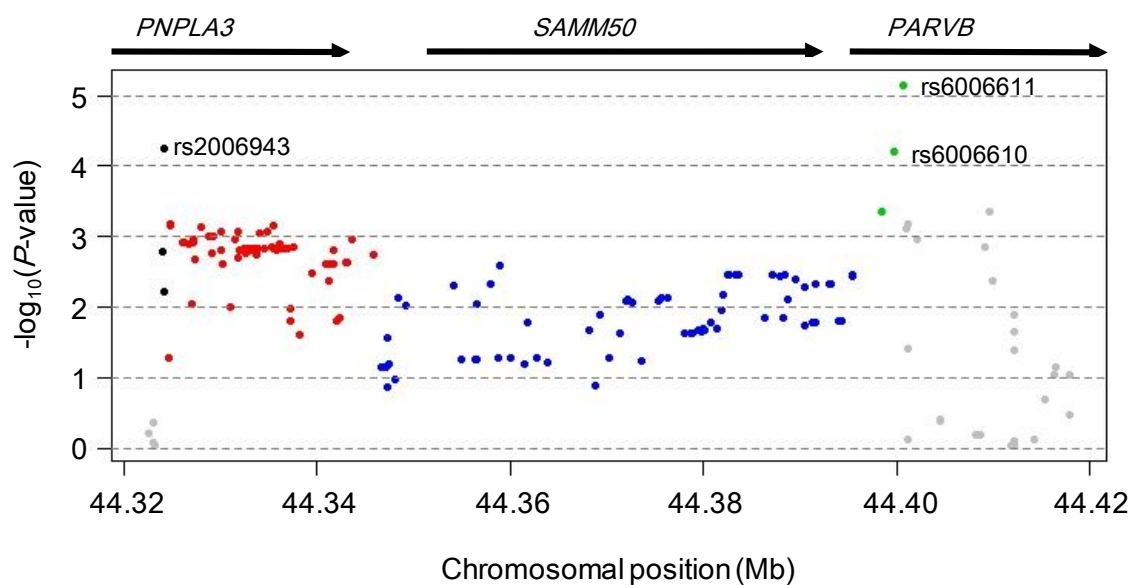


図 7A 169 箇所の遺伝子多型と NASH との関連 (単純性脂肪肝と比較)

NAFLD vs. control

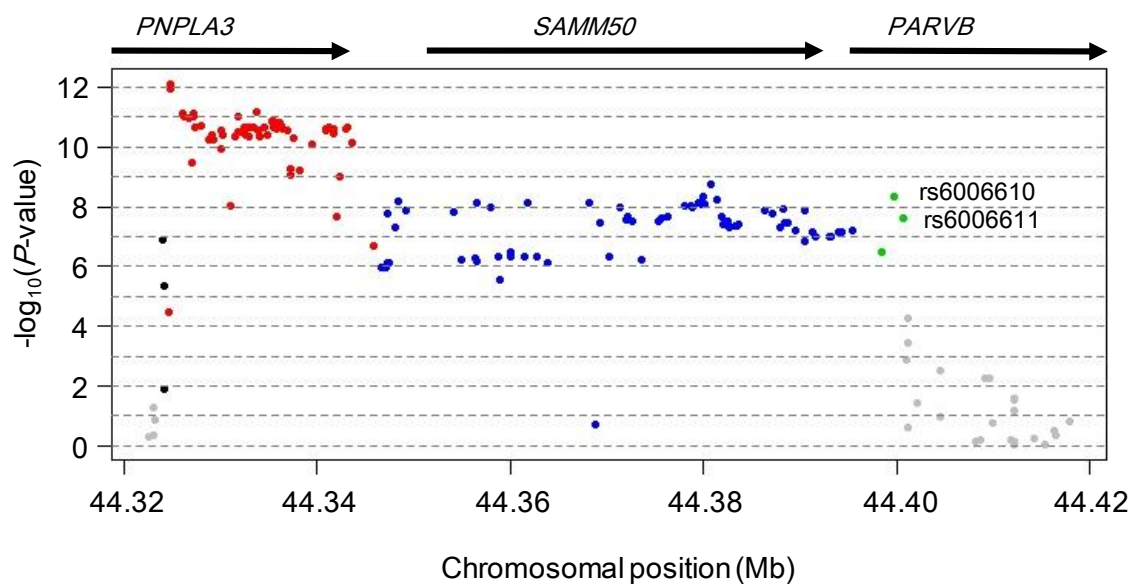


図 7B 169 箇所の遺伝子多型と NAFLD との関連 (コントロール群と比較)

NASH vs. control

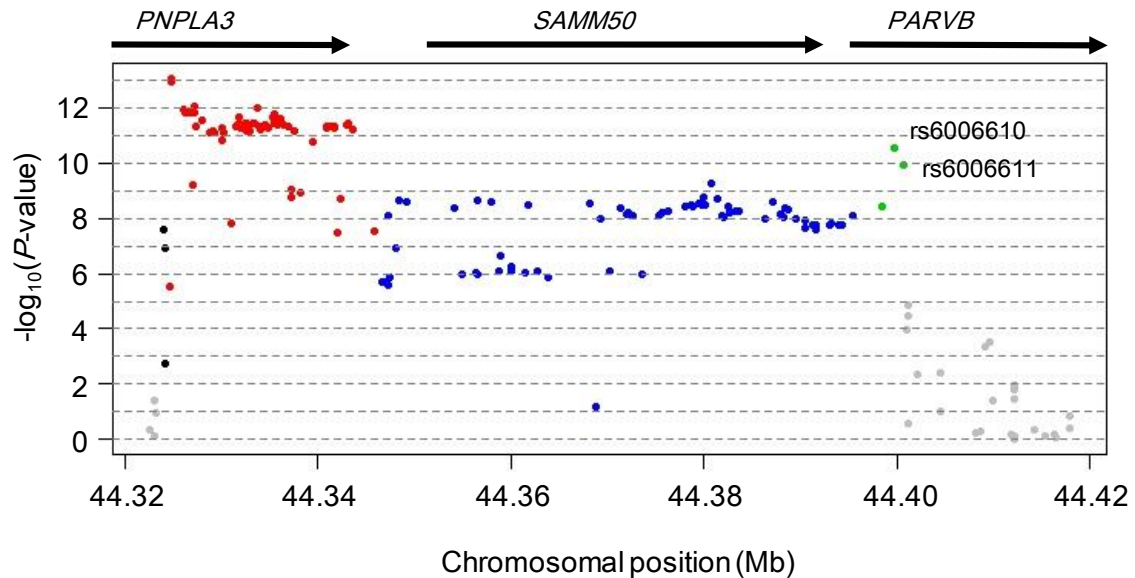
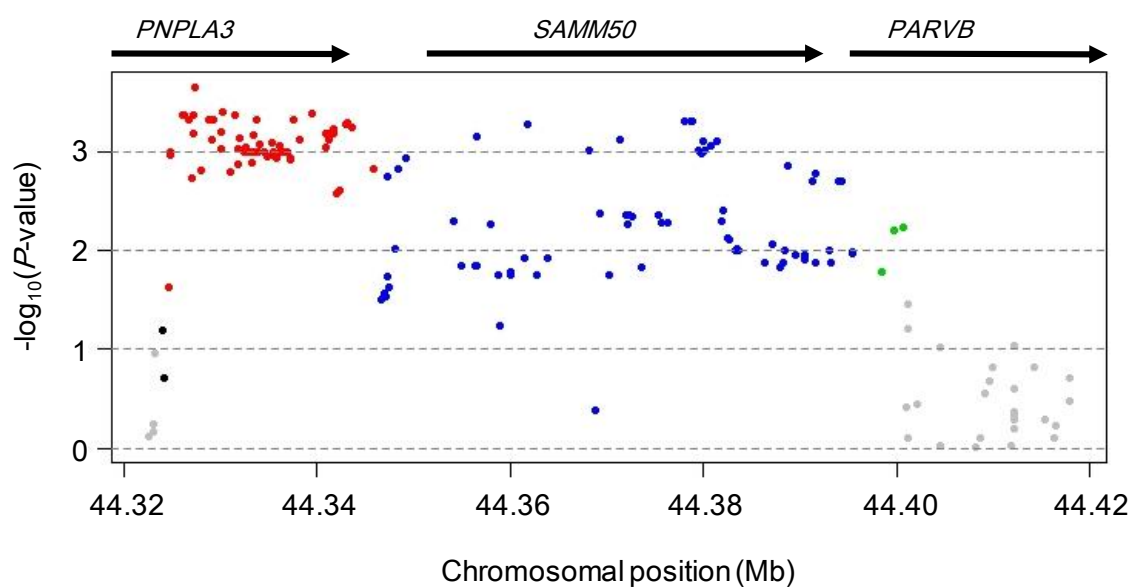


図 7C 169 箇所の遺伝子多型と NASH との関連 (コントロール群と比較)

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を行った。その結果、実質炎症との関連はみられなかった (図 8A, 補足表 4)。脂肪化の程度は、LD ブロック 2 の SNP(rs12484700)に関連がみられた ($P = 2.2 \times 10^{-4}$) (図 8A, 補足表 4)。LD ブロック 4 の 2 箇所の SNP (rs6006610, $P = 1.9 \times 10^{-4}$; rs6006611, $P = 4.4 \times 10^{-5}$)は、風船様膨化との関連がみられた (図 8B, 補足表 4)。また LD ブロック 2 から 4 までの多数の遺伝子多型に NAS 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 (図 8B, 補足表 4)。LD ブロック 1 の rs734561 ($P = 2.6 \times 10^{-4}$) と rs2006943 ($P = 1.9 \times 10^{-4}$) に、肝線維化の進行度との関連がみられた (図 8C, 補足表 4)。

Steatosis grade



Lobular inflammation

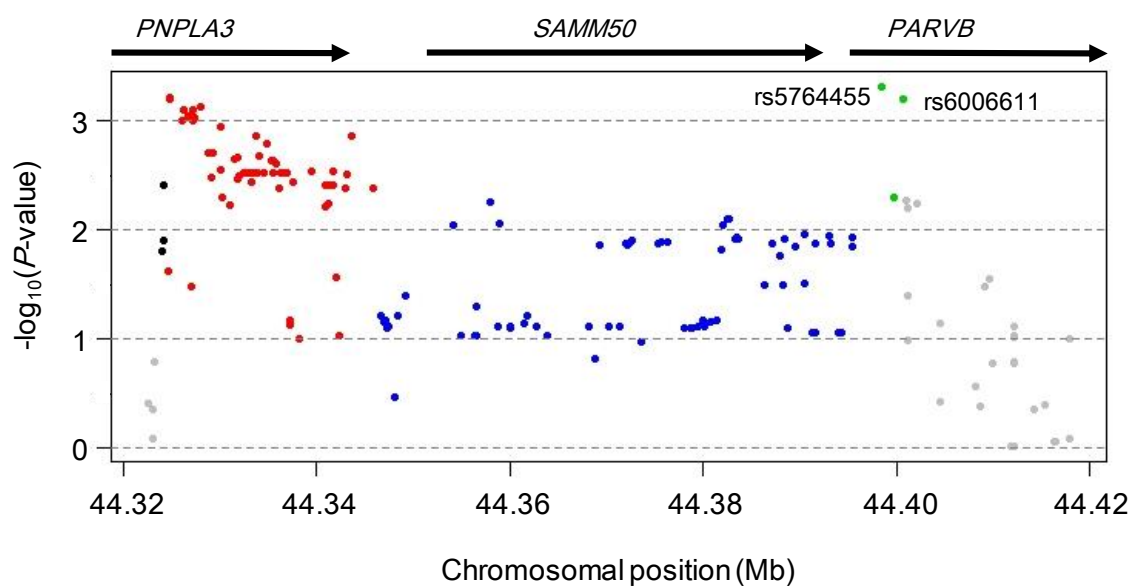
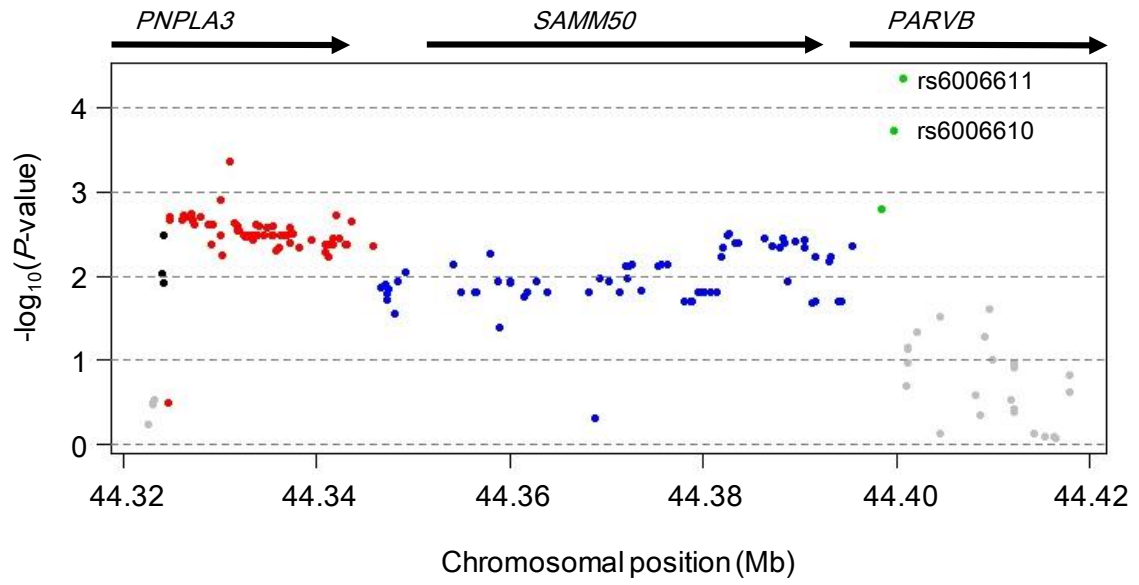


図 8A 169 箇所の遺伝子多型と組織学的所見（脂肪化の程度、実質炎症）との関連

Hepatocyte ballooning



NAS

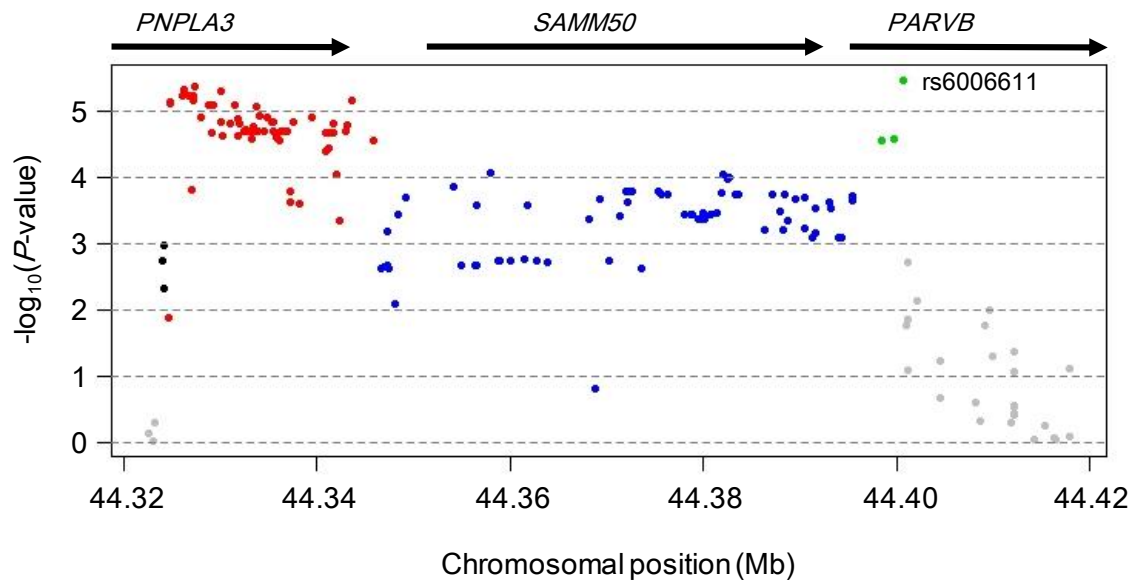


図 8B 169 箇所 の 遺 伝 子 多 型 と 組 織 学 的 所 見 (風 船 様 膨 化 、 NAS) と の 関 連

Fibrosis stage

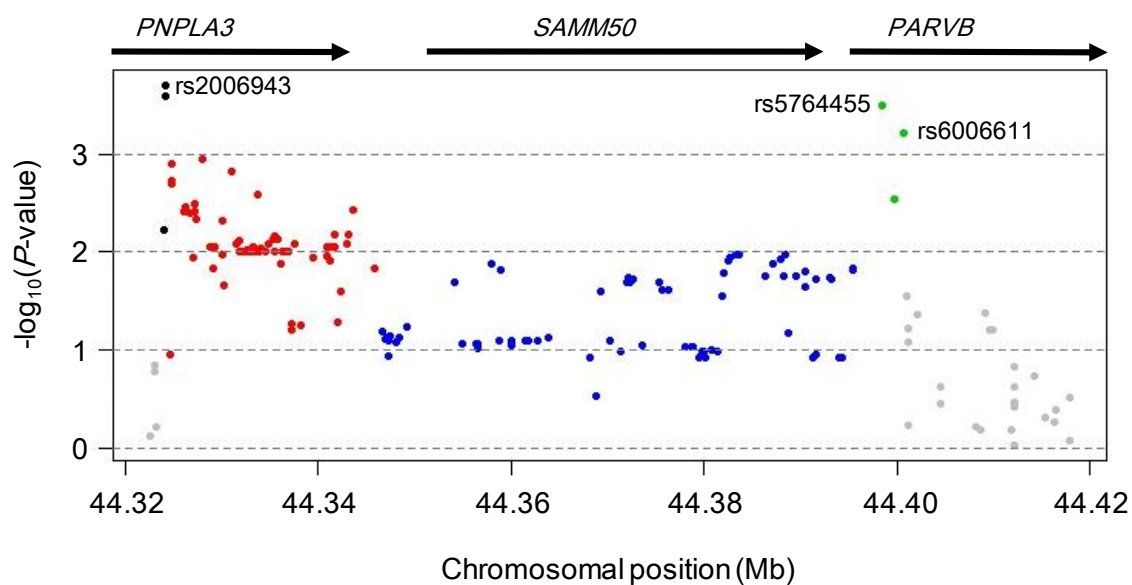
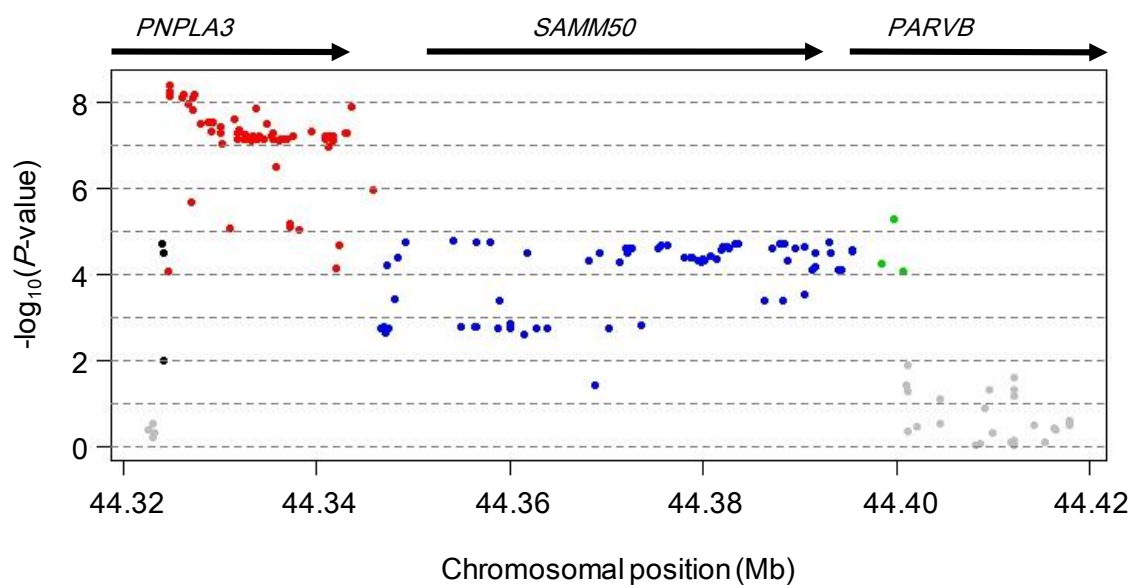


図 8C 169 箇所の遺伝子多型と組織学的所見（線維化）との関連

最後に生化学的形質として、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 (図 9, 補足表 4)。その結果、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 (*PNPLA3* 遺伝子) との関連が最も強かった。

AST



ALT

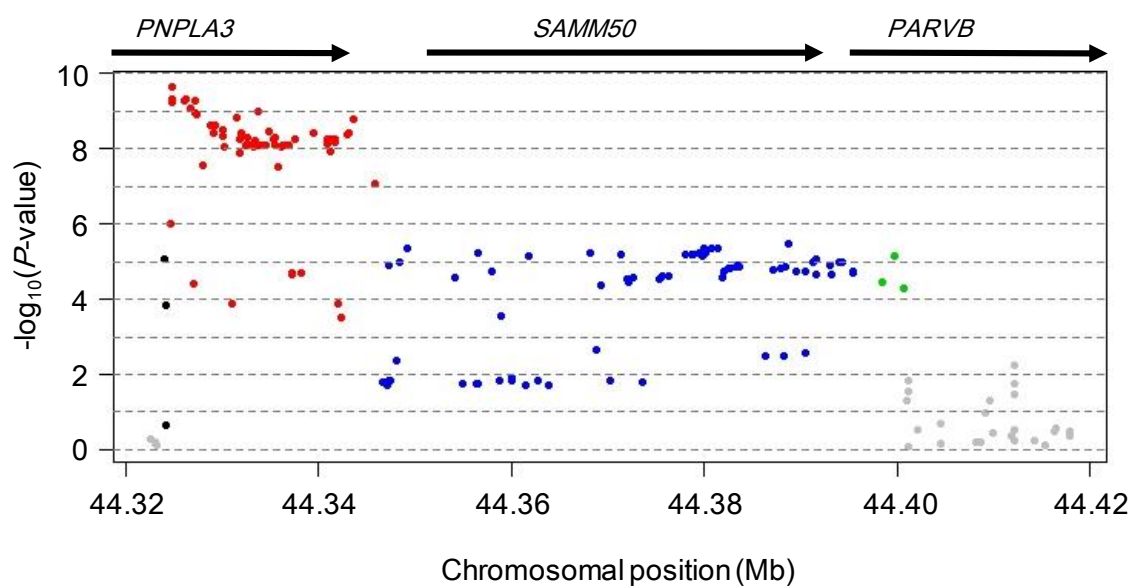


図9 169箇所 の遺伝子多型と生化学的形質 (AST、ALT) との関連

第三節 考察

NAFLD の遺伝素因については、PNPLA3 遺伝子の rs738409 が NAFLD と関連することを示した最初の報告から[5]、様々な集団による多くの研究や追試が行われ、NAFLD の発症において rs738409 の SNP が重要であることが確認されている[6,7,8,28,29,30]。

本研究でも、日本人症例を用いたマイクロアレイチップによる遺伝素因の網羅的探索により、rs738409 を含む領域が NAFLD と有意に関連することを見出した。本研究による日本人集団の GWAS では、rs738409 を含む連鎖不平衡ブロックは約 76 Kb に及んでいた。この領域には多くの遺伝子多型が dbSNP に登録されている。しかしマイクロアレイチップにはこれら数多くの遺伝子多型の中の一部の SNP しか搭載されていないため、その他の多くの遺伝子多型と NAFLD との関連についてはこれまで詳細には検証されていなかった。

そこで本研究では、28 人の NAFLD 症例を用いた次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンスにより、感受性領域全体の遺伝子多型 (MAF >0.05) を抽出し、insertion/deletion を含む 169 箇所の遺伝子多型に対して 540 人の NAFLD 症例と 1012 人のコントロール群を用いてインバーダーアッセイにより遺伝子型の決定を行った。この遺伝子型のデータを用いて、NAFLD 感受性領域全体の詳細な連鎖不平衡地図の作成を行った。その結果、感受性領域はさらに 4 つのブロックに分かれており、また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。

また 169 箇所の遺伝子多型と、NAFLD や NASH との関連、生化学的形質や組織学的所見 (重症度) との関連を解析した。その結果、これまで重要だと考えられていた PNPLA3 遺伝子の関与を確認することに加えて、SAMM50 遺伝

子や PARVB 遺伝子も NAFLD の発症や進展に重要な役割を持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多型との関連の程度が異なることから、NAFLD の発症や進行に対して、それぞれの遺伝子の役割が異なることが示唆された。

SAMM50 遺伝子にコードされる Sam50 はミトコンドリアの β バレル型外膜タンパク質であるが、クリステの構造維持や呼吸鎖複合体の集合、ミトコンドリア DNA の維持に関与することが報告されている[31]。NASH 患者の肝生検試料においてミトコンドリアクリステの消失や結晶様封入体などの異常が報告されている[32,33]。これらのことから SAMM50 はミトコンドリアの機能障害に関与し、その結果 NAFLD の発症や進展に関与していることが考えられた。

PARVB 遺伝子にコードされる parvin- β は integrin-linked kinase と複合体を形成し、インテグリンのシグナル伝達を調節することが知られている[34]。インテグリンは細胞外マトリックスに影響を及ぼし、肝繊維化の発症や進行に重要な役割をしていると考えられている[35,36]。これらのことから、PARVB 遺伝子はインテグリンに作用して細胞外マトリックスに影響を及ぼすことで NAFLD の発症や進展に関与していることが考えられた。

今後、これら遺伝子の機能解析を行うことにより、NAFLD 発症や進展のメカニズムが明らかになるだろうと考えられる。

今回用いたターゲットリシーケンスによる遺伝子多型の抽出とインベーターアッセイによる遺伝子型決定の組合せによる手法は、NAFLD だけではなく他の疾患にも応用できるものであり、疾患感受性領域を対象とした遺伝素因の詳細な解析を行うために有用な手法であると考えられた。

第三章 NAFLD 発症と進展に関わる DNA メチル化の解析

前章では、PNPLA3、SAMM50、PARVB 遺伝子を含む領域が NAFLD の発症や進展に重要な領域（遺伝素因）であることを示した。NAFLD の発症や進展には遺伝素因と環境要因（DNA メチル化）が相互作用していると考えられていることから、感受性領域に DNA メチル化の変化が生じていることが考えられる。しかし、この感受性領域を対象として DNA のメチル化を詳細に解析した報告はこれまでにない。この領域には 4 箇所の CpG 領域（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 領域の 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 CpG 領域のターゲットバイサルファイトシーケンスを行った。さらに、それぞれの遺伝子の発現量と、メチル化レベルや重症度との関連を解析した。

第一節 方法

第一項 症例と臨床情報

NAFLD 症例は、肝生検を行った症例の中からランダムに、1st セットとして 32 人、2nd セットとして 33 人を用いた。除外基準や診断基準は第一章一節二項と同様である。肝線維化のステージ (0 から 4) により、軽度群 (mild NAFLD : 0 または 1)、進行群 (advanced NAFLD : 2 から 4) にグループ分けを行った。

C 型慢性肝炎 (Chronic hepatitis C) は、肝生検を行った 30 人の症例を用い

た。METAVIR 分類によって C 型慢性肝炎症例の肝線維化の程度により、軽度群 (mild : F0 から F2)、進行群 (advanced : F3 または F4) にグループ分けを行った[37]。血清パラメーターや生化学的形質の測定は第一章一節二項と同様である。NAFLD 症例の 1st セット 32 人、2nd セット 33 人、C 型慢性肝炎症例の 30 人それぞれの臨床的特徴を表 11 に示した。

全ての対象者から書面によるインフォームドコンセントを得て、研究は京都大学、横浜市立大学の倫理委員会の承認を受けた (倫理委員会承認番号 : G364)。

表 11 1st セット、2nd セットの NAFLD 症例と C 型慢性肝炎症例の臨床的特徴

	NAFLD						Chronic hepatitis C		
	1st set			2nd set			Mild	Advanced	<i>P</i> -value
	Mild	Advanced	<i>P</i> -value	Mild	Advanced	<i>P</i> -value			
n	21	11	-	15	18	-	19	11	-
Male/Female	15/6	4/7	0.072*	9/6	12/6	0.73*	11/8	8/3	0.47*
Age (years)	47.3 ± 18.1	59.5 ± 13.5	0.042	49.8 ± 15.1	53.3 ± 14.5	0.51	54.8 ± 12.8	64.3 ± 9.7	0.031
BMI (kg/m ²)	27.7 ± 3.9	26.9 ± 4.3	0.61	29.5 ± 3.6	28.8 ± 4.6	0.65	23.1 ± 3.1	25.1 ± 6.3	0.39
Plasma glucose (mg/dL)	99.9 ± 12.6	116.4 ± 25.2	0.12	104.7 ± 18.3	109.8 ± 19.2	0.44	107.3 ± 29.4	111.8 ± 24.6	0.67
Hb.A1c (%)	5.8 ± 1.2	6.1 ± 1.2	0.57	5.8 ± 0.7	6 ± 0.8	0.38	5.7 ± 1.2	5.6 ± 0.8	0.78
Fasting insulin (μU/mL)	17.4 ± 28.3	13.9 ± 7.5	0.59	13.3 ± 6	20.6 ± 9.8	0.016	10.3 ± 5.7	11.2 ± 7.1	0.73
Total cholesterol (mg/dL)	203.2 ± 28.4	186.3 ± 37	0.21	198.6 ± 37.6	199.6 ± 30.2	0.93	195.5 ± 29.4	177.1 ± 42.1	0.24
Triglycerides (mg/dL)	148.6 ± 69.8	124.9 ± 33.9	0.21	154.5 ± 51.1	155.4 ± 84.7	0.97	170.4 ± 125.8	116.6 ± 53.8	0.12
HDL-cholesterol (mg/dL)	53.6 ± 15.2	54.7 ± 14.3	0.84	51.4 ± 9.8	49.3 ± 20.3	0.70	52.6 ± 16.1	52 ± 14.5	0.91
SBP (mmHg)	127.9 ± 17.1	145.0 ± 8.9	0.07	129.9 ± 14.6	122.9 ± 12.6	0.16	125.3 ± 16.6	137.2 ± 18.8	0.10
DBP (mmHg)	76.6 ± 12.9	84.7 ± 13.8	0.44	78.4 ± 12.2	74.4 ± 11.5	0.35	75.2 ± 10.2	82.1 ± 12.7	0.14
AST (IU/L)	38.2 ± 19.6	67.6 ± 31.2	0.013	44.6 ± 19.7	46.7 ± 17.3	0.75	42.2 ± 19.6	73.3 ± 48.8	0.066
ALT (IU/L)	65.0 ± 48.5	86.1 ± 51.4	0.28	69.9 ± 44.5	57.4 ± 29.9	0.36	50.3 ± 30	68.8 ± 52.2	0.30
Ferritin (ng/ml)	240.8 ± 178.5	271.1 ± 211.9	0.69	183.2 ± 90.7	200 ± 90.5	0.60	161.5 ± 122.1	336.4 ± 375.4	0.16
Hyaluronic acid (ng/dL)	36.6 ± 38.2	101.3 ± 99.4	0.061	32.5 ± 24	82.6 ± 91	0.037	72 ± 51.2	235.6 ± 240.6	0.049
Type IV collagen 7s (ng/dL)	4.2 ± 0.8	6.4 ± 2.3	0.010	4.4 ± 0.8	6.3 ± 2.2	0.0015	5 ± 1.5	7.9 ± 2.5	0.0037
Steatosis grade (0–3)	1.5 ± 0.7	1.5 ± 0.7	0.93	1.9 ± 0.7	1.5 ± 0.7	0.16	-	-	-

Lobular inflammation (0-3)	0.9 ± 0.6	2.0 ± 0.4	4.6×10 ⁻⁶	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.5	0.27	-	-	-
Hepatocyte ballooning (0-2)	0.7 ± 0.6	1.5 ± 0.5	0.0012	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.18	-	-	-
NAS (0-8)	3.1 ± 1.5	5.0 ± 1.0	2.9×10 ⁻⁴	3.2 ± 1.4	3.3 ± 1.1	0.86	-	-	-
Fibrosis stage (0-4)	0.7 ± 0.5	2.5 ± 0.5	1.3×10 ⁻⁸	0.8 ± 0.4	2.6 ± 0.6	3.4×10 ⁻¹¹	1.2 ± 0.7	3.3 ± 0.5	3.2×10 ⁻¹⁰
Obesity (%)	17 (81.0)	9 (81.8)	1.00	12 (80.0)	13 (72.2)	0.70	5 (26.3)	5 (45.5)	0.43
Type 2 diabetes (%)	4 (19.0)	4 (36.4)	0.40	3 (20.0)	6 (33.3)	0.46	3 (15.8)	5 (45.5)	0.10
Impaired fasting glucose (%)	5 (23.8)	5 (45.5)	0.25	5 (33.3)	8 (44.4)	0.72	5 (26.3)	5 (45.5)	0.43
Dyslipidemia (%)	12 (57.1)	8 (72.7)	0.46	7 (46.7)	10 (55.6)	0.73	2 (10.5)	0 (0.0)	0.52
Hypertension (%)	7 (33.3)	5 (45.5)	0.70	11 (73.3)	9 (50.0)	0.28	9 (47.4)	8 (72.7)	0.26
Genotype (II/IM/MM)	rs738409 2/9/10	2/4/5	0.77	4/7/4	2/8/8	0.48	7/5/7	2/3/6	0.56

第二項 ターゲットバイサルファイトシーケンス

ゲノム DNA を、凍結肝生検体の断片と血液からそれぞれ抽出した。Zymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA) を用いて 300ng のゲノム DNA のバイサルファイト反応を行い、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。反応後、カラムから 10 μ L の M-Elution Buffer で溶出し、30ng/ μ L とした。

バイサルファイト反応後のゲノム DNA 配列に対して、CpG サイトを避けて特異的なプライマーを設計した。1st セットの 32 人の NAFLD 症例 (32 人分の肝臓 DNA と、そのうちの 29 人分の血液 DNA) を用いて、CpG99 は 1 セット (1)、CpG71 は 1 セット (2)、CpG26 は 2 セット (3-1、3-2)、CpG101 は 2 セット (4-1、4-2) の、合計 6 つのプライマーセットにより 4 箇所の CpG 領域をカバーした。

2nd セットの 33 人の NAFLD 症例 (肝臓 DNA) と 30 人の C 型慢性肝炎症例 (肝臓 DNA) は、CpG99 と CpG26 の 2 箇所の CpG 領域を対象とし、CpG99 の後半部分を 1 セット (5)、CpG26 を 3 セット (6-1、6-2、3-2) の合計 4 つのプライマーセットでカバーした (図 10)。用いたそれぞれのプライマー配列と増幅長を補足表 5 に示した。

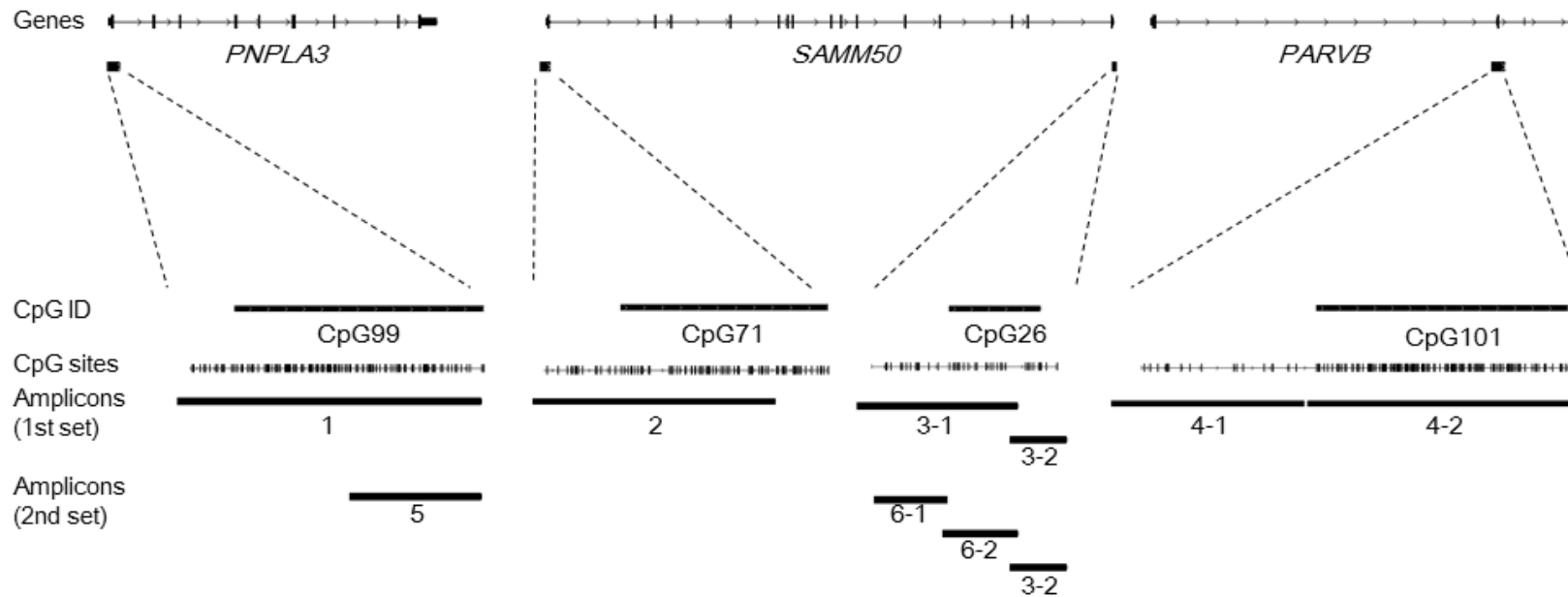


図10 4箇所の CpG 領域と 1st セット (1、2、3-1、3-2、4-1、4-2)、2nd セット (5、6-1、6-2、3-2) の増幅産物

バイサルファイト処理をした DNA は非メチル化シトシンがウラシルに変換されることや、今回の方法では CpG サイトを避けてプライマー設計を行わなくてはならないため、プライマーを構成する塩基の種類が 3 種類だけとなる (Forward : A or G or T、Reverse : A or C or T)。そのためプライマー配列の特異性を確保するためには通常よりも長い配列が必要となることから、プライマー長は 27 nt を基本として設計した。非 CpG の C を T に変換したヒト全ゲノム配列 (UCSC hg19) を対象として、目的の場所以外には完全一致する配列が存在せず、染色体上の他のどの位置に対しても必ず 1 塩基以上は異なる配列を選択した。27 nt の確保ができない場合には 20 nt 以上とした。配列には必ず 3 種類の塩基が含まれるようにし、第一章一節五項と同様にプライマー配列上に遺伝子多型が存在しないようにプライマーを選択した。T_m 値は最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method) により計算し、55°C 以上となるように設計した。増幅は、30 ng のバイサルファイト処理したゲノム DNA を用いて、TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) (タカラバイオ株式会社) により下記の条件で行った (表 12)。

表 12 バイサルファイト処理 DNA の PCR 増幅の反応液組成と反応条件

反応液組成

Genome(30 ng/μL)	1.0 μL
(5 U/μL)10× EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1.5 μL
25 mM MgCl ₂	1.5 μL
2.5 mM dNTPs	1.8 μL
5 μM Primer Forward	0.8 μL
5 μM Primer Reverse	0.8 μL
Distilled water	7.6 μL
Total	15.0 μL

反応条件

98°C	10 sec	40 cycles
55°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	∞	

バイサルファイト PCR の反応には GeneAmp 9700 PCR System を用いた。
 増幅のサイズはアガロースゲル (日本ジェネティクス株式会社) で確認した。
 増幅産物のモル濃度は High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit を用いて
 Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Ames, IA) により測
 定した。

サンプルごとに増幅産物を等モル混合した後、Covaris S220 (COVARIS, INC,

Woburn, MA) を用いて以下の条件下で断片化を行った (表 13)。

表 13 Covaris による断片化条件

Duty factor	10%
Peak incident power	175 W
Cycles per burst	200
Duration	180 sec
frequency sweeping mode	

Covaris S220 による断片化後、TruSeq DNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプロトコルに従いライブラリ調整を行った。その際、シーケンス後に各サンプルを識別できるように Dual index を用いた。ライブラリ作製後、各サンプルのライブラリを等モル混合し、アガロースゲル電気泳動により 250 bp~350 bp の範囲のサイズを切り出した。切出し後、MinElute (株式会社キアゲン) で精製を行い、25 μ L の Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) で溶出した。

その後、Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Ames, IA) でライブラリのサイズ分布と平均サイズを確認し、Kapa Library Quantification Kit (日本ジェネティクス) によりライブラリ濃度を測定した。得られた平均サイズと濃度から、Kapa Library Quantification Kit の計算式に従って補正を行い、Resuspension Buffer (RSB) (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) で希釈して 2 nM のライブラリを作製した。ライブラリをアルカリ変性後、Hybridization Buffer (HT1) で希釈して 10.5 pM のライブラリを作製し

た。

MiSeq system (Illumina) により 100-bp paired-end reads でシーケンスを行った。出力されたシーケンスリードを、FastQC software package (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) によりクオリティチェックを行った。全てのサンプルでライブラリのクオリティは高く、シーケンスの最後のサイクルに至るまで Phred score >31 であった。

バイサルファイト処理をしたゲノム DNA から出力されたシーケンスのリードを、C->T 変換、G->A 変換[38]を行ったヒトゲノム配列 (UCSC hg19) をリファレンスとして、Bowtie 2 (Version 2.1.0, <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) [39] を搭載する Bismark (v0.8.3, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>) [38]によりマッピングを行った。マッピングの結果、ペアエンドのリードが両方ともにユニークにマッピングされ、かつマッピングの方向が正しいものだけを以降の解析に用いた。シーケンスデータの変換、インデックス作成は SAMtools (Version 0.1.17; <http://www.samtools.sourceforge.net/>) [20]を用いた。PCR を原因とする重複リードの除去には Picard (Version 1.72; <http://picard.sourceforge.net>) を用いた。メチル化シトシンを Bismark methylation extractor[38]により抽出し、マッピングの状態や CpG 領域のメチル化の状態を Integrative Genomics Viewer (IGV Version 1.5.65, <http://www.broadinstitute.org/igv/>) [23,24]により確認した。

第三項 RNA 精製と Quantitative PCR (qPCR)

肝臓のトータル RNA は、ゲノム DNA を抽出した凍結肝生検体と同じ断片から RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて抽出を行った。2nd セットの 1 サンプルについては十分な量の RNA が得られなかったのを除外した。RNA の品質を評価するために、Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) により Agilent RNA 6000 Nano Kit を用いて RNA Integrity Number (RIN) を測定した[40]。全てのサンプルで RIN >8 であり、正確な定量を行うことができる十分な品質であった。逆転写は ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた。逆転写後、Distilled water を加えて 1 ng/ μ L に調整した。

PNPLA3、SAMM50、PARVB variant1、PARVB variant2 の各遺伝子のエキソン部分に特異的なプライマーを設計し、逆転写した 1 ng の肝臓 cDNA を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて定量を行った。インターナルコントロールには glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。PARVB variant1 に関しては、サンプルにより発現していることは確認できるものの、発現量が非常に少ないために定量ができなかったため、PNPLA3、SAMM50、PARVB variant2、GAPDH の増幅に用いたそれぞれのプライマー配列と増幅長を補足表 6 に示した。qPCR は下記の条件で行った (表 14)。

表 14 qPCR の反応液組成と反応条件

反応液組成

Distilled water	6.2 μ L
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	10.0 μ L
5 μ M Primer Forward	1.2 μ L
5 μ M Primer Reverse	1.2 μ L
5 \times ROX	0.4 μ L
DNA (1 ng/ μ L)	1.0 μ L
Total	20.0 μ L

反応条件

94 $^{\circ}$ C	20 sec	
95 $^{\circ}$ C	3 sec	40 cycles
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
4 $^{\circ}$ C	∞	

qPCR 反応には GeneAmp 9700 PCR System を用いた。

qPCR 後、Ct value を算出した。GAPDH をインターナルコントロールとし、相対的な mRNA レベルを $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method により定量した。これを 3 回行って平均値を算出した。

第四項 Multi-Plex PCR とインバーダーアッセイ

Rs738409 の SNP を含む領域を増幅するプライマーとインバーダープローブ (Third Wave Technologies, Madison, WI, USA) を設計し、NAFLD 症例 (1st セットの 32 人と 2nd セットの 33 人) の血液 DNA を用いて遺伝子型決定を行った。第一章一節五項と同様な方法で行った。

第五項 統計解析

mild NAFLD と advanced NAFLD のメチル化レベルとの関連は t test を用いて解析した。同じサンプル間での肝臓と血液の DNA メチル化レベルの比較は paired t test を用いた。男女比、2 型糖尿病の比率、メタボリックシンドロームに関する項目は、Fisher's exact test を用いた。統計解析には R software (<http://www.r-project.org/>) を用いた。1st セットと 2nd セットによるメタ解析は、R package metafor (<http://www.metafor-project.org> <http://www.wvbauer.com>) [41]を用いた。多重検定における有意性の評価は Q value を用いた。Q value は Q-VALUE (<http://faculty.washington.edu/~jstorey/qvalue/>) [42]により計算し、Q value <0.05 を統計的に有意とした。

第二節 結果

第一項 CpG99、CpG71、CpG26、CpG101 のバイサルファイトシーケンス

まず始めに 1st セットの NAFLD 症例 32 人分の肝臓 DNA と 29 人分の血液 DNA を用いて、4 箇所の CpG 領域 (CpG99、CpG71、CpG26、CpG101) のバイサルファイトシーケンスを行った (図 10)。バイサルファイトシーケンスに用いた PCR 増幅産物の電気泳動による確認と、バイサルファイトシーケンスにより得られたデータをリファレンスゲノム (UCSC hg19) にマッピングして IGV で表示した例を補足図 2 に示した。4 箇所の CpG 領域の平均カバレッジ (depth) は、肝臓 DNA でサンプルにより 1567×から 3078×、血液 DNA でサンプルにより 607×から 1429×であり、正確なメチル化レベルを解析するために十分な量のシーケンスデータが得られた (補足図 3)。CpG101 内の 20 箇所の CpG サイトは、2 サンプル以上でカバレッジが 50 未満であったので解析から除外した。非 CpG サイトのシトシン (CHH、CHG) のメチル化レベルは肝臓 DNA と血液 DNA の両方ともに平均して 3%未満と非常に低いことから、バイサルファイト反応は至適に行われたと考えられた (補足図 4, 補足表 7) [43]。

CpG99 領域の 117 箇所の CpG サイト、CpG71 領域の 66 箇所の CpG サイト、CpG26 領域の 42 箇所の CpG サイト、CpG101 領域の 124 箇所の CpG サイトの、合計 349 箇所の CpG サイトを、メチル化レベルの解析に用いた。

第二項 肝線維化ステージと肝臓 DNA メチル化レベルとの関連解析

まず 1st セットの NAFLD 症例を、mild NAFLD (21 人) と advanced NAFLD (11 人) の 2 群に分け、肝臓 DNA における 4 箇所 CpG 領域のメチル化レベルとの関連を t 検定により解析した。図 11 には 4 箇所 CpG 領域内の CpG サイトの染色体上の位置と肝臓 DNA のメチル化レベルを示した。CpG99 のメチル化レベルは全体的に非常に低かったため、メチル化レベルが全サンプルで平均 5%以上の CpG サイトを解析の対象とした。

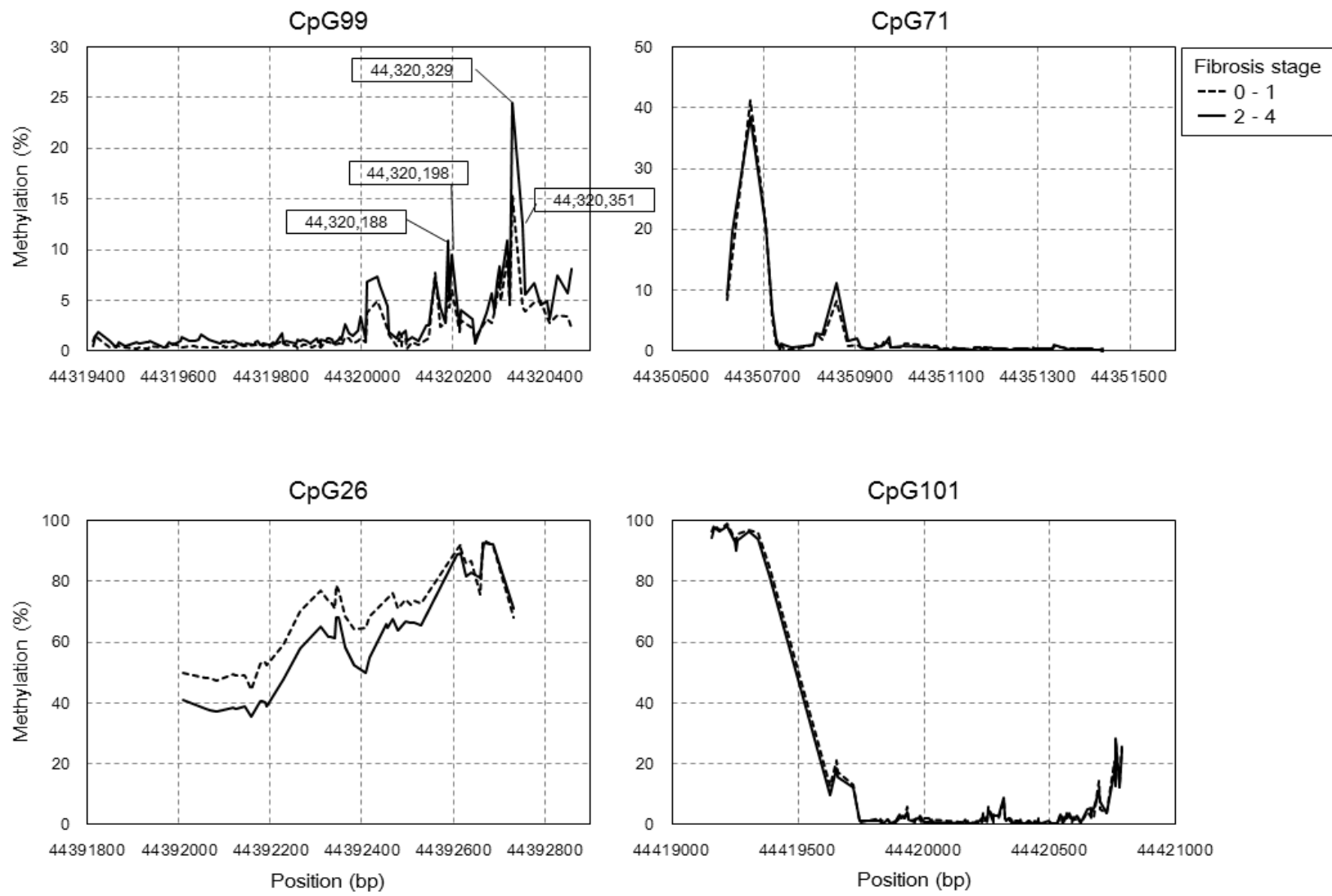


図 11 4箇所 の CpG 領域における肝線維化ステージごとの肝臓 DNA のメチル化レベル

その結果、CpG99 内の 4 箇所の CpG サイト（ポジション：44,320,188、44,320,198、44,320,329、44,320,351）が advanced NAFLD において高メチル化状態であった（ $p < 0.05$ ）（表 15）。線維化のステージによるメチル化レベルの違いは CpG26 で最も顕著にみられ、25 箇所の CpG サイトが advanced NAFLD において、CpG99 とは反対に低メチル化状態であった（ $p < 0.05$ ）（表 16）。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の再現性を確認するために、さらに NAFLD 症例 33 人分の肝臓 DNA（2nd セット）を用いて、1st セットで有意差がみられた CpG99 の後半部分と CpG26 について再度次世代シーケンサーによるバイサルファイトシーケンスを行い、同様な解析を行った。また 1st セットと 2nd セットによるメタ解析を行った。メタ解析の結果、advanced NAFLD において CpG99 では 4 箇所の CpG サイトが有意に高メチル化状態であり（Q values < 0.05 , 表 15）、CpG26 では 18 箇所の CpG サイトが有意に低メチル化状態であった（Q values < 0.05 , 表 16）。1st セットと 2nd セットのデータを足し合わせて解析を行った場合にも、メタ解析と同様の結果が得られた。

表 15 CpG99 における肝線維化ステージごとの肝臓 DNA のメチル化レベル (NAFLD、C 型慢性肝炎)

Position (bp)	1st set of NAFLD			2nd set of NAFLD			NAFLD Meta-analysis		Chronic hepatitis C			
	Stages 0-1 (n = 21)	Stages 2-4 (n = 11)	<i>P</i> -value	Stages 0-1 (n = 15)	Stages 2-4 (n = 18)	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value	<i>Q</i> -value	Stages 0-2 (n = 19)	Stages 3-4 (n = 11)	<i>P</i> -value	<i>Q</i> -value
44,320,033	5 ± 4	7 ± 4	0.14	4 ± 2	4 ± 2	0.96	0.33	0.41	5 ± 3	8 ± 3	0.05	0.067
44,320,040	4 ± 4	6 ± 6	0.31	4 ± 2	5 ± 3	0.26	0.12	0.20	4 ± 3	6 ± 5	0.18	0.21
44,320,162	8 ± 5	7 ± 4	0.77	8 ± 2	8 ± 2	0.58	0.83	0.84	10 ± 3	10 ± 2	0.74	0.76
44,320,188	7 ± 5	11 ± 5	0.034	8 ± 2	11 ± 5	0.079	0.0075	0.035	11 ± 5	16 ± 5	0.010	0.031
44,320,198	6 ± 5	9 ± 3	0.036	6 ± 2	9 ± 5	0.028	0.0059	0.029	8 ± 4	14 ± 4	8.4×10 ⁻⁴	0.016
44,320,295	5 ± 6	7 ± 4	0.43	4 ± 2	8 ± 4	0.0077	0.022	0.062	7 ± 4	11 ± 4	0.0038	0.021
44,320,300	7 ± 6	8 ± 6	0.68	5 ± 2	9 ± 6	0.022	0.069	0.14	8 ± 4	13 ± 5	0.011	0.031
44,320,303	5 ± 5	7 ± 5	0.35	5 ± 2	7 ± 4	0.075	0.061	0.12	8 ± 4	11 ± 4	0.028	0.046
44,320,317	9 ± 6	11 ± 8	0.51	10 ± 4	12 ± 3	0.11	0.10	0.18	12 ± 5	19 ± 5	0.0012	0.016
44,320,329	15 ± 9	24 ± 10	0.017	18 ± 4	21 ± 7	0.22	0.012	0.043	21 ± 8	33 ± 9	0.0013	0.016
44,320,351	4 ± 5	12 ± 7	0.0036	7 ± 2	9 ± 5	0.079	4.4×10 ⁻⁴	0.010	8 ± 4	15 ± 5	0.0021	0.016
44,320,377	5 ± 4	7 ± 5	0.26	5 ± 2	6 ± 2	0.028	0.021	0.061	6 ± 4	9 ± 2	0.011	0.031

表 16 CpG26 における肝線維化ステージごとの肝臓 DNA のメチル化レベル (NAFLD、C 型慢性肝炎)

Position (bp)	1st set of NAFLD			2nd set of NAFLD			NAFLD Meta-analysis		Chronic hepatitis C			
	Stages 0-1	Stages 2-4	<i>P</i> -value	Stages 0-1	Stages 2-4	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value	<i>Q</i> -value	Stages 0-2	Stages 3-4	<i>P</i> -value	<i>Q</i> -value
	(n = 21)	(n = 11)		(n = 15)	(n = 18)				(n = 19)	(n = 11)		
44,392,061	48 ± 10	38 ± 8	0.0048	33 ± 5	30 ± 7	0.14	0.0046	0.024	27 ± 6	23 ± 4	0.065	0.081
44,392,067	48 ± 10	37 ± 9	0.0045	34 ± 5	30 ± 7	0.13	0.0032	0.020	28 ± 6	24 ± 4	0.029	0.046
44,392,082	48 ± 9	37 ± 9	0.0060	36 ± 5	32 ± 7	0.11	0.0025	0.020	28 ± 6	24 ± 3	0.0094	0.030
44,392,120	50 ± 11	39 ± 8	0.0039	45 ± 7	43 ± 9	0.41	0.018	0.060	37 ± 6	30 ± 5	0.0021	0.016
44,392,126	49 ± 9	38 ± 8	0.0014	45 ± 7	43 ± 8	0.47	0.0093	0.041	37 ± 5	30 ± 6	0.0037	0.021
44,392,143	49 ± 10	39 ± 7	0.0027	47 ± 6	44 ± 8	0.36	0.012	0.043	39 ± 5	31 ± 6	0.0014	0.016
44,392,159	44 ± 9	35 ± 8	0.0085	43 ± 6	41 ± 7	0.47	0.027	0.074	36 ± 5	27 ± 6	7.3×10 ⁻⁴	0.016
44,392,179	53 ± 14	41 ± 7	0.0025	51 ± 8	50 ± 9	0.63	0.040	0.098	44 ± 6	34 ± 7	0.0017	0.016
44,392,184	54 ± 14	41 ± 7	0.0014	51 ± 7	50 ± 9	0.69	0.038	0.096	45 ± 6	34 ± 7	0.0010	0.016
44,392,188	53 ± 13	40 ± 8	0.0014	51 ± 8	50 ± 9	0.85	0.051	0.11	44 ± 7	34 ± 8	0.0018	0.016
44,392,191	52 ± 13	39 ± 8	0.0010	51 ± 8	49 ± 8	0.55	0.019	0.060	43 ± 6	33 ± 7	6.3×10 ⁻⁴	0.016
44,392,230	59 ± 11	48 ± 8	0.0018	56 ± 7	53 ± 8	0.42	0.014	0.049	48 ± 6	40 ± 10	0.018	0.035
44,392,265	70 ± 11	58 ± 8	0.0023	70 ± 9	65 ± 8	0.16	0.0035	0.020	63 ± 8	50 ± 11	0.0047	0.023
44,392,310	77 ± 10	65 ± 10	0.0058	51 ± 16	41 ± 9	0.035	3.4×10 ⁻⁴	0.010	38 ± 8	31 ± 9	0.044	0.062
44,392,326	74 ± 9	62 ± 8	0.0016	46 ± 8	40 ± 8	0.055	4.8×10 ⁻⁴	0.010	36 ± 7	30 ± 8	0.028	0.046
44,392,333	73 ± 9	62 ± 10	0.0042	49 ± 8	43 ± 9	0.038	3.9×10 ⁻⁴	0.010	38 ± 7	32 ± 8	0.038	0.055
44,392,341	71 ± 9	61 ± 7	0.0030	50 ± 9	44 ± 9	0.070	0.0013	0.015	39 ± 7	34 ± 7	0.063	0.080
44,392,343	79 ± 10	68 ± 7	0.0020	57 ± 14	50 ± 9	0.079	0.0012	0.015	45 ± 7	39 ± 8	0.034	0.051
44,392,351	77 ± 9	68 ± 8	0.0088	58 ± 8	52 ± 9	0.077	0.0031	0.020	47 ± 7	41 ± 8	0.070	0.087
44,392,365	69 ± 9	58 ± 7	0.0017	54 ± 8	50 ± 10	0.25	0.0042	0.023	45 ± 8	38 ± 8	0.016	0.035

44,392,384	64 ± 11	52 ± 8	0.0011	58 ± 8	54 ± 10	0.15	0.0027	0.020	47 ± 7	39 ± 9	0.018	0.035
44,392,410	65 ± 10	50 ± 9	2.6×10 ⁻⁴	58 ± 10	54 ± 11	0.29	0.0021	0.019	48 ± 8	38 ± 10	0.012	0.032
44,392,418	68 ± 10	55 ± 9	6.7×10 ⁻⁴	63 ± 10	58 ± 11	0.17	0.0014	0.015	53 ± 10	41 ± 11	0.0089	0.030
44,392,454	74 ± 12	66 ± 10	0.061	67 ± 9	65 ± 10	0.43	0.079	0.15	58 ± 10	47 ± 11	0.018	0.035
44,392,456	74 ± 11	65 ± 10	0.022	68 ± 11	63 ± 11	0.15	0.011	0.043	57 ± 11	47 ± 11	0.020	0.038
44,392,469	76 ± 12	68 ± 9	0.028	71 ± 11	65 ± 10	0.14	0.015	0.051	59 ± 10	49 ± 12	0.021	0.039
44,392,479	71 ± 13	64 ± 13	0.16	65 ± 13	59 ± 12	0.20	0.060	0.12	53 ± 11	43 ± 9	0.0069	0.026
44,392,495	74 ± 14	67 ± 12	0.13	65 ± 10	59 ± 13	0.17	0.048	0.11	54 ± 9	47 ± 8	0.035	0.052
44,392,508	72 ± 15	66 ± 15	0.26	62 ± 13	59 ± 10	0.54	0.23	0.30	51 ± 9	44 ± 7	0.015	0.035
44,392,516	73 ± 15	66 ± 14	0.20	61 ± 13	58 ± 9	0.50	0.17	0.25	51 ± 8	43 ± 7	0.012	0.032
44,392,529	73 ± 15	65 ± 16	0.24	58 ± 9	56 ± 9	0.52	0.20	0.27	49 ± 9	42 ± 7	0.018	0.035
44,392,607	90 ± 6	89 ± 3	0.38	82 ± 8	81 ± 11	0.63	0.40	0.48	76 ± 10	69 ± 10	0.085	0.10
44,392,616	92 ± 4	89 ± 5	0.14	86 ± 7	85 ± 11	0.74	0.18	0.26	80 ± 10	73 ± 9	0.053	0.071
44,392,618	90 ± 5	89 ± 4	0.36	84 ± 7	83 ± 12	0.87	0.49	0.55	78 ± 10	70 ± 10	0.053	0.071
44,392,627	86 ± 7	81 ± 6	0.060	80 ± 9	77 ± 12	0.49	0.10	0.18	72 ± 11	61 ± 12	0.017	0.035
44,392,639	87 ± 6	83 ± 7	0.14	80 ± 7	79 ± 13	0.73	0.21	0.28	74 ± 11	63 ± 13	0.027	0.046
44,392,658	76 ± 26	81 ± 18	0.48	78 ± 19	81 ± 14	0.62	0.43	0.50	73 ± 20	68 ± 18	0.46	0.48
44,392,664	93 ± 4	90 ± 4	0.16	88 ± 5	87 ± 9	0.58	0.18	0.26	84 ± 8	77 ± 10	0.047	0.066
44,392,668	94 ± 5	93 ± 4	0.59	89 ± 5	91 ± 7	0.38	0.78	0.81	88 ± 8	81 ± 9	0.054	0.071
44,392,687	92 ± 5	92 ± 3	0.83	90 ± 6	88 ± 7	0.40	0.64	0.71	86 ± 7	79 ± 9	0.032	0.050
44,392,731	68 ± 24	71 ± 14	0.62	73 ± 14	75 ± 8	0.55	0.46	0.53	69 ± 17	66 ± 15	0.61	0.63

rs738409 の SNP は NAFLD の発症に強く影響することが知られている [28,29]。そこで次に、線維化のステージにより有意差がみられた CpG99 と CpG26 のメチル化レベルに対する rs738409 の遺伝子型の影響を解析した。

rs738409 は C/G の nonsynonymous な SNP であり、野生型の C アレルの場合は PNPLA3 遺伝子の 148 番目のアミノ酸がイソロイシン (I) であるのに対し、リスクアレルである G アレルの場合はメチオニン (M) となっている (I148M)。そこで 1st セットと 2nd セットを、rs738409 の遺伝子型により 2 つの群に分けて (リスクアレルのホモ型 : MM とその他 : IM + II)、その遺伝子型ごとに mild NAFLD と advanced NAFLD のメチル化レベルを比較した。

その結果、CpG99 ではリスクアレルをホモに持つ MM グループで 4 箇所の CpG サイト (44,320,188、44,320,198、44,320,329、44,320,351) が、advanced NAFLD で高メチル化状態であった (表 17)。しかし IM + II グループでは上記 CpG99 内の 4 箇所の CpG サイトに mild NAFLD と advanced NAFLD の間でメチル化レベルの違いはみられなかった。一方、advanced NAFLD で低メチル化状態であった CpG26 では、MM グループと IM + II グループのどちらにおいても advanced NAFLD で低メチル化状態であり ($p < 0.05$; 表 18)、遺伝子型による影響はみられなかった。

表 17 CpG99 における rs738409 遺伝子型と肝線維化ステージごとの肝臓 DNA のメチル化レベル

Position (bp)	MM genotype			IM or II genotypes		
	Stages 0-1	Stages 2-4	<i>P</i> -value	Stages 0-1	Stages 2-4	<i>P</i> -value
	(n = 14)	(n = 13)		(n = 22)	(n = 16)	
44,320,033	4 ± 3	6 ± 4	0.22	5 ± 4	5 ± 3	0.92
44,320,040	3 ± 2	6 ± 6	0.090	5 ± 4	5 ± 3	0.95
44,320,162	9 ± 5	9 ± 4	0.89	7 ± 4	7 ± 3	0.92
44,320,188	8 ± 5	12 ± 5	0.018	7 ± 4	10 ± 4	0.099
44,320,198	6 ± 5	11 ± 4	0.017	6 ± 4	8 ± 4	0.11
44,320,295	7 ± 7	7 ± 4	0.87	4 ± 2	7 ± 4	0.0050
44,320,300	7 ± 5	10 ± 6	0.26	6 ± 5	8 ± 5	0.31
44,320,303	5 ± 5	7 ± 5	0.40	5 ± 3	7 ± 4	0.094
44,320,317	9 ± 5	12 ± 5	0.12	10 ± 5	11 ± 5	0.47
44,320,329	16 ± 5	24 ± 9	0.0075	17 ± 8	21 ± 8	0.21
44,320,351	4 ± 3	13 ± 7	4.3×10 ⁻⁴	6 ± 4	8 ± 4	0.19
44,320,377	5 ± 3	8 ± 3	0.018	5 ± 4	5 ± 3	0.57

表 18 CpG26 における rs738409 遺伝子型と肝線維化ステージごとの肝臓 DNA のメチル化レベル

Position (bp)	MM genotype			IM or II genotypes		
	Stages 0-1	Stages 2-4	<i>P</i> -value	Stages 0-1	Stages 2-4	<i>P</i> -value
	(n = 14)	(n = 13)		(n = 22)	(n = 16)	
44,392,061	45 ± 13	33 ± 9	0.015	40 ± 10	33 ± 8	0.014
44,392,067	45 ± 13	33 ± 9	0.011	41 ± 9	33 ± 8	0.013
44,392,082	45 ± 11	35 ± 9	0.017	41 ± 9	33 ± 7	0.0051
44,392,120	48 ± 9	41 ± 10	0.082	47 ± 10	41 ± 7	0.036
44,392,126	48 ± 9	41 ± 10	0.089	47 ± 8	41 ± 7	0.019
44,392,143	49 ± 8	43 ± 10	0.088	48 ± 9	42 ± 7	0.035
44,392,159	44 ± 8	40 ± 10	0.28	44 ± 8	38 ± 6	0.020
44,392,179	52 ± 8	46 ± 11	0.11	52 ± 13	47 ± 8	0.13
44,392,184	53 ± 8	46 ± 11	0.083	52 ± 13	47 ± 7	0.11
44,392,188	52 ± 7	46 ± 12	0.11	53 ± 13	47 ± 8	0.14
44,392,191	52 ± 8	44 ± 11	0.045	51 ± 13	46 ± 8	0.11

44,392,230	58 ± 7	50 ± 10	0.034	58 ± 11	52 ± 7	0.065
44,392,265	68 ± 5	62 ± 11	0.078	71 ± 13	63 ± 7	0.020
44,392,310	67 ± 17	50 ± 15	0.012	66 ± 18	50 ± 15	0.0085
44,392,326	65 ± 17	47 ± 14	0.0057	60 ± 16	50 ± 13	0.036
44,392,333	66 ± 14	48 ± 14	0.0027	62 ± 15	51 ± 13	0.033
44,392,341	63 ± 13	49 ± 12	0.0076	62 ± 14	52 ± 12	0.025
44,392,343	72 ± 15	56 ± 14	0.0067	69 ± 17	57 ± 12	0.020
44,392,351	71 ± 13	57 ± 13	0.010	68 ± 13	59 ± 11	0.038
44,392,365	64 ± 11	52 ± 10	0.012	62 ± 11	54 ± 9	0.024
44,392,384	62 ± 8	53 ± 11	0.020	62 ± 11	54 ± 8	0.013
44,392,410	61 ± 8	51 ± 11	0.023	63 ± 12	54 ± 10	0.014
44,392,418	65 ± 8	57 ± 12	0.045	67 ± 12	57 ± 9	0.0044
44,392,454	69 ± 11	66 ± 12	0.53	73 ± 11	64 ± 8	0.013
44,392,456	70 ± 10	64 ± 11	0.19	73 ± 12	63 ± 10	0.0075
44,392,469	71 ± 10	68 ± 11	0.42	76 ± 13	65 ± 8	0.0023
44,392,479	65 ± 14	63 ± 13	0.76	70 ± 13	59 ± 11	0.0053
44,392,495	67 ± 14	66 ± 11	0.79	72 ± 12	58 ± 13	0.0032
44,392,508	64 ± 16	66 ± 12	0.68	70 ± 14	58 ± 11	0.0055
44,392,516	65 ± 16	65 ± 12	0.99	70 ± 15	58 ± 11	0.0064
44,392,529	64 ± 16	64 ± 13	0.99	68 ± 14	56 ± 12	0.0063
44,392,607	85 ± 6	83 ± 12	0.48	88 ± 9	85 ± 7	0.20
44,392,616	88 ± 5	84 ± 12	0.31	91 ± 7	89 ± 6	0.31
44,392,618	86 ± 5	84 ± 13	0.55	89 ± 8	87 ± 5	0.38
44,392,627	82 ± 7	78 ± 14	0.38	84 ± 10	79 ± 7	0.069
44,392,639	83 ± 5	78 ± 14	0.19	84 ± 8	82 ± 7	0.50
44,392,658	76 ± 22	81 ± 15	0.52	77 ± 25	81 ± 16	0.50
44,392,664	91 ± 3	86 ± 10	0.090	91 ± 6	91 ± 4	0.83
44,392,668	91 ± 5	90 ± 7	0.46	92 ± 5	93 ± 4	0.42
44,392,687	89 ± 4	88 ± 8	0.53	92 ± 6	92 ± 3	0.52
44,392,731	72 ± 20	74 ± 11	0.73	69 ± 21	74 ± 11	0.36

第三項 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が知られている。そこで、肝臓での CpG99 と CpG26 のメチル化状態の違いが NAFLD に特異的な現象であるのかどうかを調べるために、C 型慢性肝炎症例 30 人分の肝臓 DNA のメチル化レベルを同様に次世代シーケンサーにより解析した。

その結果、CpG99 では、advanced NAFLD で高メチル化状態であった 4 箇所、CpG26 でも、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 (F3、F4) で同様に高メチル化状態であった (Q values <0.05, 表 15)。CpG26 でも、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, 表 16)。

肝臓での CpG99 の高メチル化状態と CpG26 の低メチル化状態は、NAFLD だけではなく C 型慢性肝炎症例でもみられたことから、NAFLD に特異的なものではなく肝線維化の進行と関連していることが示唆された。

第四項 その他の組織学的所見との関連解析

肝線維化以外の組織学的所見として、風船様膨化、炎症、NAS と、肝臓 DNA のメチル化レベルとの関連を調べた。その結果、どの項目にも有意な関連はみられなかった。

第五項 肝線維化ステージと血液 DNA メチル化レベルとの関連解析

次に、mild NAFLD と advanced NAFLD のメチル化状態の違いが肝臓以外の組織でもみられるのかを調べるために、血液 DNA で同様の解析を行った。その結果、CpG99、CpG71、CpG26、CpG101 全ての領域で mild NAFLD と advanced NAFLD の間に有意差はみられなかった。このことから、肝線維化のステージによる DNA メチル化レベルの違いは、肝臓の DNA に特異的であることが示唆された (図 12)。

第六項 肝臓 DNA と血液 DNA のメチル化レベルの比較

DNA メチル化の組織特異性を調べるために、肝臓と血液の DNA メチル化レベルの比較を行った。その結果、CpG26 では全体的に肝臓 DNA のほうが血液 DNA よりもメチル化レベルが高くなっており (Q values <0.05)、CpG99 では肝臓 DNA のほうが血液 DNA よりも低くなっていた (補足図 5, Q values <0.05) ことから、組織特異性がみられた。

血液 DNA との比較の結果ではあるが、肝臓において、通常の状態では CpG26 のメチル化レベルは高く保たれており、CpG99 のメチル化レベルは低く保たれていることが必要であると考えられる。肝臓 DNA において CpG26 の低メチル化と CpG99 の高メチル化が肝線維化の進行と関連することから、組織特異的なメチル化状態からの逸脱が NAFLD の発症や進展に影響することが示唆された。

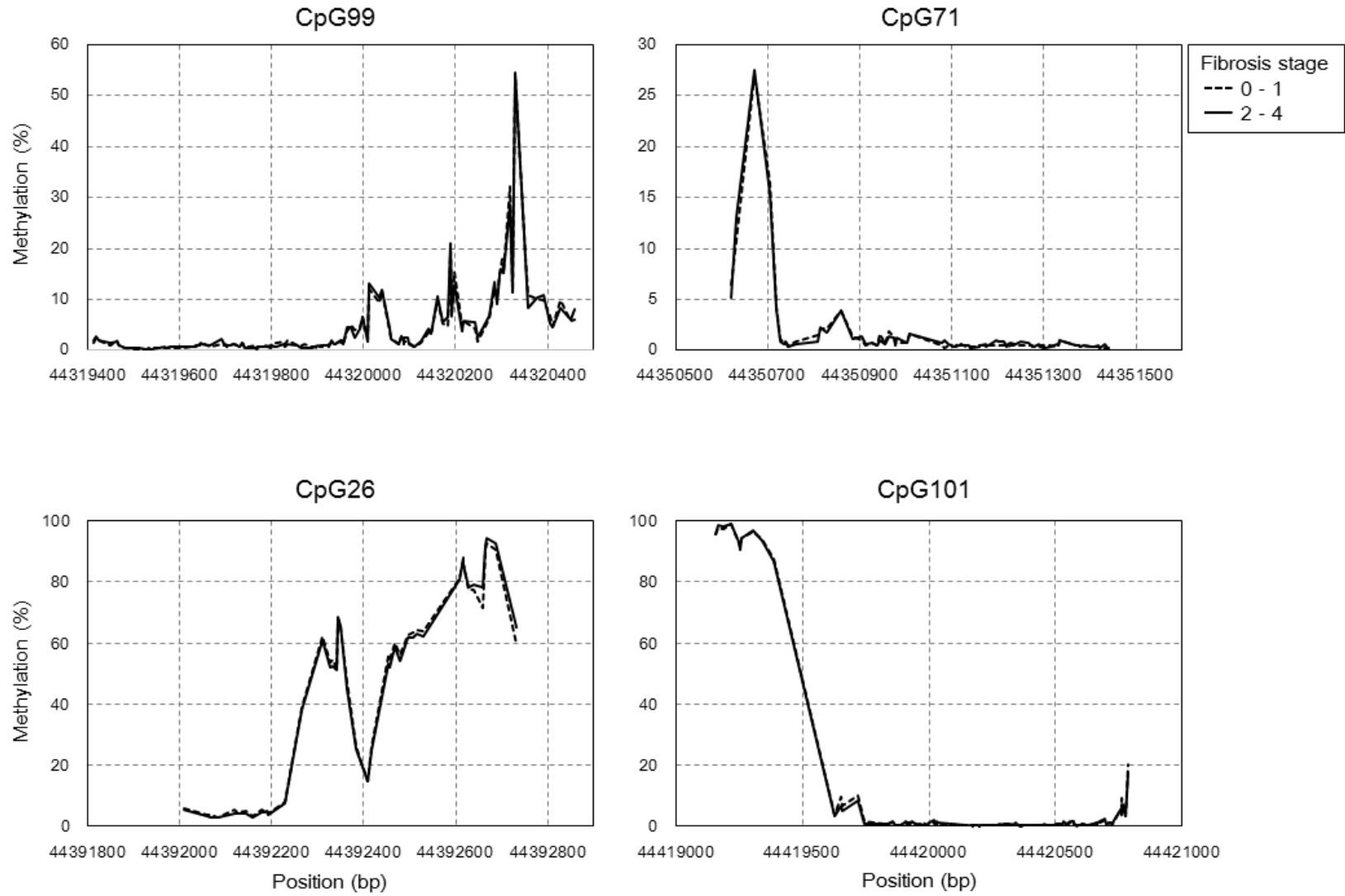


図 12 4 箇所の CpG 領域における肝線維化ステージごとの血液 DNA のメチル化レベル

第七項 NAFLD 症例の肝臓における PNPLA3、SAMM50、PARVB mRNA レベル測定

qPCR により肝臓での PNPLA3、SAMM50、PARVB variant 1、PARVB variant 2 それぞれの mRNA レベルを測定した。PARVB variant 1 の mRNA は肝臓で発現はみられるものの、発現量が非常に少ないため qPCR による定量ができなかった。そのため、PARVB に関しては PARVB variant 2 の mRNA だけを測定した。1st セットのサンプルで、PNPLA3、SAMM50、PARVB 遺伝子それぞれの mRNA レベルを mild NAFLD と advanced NAFLD に分けて比較した結果を図 13A に示した。その結果、PNPLA3 の mRNA レベルは mild NAFLD に比較して advanced NAFLD で低下している傾向がみられた ($p = 0.045$)。SAMM50 と PARVB の mRNA レベルには mild NAFLD と advanced NAFLD の間に差はみられなかった。

mRNA レベルに差がみられた PNPLA3 遺伝子については、2nd セットでも同様に qPCR により mRNA レベルを測定した。mild NAFLD と advanced NAFLD に分けて比較した結果を図 13B に示した。その結果、1st セットの結果と同様に PNPLA3 の mRNA レベルは advanced NAFLD で低下している傾向がみられた ($p = 0.051$)。1st セットと 2nd セットによるメタ解析を行った結果、PNPLA3 の mRNA レベルは advanced NAFLD で有意に低下していた ($p = 0.0076$)。

次に 1st セットと 2nd セットのサンプルを合わせて、rs738409 の MM 遺伝子型グループと IM + II 遺伝子型グループに分けて PNPLA3 遺伝子の mRNA レベルを解析した。その結果、MM 遺伝子型グループにおいてのみ advanced NAFLD で有意な低下がみられた ($p = 0.0081$, 図 14A)。IM + II 遺伝子型グループでも advanced NAFLD で低下している傾向はみられたものの、統計的に有

意ではなかった。

ここまでの解析により、肝臓 DNA メチル化レベル (CpG99 と CpG26) と肝線維化との関連、また肝線維化と PNPLA3 の mRNA 発現量との関連がみられたので、次に肝臓 DNA メチル化レベル (CpG99) と mRNA (PNPLA3) 発現量との関連を調べた。その結果、PNPLA3 の mRNA レベルは、CpG99 内のポジション 44,320,188 ($r = -0.442$, $p = 2.5 \times 10^{-4}$) (図 13C) で最も強い逆の関連がみられた。このことから CpG99 の高メチル化により PNPLA3 の mRNA の発現が抑制されていることが示唆された。この関連は、rs738409 の MM グループでは有意差がみられたが ($r = -0.606$, $p = 0.0010$)、II + IM グループでは有意差はみられなかった ($r = -0.245$, $p = 0.14$) (図 14B)。これらのデータから、rs738409 の遺伝子型は肝臓で CpG99 の DNA のメチル化レベルに影響し、さらに、CpG99 の下流に位置する PNPLA3 遺伝子の mRNA 発現に影響することが示唆された。

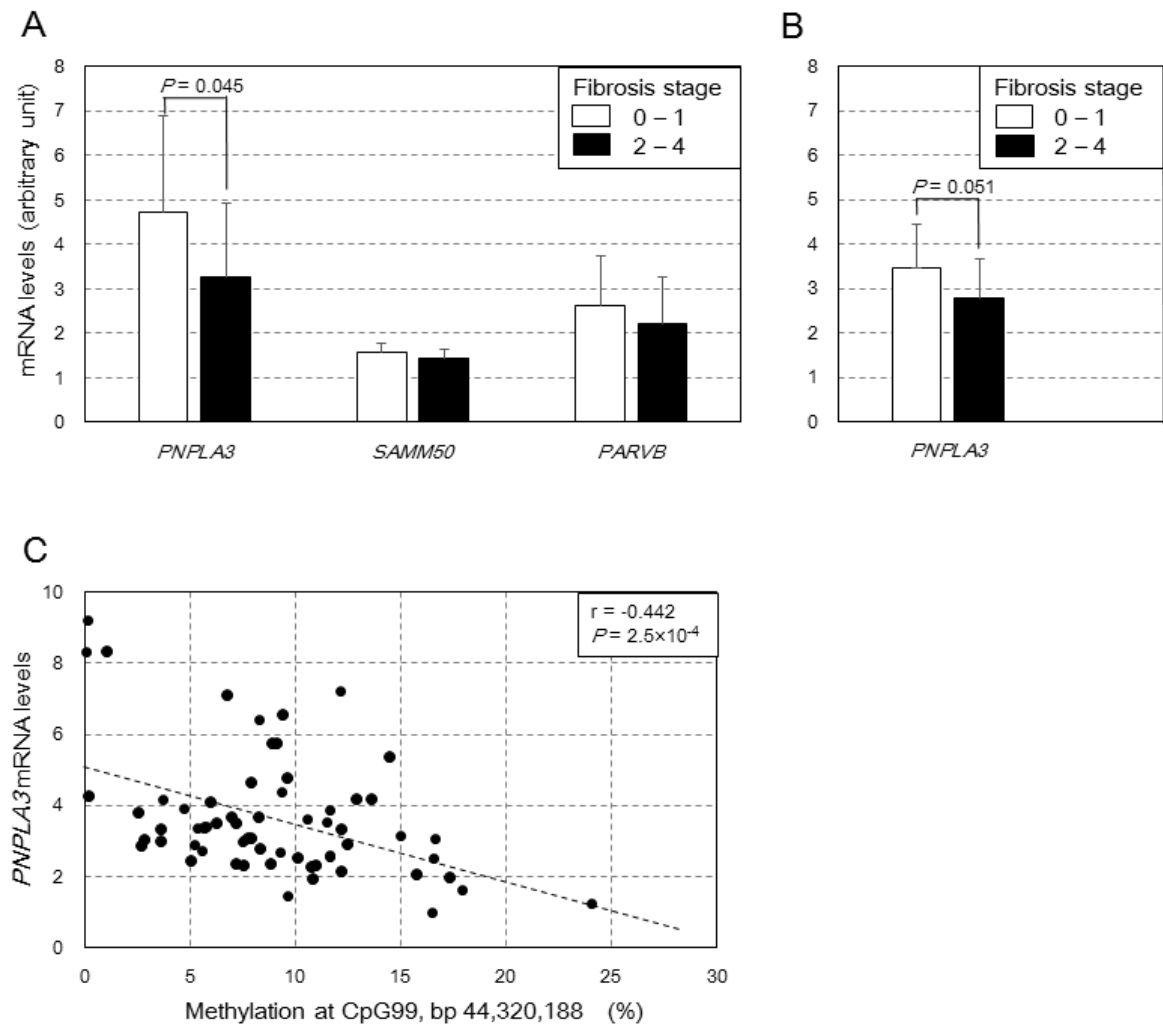


図13 1stセット(A)と2ndセット(B)のNAFLD症例の肝臓における mRNA レベルと、肝臓DNAのメチル化レベル(CpG99)と *PNPLA3* 遺伝子 mRNA レベルとの関連 (C)

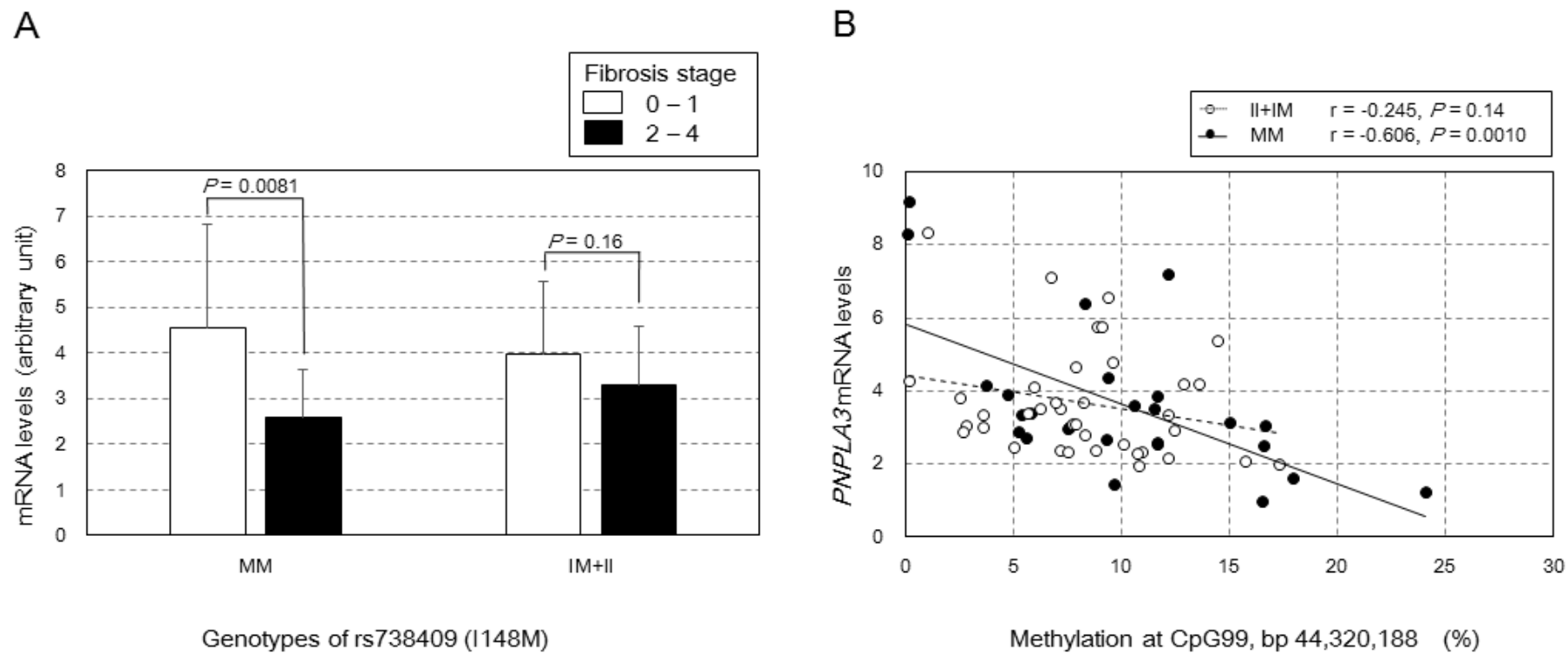


図 14 rs738409 の遺伝子型ごとの、PNPLA3 遺伝子 mRNA レベル(A)と、肝臓 DNA のメチル化レベル(CpG99)と PNPLA3 遺伝子 mRNA レベルとの関連 (B)

第三節 考察

NAFLD 感受性領域に存在する 4 箇所の CpG 領域全体を、次世代シーケンサーを用いて解析することで正確なメチル化レベルを測定し、線維化が進行した (advanced) NAFLD の肝臓 DNA において CpG99 領域が高メチル化状態であり、CpG26 領域が低メチル化状態となっていることを明らかにした。

Murphy らによる NAFLD 症例の肝臓 DNA を用いたマイクロアレイチップの公開データベースによれば[12]、CpG26 に関しては本研究と同様に advanced NAFLD で低メチル化状態であることを示していた ($p = 2.8 \times 10^{-4}$, bp 44,392,384)。このデータベースでは advanced NAFLD と mild NAFLD のメチル化レベルはそれぞれ 67%と 73%となっており、本研究の結果とほぼ一致していた。

一方 CpG99 に関しては、マイクロアレイにいくつかの CpG サイトが搭載されているものの、本研究で advanced NAFLD で高メチル化状態であった CpG サイトは搭載されていないため、advanced NAFLD と mild NAFLD のメチル化レベルの違いは検出されていなかった。

本研究に用いた次世代シーケンサーによるターゲットバイサルファイトシーケンスの手法は、マイクロアレイチップによる全ゲノムの網羅的な探索法とは異なり、対象とする CpG 領域中のほとんど全ての CpG サイトのメチル化レベルを解析することが可能である。また、各 CpG サイトに対して数百から数千の高カバレッジなデータが得られるため、非常に正確なメチル化レベルのデータを得ることが可能である。したがって、特定の CpG 領域全体を対象とした高密度かつ高精度な解析に、本手法は非常に有用であると考えられる。

CpG99 に関して、肝線維化の進行と高メチル化との関連に加えて、肝線維化

の進行と PNPLA3 遺伝子の発現量低下、さらに高メチル化と PNPLA3 遺伝子の発現量低下が関連することを見出した。また、CpG99 のメチル化と PNPLA3 遺伝子の発現量は、PNPLA3 遺伝子内の rs738409 の遺伝子型により影響を受けることを示唆した。NAFLD の発症や進行に最も重要であると考えられている PNPLA3 遺伝子の発現が、上流の CpG99 のメチル化レベルと関連し、さらにそのメチル化は PNPLA3 遺伝子内の rs738409 の遺伝子型によって影響を受けるということは新たな知見であり、PNPLA3 遺伝子と肝線維化の関係を証明することに貢献すると考えられる。

これらのことから、環境因子によって、rs738409 のリスクアレルホモ型(MM) の遺伝子型を持つ症例では CpG99 の高メチル化が引き起こされ、下流の PNPLA3 遺伝子の mRNA の転写量が減少し、その結果、肝線維化に影響を及ぼすというメカニズムが考えられた (図 15)。

CpG26 に関しては、肝線維化の進行と低メチル化との間に CpG99 よりも強い関連を見出したが、下流の PARVB variant 1 遺伝子の発現量が非常に少ないために定量することができなかった。また、PARVB variant 2 遺伝子の発現量との関連はみられなかった。

ChIP-sequence のデータベースによれば、CpG26 にはいくつかの転写因子が結合することが示されており、その中には RELA (NF- κ B) が含まれている [44,45] (補足図 6)。NF- κ B は炎症を制御するキーとなる転写因子であることが知られており [46]、また NF- κ B は、DNA に結合することで DNA メチル化が抑制されることが報告されている [47]。したがって、NF- κ B の結合によって CpG26 の低メチル化状態が引き起こされ、その結果、下流に位置する PARVB variant 1 の mRNA 発現を調節している可能性が考えられた。または今回解析を行った感受性領域の近傍に存在する他の遺伝子の転写を調節している可能性も考えられ

るが、さらなる研究が必要である。

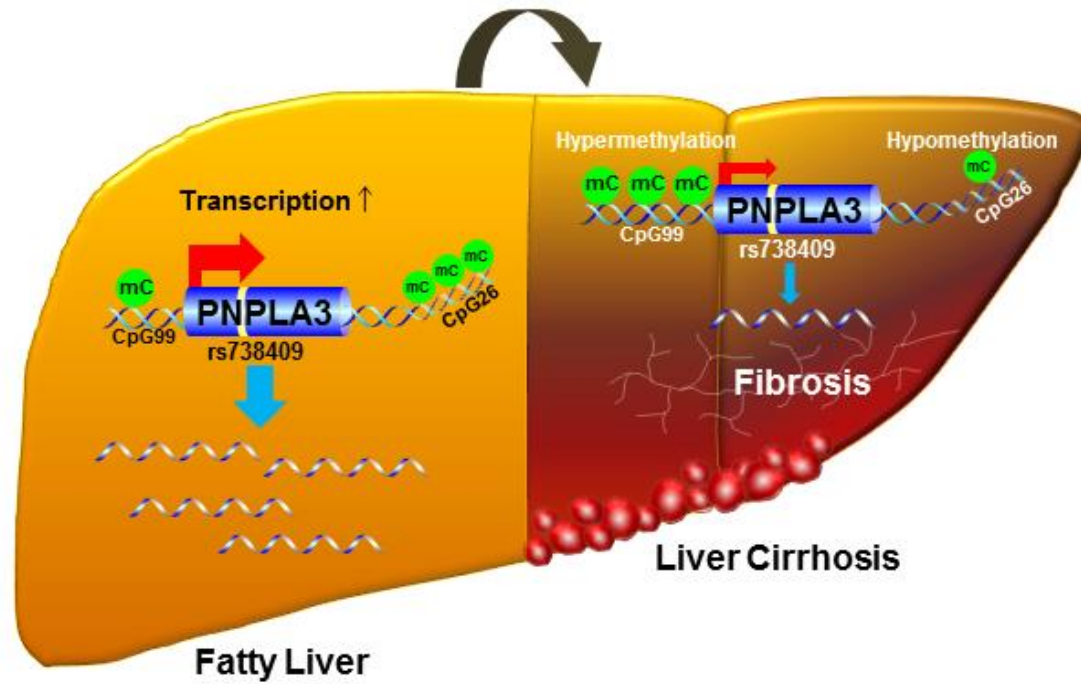


図 15 肝線維化の進行における感受性領域のメチル化状態の変化と PNPLA3 遺伝子発現変化

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 (GWAS) 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 症例を用いて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、生化学的形質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していることを示唆した。

PNPLA3、SAMM50、PARVB 遺伝子を含む NAFLD 感受性領域には 4 箇所の CpG 領域 (CpG99、CpG71、CpG26、CpG101) が存在していたことから、これらのメチル化レベルをターゲットバイサルファイトシーケンスにより高密度かつ高精度に解析した結果、肝線維化の進行と肝臓 DNA における CpG99 の高メチル化、CpG26 の低メチル化が関連していることを見出した。CpG99 の下流には PNPLA3 遺伝子が位置するが、肝線維化の進行や CpG99 の高メチル化により、PNPLA3 mRNA レベルが低下していることを見出した。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 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について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 の発症と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。

謝辞

本論文をまとめるにあたり非常に多くの方にお世話になりました。ここに深く感謝いたします。主査を担当していただきました東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科動物分子生物学研究室の喜田聡先生、副査を担当していただきました同動物発生工学研究室の河野友宏先生、小川英彦先生、大阪大学医学部附属病院未来医療開発部の堀田紀久子先生には大変お世話になり、また論文を精査していただいた上での適切なお助言と有益な議論の場を提供していただきましたことに深く感謝いたします。

さらに本実験の遂行にあたり、ご指導、ご協力をいただきました千葉大学予防医学センターの関根章博先生、横浜市立大学附属病院消化器内科肝胆膵消化器病学教室の中島淳先生、斉藤聡先生、米田正人先生、今城健人先生、小川祐二先生、本多靖先生、防衛医科大学校数学研究室の中村好宏先生、広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・代謝内科学肝臓研究室の茶山一彰先生、越智秀典先生、JA 広島総合病院消化器内科の兵庫秀幸先生、朝倉医師会病院の上野隆登先生、京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター中枢神経系制御薬研究ラボの中尾一和先生、京都大学大学院医学研究科ファーマコゲノミクスプロジェクトの水澤精穂さん、寺西啓さん、大山祐三子さん、関根裕子さん、北本綾さんに深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Angulo, Paul. "Nonalcoholic fatty liver disease." *New England Journal of Medicine* 346.16 (2002): 1221-1231.
- [2] Farrell, Geoffrey C. "Non - alcoholic steatohepatitis: What is it, and why is it important in the Asia–Pacific region?." *Journal of gastroenterology and hepatology* 18.2 (2003): 124-138.
- [3] Okanoue, Takeshi, et al. "Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan." *Journal of gastroenterology and hepatology* 26.s1 (2011): 153-162.
- [4] Ludwig, Jurgen, et al. "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." *Mayo Clinic Proceedings*. Vol. 55. No. 7. 1980.
- [5] Romeo, Stefano, et al. "Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease." *Nature genetics* 40.12 (2008): 1461-1465.
- [6] Chalasani, Naga, et al. "Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* 139.5 (2010): 1567-1576.
- [7] Kawaguchi, Takahisa, et al. "Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese." *PLoS One* 7.6 (2012): e38322.

- [8] Speliotes, Elizabeth K., et al. "Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits." *PLoS Genet* 7.3 (2011): e1001324.
- [9] de Alwis, Nimantha Mark Wilfred, and Christopher Paul Day. "Genes and nonalcoholic fatty liver disease." *Current diabetes reports* 8.2 (2008): 156-163.
- [10] Sookoian, Silvia, et al. "Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α promoter." *Hepatology* 52.6 (2010): 1992-2000.
- [11] Ahrens, Markus, et al. "DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery." *Cell metabolism* 18.2 (2013): 296-302.
- [12] Murphy, Susan K., et al. "Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* 145.5 (2013): 1076-1087.
- [13] Sanyal, Arun J. "AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* 123.5 (2002): 1705-1725.
- [14] Matteoni, Christi A., et al. "Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity." *Gastroenterology* 116.6 (1999): 1413-1419.
- [15] Teli, Mohd R., et al. "The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study." *Hepatology* 22.6 (1995): 1714-1719.
- [16] Brunt, Elizabeth M. "Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology." *Seminars in liver disease*. Vol. 21. No. 1. 2000.

- [17] Kleiner, David E., et al. "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 41.6 (2005): 1313-1321.
- [18] Ohnishi, Yozo, et al. "A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies." *Journal of human genetics* 46.8 (2001): 471-477.
- [19] Li, Heng, and Richard Durbin. "Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform." *Bioinformatics* 25.14 (2009): 1754-1760.
- [20] Li, Heng, et al. "The sequence alignment/map format and SAMtools." *Bioinformatics* 25.16 (2009): 2078-2079.
- [21] McKenna, Aaron, et al. "The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data." *Genome research* 20.9 (2010): 1297-1303.
- [22] Wang, Kai, Mingyao Li, and Hakon Hakonarson. "ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data." *Nucleic acids research* 38.16 (2010): e164-e164.
- [23] Robinson, James T., et al. "Integrative genomics viewer." *Nature biotechnology* 29.1 (2011): 24-26.
- [24] Thorvaldsdóttir, Helga, James T. Robinson, and Jill P. Mesirov. "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." *Briefings in bioinformatics* (2012): bbs017.
- [25] Purcell, Shaun, et al. "PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses." *The American Journal of Human Genetics* 81.3 (2007): 559-575.

- [26] Nielsen, Dahlia M., Meg G. Ehm, and Bruce S. Weir. "Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus." *The American Journal of Human Genetics* 63.5 (1998): 1531-1540.
- [27] Barrett, Jeffrey C., et al. "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 21.2 (2005): 263-265.
- [28] Hotta, Kikuko, et al. "Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease." *BMC medical genetics* 11.1 (2010): 172.
- [29] Zain, Shamsul Mohd, et al. "A multi-ethnic study of a PNPLA3 gene variant and its association with disease severity in non-alcoholic fatty liver disease." *Human genetics* 131.7 (2012): 1145-1152.
- [30] Sookoian, Silvia, and Carlos J. Pirola. "Meta - analysis of the influence of I148M variant of patatin - like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 53.6 (2011): 1883-1894.
- [31] Ott, Christine, et al. "Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes." *Molecular and cellular biology* 32.6 (2012): 1173-1188.
- [32] Sanyal, Arun J., et al. "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." *Gastroenterology* 120.5 (2001): 1183-1192.
- [33] Caldwell, Stephen H., et al. "Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis." *Journal of hepatology* 31.3 (1999): 430-434.
- [34] Kimura, Mariko, et al. "Functional molecular imaging of ILK-mediated Akt/PKB signaling cascades and the associated role of β -parvin." *Journal of cell science* 123.5 (2010): 747-755.

- [35] Desgrosellier, Jay S., and David A. Cheresh. "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." *Nature Reviews Cancer* 10.1 (2010): 9-22.
- [36] Patsenker, Eleonora, and Felix Stickel. "Role of integrins in fibrosing liver diseases." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301.3 (2011): G425-G434.
- [37] Bedossa, Pierre, Thierry Poynard, and METAVIR Cooperative Study Group. "An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C." *Hepatology* 24.2 (1996): 289-293.
- [38] Krueger, Felix, and Simon R. Andrews. "Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications." *Bioinformatics* 27.11 (2011): 1571-1572.
- [39] Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." *Nature methods* 9.4 (2012): 357-359.
- [40] Schroeder, Andreas, et al. "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." *BMC molecular biology* 7.1 (2006): 3.
- [41] Viechtbauer, Wolfgang. "Conducting meta-analyses in R with the metafor package." *Journal of Statistical Software* 36.3 (2010): 1-48.
- [42] Storey, John D., and Robert Tibshirani. "Statistical significance for genomewide studies." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.16 (2003): 9440-9445.
- [43] Krueger, Felix, et al. "DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data." *Nature methods* 9.2 (2012): 145-151.
- [44] Wang, Jie, et al. "Factorbook. org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium." *Nucleic acids research* 41.D1 (2013): D171-D176.

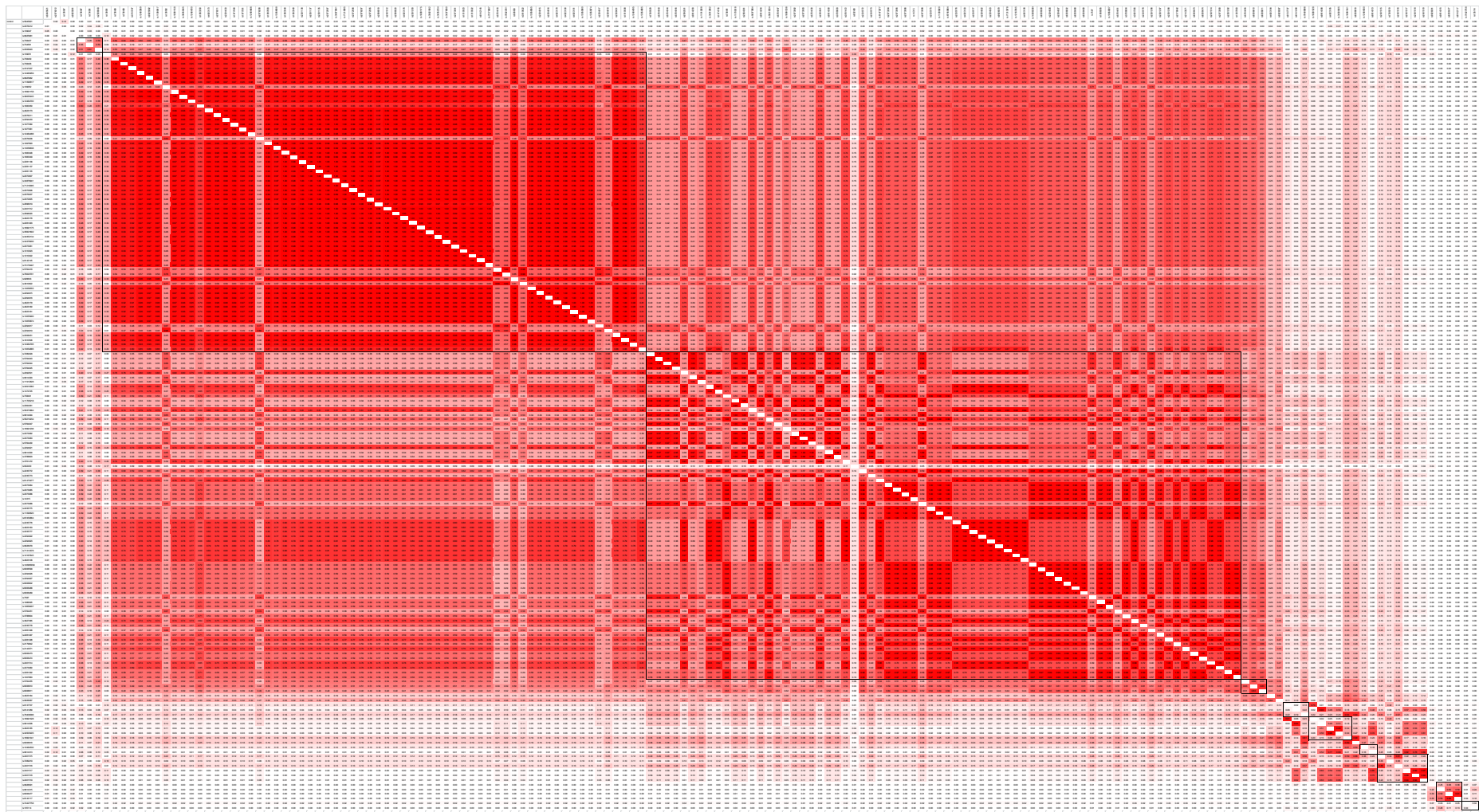
[45] Kent, W. James, et al. "The human genome browser at UCSC." *Genome research* 12.6 (2002): 996-1006.

[46] Fujii, Hideki, and Norifumi Kawada. "Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis." *Journal of gastroenterology* 47.3 (2012): 215-225.

[47] Sun, Lei, et al. "Epigenetic Regulation of SOX9 by the NF - κ B Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Stem Cells." *Stem cells* 31.8 (2013): 1454-1466

.

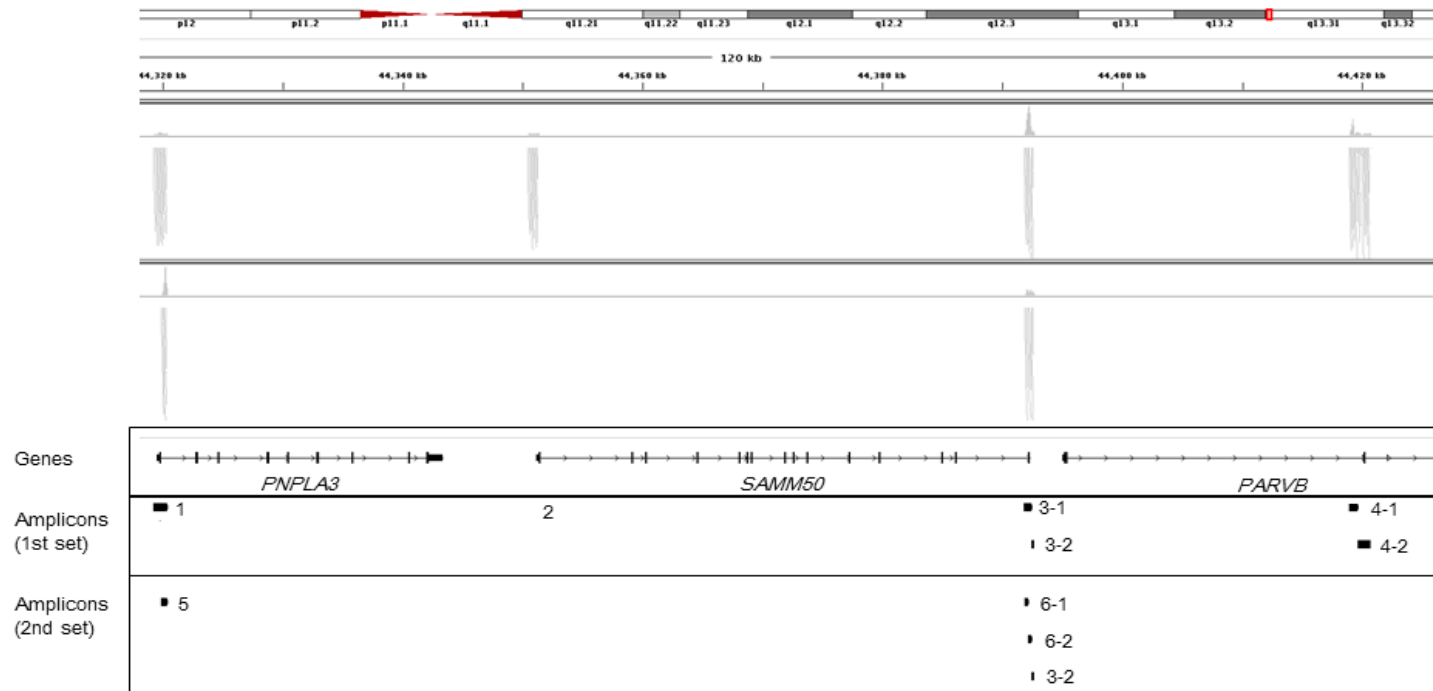
補足資料



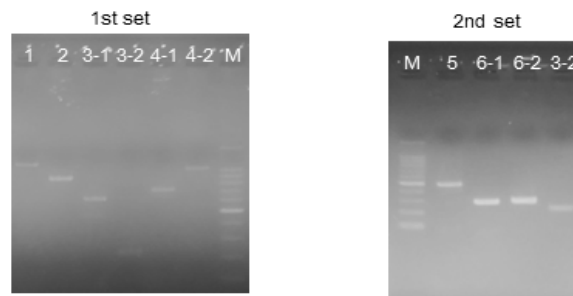
補足図1 NAFLD 症例と Control 群の LD map

上段 NAFLD 症例、下段 Control 群

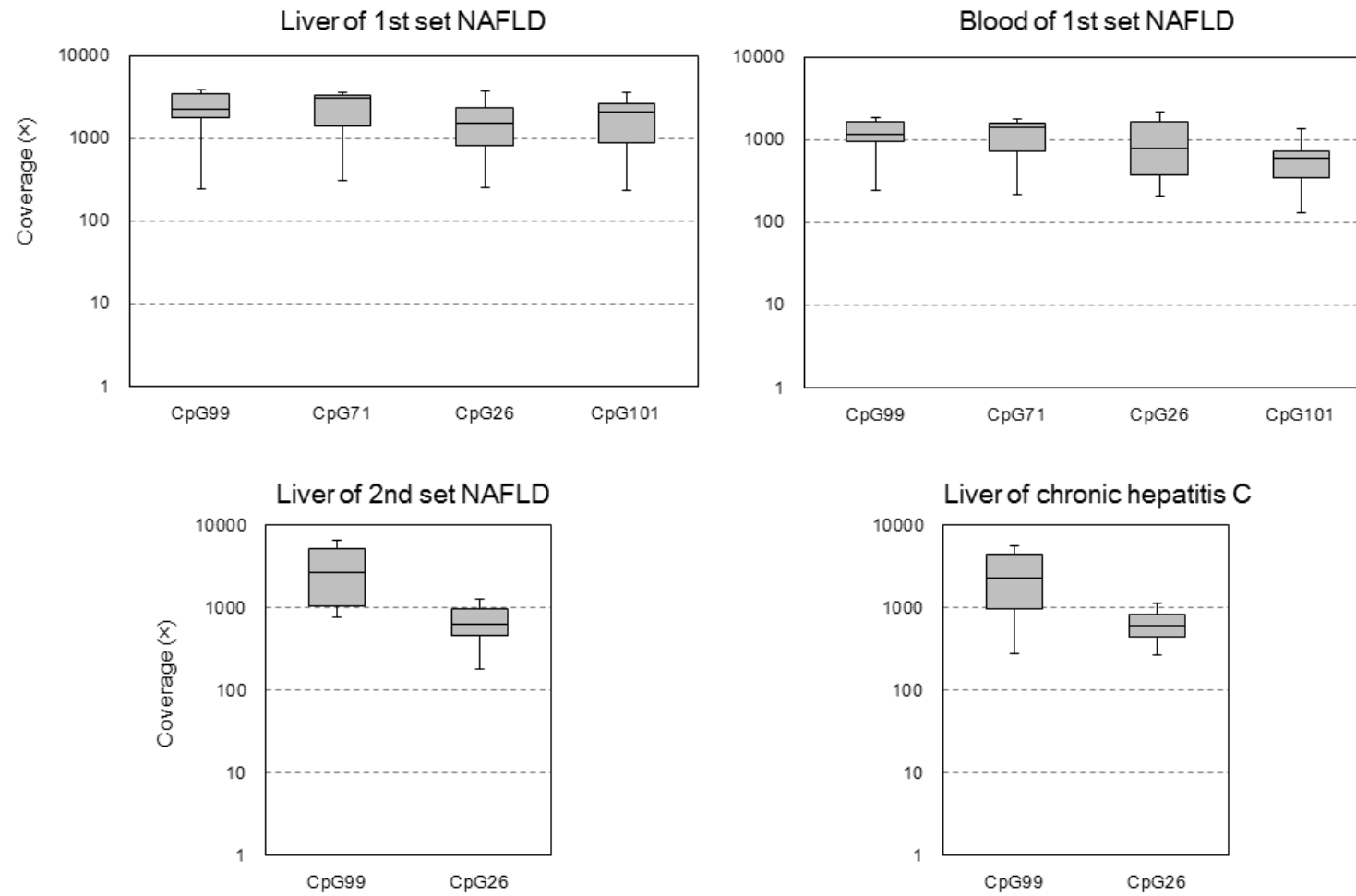
A



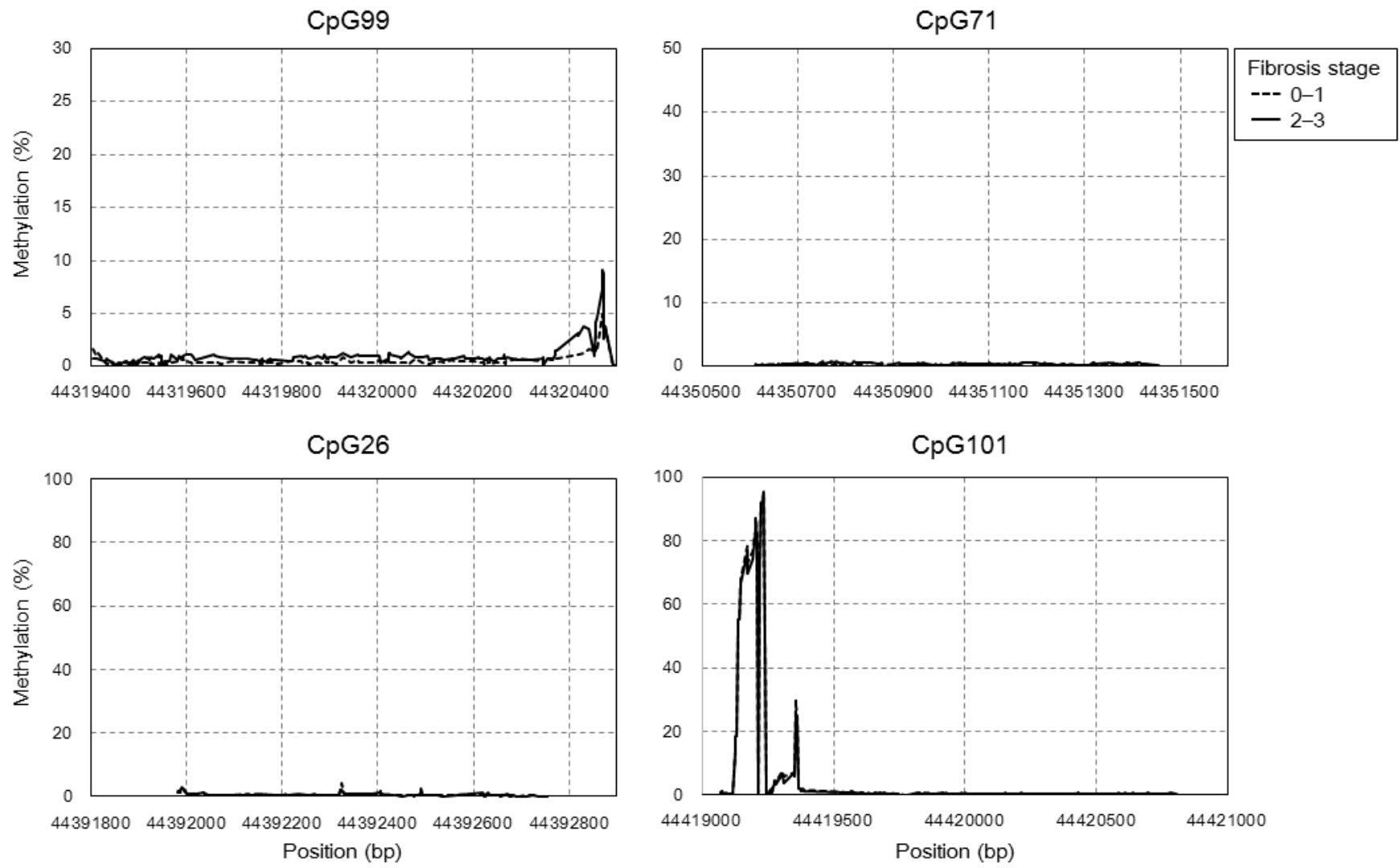
B



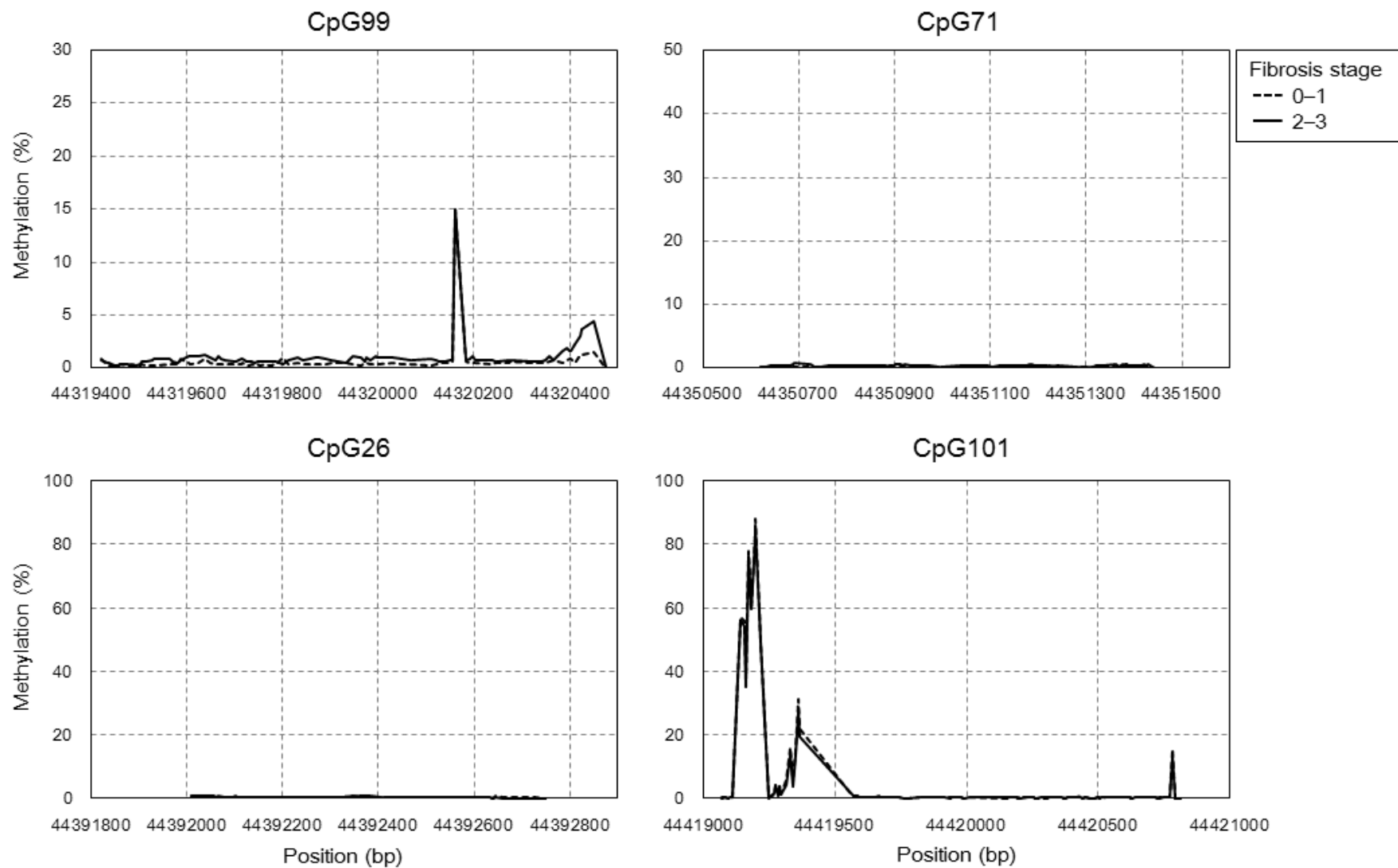
補足図 2 Miseq によるバイサルファイトシーケンスのマッピング例 (A)と、PCR 増幅産物の電気泳動 (B)



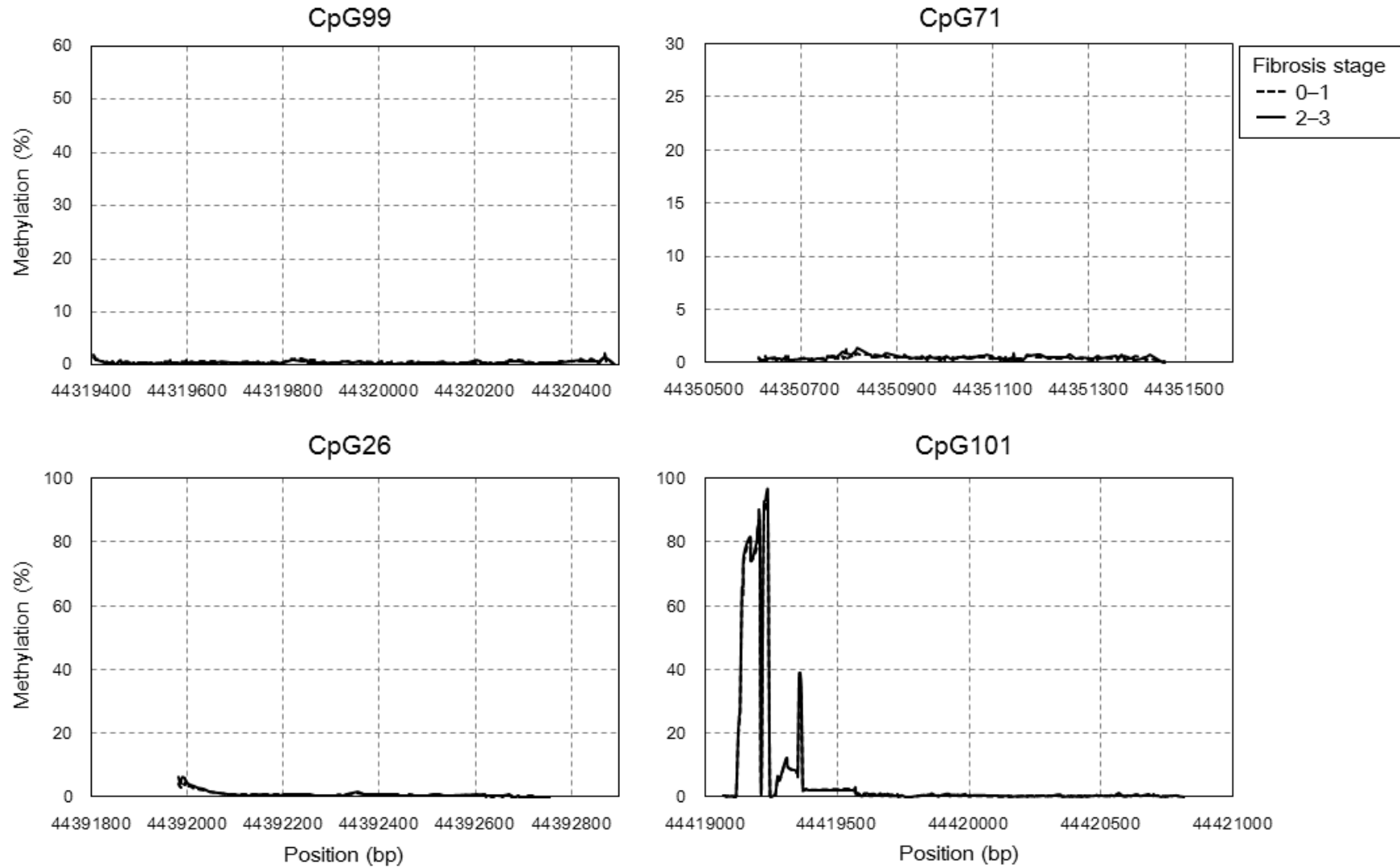
補足図 3 バイサルファイトシーケンスのカバレッジ



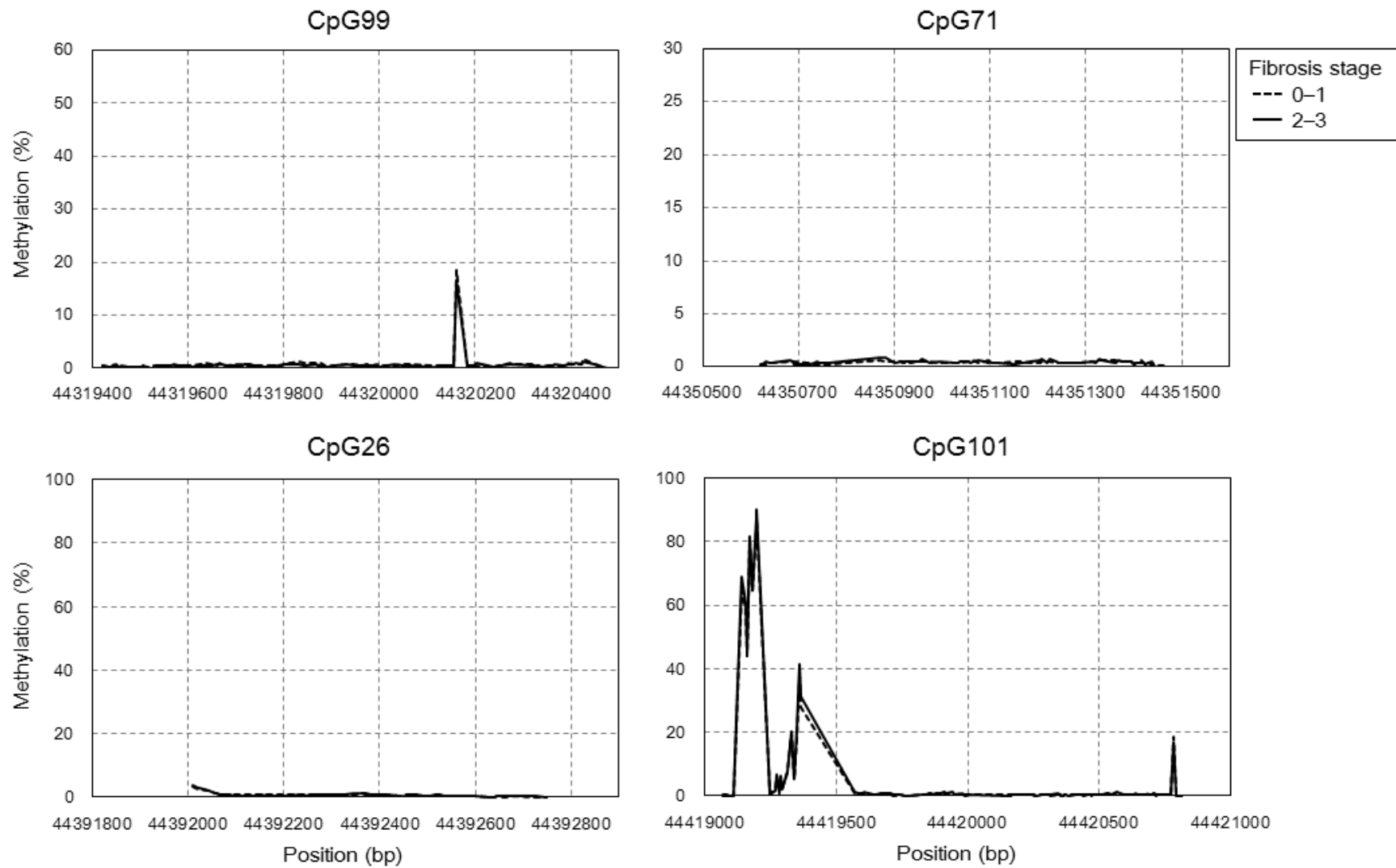
補足図 4A 肝臓 DNA における CHH サイトのメチル化レベル



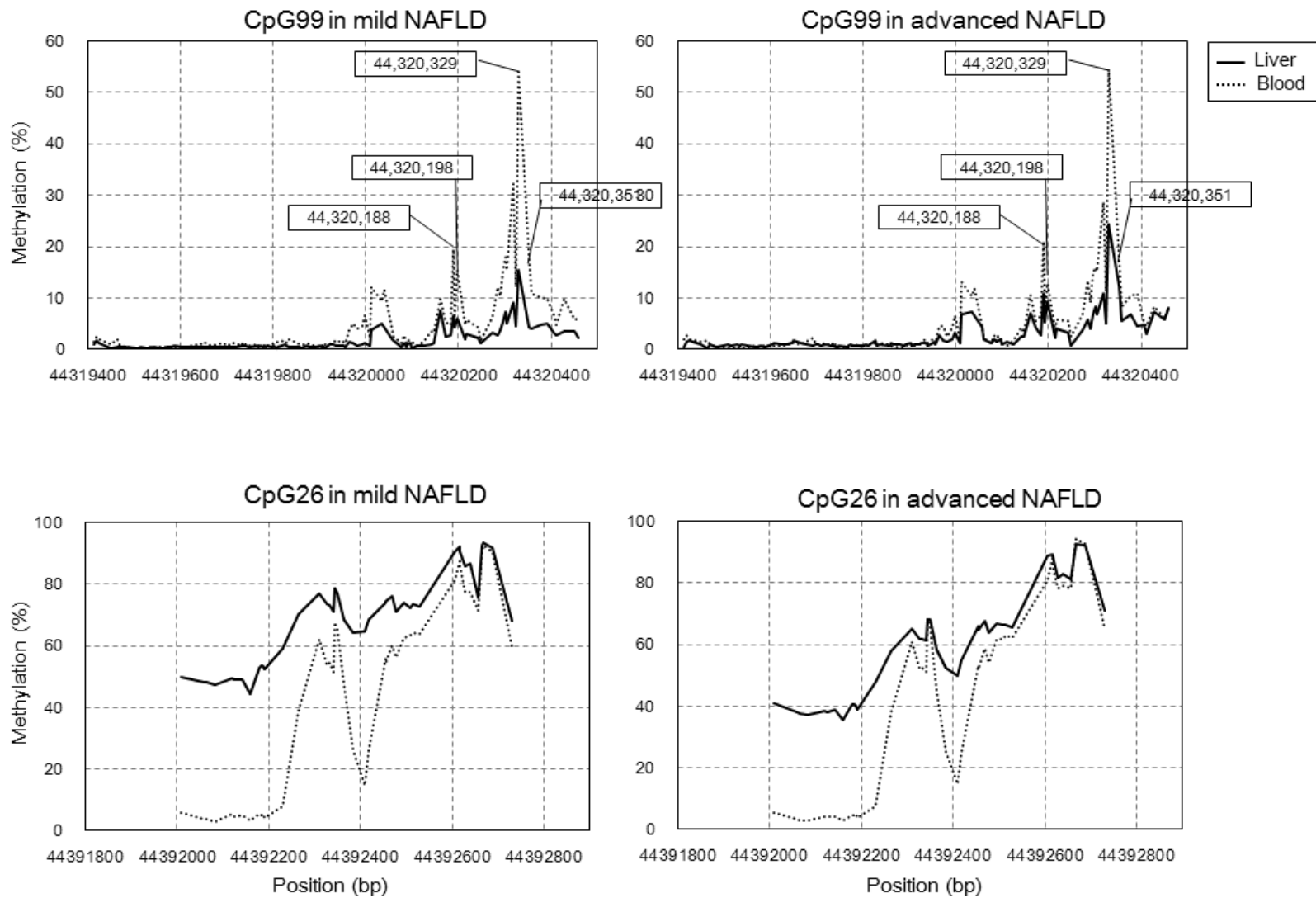
補足図 4B 肝臓 DNA における CHG サイトのメチル化レベル



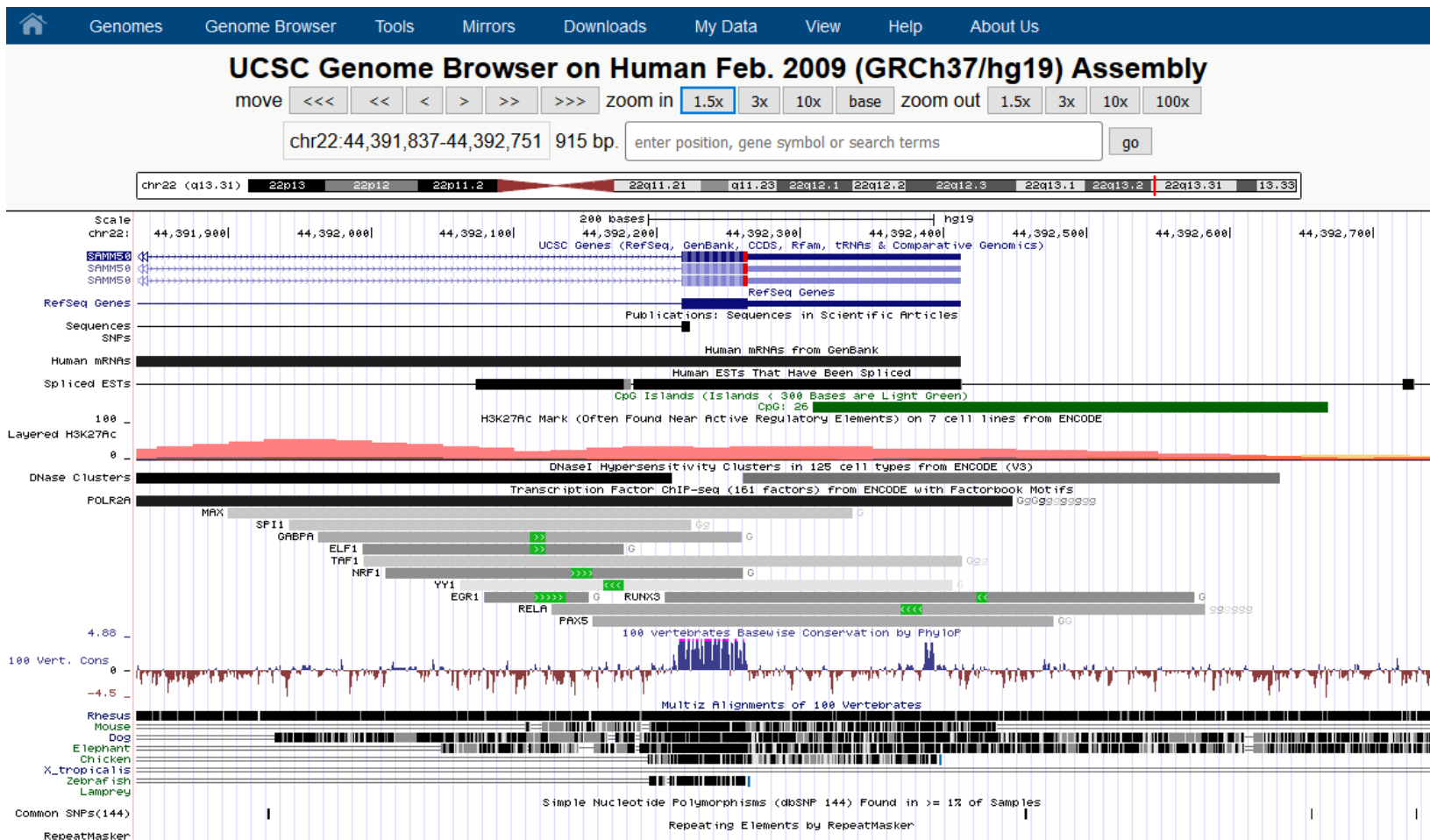
補足図 4C 血液 DNA における CHH サイトのメチル化レベル



補足図 4D 血液 DNA における CHG サイトのメチル化レベル



補足図 5 NAFLD 症例 (1st セット) の CpG99 と CpG26 における肝臓 DNA と血液 DNA のメチル化レベル



補足図 6 CpG26 に結合する転写因子 (UCSC Genome Browser : <https://genome.ucsc.edu/>)

補足表 1 ターゲトリシークエンスに用いたプライマーの配列と、増幅産物長、PCR の伸長時間

PCR amplicon	Forward Primer	Sequence	Reverse Primer	Sequence	Length (bp)	Extension time (min)
1	F09	TCAGCCCAGGTATTCACCTAAGGCCT	R07	AGACCCTGTCGGAGGAACTTGCTTA	5058	5
2	F12	TCCTGCACCTGATAGCATTAAAGGCC	R15	CATGCCTAAGGCGCTCCTACTTATC	9209	8
3	F20	AGCTCGACCTCTTGTGACCCTTAGT	R22	ACCCCGGAGACTGTGACTCAGTACA	10323	8
4	F26	ACTGGTGACATGGCTTCCAGATATG	R26	AACCATGCCATGGCAATCAGCGATC	8696	5
5	F30	TAGGAGACCATGGGACGTATTTTCT	R30	GAAGCCCATCCAAATGCAGGGGATA	8470	5
6	F34	CAGACCTTCGAGCAGGAACCTGATA	R33	ACATCTCCCTAGTGGTGTATGGAAG	7698	5
7	F38	ATGCTTTCGAGTCCATTTTGTGAGC	R39	GACATCTAGACGCATCTGGGCAACT	8752	5
8	F43	CCGTGTCCTCATTCCAGTATTGGAG	R46	AGTGAGACGCGAGCCTTCTAGACTT	13629	8
9	F51	CCACCAGTCTAACACATGTATGCTG	R52	GCAACAGTCACCATCATGATCGTCC	12494	8
10	F57	TGAGAAGGCGTGGCTCATTCTGGAT	R60	TCCACGGTTCACTACGCAAACCTGA	12698	8
11	add_F03	TTCCATGAACACAGCGGCAATTCAG	add_R02	GGTTCAGCTTCGGAATGAAAGAGTT	5979	5
12	add_F04	CCAAGTGTAGTGCAGGAATCTGACG	add_R03	TTGAAACATGCCAGGACCTCTTAGG	5750	5
13	add_F05	AATGTAAGCTCCGCAGAGGAGGTCT	add_R04	GGATGATGTGTTATTGAAGTGGCCT	6390	8
14	add_F06	GCCTGGCTCGGTGTAACCTTCTATTG	add_R06	TTGTCCCTACCCACGGGAAGCTTAG	9956	8
15	add_F08	AAGGGCATTGATCCTTGTTCAGG	add_R07	CTCCCGTAGCACATCAGCCTTAATC	4746	5
16	add_F09	AAATGCACCAAGAATTCCGGTAGCA	add_R09	AATTCTCGGTTGCTGGTTTAGAGCT	3783	5

補足表 2 Miseq によるターゲットリシーケンスで見出した NAFLD 症例の遺伝子多型と頻度

Chr.	Position (build37.2)	dbSNP ID	Reference allele	Variation	Frequency of variation	
					Sequencing (n = 28)	Typing (n = 540)
22	44,321,410	rs58002102	G	T	0.04	N.D.
22	44,322,401	rs190928670	C	T	0.02	N.D.
22	44,322,586	rs5845621	CTAA	C	0.21	0.39
22	44,322,665	rs141460550	G	C	0.04	N.D.
22	44,322,843	rs147412464	T	C	0.04	N.D.
22	44,322,862	rs200528261	C	T	0.02	N.D.
22	44,322,922	rs2076213	T	G	0.02	N.D.
22	44,322,970	rs2076212	G	T	0.09	0.10
22	44,323,074	rs139047	G	A	0.54	0.44
22	44,323,219	rs9625961	A	G	0.09	0.16
22	44,323,294	rs139663621	C	T	0.07	N.S.
22	44,323,955	rs738407	T	C	0.75	0.71
22	44,324,104	rs734561	C	T	0.48	0.40
22	44,324,171	rs738410	C	T	0.05	N.D.
22	44,324,181	rs2006943	G	A	0.63	0.56
22	44,324,676	rs139051	A	G	0.07	0.22
22	44,324,727	rs738409	C	G	0.68	0.60
22	44,324,730	rs738408	C	T	0.68	0.60
22	44,324,855	rs3747207	G	A	0.68	0.60
22	44,325,516	rs12485100	G	T	0.68	N.S.
22	44,325,565	rs12484801	C	T	0.68	N.S.
22	44,325,631	rs12484809	C	T	0.68	N.S.
22	44,325,748	rs6006585	A	G	0.07	N.S.
22	44,325,996	rs12483959	G	A	0.68	0.60
22	44,326,204	rs117414666	C	T	0.05	N.D.
22	44,326,272	rs9625962	T	C	0.68	0.60
22	44,326,700	rs11090617	C	T	0.68	0.59
22	44,327,012	rs139052	C	A	0.68	0.73
22	44,327,067	rs77236970	T	C	0.07	0.04
22	44,327,179	rs16991158	G	A	0.68	0.60
22	44,327,192	rs36055245	A	G	0.68	0.60
22	44,327,273	rs12484700	A	G	0.68	0.60
22	44,328,043	rs1883350	T	C	0.68	0.63
22	44,328,730	rs4823173	G	A	0.68	0.59

22	44,329,078	rs2076211	C	T	0.68	0.59
22	44,329,275	rs2294433	G	A	0.68	0.59
22	44,330,031	rs1977080	C	T	0.68	0.59
22	44,330,128	rs1977081	T	C	0.68	0.59
22	44,330,213	rs12484466	A	G	0.43	0.60
22	44,330,684	rs59312329	C	T	0.11	0.05
22	44,331,060	rs2076208	G	C	0.68	0.77
22	44,331,187	rs117377334	T	A	0.02	N.D.
22	44,331,513	rs1997693	C	G	0.68	0.59
22	44,331,778	rs13056638	C	G	0.68	0.59
22	44,331,815	rs1883348	C	G	0.68	0.59
22	44,331,943	rs1883349	G	A	0.68	0.59
22	44,332,477	rs2281138	T	C	0.68	0.59
22	44,332,493	rs2281137	T	C	0.68	0.59
22	44,332,570	rs2281135	G	A	0.68	0.59
22	44,332,653	rs2072907	C	G	0.68	0.59
22	44,332,685	rs4823175	A	T	1.00	N.D.
22	44,332,878	rs34879941	C	T	0.68	0.59
22	44,332,888	rs71218095	T	TC	0.68	0.59
22	44,333,172	rs2072906	A	G	0.68	0.59
22	44,333,370	rs2076207	A	G	0.68	0.59
22	44,333,479	rs2072905	C	G	0.68	0.59
22	44,333,694	rs2896019	T	G	0.68	0.60
22	44,333,945	rs2401512	C	G	0.68	0.59
22	44,333,968	rs2896020	T	C	0.68	0.59
22	44,334,476	rs4823176	T	C	0.68	0.59
22	44,334,486	rs4823177	T	C	0.68	N.S.
22	44,334,529	rs4823178	T	C	0.70	N.S.
22	44,334,842	rs2281293	T	C	0.68	0.59
22	44,335,331	rs16991175	T	C	0.68	0.59
22	44,335,406	rs35621602	C	A	0.68	0.59
22	44,335,416	rs34352134	C	T	0.68	0.59
22	44,335,421	rs145772939	G	A	0.07	0.08
22	44,335,453	rs34376930	G	T	0.68	0.59
22	44,335,670	rs35514853	TGG	T	1.00	N.D.
22	44,335,744	rs2073081	T	C	0.68	0.59
22	44,336,098	rs1010023	T	C	0.68	0.59
22	44,336,238	rs191860130	T	C	0.02	N.D.
22	44,336,310	rs1010022	A	G	0.68	0.59

22	44,336,496	rs8142145	T	C	0.68	0.59
22	44,336,562	rs137991731	G	A	0.02	N.D.
22	44,336,957	rs73176497	G	A	0.68	0.59
22	44,337,174	ss831884188	C	T	0.04	N.D.
22	44,337,184	rs5764416	T	G	0.16	0.31
22	44,337,189	rs78023701	T	C	0.16	0.31
22	44,337,533	rs926633	G	A	0.68	0.59
22	44,338,134	rs3810622	T	C	0.32	0.30
22	44,339,526	rs13056555	C	G	0.68	0.59
22	44,340,086	rs36069781	C	T	0.68	N.S.
22	44,340,904	rs2294915	C	T	0.68	0.60
22	44,340,922	rs2294916	T	G	0.68	0.59
22	44,341,141	rs117089907	C	T	0.02	N.D.
22	44,341,193	rs4823179	T	C	0.68	0.60
22	44,341,298	rs4823180	G	A	0.68	0.60
22	44,341,606	rs4823181	T	C	0.68	0.60
22	44,341,666	rs13055900	A	G	0.68	0.60
22	44,341,672	rs13055874	T	C	0.68	0.59
22	44,341,986	rs2294917	T	C	0.32	0.29
22	44,342,116	rs2294918	A	G	1.00	N.D.
22	44,342,325	rs2294919	C	T	0.32	0.27
22	44,342,969	rs2008451	T	C	0.68	0.60
22	44,343,151	rs1810508	A	G	0.68	0.60
22	44,343,626	rs12484795	A	C	0.68	0.59
22	44,345,771	rs13054885	G	A	0.68	0.54
22	44,345,926	rs28550680	C	T	0.32	N.S.
22	44,345,952	rs142354757	AAAAAAAT	A	0.32	N.S.
22	44,346,079	rs11705659	A	G	1.00	N.D.
22	44,346,128	rs11704562	C	T	0.32	N.S.
22	44,346,639	rs7289329	T	G	0.32	0.26
22	44,346,925	ss831884189	G	A	0.05	N.D.
22	44,346,965	rs5764043	G	A	0.32	0.26
22	44,347,137	rs5764044	C	G	0.32	0.26
22	44,347,250	rs5764045	C	T	0.32	0.25
22	44,347,251	rs2092501	G	A	0.68	0.55
22	44,347,355	rs2092502	G	C	1.00	N.D.
22	44,347,433	rs9614293	G	T	0.32	0.26
22	44,347,695	rs149404964	A	G	0.09	0.02
22	44,348,116	rs11912828	G	A	0.32	0.27

22	44,348,446	rs34912062	G	T	0.68	0.54
22	44,348,695	ss831884190	T	A	0.05	N.D.
22	44,348,803	rs5764421	T	A	1.00	N.D.
22	44,349,215	rs1474744	T	C	1.00	N.D.
22	44,349,236	rs1474745	T	C	0.68	0.54
22	44,349,309	rs146333519	T	C	0.11	0.04
22	44,349,908	rs184956348	G	T	0.02	N.D.
22	44,350,417	rs1474746	C	G	1.00	N.D.
22	44,354,111	rs738491	C	T	0.68	0.62
22	44,354,398	rs1807589	A	G	1.00	N.D.
22	44,354,865	rs11705218	A	G	0.32	0.27
22	44,354,882	rs5764425	G	T	1.00	N.D.
22	44,355,230	rs6006591	A	G	1.00	N.D.
22	44,355,569	rs2401513	C	T	0.32	N.S.
22	44,356,349	rs2064361	C	G	0.32	0.27
22	44,356,468	rs56373884	G	A	0.68	0.54
22	44,356,566	rs9614294	G	A	0.32	0.27
22	44,357,174	rs201208438	CT	C	0.02	N.D.
22	44,357,894	rs56219234	G	T	0.68	0.62
22	44,357,900	rs2896021	G	A	1.00	N.D.
22	44,358,812	rs5764047	G	A	0.32	0.26
22	44,358,997	rs16991236	A	G	0.63	0.46
22	44,360,007	rs2073082	G	A	0.32	0.26
22	44,360,010	rs2073083	C	A	0.32	0.26
22	44,361,497	rs5764430	C	A	0.32	0.26
22	44,361,713	rs12165526	T	A	0.16	0.08
22	44,361,842	rs2294921	C	T	0.68	0.54
22	44,361,941	ss831884191	G	T	0.04	N.D.
22	44,362,532	rs5764431	G	A	1.00	N.D.
22	44,362,623	rs144144339	G	A	0.07	0.04
22	44,362,815	rs9614300	C	T	0.32	0.26
22	44,363,619	rs79227988	T	TC	1.00	N.D.
22	44,363,939	rs3788603	T	A	0.32	0.27
22	44,364,256	rs201102948	G	A	0.02	N.D.
22	44,364,594	rs5764434	C	T	1.00	N.D.
22	44,364,794	rs2273031	T	C	1.00	N.D.
22	44,365,232	rs6006594	G	C	1.00	N.D.
22	44,365,742	rs6006465	G	A	1.00	N.D.
22	44,366,809	rs2235771	A	G	1.00	N.D.

22	44,367,597	rs67877195	G	GT	0.13	N.D.
22	44,368,122	rs3761472	A	G	0.68	0.54
22	44,368,204	rs3177036	A	G	1.00	N.D.
22	44,368,741	rs932430	C	T	0.32	0.89
22	44,369,291	rs117177740	G	A	0.09	0.03
22	44,369,329	rs2235772	C	T	0.68	0.62
22	44,369,429	rs6006466	C	T	1.00	N.D.
22	44,370,175	rs2235773	C	T	0.32	0.26
22	44,370,336	rs738492	T	G	1.00	N.D.
22	44,370,337	rs77225204	T	C	1.00	N.D.
22	44,370,615	rs738495	T	C	1.00	N.D.
22	44,371,243	rs4823106	A	G	1.00	N.D.
22	44,371,312	rs2281294	G	A	1.00	N.D.
22	44,371,406	rs61473277	A	G	0.68	0.54
22	44,371,725	rs5764442	C	G	1.00	N.D.
22	44,372,069	rs2073084	G	A	0.68	0.62
22	44,372,190	rs2073085	C	T	0.68	0.62
22	44,372,331	rs2073086	C	T	0.68	0.62
22	44,372,632	rs14315	C	T	0.68	0.62
22	44,373,579	rs2073088	G	A	0.32	0.27
22	44,374,195	rs2281295	G	T	0.32	N.S.
22	44,374,267	rs5764048	A	G	1.00	N.D.
22	44,374,584	rs34233580	A	T	1.00	N.D.
22	44,375,244	rs6519823	C	T	1.00	N.D.
22	44,375,247	rs2235774	A	C	1.00	N.D.
22	44,375,275	rs2235775	C	A	0.68	0.62
22	44,375,507	rs8142910	T	C	1.00	N.D.
22	44,375,742	rs11090620	C	T	0.68	0.62
22	44,376,335	rs67450864	C	T	0.68	0.62
22	44,377,035	rs146481554	G	A	0.02	N.D.
22	44,377,442	rs4823182	A	G	0.68	N.S.
22	44,377,999	rs2235776	C	T	0.68	0.54
22	44,378,368	rs117721198	C	T	0.05	N.D.
22	44,378,672	rs4823183	C	A	0.68	0.54
22	44,378,809	rs2235777	C	T	0.68	0.54
22	44,379,565	rs2294922	G	C	0.68	0.54
22	44,379,740	rs2294923	C	A	0.68	0.54
22	44,379,822	rs10452	T	C	1.00	N.D.
22	44,379,838	rs8418	A	G	1.00	N.D.

22	44,380,009	rs9626079	A	G	0.68	0.54
22	44,380,170	rs71313378	G	GCTTC	0.68	0.54
22	44,380,767	rs12167845	T	C	0.68	0.54
22	44,381,223	rs4823107	G	C	1.00	N.D.
22	44,381,340	rs4823108	T	C	0.68	0.54
22	44,381,482	rs4823109	C	T	0.68	N.S.
22	44,381,545	rs736082	C	T	1.00	N.D.
22	44,381,944	rs140963094	ATGGAGTCTTGCTC	A	0.66	0.62
22	44,382,004	rs6006599	C	A	0.68	0.62
22	44,382,533	rs2294926	C	T	0.68	0.62
22	44,382,684	rs2294927	T	C	0.68	0.62
22	44,383,400	rs6006602	C	T	0.68	0.62
22	44,383,432	rs6006468	G	C	0.68	0.62
22	44,383,617	rs6006469	C	G	0.68	0.62
22	44,383,673	rs142690680	A	T	0.05	N.D.
22	44,385,594	rs2073079	A	G	0.68	N.S.
22	44,386,281	rs7587	C	T	0.32	0.25
22	44,387,108	rs1986095	A	G	0.68	0.62
22	44,387,932	rs10656207	C	CTA	0.68	0.62
22	44,387,996	rs6006470	G	C	1.00	N.D.
22	44,388,208	rs6006471	C	T	1.00	N.D.
22	44,388,337	rs5764451	G	A	0.32	0.25
22	44,388,417	rs3788604	A	G	0.68	0.62
22	44,388,817	rs3827385	T	C	0.68	0.54
22	44,389,514	rs2235778	T	C	0.68	0.62
22	44,390,236	rs5764053	T	C	1.00	N.D.
22	44,390,366	rs2235779	A	G	1.00	N.D.
22	44,390,547	rs2281296	G	A	0.32	0.25
22	44,390,568	rs2281297	C	T	0.68	0.62
22	44,391,025	rs5764055	T	C	1.00	N.D.
22	44,391,234	rs2281298	G	A	0.68	0.54
22	44,391,588	rs2179642	T	C	0.68	0.62
22	44,391,686	rs2143571	G	A	0.68	0.54
22	44,393,075	rs6006473	C	T	0.68	0.62
22	44,393,241	rs6006474	C	T	0.68	0.62
22	44,394,019	rs2401514	T	A	0.68	0.54
22	44,394,402	rs2073080	C	T	0.68	0.54
22	44,395,389	rs2281292	A	C	0.68	0.62
22	44,395,451	rs1007863	T	C	0.68	0.62

22	44,396,144	rs190109984	G	A	0.02	N.D.
22	44,396,533	rs75848795	G	A	0.05	N.D.
22	44,397,887	rs3083324	GTTTCCCTCC	G	1.00	N.D.
22	44,398,201	rs738496	G	C	1.00	N.D.
22	44,398,524	rs5764455	A	G	0.32	0.49
22	44,398,797	rs117469470	C	G	0.09	0.08
22	44,399,761	rs6006610	A	G	0.32	0.39
22	44,400,698	rs6006611	G	A	0.32	0.35
22	44,401,022	rs4823184	C	T	0.52	0.44
22	44,401,124	rs9626087	C	T	0.68	0.48
22	44,401,191	rs8137707	C	T	0.14	0.13
22	44,401,232	rs8141269	G	A	0.80	0.84
22	44,401,282	rs117448761	C	T	0.09	0.02
22	44,401,820	rs8138668	C	T	0.02	N.D.
22	44,402,167	rs76409096	T	TA	0.63	0.54
22	44,404,484	rs16991328	A	G	0.16	0.15
22	44,404,522	rs9614308	A	G	0.77	0.85
22	44,405,213	rs117094531	G	C	0.02	N.D.
22	44,405,614	rs9614309	A	C	0.20	N.S.
22	44,408,241	rs4823185	T	C	0.80	0.74
22	44,408,627	rs34505405	CT	C	0.80	0.74
22	44,408,935	rs35222770	C	G	0.80	N.S.
22	44,409,176	rs16991341	G	A	0.63	0.50
22	44,409,575	rs6006618	C	T	0.63	0.52
22	44,409,993	rs12484530	G	A	0.52	0.34
22	44,410,126	rs149620106	T	G	0.02	N.D.
22	44,410,131	rs9625971	T	C	0.02	N.D.
22	44,410,173	rs5764058	A	G	0.91	N.S.
22	44,411,486	rs140454231	G	A	0.02	N.D.
22	44,411,910	rs9614313	C	T	0.79	0.74
22	44,412,178	rs140178505	G	A	0.07	0.02
22	44,412,182	rs2401515	T	C	0.48	0.47
22	44,412,190	rs7289219	A	T	0.23	0.28
22	44,412,192	rs2401516	G	A	0.54	0.47
22	44,412,209	rs2401517	T	C	0.80	0.77
22	44,412,227	rs2401518	C	T	0.79	0.76
22	44,412,228	rs2401519	A	G	0.80	0.77
22	44,412,256	rs9614314	A	G	0.04	N.D.
22	44,412,635	rs114704228	T	C	0.09	N.S.

22	44,412,706	rs151015821	A	C	0.02	N.D.
22	44,412,952	rs12167483	G	A	0.05	N.D.
22	44,413,270	rs78788310	A	G	0.05	N.D.
22	44,414,326	rs9626091	G	A	0.54	0.53
22	44,414,782	rs10714888	GT	G	0.27	N.S.
22	44,415,325	rs9614315	G	C	0.27	0.18
22	44,415,523	rs5764466	A	G	1.00	N.D.
22	44,416,110	rs147596539	A	C	0.04	N.D.
22	44,416,361	rs6006477	A	C	0.41	0.28
22	44,416,429	rs8142117	A	G	0.38	0.26
22	44,417,639	rs62226384	T	A	0.05	N.D.
22	44,417,927	rs74427758	A	G	0.11	0.16
22	44,417,970	rs135114	C	T	0.20	0.14
22	44,418,039	rs7289308	G	A	0.05	N.D.
22	44,418,139	rs139746146	C	T	0.05	N.D.
22	44,418,321	rs130415	C	T	0.34	N.D.
22	44,418,400	rs117826218	C	T	0.07	N.D.
22	44,418,444	rs5764467	A	G	0.36	N.D.
22	44,418,447	rs5764468	T	C	0.14	N.D.
22	44,418,502	rs77879449	A	T	0.02	N.D.
22	44,418,627	rs56956306	AT	A	0.09	N.D.
22	44,419,010	rs5764060	G	C	0.64	N.D.
22	44,419,039	rs113509766	C	T	0.25	N.D.
22	44,419,185	rs147560545	G	T	0.09	N.D.
22	44,419,407	rs6006621	T	C	0.18	N.D.
22	44,419,871	rs7285340	T	C	0.55	N.D.
22	44,420,015	rs35928604	G	C	0.39	N.D.
22	44,420,049	rs7290527	G	C	1.00	N.D.
22	44,420,118	rs111806469	C	G	1.00	N.D.
22	44,420,156	rs112388263	T	A	1.00	N.D.
22	44,420,498	rs112385337	A	G	0.55	N.D.
22	44,420,502	rs111826791	A	C	0.09	N.D.
22	44,420,859	rs9941915	A	T	0.04	N.D.
22	44,420,897	rs74548230	C	T	0.09	N.D.
22	44,421,425	rs2267591	G	A	0.09	N.D.
22	44,421,563	rs2267592	G	T	0.66	N.D.
22	44,421,603	rs139003197	T	TTCTC	0.21	N.D.
22	44,422,058	rs146844123	C	T	0.02	N.D.
22	44,422,076	rs117577313	A	G	0.07	N.D.

22	44,422,333	rs12170546	T	C	0.20	N.D.
22	44,422,501	rs80029111	C	T	0.11	N.D.
22	44,422,567	rs78095343	G	C	0.04	N.D.
22	44,422,638	rs11914048	T	C	0.09	N.D.
22	44,422,729	rs135115	A	G	1.00	N.D.
22	44,422,912	rs9306472	T	C	0.20	N.D.
22	44,422,945	rs76180808	C	T	0.18	N.D.
22	44,422,986	rs130416	C	G	1.00	N.D.
22	44,423,098	rs73888819	T	C	0.04	N.D.
22	44,423,396	rs7288265	G	A	0.57	N.D.
22	44,423,890	rs138117859	C	T	0.02	N.D.
22	44,423,923	rs74279267	C	G	0.11	N.D.
22	44,424,108	rs6006622	C	T	0.66	N.D.
22	44,424,191	rs13057162	T	G	0.11	N.D.
22	44,424,192	rs79270758	G	T	0.55	N.D.
22	44,424,423	rs5764472	A	G	0.55	N.D.
22	44,424,649	rs5764473	T	C	0.20	N.D.
22	44,424,829	rs79967345	A	G	0.04	N.D.
22	44,425,427	rs7292997	A	G	0.66	N.D.
22	44,425,647	rs184382968	G	A	0.02	N.D.
22	44,425,678	rs149903880	T	G	0.11	N.D.
22	44,425,761	rs79578076	G	C	0.04	N.D.

SNPs in bold were successfully genotyped. N.D.; Invader probe was not designed; N.S., genotyping was not successful.

補足表 3 169 箇所 の 遺 伝 子 多 型 と NAFLD、NASH と の 関 連

SNP	Tested allele	Tested allele frequency				NAFLD vs. control		NASH vs. control		NASH vs. simple steatosis	
		Control (n=1012)	NAFLD (n=540)	NASH (n=488)	simple steatosis (n=52)	<i>P</i>	OR (95%CI)	<i>P</i>	OR (95%CI)	<i>P</i>	OR (95%CI)
rs5845621	C	0.37	0.39	0.39	0.38	0.53	1.07 (0.87 - 1.31)	0.46	1.09 (0.87 - 1.35)	0.63	1.12 (0.72 - 1.73)
rs2076212	T	0.10	0.10	0.10	0.12	0.43	1.14 (0.82 - 1.58)	0.71	1.07 (0.76 - 1.50)	0.83	0.93 (0.48 - 1.81)
rs139047	A	0.43	0.44	0.44	0.40	0.053	1.23 (1.00 - 1.51)	0.041	1.26 (1.01 - 1.56)	0.43	1.19 (0.77 - 1.83)
rs9625961	A	0.82	0.84	0.84	0.85	0.14	1.23 (0.94 - 1.61)	0.11	1.27 (0.95 - 1.68)	0.92	1.03 (0.57 - 1.85)
LD block 1											
rs738407	C	0.61	0.71	0.72	0.60	1.3×10⁻⁷	1.81 (1.45 - 2.26)	2.7×10⁻⁸	1.95 (1.54 - 2.47)	0.0016	1.99 (1.30 - 3.06)
rs734561	T	0.34	0.40	0.41	0.29	0.013	1.30 (1.06 - 1.59)	0.0019	1.40 (1.13 - 1.74)	0.0060	1.92 (1.21 - 3.06)
rs2006943	A	0.46	0.56	0.58	0.39	4.6×10⁻⁶	1.61 (1.31 - 1.97)	1.2×10⁻⁷	1.79 (1.44 - 2.23)	5.6×10⁻⁵	2.54 (1.62 - 4.00)
LD block 2											
rs139051	A	0.70	0.78	0.79	0.70	3.3×10⁻⁵	1.64 (1.30 - 2.08)	2.9×10⁻⁶	1.83 (1.42 - 2.35)	0.052	1.58 (1.00 - 2.50)
rs738409	G	0.45	0.60	0.62	0.46	1.1×10⁻¹²	2.13 (1.73 - 2.62)	1.1×10⁻¹³	2.32 (1.86 - 2.90)	6.7×10 ⁻⁴	2.05 (1.36 - 3.10)
rs738408	T	0.45	0.60	0.62	0.46	1.1×10⁻¹²	2.13 (1.73 - 2.62)	1.1×10⁻¹³	2.33 (1.86 - 2.91)	6.7×10 ⁻⁴	2.05 (1.36 - 3.10)
rs3747207	A	0.45	0.60	0.62	0.46	7.4×10⁻¹³	2.14 (1.74 - 2.63)	8.4×10⁻¹⁴	2.33 (1.87 - 2.91)	7.1×10 ⁻⁴	2.04 (1.35 - 3.09)
rs12483959	A	0.45	0.60	0.61	0.46	7.4×10⁻¹²	2.06 (1.68 - 2.54)	1.1×10⁻¹²	2.23 (1.79 - 2.79)	0.0012	1.97 (1.31 - 2.98)
rs9625962	C	0.45	0.60	0.61	0.46	9.8×10⁻¹²	2.05 (1.67 - 2.53)	1.4×10⁻¹²	2.23 (1.78 - 2.78)	0.0012	1.97 (1.31 - 2.98)
rs11090617	T	0.45	0.59	0.61	0.46	1.0×10⁻¹¹	2.05 (1.67 - 2.52)	1.5×10⁻¹²	2.22 (1.78 - 2.78)	0.0013	1.97 (1.30 - 2.97)
rs139052	A	0.61	0.73	0.74	0.64	3.4×10⁻¹⁰	2.05 (1.64 - 2.56)	6.1×10⁻¹⁰	2.11 (1.67 - 2.68)	0.0088	1.78 (1.16 - 2.74)
rs16991158	A	0.45	0.60	0.61	0.46	9.8×10⁻¹²	2.05 (1.67 - 2.53)	1.4×10⁻¹²	2.23 (1.78 - 2.78)	0.0012	1.97 (1.31 - 2.98)
rs36055245	G	0.45	0.60	0.61	0.46	7.1×10⁻¹²	2.06 (1.68 - 2.54)	9.3×10⁻¹³	2.24 (1.80 - 2.80)	0.0011	1.99 (1.32 - 3.00)

rs12484700	G	0.45	0.60	0.61	0.47	2.3×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.48)	4.8×10⁻¹²	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0021	1.90 (1.26 - 2.86)
rs1883350	C	0.50	0.63	0.65	0.50	2.0×10⁻¹¹	2.05 (1.66 - 2.53)	2.7×10⁻¹²	2.23 (1.78 - 2.79)	7.4×10 ⁻⁴	2.03 (1.35 - 3.07)
rs4823173	A	0.45	0.59	0.60	0.45	5.9×10⁻¹¹	1.99 (1.62 - 2.45)	8.1×10⁻¹²	2.15 (1.73 - 2.68)	0.0010	2.01 (1.33 - 3.05)
rs2076211	T	0.45	0.59	0.60	0.46	3.8×10⁻¹¹	2.00 (1.63 - 2.46)	6.9×10⁻¹²	2.16 (1.73 - 2.69)	0.0017	1.93 (1.28 - 2.91)
rs2294433	A	0.45	0.59	0.60	0.45	5.8×10⁻¹¹	1.99 (1.62 - 2.45)	8.0×10⁻¹²	2.15 (1.73 - 2.68)	0.0010	2.01 (1.33 - 3.05)
rs1977080	T	0.45	0.59	0.61	0.46	2.9×10⁻¹¹	2.01 (1.64 - 2.47)	5.3×10⁻¹²	2.16 (1.74 - 2.69)	0.0016	1.94 (1.29 - 2.92)
rs1977081	C	0.45	0.59	0.61	0.45	1.1×10⁻¹⁰	1.96 (1.60 - 2.41)	1.5×10⁻¹¹	2.12 (1.70 - 2.63)	8.6×10 ⁻⁴	2.02 (1.34 - 3.06)
rs12484466	G	0.45	0.60	0.61	0.47	3.9×10⁻¹¹	1.99 (1.62 - 2.44)	7.6×10⁻¹²	2.14 (1.72 - 2.67)	0.0024	1.88 (1.25 - 2.82)
rs2076208	C	0.66	0.77	0.77	0.68	9.3×10⁻⁹	1.94 (1.55 - 2.43)	1.5×10⁻⁸	2.01 (1.58 - 2.56)	0.010	1.79 (1.15 - 2.78)
rs1997693	G	0.45	0.59	0.60	0.45	4.2×10⁻¹¹	2.00 (1.63 - 2.45)	4.8×10⁻¹²	2.17 (1.74 - 2.69)	0.0011	2.00 (1.32 - 3.04)
rs13056638	G	0.44	0.59	0.60	0.46	9.6×10⁻¹²	2.04 (1.66 - 2.50)	2.1×10⁻¹²	2.19 (1.76 - 2.72)	0.0020	1.92 (1.27 - 2.89)
rs1883348	G	0.45	0.59	0.61	0.45	2.9×10⁻¹¹	2.01 (1.64 - 2.47)	3.8×10⁻¹²	2.17 (1.75 - 2.71)	8.7×10 ⁻⁴	2.02 (1.34 - 3.06)
rs1883349	A	0.45	0.59	0.60	0.46	2.9×10⁻¹¹	2.01 (1.63 - 2.46)	5.4×10⁻¹²	2.16 (1.73 - 2.69)	0.0015	1.94 (1.29 - 2.92)
rs2281138	C	0.45	0.59	0.61	0.46	2.2×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.48)	3.8×10⁻¹²	2.17 (1.75 - 2.71)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2281137	C	0.45	0.59	0.61	0.46	2.2×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.47)	3.8×10⁻¹²	2.17 (1.75 - 2.71)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2281135	A	0.45	0.59	0.61	0.46	2.2×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.48)	3.8×10⁻¹²	2.17 (1.75 - 2.71)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2072907	G	0.45	0.59	0.61	0.46	3.9×10⁻¹¹	2.00 (1.63 - 2.46)	7.1×10⁻¹²	2.16 (1.73 - 2.68)	0.0017	1.93 (1.28 - 2.91)
rs34879941	T	0.45	0.59	0.61	0.46	4.3×10⁻¹¹	1.99 (1.62 - 2.44)	7.3×10⁻¹²	2.15 (1.72 - 2.67)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs71218095	TC	0.45	0.59	0.61	0.46	2.3×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.47)	3.9×10⁻¹²	2.17 (1.75 - 2.70)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2072906	G	0.45	0.59	0.61	0.46	2.1×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.48)	3.6×10⁻¹²	2.18 (1.75 - 2.71)	0.0016	1.94 (1.29 - 2.94)
rs2076207	G	0.44	0.59	0.60	0.46	2.2×10⁻¹¹	2.01 (1.64 - 2.47)	3.9×10⁻¹²	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0015	1.94 (1.29 - 2.93)
rs2072905	G	0.45	0.59	0.61	0.46	2.2×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.47)	3.8×10⁻¹²	2.17 (1.75 - 2.71)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2896019	G	0.45	0.60	0.61	0.47	6.6×10⁻¹²	2.06 (1.68 - 2.53)	9.6×10⁻¹³	2.24 (1.79 - 2.79)	0.0018	1.92 (1.28 - 2.89)
rs2401512	G	0.45	0.59	0.61	0.46	2.7×10⁻¹¹	2.01 (1.64 - 2.47)	4.5×10⁻¹²	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)

rs2896020	C	0.45	0.59	0.61	0.45	4.5×10^{-11}	2.00 (1.62 - 2.45)	6.1×10^{-12}	2.16 (1.73 - 2.69)	8.9×10^{-4}	2.02 (1.33 - 3.06)
rs4823176	C	0.45	0.59	0.61	0.46	2.3×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	3.9×10^{-12}	2.17 (1.75 - 2.70)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2281293	C	0.45	0.59	0.61	0.45	4.1×10^{-11}	2.00 (1.63 - 2.46)	5.6×10^{-12}	2.16 (1.74 - 2.69)	8.6×10^{-4}	2.03 (1.34 - 3.07)
rs16991175	C	0.45	0.59	0.61	0.46	1.3×10^{-11}	2.04 (1.66 - 2.50)	2.2×10^{-12}	2.20 (1.76 - 2.74)	0.0014	1.95 (1.30 - 2.94)
rs35621602	A	0.45	0.59	0.61	0.45	1.4×10^{-11}	2.04 (1.66 - 2.50)	1.6×10^{-12}	2.21 (1.77 - 2.76)	6.9×10^{-4}	2.06 (1.36 - 3.12)
rs34352134	T	0.45	0.59	0.61	0.46	2.2×10^{-11}	2.02 (1.64 - 2.47)	3.8×10^{-12}	2.17 (1.75 - 2.71)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs34376930	T	0.45	0.59	0.61	0.46	2.2×10^{-11}	2.02 (1.64 - 2.47)	3.8×10^{-12}	2.17 (1.75 - 2.70)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs2073081	C	0.45	0.59	0.60	0.46	2.5×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.3×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0016	1.94 (1.29 - 2.92)
rs1010023	C	0.45	0.59	0.61	0.46	1.6×10^{-11}	2.03 (1.65 - 2.49)	2.6×10^{-12}	2.19 (1.76 - 2.73)	0.0013	1.96 (1.30 - 2.96)
rs1010022	G	0.45	0.59	0.61	0.46	2.0×10^{-11}	2.02 (1.65 - 2.48)	3.5×10^{-12}	2.18 (1.75 - 2.71)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs8142145	C	0.45	0.59	0.61	0.46	2.5×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.3×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs73176497	A	0.45	0.59	0.61	0.46	2.7×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.6×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0015	1.95 (1.29 - 2.93)
rs5764416	T	0.57	0.69	0.70	0.61	9.1×10^{-10}	1.95 (1.58 - 2.42)	1.6×10^{-9}	2.01 (1.60 - 2.52)	0.016	1.68 (1.10 - 2.55)
rs78023701	T	0.56	0.69	0.70	0.60	5.3×10^{-10}	1.98 (1.59 - 2.45)	9.2×10^{-10}	2.04 (1.62 - 2.56)	0.011	1.74 (1.14 - 2.65)
rs926633	A	0.45	0.59	0.61	0.46	4.7×10^{-11}	1.99 (1.62 - 2.44)	6.6×10^{-12}	2.16 (1.73 - 2.69)	0.0014	1.94 (1.29 - 2.92)
rs3810622	T	0.57	0.70	0.70	0.62	5.7×10^{-10}	1.97 (1.59 - 2.44)	1.2×10^{-9}	2.03 (1.61 - 2.55)	0.025	1.62 (1.06 - 2.46)
rs13056555	G	0.45	0.59	0.60	0.47	7.9×10^{-11}	1.98 (1.61 - 2.43)	1.7×10^{-11}	2.13 (1.71 - 2.65)	0.0033	1.85 (1.23 - 2.78)
rs2294915	T	0.45	0.60	0.61	0.47	2.5×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.7×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0025	1.88 (1.25 - 2.82)
rs2294916	G	0.45	0.59	0.61	0.47	2.7×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	5.1×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0025	1.88 (1.25 - 2.82)
rs4823179	C	0.45	0.60	0.61	0.48	2.1×10^{-11}	2.02 (1.64 - 2.48)	4.7×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0043	1.82 (1.21 - 2.74)
rs4823180	A	0.45	0.60	0.61	0.47	2.5×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.7×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0025	1.88 (1.25 - 2.82)
rs4823181	C	0.45	0.60	0.61	0.47	2.6×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.9×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0025	1.88 (1.25 - 2.82)
rs13055900	G	0.45	0.60	0.61	0.47	2.5×10^{-11}	2.01 (1.64 - 2.47)	4.8×10^{-12}	2.17 (1.74 - 2.70)	0.0025	1.88 (1.25 - 2.82)
rs13055874	C	0.45	0.59	0.61	0.46	3.4×10^{-11}	2.00 (1.63 - 2.46)	5.6×10^{-12}	2.16 (1.74 - 2.69)	0.0015	1.94 (1.29 - 2.91)

rs2294917	T	0.59	0.71	0.72	0.63	2.0×10⁻⁸	1.84 (1.49 - 2.28)	3.5×10⁻⁸	1.90 (1.51 - 2.38)	0.015	1.69 (1.11 - 2.57)
rs2294919	C	0.62	0.73	0.74	0.65	9.9×10⁻¹⁰	2.01 (1.61 - 2.52)	2.1×10⁻⁹	2.07 (1.63 - 2.62)	0.014	1.73 (1.12 - 2.67)
rs2008451	C	0.45	0.60	0.61	0.47	2.4×10⁻¹¹	2.02 (1.64 - 2.48)	4.0×10⁻¹²	2.18 (1.75 - 2.72)	0.0023	1.89 (1.26 - 2.84)
rs1810508	G	0.45	0.60	0.61	0.47	2.1×10⁻¹¹	2.02 (1.65 - 2.49)	3.6×10⁻¹²	2.18 (1.75 - 2.72)	0.0023	1.88 (1.25 - 2.83)
rs12484795	C	0.44	0.59	0.60	0.45	6.8×10⁻¹¹	1.98 (1.61 - 2.42)	6.1×10⁻¹²	2.15 (1.73 - 2.68)	0.0011	1.98 (1.31 - 2.97)
rs13054885	A	0.42	0.54	0.55	0.40	2.0×10⁻⁷	1.71 (1.40 - 2.09)	2.7×10⁻⁸	1.84 (1.48 - 2.27)	0.0018	1.97 (1.29 - 3.02)
LD block 3											
rs7289329	T	0.64	0.74	0.75	0.68	1.1×10⁻⁶	1.72 (1.38 - 2.14)	2.1×10⁻⁶	1.75 (1.39 - 2.20)	0.070	1.51 (0.97 - 2.37)
rs5764043	G	0.64	0.74	0.75	0.68	1.0×10⁻⁶	1.72 (1.39 - 2.14)	2.0×10⁻⁶	1.75 (1.39 - 2.20)	0.070	1.51 (0.97 - 2.37)
rs5764044	C	0.64	0.74	0.75	0.68	1.1×10⁻⁶	1.72 (1.38 - 2.14)	2.1×10⁻⁶	1.75 (1.39 - 2.20)	0.069	1.52 (0.97 - 2.38)
rs5764045	C	0.65	0.75	0.75	0.70	7.6×10⁻⁷	1.74 (1.40 - 2.16)	2.5×10⁻⁶	1.74 (1.38 - 2.19)	0.14	1.41 (0.90 - 2.22)
rs2092501	A	0.43	0.55	0.56	0.46	1.8×10⁻⁸	1.80 (1.47 - 2.21)	7.7×10⁻⁹	1.90 (1.53 - 2.36)	0.027	1.60 (1.06 - 2.42)
rs9614293	G	0.64	0.74	0.75	0.68	7.7×10⁻⁷	1.74 (1.40 - 2.16)	1.4×10⁻⁶	1.77 (1.40 - 2.23)	0.064	1.53 (0.98 - 2.40)
rs11912828	G	0.62	0.73	0.73	0.67	4.9×10⁻⁸	1.84 (1.48 - 2.29)	1.2×10⁻⁷	1.86 (1.48 - 2.35)	0.11	1.45 (0.92 - 2.27)
rs34912062	T	0.42	0.54	0.55	0.43	6.6×10⁻⁹	1.83 (1.49 - 2.25)	2.4×10⁻⁹	1.93 (1.56 - 2.40)	0.0074	1.78 (1.17 - 2.72)
rs1474745	C	0.41	0.54	0.55	0.43	1.3×10⁻⁸	1.81 (1.48 - 2.22)	2.5×10⁻⁹	1.93 (1.56 - 2.40)	0.0094	1.75 (1.15 - 2.66)
rs738491	T	0.49	0.62	0.63	0.51	1.5×10⁻⁸	1.81 (1.47 - 2.22)	4.2×10⁻⁹	1.92 (1.55 - 2.39)	0.0050	1.82 (1.20 - 2.78)
rs11705218	A	0.63	0.73	0.74	0.67	5.6×10⁻⁷	1.74 (1.40 - 2.17)	9.9×10⁻⁷	1.78 (1.41 - 2.23)	0.056	1.55 (0.99 - 2.44)
rs2064361	C	0.63	0.73	0.74	0.67	5.4×10⁻⁷	1.75 (1.40 - 2.17)	9.6×10⁻⁷	1.78 (1.41 - 2.24)	0.056	1.55 (0.99 - 2.44)
rs56373884	A	0.42	0.54	0.55	0.43	7.2×10⁻⁹	1.84 (1.50 - 2.26)	2.2×10⁻⁹	1.94 (1.56 - 2.42)	0.0089	1.76 (1.15 - 2.69)
rs9614294	G	0.64	0.73	0.74	0.67	6.4×10⁻⁷	1.74 (1.40 - 2.16)	1.1×10⁻⁶	1.77 (1.41 - 2.23)	0.056	1.55 (0.99 - 2.44)
rs56219234	T	0.50	0.62	0.63	0.51	9.9×10⁻⁹	1.82 (1.48 - 2.24)	2.5×10⁻⁹	1.95 (1.56 - 2.42)	0.0046	1.83 (1.20 - 2.79)
rs5764047	G	0.64	0.74	0.74	0.67	4.7×10⁻⁷	1.75 (1.41 - 2.18)	8.1×10⁻⁷	1.78 (1.42 - 2.25)	0.053	1.56 (0.99 - 2.45)
rs16991236	G	0.36	0.46	0.48	0.34	2.9×10⁻⁶	1.65 (1.34 - 2.03)	2.3×10⁻⁷	1.79 (1.44 - 2.23)	0.0026	1.99 (1.27 - 3.10)

rs2073082	G	0.63	0.74	0.74	0.67	3.4×10⁻⁷	1.77 (1.42 - 2.20)	5.8×10⁻⁷	1.80 (1.43 - 2.27)	0.052	1.56 (1.00 - 2.45)
rs2073083	C	0.64	0.74	0.74	0.67	4.8×10⁻⁷	1.75 (1.41 - 2.18)	8.2×10⁻⁷	1.78 (1.42 - 2.25)	0.053	1.56 (0.99 - 2.45)
rs5764430	C	0.64	0.74	0.74	0.68	4.8×10⁻⁷	1.75 (1.41 - 2.18)	8.7×10⁻⁷	1.78 (1.42 - 2.24)	0.065	1.53 (0.97 - 2.41)
rs2294921	T	0.42	0.54	0.55	0.44	7.1×10⁻⁹	1.83 (1.49 - 2.25)	3.1×10⁻⁹	1.93 (1.55 - 2.40)	0.016	1.67 (1.10 - 2.53)
rs9614300	C	0.64	0.74	0.74	0.67	4.5×10⁻⁷	1.75 (1.41 - 2.18)	7.8×10⁻⁷	1.79 (1.42 - 2.25)	0.053	1.56 (0.99 - 2.45)
rs3788603	T	0.63	0.73	0.74	0.67	7.3×10⁻⁷	1.73 (1.39 - 2.15)	1.3×10⁻⁶	1.76 (1.4 - 2.21)	0.062	1.53 (0.98 - 2.40)
rs3761472	G	0.42	0.54	0.55	0.45	7.2×10⁻⁹	1.84 (1.50 - 2.26)	2.8×10⁻⁹	1.94 (1.56 - 2.41)	0.021	1.64 (1.08 - 2.49)
rs932430	T	0.86	0.89	0.89	0.85	0.19	1.24 (0.90 - 1.69)	0.068	1.37 (0.98 - 1.92)	0.13	1.58 (0.87 - 2.87)
rs2235772	T	0.50	0.62	0.63	0.52	3.3×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.18)	9.9×10⁻⁹	1.89 (1.52 - 2.35)	0.013	1.70 (1.12 - 2.58)
rs2235773	C	0.64	0.74	0.74	0.67	4.7×10⁻⁷	1.75 (1.41 - 2.18)	8.1×10⁻⁷	1.79 (1.42 - 2.25)	0.053	1.56 (0.99 - 2.45)
rs61473277	G	0.42	0.54	0.55	0.45	1.0×10⁻⁸	1.82 (1.49 - 2.24)	4.1×10⁻⁹	1.92 (1.55 - 2.39)	0.023	1.62 (1.07 - 2.46)
rs2073084	A	0.50	0.62	0.63	0.52	2.7×10⁻⁸	1.79 (1.46 - 2.19)	7.3×10⁻⁹	1.91 (1.53 - 2.37)	0.0083	1.76 (1.16 - 2.68)
rs2073085	T	0.50	0.62	0.63	0.52	2.2×10⁻⁸	1.80 (1.46 - 2.20)	5.9×10⁻⁹	1.91 (1.54 - 2.38)	0.0078	1.77 (1.16 - 2.69)
rs2073086	T	0.50	0.62	0.63	0.52	2.7×10⁻⁸	1.79 (1.46 - 2.19)	7.3×10⁻⁹	1.91 (1.53 - 2.37)	0.0083	1.76 (1.16 - 2.68)
rs14315	T	0.50	0.62	0.63	0.52	3.1×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.19)	8.4×10⁻⁹	1.90 (1.53 - 2.37)	0.0085	1.76 (1.15 - 2.67)
rs2073088	G	0.64	0.73	0.74	0.67	6.1×10⁻⁷	1.74 (1.40 - 2.17)	1.1×10⁻⁶	1.77 (1.41 - 2.23)	0.057	1.55 (0.99 - 2.43)
rs2235775	A	0.50	0.62	0.63	0.52	3.1×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.19)	8.2×10⁻⁹	1.90 (1.53 - 2.36)	0.0083	1.76 (1.16 - 2.68)
rs11090620	T	0.50	0.62	0.63	0.52	2.3×10⁻⁸	1.80 (1.46 - 2.20)	5.9×10⁻⁹	1.92 (1.54 - 2.39)	0.0074	1.78 (1.17 - 2.72)
rs67450864	T	0.50	0.62	0.63	0.52	2.1×10⁻⁸	1.80 (1.46 - 2.21)	5.4×10⁻⁹	1.92 (1.54 - 2.39)	0.0074	1.78 (1.17 - 2.72)
rs2235776	T	0.42	0.54	0.55	0.45	8.8×10⁻⁹	1.83 (1.49 - 2.25)	3.5×10⁻⁹	1.93 (1.55 - 2.40)	0.023	1.62 (1.07 - 2.47)
rs4823183	A	0.42	0.54	0.55	0.45	8.7×10⁻⁹	1.83 (1.49 - 2.25)	3.4×10⁻⁹	1.93 (1.55 - 2.40)	0.023	1.62 (1.07 - 2.47)
rs2235777	T	0.42	0.54	0.55	0.45	9.9×10⁻⁹	1.83 (1.49 - 2.25)	3.9×10⁻⁹	1.93 (1.55 - 2.40)	0.023	1.62 (1.07 - 2.47)
rs2294922	C	0.42	0.54	0.55	0.45	7.5×10⁻⁹	1.84 (1.50 - 2.26)	2.9×10⁻⁹	1.94 (1.56 - 2.41)	0.021	1.64 (1.08 - 2.49)
rs2294923	A	0.42	0.54	0.55	0.45	8.3×10⁻⁹	1.84 (1.49 - 2.26)	3.3×10⁻⁹	1.94 (1.56 - 2.41)	0.022	1.63 (1.07 - 2.48)

rs9626079	G	0.42	0.54	0.55	0.45	4.6×10⁻⁹	1.85 (1.51 - 2.28)	1.7×10⁻⁹	1.96 (1.57 - 2.44)	0.020	1.64 (1.08 - 2.50)
rs71313378	GCTTC	0.42	0.54	0.55	0.45	8.1×10⁻⁹	1.84 (1.49 - 2.26)	3.1×10⁻⁹	1.94 (1.56 - 2.41)	0.021	1.64 (1.08 - 2.49)
rs12167845	C	0.42	0.54	0.55	0.45	1.7×10⁻⁹	1.90 (1.54 - 2.33)	5.7×10⁻¹⁰	2.01 (1.61 - 2.51)	0.016	1.68 (1.10 - 2.56)
rs4823108	C	0.42	0.54	0.55	0.45	5.6×10⁻⁹	1.85 (1.50 - 2.27)	2.0×10⁻⁹	1.95 (1.57 - 2.43)	0.020	1.64 (1.08 - 2.50)
rs140963094	A	0.50	0.62	0.63	0.53	2.2×10⁻⁸	1.80 (1.47 - 2.21)	8.5×10⁻⁹	1.91 (1.53 - 2.37)	0.011	1.73 (1.13 - 2.64)
rs6006599	A	0.50	0.62	0.63	0.52	3.8×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.19)	8.8×10⁻⁹	1.90 (1.53 - 2.37)	0.0066	1.79 (1.18 - 2.74)
rs2294926	T	0.50	0.62	0.64	0.51	2.9×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.19)	3.9×10⁻⁹	1.93 (1.55 - 2.40)	0.0034	1.87 (1.23 - 2.85)
rs2294927	C	0.50	0.62	0.63	0.51	4.8×10⁻⁸	1.77 (1.44 - 2.17)	6.5×10⁻⁹	1.91 (1.54 - 2.38)	0.0035	1.87 (1.23 - 2.84)
rs6006602	T	0.50	0.62	0.63	0.51	4.2×10⁻⁸	1.77 (1.44 - 2.17)	5.8×10⁻⁹	1.91 (1.54 - 2.38)	0.0034	1.87 (1.23 - 2.85)
rs6006468	C	0.50	0.62	0.63	0.51	4.1×10⁻⁸	1.77 (1.44 - 2.17)	5.6×10⁻⁹	1.92 (1.54 - 2.38)	0.0034	1.87 (1.23 - 2.85)
rs6006469	G	0.50	0.62	0.63	0.51	3.8×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.18)	5.1×10⁻⁹	1.92 (1.54 - 2.39)	0.0034	1.87 (1.23 - 2.85)
rs7587	C	0.65	0.75	0.76	0.68	1.3×10⁻⁸	1.93 (1.54 - 2.41)	1.0×10⁻⁸	2.01 (1.58 - 2.56)	0.014	1.77 (1.12 - 2.79)
rs1986095	G	0.50	0.62	0.64	0.51	1.8×10⁻⁸	1.80 (1.47 - 2.21)	2.4×10⁻⁹	1.95 (1.57 - 2.43)	0.0034	1.88 (1.23 - 2.86)
rs10656207	CTA	0.50	0.62	0.63	0.51	5.1×10⁻⁸	1.76 (1.44 - 2.16)	7.5×10⁻⁹	1.90 (1.53 - 2.37)	0.0036	1.86 (1.23 - 2.84)
rs5764451	G	0.65	0.75	0.76	0.68	1.2×10⁻⁸	1.93 (1.54 - 2.42)	9.4×10⁻⁹	2.02 (1.59 - 2.57)	0.014	1.77 (1.12 - 2.79)
rs3788604	G	0.50	0.62	0.63	0.51	3.3×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.19)	4.5×10⁻⁹	1.93 (1.55 - 2.40)	0.0034	1.87 (1.23 - 2.85)
rs3827385	C	0.42	0.54	0.55	0.43	3.2×10⁻⁸	1.78 (1.45 - 2.19)	4.7×10⁻⁹	1.92 (1.54 - 2.38)	0.0077	1.77 (1.16 - 2.69)
rs2235778	C	0.50	0.62	0.63	0.51	6.4×10⁻⁸	1.76 (1.43 - 2.15)	9.9×10⁻⁹	1.89 (1.52 - 2.35)	0.0040	1.86 (1.22 - 2.82)
rs2281296	G	0.64	0.75	0.76	0.68	1.4×10⁻⁸	1.92 (1.53 - 2.41)	1.2×10⁻⁸	2.00 (1.58 - 2.55)	0.018	1.73 (1.10 - 2.73)
rs2281297	T	0.50	0.62	0.63	0.51	1.4×10⁻⁷	1.73 (1.41 - 2.12)	2.3×10⁻⁸	1.86 (1.5 - 2.31)	0.0051	1.82 (1.20 - 2.77)
rs2281298	A	0.42	0.54	0.55	0.44	6.5×10⁻⁸	1.76 (1.43 - 2.16)	1.7×10⁻⁸	1.87 (1.5 - 2.32)	0.016	1.68 (1.10 - 2.55)
rs2179642	C	0.50	0.62	0.63	0.51	1.0×10⁻⁷	1.74 (1.42 - 2.13)	1.6×10⁻⁸	1.87 (1.51 - 2.33)	0.0046	1.84 (1.21 - 2.80)
rs2143571	A	0.42	0.54	0.55	0.44	9.3×10⁻⁸	1.75 (1.42 - 2.15)	2.5×10⁻⁸	1.86 (1.49 - 2.31)	0.017	1.67 (1.10 - 2.55)
rs6006473	T	0.50	0.62	0.63	0.51	1.0×10⁻⁷	1.74 (1.42 - 2.13)	1.7×10⁻⁸	1.87 (1.51 - 2.33)	0.0046	1.84 (1.21 - 2.80)

rs6006474	T	0.50	0.62	0.63	0.51	9.7×10⁻⁸	1.74 (1.42 - 2.13)	1.6×10⁻⁸	1.87 (1.51 - 2.33)	0.0046	1.84 (1.21 - 2.80)
rs2401514	A	0.42	0.54	0.55	0.44	6.7×10⁻⁸	1.76 (1.43 - 2.16)	1.8×10⁻⁸	1.87 (1.5 - 2.32)	0.016	1.68 (1.10 - 2.56)
rs2073080	T	0.42	0.54	0.55	0.44	6.7×10⁻⁸	1.76 (1.43 - 2.16)	1.8×10⁻⁸	1.87 (1.5 - 2.32)	0.016	1.68 (1.10 - 2.56)
rs2281292	C	0.50	0.62	0.63	0.51	5.9×10⁻⁸	1.76 (1.43 - 2.15)	8.4×10⁻⁹	1.9 (1.53 - 2.36)	0.0036	1.86 (1.23 - 2.84)
rs1007863	C	0.51	0.62	0.63	0.51	5.8×10⁻⁸	1.76 (1.43 - 2.15)	8.3×10⁻⁹	1.9 (1.53 - 2.36)	0.0036	1.86 (1.23 - 2.84)
LD block 4											
rs5764455	A	0.40	0.51	0.53	0.37	3.1×10⁻⁷	1.70 (1.39 - 2.08)	3.7×10⁻⁹	1.92 (1.55 - 2.38)	4.4×10 ⁻⁴	2.17 (1.41 - 3.34)
rs6006610	A	0.50	0.61	0.62	0.44	4.5×10⁻⁹	1.85 (1.50 - 2.26)	2.9×10⁻¹¹	2.11 (1.69 - 2.63)	6.1×10⁻⁵	2.37 (1.55 - 3.62)
rs6006611	G	0.54	0.65	0.67	0.47	2.3×10⁻⁸	1.80 (1.47 - 2.21)	1.2×10⁻¹⁰	2.09 (1.67 - 2.61)	7.1×10⁻⁶	2.68 (1.74 - 4.12)
rs4823184	T	0.37	0.45	0.46	0.30	0.0014	1.39 (1.14 - 1.70)	1.0×10⁻⁴	1.52 (1.23 - 1.88)	7.6×10 ⁻⁴	2.22 (1.40 - 3.53)
rs9626087	T	0.40	0.48	0.49	0.34	3.8×10⁻⁴	1.45 (1.18 - 1.78)	1.4×10⁻⁵	1.62 (1.31 - 2.02)	6.7×10 ⁻⁴	2.18 (1.39 - 3.42)
LD block 5											
rs8137707	C	0.81	0.88	0.88	0.83	5.2×10⁻⁵	1.82 (1.36 - 2.43)	3.4×10⁻⁵	1.92 (1.41 - 2.62)	0.039	1.83 (1.03 - 3.26)
rs8141269	A	0.82	0.84	0.84	0.84	0.24	1.17 (0.90 - 1.52)	0.26	1.17 (0.89 - 1.54)	0.75	1.10 (0.62 - 1.93)
rs76409096	TA	0.48	0.54	0.55	0.39	0.038	1.23 (1.01 - 1.50)	0.0043	1.35 (1.10 - 1.67)	0.0011	2.06 (1.34 - 3.19)
LD block 6											
rs16991328	A	0.81	0.85	0.86	0.84	0.0029	1.52 (1.15 - 2.00)	0.0039	1.53 (1.15 - 2.04)	0.41	1.26 (0.72 - 2.21)
rs9614308	G	0.82	0.85	0.85	0.83	0.11	1.24 (0.95 - 1.61)	0.10	1.26 (0.96 - 1.67)	0.40	1.27 (0.73 - 2.21)
rs4823185	C	0.72	0.74	0.74	0.72	0.71	1.04 (0.84 - 1.30)	0.58	1.07 (0.85 - 1.35)	0.63	1.12 (0.71 - 1.75)
rs34505405	G	0.72	0.74	0.74	0.72	0.67	1.05 (0.84 - 1.31)	0.54	1.08 (0.85 - 1.37)	0.65	1.11 (0.70 - 1.77)
rs16991341	A	0.43	0.50	0.51	0.36	0.0058	1.32 (1.08 - 1.61)	4.7×10 ⁻⁴	1.45 (1.18 - 1.79)	0.0014	2.04 (1.32 - 3.16)
rs6006618	T	0.46	0.52	0.54	0.38	0.0055	1.33 (1.09 - 1.62)	3.1×10 ⁻⁴	1.48 (1.20 - 1.83)	4.5×10 ⁻⁴	2.26 (1.43 - 3.56)
LD block 7											
rs12484530	A	0.32	0.34	0.35	0.23	0.18	1.16 (0.93 - 1.44)	0.038	1.27 (1.01 - 1.59)	0.0042	2.07 (1.26 - 3.40)

rs9614313	T	0.72	0.74	0.74	0.75	0.60	1.06 (0.85 - 1.33)	0.66	1.06 (0.83 - 1.34)	0.93	1.02 (0.62 - 1.69)
LD block 8											
rs2401515	C	0.43	0.47	0.48	0.38	0.067	1.20 (0.99 - 1.47)	0.035	1.25 (1.02 - 1.55)	0.013	1.75 (1.13 - 2.73)
rs7289219	A	0.69	0.72	0.73	0.64	0.027	1.28 (1.03 - 1.59)	0.011	1.35 (1.07 - 1.70)	0.023	1.67 (1.07 - 2.58)
rs2401516	A	0.42	0.47	0.48	0.40	0.029	1.25 (1.02 - 1.52)	0.016	1.29 (1.05 - 1.59)	0.040	1.58 (1.02 - 2.44)
rs2401517	C	0.75	0.77	0.77	0.77	0.92	1.01 (0.80 - 1.28)	0.99	1.00 (0.78 - 1.28)	0.86	1.05 (0.64 - 1.72)
rs2401518	T	0.74	0.76	0.76	0.77	0.68	1.05 (0.83 - 1.32)	0.77	1.04 (0.81 - 1.32)	0.90	1.03 (0.63 - 1.68)
rs2401519	A	0.25	0.23	0.23	0.23	0.89	1.02 (0.81 - 1.28)	0.82	1.03 (0.80 - 1.32)	0.79	0.93 (0.57 - 1.53)
rs9626091	A	0.52	0.53	0.53	0.54	0.58	1.06 (0.87 - 1.28)	0.44	1.08 (0.88 - 1.33)	0.74	0.93 (0.62 - 1.40)
LD block 9											
rs9614315	G	0.82	0.82	0.82	0.88	0.91	1.02 (0.78 - 1.32)	0.71	0.95 (0.72 - 1.25)	0.21	0.67 (0.36 - 1.25)
rs6006477	A	0.71	0.72	0.71	0.80	0.31	1.12 (0.90 - 1.40)	0.68	1.05 (0.83 - 1.32)	0.092	0.64 (0.38 - 1.08)
rs8142117	A	0.73	0.74	0.73	0.82	0.45	1.09 (0.87 - 1.37)	0.83	1.03 (0.81 - 1.30)	0.072	0.61 (0.35 - 1.05)
LD block 10											
rs74427758	G	0.16	0.16	0.16	0.19	0.15	1.21 (0.93 - 1.58)	0.15	1.23 (0.93 - 1.63)	0.34	0.77 (0.45 - 1.31)
rs135114	C	0.85	0.86	0.86	0.92	0.14	1.24 (0.93 - 1.65)	0.39	1.14 (0.85 - 1.53)	0.089	0.52 (0.25 - 1.11)

Numbers in bold indicate a P -value of $<3.0 \times 10^{-4}$.

補足表 4 169 箇所 の 遺 伝 子 多 型 と 組 織 学 的 表 現 型 や 生 化 学 的 形 質 と の 関 連

SNP	Tested allele	Tested allele Freq	Steatosis grade		Lobular inflammation		Hepatocyte ballooning		NAS		Fibrosis stage		AST		ALT	
			β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P
rs5845621	C	0.39	-	0.76	+	0.39	-	0.57	-	0.75	+	0.77	-	0.43	-	0.52
rs2076212	T	0.10	-	0.67	-	0.45	+	0.32	+	0.98	-	0.14	-	0.29	-	0.64
rs139047	A	0.44	-	0.58	-	0.81	+	0.34	+	0.98	+	0.17	+	0.63	+	0.70
rs9625961	A	0.84	-	0.11	+	0.16	-	0.29	-	0.52	+	0.61	-	0.50	-	0.76
LD block 1																
rs738407	C	0.71	+	0.063	+	0.016	+	0.0094	+	0.0018	+	0.0060	+	2.0×10^{-5}	+	8.9×10^{-6}
rs734561	T	0.40	+	0.20	+	0.013	+	0.012	+	0.0047	+	2.6×10^{-4}	+	0.011	+	0.22
rs2006943	A	0.56	+	0.19	+	0.0039	+	0.0033	+	0.0011	+	1.9×10^{-4}	+	3.4×10^{-5}	+	1.5×10^{-4}
LD block 2																
rs139051	A	0.78	+	0.024	+	0.024	+	0.32	+	0.013	+	0.11	+	8.5×10^{-5}	+	9.9×10^{-7}
rs738409	G	0.60	+	0.0010	+	6.0×10^{-4}	+	0.0021	+	7.2×10^{-6}	+	0.0020	+	7.6×10^{-9}	+	5.8×10^{-10}
rs738408	T	0.60	+	0.0011	+	6.3×10^{-4}	+	0.0021	+	7.6×10^{-6}	+	0.0019	+	5.6×10^{-9}	+	4.8×10^{-10}
rs3747207	A	0.60	+	0.0011	+	6.1×10^{-4}	+	0.0020	+	7.4×10^{-6}	+	0.0012	+	4.0×10^{-9}	+	2.2×10^{-10}
rs12483959	A	0.60	+	4.3×10^{-4}	+	9.8×10^{-4}	+	0.0021	+	6.0×10^{-6}	+	0.0038	+	7.9×10^{-9}	+	5.1×10^{-10}
rs9625962	C	0.60	+	4.2×10^{-4}	+	7.9×10^{-4}	+	0.0019	+	4.7×10^{-6}	+	0.0035	+	6.8×10^{-9}	+	4.7×10^{-10}
rs11090617	T	0.59	+	4.8×10^{-4}	+	9.0×10^{-4}	+	0.0020	+	5.8×10^{-6}	+	0.0040	+	1.1×10^{-8}	+	8.2×10^{-10}
rs139052	A	0.73	+	0.0019	+	0.033	+	0.0018	+	1.6×10^{-4}	+	0.011	+	2.2×10^{-6}	+	3.9×10^{-5}
rs16991158	A	0.60	+	4.3×10^{-4}	+	9.8×10^{-4}	+	0.0021	+	6.0×10^{-6}	+	0.0038	+	7.9×10^{-9}	+	5.1×10^{-10}
rs36055245	G	0.60	+	6.6×10^{-4}	+	8.0×10^{-4}	+	0.0022	+	7.0×10^{-6}	+	0.0032	+	1.5×10^{-8}	+	1.2×10^{-9}
rs12484700	G	0.60	+	2.2×10^{-4}	+	9.1×10^{-4}	+	0.0024	+	4.2×10^{-6}	+	0.0046	+	6.7×10^{-9}	+	1.2×10^{-9}

rs1883350	C	0.63	+	0.0015	+	7.5×10^{-4}	+	0.0020	+	1.3×10^{-5}	+	0.0011	+	3.4×10^{-8}	+	2.6×10^{-8}
rs4823173	A	0.59	+	4.8×10^{-4}	+	0.0019	+	0.0025	+	8.1×10^{-6}	+	0.0089	+	2.9×10^{-8}	+	2.5×10^{-9}
rs2076211	T	0.59	+	7.7×10^{-4}	+	0.0033	+	0.0041	+	2.1×10^{-5}	+	0.015	+	4.8×10^{-8}	+	3.9×10^{-9}
rs2294433	A	0.59	+	4.8×10^{-4}	+	0.0019	+	0.0025	+	8.1×10^{-6}	+	0.0089	+	2.9×10^{-8}	+	2.5×10^{-9}
rs1977080	T	0.59	+	6.3×10^{-4}	+	0.0028	+	0.0032	+	1.4×10^{-5}	+	0.011	+	5.2×10^{-8}	+	4.6×10^{-9}
rs1977081	C	0.59	+	9.4×10^{-4}	+	0.0011	+	0.0012	+	5.1×10^{-6}	+	0.0048	+	3.8×10^{-8}	+	3.2×10^{-9}
rs12484466	G	0.60	+	4.0×10^{-4}	+	0.0051	+	0.0056	+	2.3×10^{-5}	+	0.022	+	9.3×10^{-8}	+	8.6×10^{-9}
rs2076208	C	0.77	+	0.0016	+	0.0059	+	4.3×10^{-4}	+	1.6×10^{-5}	+	0.0015	+	8.5×10^{-6}	+	1.3×10^{-4}
rs1997693	G	0.59	+	4.3×10^{-4}	+	0.0022	+	0.0023	+	8.0×10^{-6}	+	0.0083	+	2.5×10^{-8}	+	1.5×10^{-9}
rs13056638	G	0.59	+	0.0013	+	0.0034	+	0.0029	+	2.4×10^{-5}	+	0.0098	+	7.4×10^{-8}	+	1.3×10^{-8}
rs1883348	G	0.59	+	9.4×10^{-4}	+	0.0022	+	0.0025	+	1.3×10^{-5}	+	0.0076	+	5.3×10^{-8}	+	5.7×10^{-9}
rs1883349	A	0.59	+	7.3×10^{-4}	+	0.0032	+	0.0029	+	1.6×10^{-5}	+	0.0099	+	4.4×10^{-8}	+	3.9×10^{-9}
rs2281138	C	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2281137	C	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2281135	A	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2072907	G	0.59	+	9.2×10^{-4}	+	0.0030	+	0.0034	+	1.9×10^{-5}	+	0.0095	+	5.6×10^{-8}	+	5.0×10^{-9}
rs34879941	T	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs71218095	TC	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2072906	G	0.59	+	0.0013	+	0.0036	+	0.0035	+	2.6×10^{-5}	+	0.0087	+	7.8×10^{-8}	+	9.0×10^{-9}
rs2076207	G	0.59	+	6.9×10^{-4}	+	0.0030	+	0.0037	+	1.7×10^{-5}	+	0.0094	+	6.2×10^{-8}	+	6.2×10^{-9}
rs2072905	G	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2896019	G	0.60	+	4.8×10^{-4}	+	0.0014	+	0.0025	+	8.6×10^{-6}	+	0.0026	+	1.5×10^{-8}	+	1.0×10^{-9}
rs2401512	G	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2896020	C	0.59	+	8.5×10^{-4}	+	0.0021	+	0.0025	+	1.2×10^{-5}	+	0.0090	+	6.4×10^{-8}	+	8.0×10^{-9}

rs4823176	C	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2281293	C	0.59	+	0.0011	+	0.0016	+	0.0027	+	1.3×10^{-5}	+	0.0081	+	3.3×10^{-8}	+	3.4×10^{-9}
rs16991175	C	0.59	+	8.2×10^{-4}	+	0.0023	+	0.0033	+	1.5×10^{-5}	+	0.0074	+	6.3×10^{-8}	+	5.8×10^{-9}
rs35621602	A	0.59	+	0.0011	+	0.0023	+	0.0025	+	1.5×10^{-5}	+	0.0069	+	5.4×10^{-8}	+	4.9×10^{-9}
rs34352134	T	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs34376930	T	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs2073081	C	0.59	+	0.0012	+	0.0024	+	0.0049	+	2.5×10^{-5}	+	0.0075	+	3.3×10^{-7}	+	2.9×10^{-8}
rs1010023	C	0.59	+	8.7×10^{-4}	+	0.0042	+	0.0046	+	2.8×10^{-5}	+	0.013	+	8.2×10^{-8}	+	9.2×10^{-9}
rs1010022	G	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs8142145	C	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs73176497	A	0.59	+	0.0010	+	0.0030	+	0.0033	+	2.0×10^{-5}	+	0.0098	+	7.3×10^{-8}	+	8.1×10^{-9}
rs5764416	T	0.69	+	0.0012	+	0.076	+	0.0041	+	2.4×10^{-4}	+	0.062	+	6.8×10^{-6}	+	2.0×10^{-5}
rs78023701	T	0.69	+	0.0012	+	0.068	+	0.0027	+	1.6×10^{-4}	+	0.054	+	7.9×10^{-6}	+	2.2×10^{-5}
rs926633	A	0.59	+	4.7×10^{-4}	+	0.0037	+	0.0032	+	1.4×10^{-5}	+	0.0081	+	6.4×10^{-8}	+	5.6×10^{-9}
rs3810622	T	0.70	+	7.5×10^{-4}	+	0.10	+	0.0046	+	2.5×10^{-4}	+	0.055	+	9.7×10^{-6}	+	2.0×10^{-5}
rs13056555	G	0.59	+	4.2×10^{-4}	+	0.0029	+	0.0036	+	1.3×10^{-5}	+	0.011	+	4.8×10^{-8}	+	3.8×10^{-9}
rs2294915	T	0.60	+	6.5×10^{-4}	+	0.0039	+	0.0042	+	2.1×10^{-5}	+	0.0087	+	6.1×10^{-8}	+	5.5×10^{-9}
rs2294916	G	0.59	+	9.2×10^{-4}	+	0.0061	+	0.0052	+	4.0×10^{-5}	+	0.011	+	7.2×10^{-8}	+	7.6×10^{-9}
rs4823179	C	0.60	+	7.6×10^{-4}	+	0.0057	+	0.0059	+	3.6×10^{-5}	+	0.012	+	1.1×10^{-7}	+	1.2×10^{-8}
rs4823180	A	0.60	+	6.5×10^{-4}	+	0.0039	+	0.0042	+	2.1×10^{-5}	+	0.0087	+	6.1×10^{-8}	+	5.5×10^{-9}
rs4823181	C	0.60	+	6.5×10^{-4}	+	0.0039	+	0.0042	+	2.1×10^{-5}	+	0.0087	+	6.1×10^{-8}	+	5.5×10^{-9}
rs13055900	G	0.60	+	6.5×10^{-4}	+	0.0039	+	0.0042	+	2.1×10^{-5}	+	0.0087	+	6.1×10^{-8}	+	5.5×10^{-9}
rs13055874	C	0.59	+	6.0×10^{-4}	+	0.0029	+	0.0036	+	1.6×10^{-5}	+	0.0066	+	8.1×10^{-8}	+	6.7×10^{-9}
rs2294917	T	0.71	+	0.0026	+	0.027	+	0.0019	+	9.2×10^{-5}	+	0.051	+	7.3×10^{-5}	+	1.3×10^{-4}

rs2294919	C	0.73	+	0.0024	+	0.092	+	0.0036	+	4.5×10^{-4}	+	0.026	+	2.1×10^{-5}	+	3.0×10^{-4}
rs2008451	C	0.60	+	5.3×10^{-4}	+	0.0041	+	0.0042	+	2.0×10^{-5}	+	0.0083	+	5.2×10^{-8}	+	4.0×10^{-9}
rs1810508	G	0.60	+	5.2×10^{-4}	+	0.0030	+	0.0042	+	1.6×10^{-5}	+	0.0065	+	5.2×10^{-8}	+	3.9×10^{-9}
rs12484795	C	0.59	+	5.7×10^{-4}	+	0.0014	+	0.0022	+	6.9×10^{-6}	+	0.0037	+	1.4×10^{-8}	+	1.7×10^{-9}
rs13054885	A	0.54	+	0.0015	+	0.0041	+	0.0045	+	2.9×10^{-5}	+	0.015	+	1.2×10^{-6}	+	8.5×10^{-8}
LD block 3																
rs7289329	T	0.74	+	0.032	+	0.062	+	0.014	+	0.0024	+	0.065	+	0.0018	+	0.017
rs5764043	G	0.74	+	0.027	+	0.069	+	0.013	+	0.0023	+	0.077	+	0.0018	+	0.016
rs5764044	C	0.74	+	0.029	+	0.068	+	0.013	+	0.0023	+	0.076	+	0.0024	+	0.020
rs5764045	C	0.75	+	0.018	+	0.077	+	0.016	+	0.0021	+	0.080	+	0.0018	+	0.015
rs2092501	A	0.55	+	0.0018	+	0.080	+	0.019	+	6.8×10^{-4}	+	0.11	+	6.6×10^{-5}	+	1.3×10^{-5}
rs9614293	G	0.74	+	0.024	+	0.078	+	0.014	+	0.0024	+	0.073	+	0.0019	+	0.015
rs11912828	G	0.73	+	0.0095	+	0.35	+	0.028	+	0.0080	+	0.084	+	3.8×10^{-4}	+	0.0042
rs34912062	T	0.54	+	0.0015	+	0.061	+	0.011	+	3.7×10^{-4}	+	0.074	+	4.1×10^{-5}	+	1.1×10^{-5}
rs1474745	C	0.54	+	0.0012	+	0.041	+	0.0088	+	2.0×10^{-4}	+	0.058	+	1.9×10^{-5}	+	4.5×10^{-6}
rs738491	T	0.62	+	0.0051	+	0.0091	+	0.0072	+	1.4×10^{-4}	+	0.020	+	1.8×10^{-5}	+	2.7×10^{-5}
rs11705218	A	0.73	+	0.014	+	0.092	+	0.015	+	0.0021	+	0.088	+	0.0017	+	0.017
rs2064361	C	0.73	+	0.014	+	0.092	+	0.015	+	0.0021	+	0.088	+	0.0017	+	0.017
rs56373884	A	0.54	+	7.1×10^{-4}	+	0.051	+	0.016	+	2.6×10^{-4}	+	0.096	+	1.8×10^{-5}	+	6.1×10^{-6}
rs9614294	G	0.73	+	0.014	+	0.092	+	0.015	+	0.0021	+	0.088	+	0.0017	+	0.017
rs56219234	T	0.62	+	0.0054	+	0.0055	+	0.0054	+	8.7×10^{-5}	+	0.013	+	1.8×10^{-5}	+	1.9×10^{-5}
rs5764047	G	0.74	+	0.017	+	0.077	+	0.012	+	0.0018	+	0.081	+	0.0019	+	0.015
rs16991236	G	0.46	+	0.058	+	0.0088	+	0.041	+	0.0018	+	0.015	+	4.1×10^{-4}	+	2.8×10^{-4}
rs2073082	G	0.74	+	0.017	+	0.079	+	0.012	+	0.0018	+	0.090	+	0.0015	+	0.013

rs2073083	C	0.74	+	0.017	+	0.077	+	0.012	+	0.0018	+	0.081	+	0.0019	+	0.015
rs5764430	C	0.74	+	0.012	+	0.073	+	0.018	+	0.0018	+	0.080	+	0.0025	+	0.019
rs2294921	T	0.54	+	5.3×10^{-4}	+	0.061	+	0.015	+	2.6×10^{-4}	+	0.080	+	3.4×10^{-5}	+	7.4×10^{-6}
rs9614300	C	0.74	+	0.017	+	0.077	+	0.012	+	0.0018	+	0.081	+	0.0019	+	0.015
rs3788603	T	0.73	+	0.012	+	0.094	+	0.016	+	0.0020	+	0.075	+	0.0019	+	0.019
rs3761472	G	0.54	+	9.7×10^{-4}	+	0.077	+	0.015	+	4.3×10^{-4}	+	0.12	+	4.8×10^{-5}	+	5.7×10^{-6}
rs932430	T	0.89	+	0.41	+	0.15	+	0.48	+	0.16	+	0.30	+	0.039	+	0.0022
rs2235772	T	0.62	+	0.0043	+	0.014	+	0.011	+	2.1×10^{-4}	+	0.025	+	3.3×10^{-5}	+	4.1×10^{-5}
rs2235773	C	0.74	+	0.017	+	0.077	+	0.012	+	0.0018	+	0.081	+	0.0019	+	0.015
rs61473277	G	0.54	+	7.6×10^{-4}	+	0.078	+	0.016	+	3.8×10^{-4}	+	0.11	+	5.3×10^{-5}	+	6.7×10^{-6}
rs2073084	A	0.62	+	0.0043	+	0.013	+	0.0076	+	1.7×10^{-4}	+	0.020	+	2.5×10^{-5}	+	3.0×10^{-5}
rs2073085	T	0.62	+	0.0054	+	0.014	+	0.011	+	2.4×10^{-4}	+	0.018	+	3.2×10^{-5}	+	3.6×10^{-5}
rs2073086	T	0.62	+	0.0043	+	0.013	+	0.0076	+	1.7×10^{-4}	+	0.020	+	2.5×10^{-5}	+	3.0×10^{-5}
rs14315	T	0.62	+	0.0046	+	0.013	+	0.0074	+	1.6×10^{-4}	+	0.019	+	2.5×10^{-5}	+	2.8×10^{-5}
rs2073088	G	0.73	+	0.015	+	0.11	+	0.015	+	0.0024	+	0.091	+	0.0016	+	0.016
rs2235775	A	0.62	+	0.0043	+	0.013	+	0.0076	+	1.7×10^{-4}	+	0.020	+	2.5×10^{-5}	+	3.0×10^{-5}
rs11090620	T	0.62	+	0.0053	+	0.013	+	0.0074	+	1.8×10^{-4}	+	0.024	+	2.2×10^{-5}	+	2.5×10^{-5}
rs67450864	T	0.62	+	0.0053	+	0.013	+	0.0074	+	1.8×10^{-4}	+	0.024	+	2.2×10^{-5}	+	2.5×10^{-5}
rs2235776	T	0.54	+	4.9×10^{-4}	+	0.080	+	0.020	+	3.7×10^{-4}	+	0.094	+	4.3×10^{-5}	+	6.5×10^{-6}
rs4823183	A	0.54	+	4.9×10^{-4}	+	0.079	+	0.020	+	3.6×10^{-4}	+	0.094	+	4.3×10^{-5}	+	6.4×10^{-6}
rs2235777	T	0.54	+	4.9×10^{-4}	+	0.080	+	0.020	+	3.7×10^{-4}	+	0.094	+	4.3×10^{-5}	+	6.5×10^{-6}
rs2294922	C	0.54	+	9.7×10^{-4}	+	0.077	+	0.015	+	4.3×10^{-4}	+	0.12	+	4.8×10^{-5}	+	5.7×10^{-6}
rs2294923	A	0.54	+	0.0010	+	0.075	+	0.015	+	4.3×10^{-4}	+	0.10	+	5.6×10^{-5}	+	7.3×10^{-6}
rs9626079	G	0.54	+	7.9×10^{-4}	+	0.067	+	0.016	+	3.5×10^{-4}	+	0.10	+	4.4×10^{-5}	+	4.5×10^{-6}

rs71313378	GCTTC	0.54	+	9.7×10^{-4}	+	0.077	+	0.015	+	4.3×10^{-4}	+	0.12	+	4.8×10^{-5}	+	5.7×10^{-6}
rs12167845	C	0.54	+	8.6×10^{-4}	+	0.070	+	0.016	+	3.8×10^{-4}	+	0.099	+	3.9×10^{-5}	+	4.5×10^{-6}
rs4823108	C	0.54	+	7.9×10^{-4}	+	0.067	+	0.016	+	3.5×10^{-4}	+	0.10	+	4.4×10^{-5}	+	4.5×10^{-6}
rs140963094	A	0.62	+	0.0050	+	0.015	+	0.0059	+	1.7×10^{-4}	+	0.028	+	2.7×10^{-5}	+	2.6×10^{-5}
rs6006599	A	0.62	+	0.0039	+	0.0089	+	0.0047	+	9.0×10^{-5}	+	0.016	+	2.4×10^{-5}	+	1.8×10^{-5}
rs2294926	T	0.62	+	0.0076	+	0.0080	+	0.0033	+	1.0×10^{-4}	+	0.012	+	2.3×10^{-5}	+	1.4×10^{-5}
rs2294927	C	0.62	+	0.0078	+	0.0078	+	0.0032	+	1.0×10^{-4}	+	0.011	+	2.5×10^{-5}	+	1.6×10^{-5}
rs6006602	T	0.62	+	0.0100	+	0.012	+	0.0040	+	1.9×10^{-4}	+	0.011	+	2.0×10^{-5}	+	1.3×10^{-5}
rs6006468	C	0.62	+	0.0097	+	0.012	+	0.0041	+	1.8×10^{-4}	+	0.011	+	2.0×10^{-5}	+	1.2×10^{-5}
rs6006469	G	0.62	+	0.0100	+	0.012	+	0.0040	+	1.9×10^{-4}	+	0.011	+	2.0×10^{-5}	+	1.3×10^{-5}
rs7587	C	0.75	+	0.013	+	0.032	+	0.0035	+	6.3×10^{-4}	+	0.018	+	4.1×10^{-4}	+	0.0032
rs1986095	G	0.62	+	0.0085	+	0.013	+	0.0043	+	1.9×10^{-4}	+	0.013	+	2.6×10^{-5}	+	1.7×10^{-5}
rs10656207	CTA	0.62	+	0.015	+	0.017	+	0.0045	+	3.3×10^{-4}	+	0.012	+	2.1×10^{-5}	+	1.5×10^{-5}
rs5764451	G	0.75	+	0.013	+	0.032	+	0.0035	+	6.3×10^{-4}	+	0.018	+	4.1×10^{-4}	+	0.0032
rs3788604	G	0.62	+	0.0100	+	0.012	+	0.0040	+	1.9×10^{-4}	+	0.011	+	2.0×10^{-5}	+	1.3×10^{-5}
rs3827385	C	0.54	+	0.0014	+	0.081	+	0.012	+	4.6×10^{-4}	+	0.067	+	4.7×10^{-5}	+	3.3×10^{-6}
rs2235778	C	0.62	+	0.011	+	0.014	+	0.0039	+	2.2×10^{-4}	+	0.018	+	2.5×10^{-5}	+	1.8×10^{-5}
rs2281296	G	0.75	+	0.012	+	0.031	+	0.0037	+	6.1×10^{-4}	+	0.016	+	2.9×10^{-4}	+	0.0027
rs2281297	T	0.62	+	0.011	+	0.011	+	0.0046	+	2.0×10^{-4}	+	0.023	+	2.4×10^{-5}	+	1.8×10^{-5}
rs2281298	A	0.54	+	0.0020	+	0.089	+	0.020	+	8.0×10^{-4}	+	0.12	+	8.3×10^{-5}	+	1.0×10^{-5}
rs2179642	C	0.62	+	0.013	+	0.013	+	0.0058	+	2.9×10^{-4}	+	0.019	+	3.3×10^{-5}	+	2.3×10^{-5}
rs2143571	A	0.54	+	0.0016	+	0.087	+	0.020	+	7.1×10^{-4}	+	0.11	+	6.7×10^{-5}	+	8.2×10^{-6}
rs6006473	T	0.62	+	0.010	+	0.011	+	0.0065	+	2.4×10^{-4}	+	0.018	+	1.9×10^{-5}	+	1.2×10^{-5}
rs6006474	T	0.62	+	0.013	+	0.013	+	0.0058	+	2.9×10^{-4}	+	0.019	+	3.3×10^{-5}	+	2.3×10^{-5}

rs2401514	A	0.54	+	0.0020	+	0.088	+	0.020	+	8.0×10^{-4}	+	0.12	+	8.1×10^{-5}	+	1.0×10^{-5}
rs2073080	T	0.54	+	0.0020	+	0.088	+	0.020	+	8.0×10^{-4}	+	0.12	+	8.1×10^{-5}	+	1.0×10^{-5}
rs2281292	C	0.62	+	0.011	+	0.014	+	0.0043	+	2.2×10^{-4}	+	0.015	+	2.8×10^{-5}	+	1.9×10^{-5}
rs1007863	C	0.62	+	0.010	+	0.012	+	0.0044	+	2.0×10^{-4}	+	0.015	+	3.0×10^{-5}	+	2.0×10^{-5}
LD block 4																
rs5764455	A	0.51	+	0.016	+	4.8×10^{-4}	+	0.0016	+	2.8×10^{-5}	+	3.2×10^{-4}	+	5.8×10^{-5}	+	3.7×10^{-5}
rs6006610	A	0.61	+	0.0064	+	0.0050	+	1.9×10^{-4}	+	2.6×10^{-5}	+	0.0028	+	5.5×10^{-6}	+	7.3×10^{-6}
rs6006611	G	0.65	+	0.0059	+	6.3×10^{-4}	+	4.4×10^{-5}	+	3.4×10^{-6}	+	6.1×10^{-4}	+	8.9×10^{-5}	+	5.1×10^{-5}
LD block 5																
rs4823184	T	0.45	+	0.39	+	0.0054	+	0.20	+	0.018	+	0.028	+	0.040	+	0.048
rs9626087	T	0.48	+	0.034	+	0.0063	+	0.075	+	0.0020	+	0.082	+	0.053	+	0.015
LD block 6																
rs8137707	C	0.88	+	0.062	+	0.040	+	0.11	+	0.014	+	0.060	+	0.014	+	0.029
rs8141269	A	0.84	+	0.79	+	0.10	+	0.071	+	0.084	+	0.60	+	0.44	+	0.86
rs76409096	TA	0.54	+	0.36	+	0.0058	+	0.045	+	0.0075	+	0.043	+	0.36	+	0.30
LD block 7																
rs16991328	A	0.85	+	0.097	+	0.37	+	0.75	+	0.22	+	0.35	+	0.083	+	0.20
rs9614308	G	0.85	+	0.94	+	0.072	+	0.031	+	0.060	+	0.24	+	0.31	+	0.67
rs4823185	C	0.74	+	0.98	+	0.27	+	0.26	+	0.25	+	0.61	-	0.97	-	0.66
rs34505405	G	0.74	-	0.78	+	0.41	+	0.45	+	0.47	+	0.66	-	0.87	-	0.62
rs16991341	A	0.50	+	0.27	+	0.033	+	0.053	+	0.017	+	0.042	+	0.13	+	0.11
rs6006618	T	0.52	+	0.21	+	0.028	+	0.024	+	0.010	+	0.062	+	0.049	+	0.048
LD block 7																

rs12484530	A	0.34	+	0.15	+	0.17	+	0.097	+	0.052	+	0.063	+	0.49	+	0.35
rs9614313	T	0.74	+	0.95	+	0.95	+	0.29	+	0.52	+	0.67	-	0.81	-	0.42
LD block 8																
rs2401515	C	0.47	+	0.25	+	0.078	+	0.12	+	0.044	+	0.15	+	0.026	+	0.017
rs7289219	A	0.72	+	0.092	+	0.97	+	0.41	+	0.28	+	0.95	+	0.070	+	0.0058
rs2401516	A	0.47	+	0.47	+	0.17	+	0.11	+	0.089	+	0.39	+	0.050	+	0.034
rs2401517	C	0.77	-	0.51	+	0.16	+	0.38	+	0.39	+	0.34	-	0.77	-	0.31
rs2401518	T	0.76	-	0.42	+	0.096	+	0.40	+	0.36	+	0.35	+	0.76	-	0.59
rs2401519	A	0.23	+	0.63	-	0.095	-	0.42	-	0.30	-	0.24	-	0.94	+	0.56
LD block 9																
rs9626091	A	0.53	-	0.15	+	0.44	+	0.74	-	0.94	+	0.19	-	0.34	-	0.57
LD block 10																
rs9614315	G	0.82	-	0.50	-	0.41	-	0.82	-	0.57	+	0.50	+	0.78	+	0.78
rs6006477	A	0.72	-	0.80	+	0.88	+	0.82	+	0.85	+	0.54	-	0.37	-	0.33
rs8142117	A	0.74	-	0.59	-	0.88	+	0.85	-	0.94	+	0.40	-	0.42	-	0.27
LD block 10																
rs74427758	G	0.16	-	0.19	+	0.82	+	0.24	+	0.84	+	0.85	-	0.26	-	0.33
rs135114	C	0.86	-	0.33	-	0.10	-	0.15	-	0.079	-	0.31	+	0.33	+	0.43

Numbers in bold indicate a P -value of $<3.0 \times 10^{-4}$.

補足表 5 CpG 領域の増幅に用いたプライマー配列と増幅産物長

CpG island	PCR amplicon	Forward Primer	Sequence	Reverse Primer	Sequence	Length (bp)
For the 1st set						
CpG99	1	PN_F7	GATATGTAGTGTGTTTGGAGTTTTGGA	PN_R4	AAATATCTTAAATCCCTCAATCCCCAAA	1132
CpG71	2	SA1_F3	GTAGGGGAGTTGTTTTGTTATTAATAATT	SA1_R3	ACACAATCCCCATAATTCCTCTCCAAC	891
CpG26	3-1	PAv1_F1	GAAGGAGGTGAGGAGGGAGTAGTGTAGG	PAv1_R1	CCTCCTACTACCTAACTCTAAATACATC	628
CpG26	3-2	PAv1_F3	AGATATGATGTATTTAGAGTTAGGTAGT	PAv1_R3	TCTTTACTTCAATATCCCTAATATTACA	224
CpG101	4-1	PAv2_F3	TTGTTGAGTAGTTATTAGTTAGAGGTAA	PAv2_R3	AACCCTTCAAACTAAAATTATCCCTA	740
CpG101	4-2	PAv2_F8	GGGTTTGGTTTTTGGTAGAAGTTTAATA	PAv2_R5	CAAACCTCCCAAACCTCAACCCTACAC	1026
For the 2nd set						
CpG99	5	PN_addF3	GGAGTGGGTGTTTTTTAGGT	PN_R4	AAATATCTTAAATCCCTCAATCCCCAAA	491
CpG26	6-1	PAv1_addF2	GAGGGTTTAATTAGTTGGTGAAGG	PAv1_addR2	CCAATCCCAAACCTTCTCCT	287
CpG26	6-2	PAv1_addF4	AGGAGAAGTTTTGGGATTGG	PAv1_R1	CCTCCTACTACCTAACTCTAAATACATC	294

補足表 6 qPCR に用いたプライマー配列と増幅産物長

Gene	Forward Primer	Sequence	Reverse Primer	Sequence	Length (bp)
<i>PNPLA3</i>	qPN_F2	CCTGTGGAATCTGCCATTGCG	qPN_R2	TCCAGGTCCCAAATGCCAGTG	153
<i>SAMM50</i>	qSA_F1	TTGATTGACACATGTCAAGGTG	qSA_R1	AGGCAGTATGGTACTTGGCCT	147
<i>PARVB</i> variant 2	qPAv2_F1	CCCCGCAGGATGAAGAAGGA	qPAv2_R1	AAGAATGCCATCAACTCACCG	121
<i>GAPDH</i>	qGAPDH_F1	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	qGAPDH_R1	ATGTTCCAATATGATTCCACCC	138

補足表 7 4箇所 CpG 領域の、CpG、CHH、CHG サイトのメチル化レベル

CpG island	CpG sites		CHH sites						CHG sites					
					Average methylation (%)						Average methylation (%)			
	No. of sites		No. of sites		Liver		Blood		No. of sites		Liver		Blood	
ID	Total	Analyzed	Total	Analyzed	Mild	Advanced	Mild	Advanced	Total	Analyzed	Mild	Advanced	Mild	Advanced
1st set of NAFLD														
CpG99	117	117	202	201	0.5	1.0	0.5	0.5	89	89	0.6	1.1	0.8	0.7
CpG71	66	66	146	146	0.3	0.4	0.5	0.5	64	64	0.3	0.4	0.4	0.5
CpG26	42	42	105	105	0.7	0.6	1.0	1.1	55	55	0.5	0.5	0.8	0.8
CpG101	144	124	294	263	6.0	5.8	6.4	6.7	133	116	5.7	5.5	6.3	6.6
2nd set of NAFLD														
CpG99	42	42	71	71	0.5	0.4	-	-	30	30	1.1	1.0	-	-
CpG26	41	41	91	91	0.7	0.6	-	-	50	50	0.5	0.5	-	-
Chronic Hepatitis C														
CpG99	42	42	71	71	0.3	0.4	-	-	30	30	1.0	1.0	-	-
CpG26	41	41	91	91	0.5	0.4	-	-	50	50	0.3	0.3	-	-