

原発性胆汁性肝硬変の重症化感受性遺伝子の同定と biomarker として遺伝子診断への応用

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 大石 裕樹

[背景・目的]

原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis: PBC)は緩徐に進行する慢性の自己免疫性肝疾患で、中年以降の女性に多い疾患である。PBCの初期はほとんど無症状であるが、中には肝硬変に進行し、さらに重症化して肝不全に至って肝移植の適応となる。このようにPBCであっても病態の進行に個人差を認める。

双生児研究で一卵性双生児の一致率が63%と高く、またPBC患者の5.1%に家族集約性を認めたことから遺伝因子の強い関与が示唆されている。よって、PBCの発症や進行に関与する遺伝因子を同定し、これをbiomarkerとして遺伝子診断へ応用する目的で、胆汁酸の排泄に関与するABCトランスポーター(MDR3/BSEP/MRP2)や胆汁酸の合成や排泄に関連する遺伝子の発現を調整している核内リセプター(FXR/RXR β)に着目し、これらの遺伝子多型とPBCの重症度間で相関解析を行った。

[実験方法]

PBC患者148名(stage I: 104例, stage II: 34例, stage III: 10例)を病態の進行と重症度から、early stage群(stage I)とlate stage群(stage II+III)に、あるいはnon-jaundice群(stage I+II)とjaundice群(stage III)に分類した。5つの候補遺伝子遺伝子内に存在するsingle nucleotide polymorphisms (SNPs)から48個のtag SNPsを選出し、PCR-restriction fragment length polymorphism法とPCR-direct DNA sequencing法で多型解析した。さらに、有意差を認めたSNPsを組み合わせてhaplotypesおよびdiplotypesを構築した。各多型の出現頻度を各群間で有意差検定(カイニ乗法とロジスティック回帰分析法)を行った。

[結果]

- (1) MDR3について、3つのSNPsで有意差を認め、これらからhaplotype/diplotypeを構築した。Hap 1やHap1/Hap 1を持つ患者の病態は進行せず、Hap 2やHap2/Hap 2を持つ患者は重症のjaundice stageに進行しやすかった¹⁾。
- (2) BSEPについて、3つのSNPsで有意差を認め、これらからhaplotype/diplotypeを構築した。Hap 1を持つ患者の病態は進行せず、Hap 4を持つ患者は重症のjaundice stageに進行しやすかった²⁾。
- (3) MRP2について、すべてのSNPsで有意差を認めなかった。
- (4) FXRについて、2つのSNPsで有意差を認め、これらからhaplotype/diplotypeを構築した。Hap 2/Hap 2を持つ患者の病態は進行せず、Hap 3/Hap 4を持つ患者は重症のjaundice stageに進行しやすかった³⁾。
- (5) RXR β について、1つのSNPで有意差を認めたが、すべてのtag SNPsからhaplotype/diplotypeを構築した。Hap 3あるいはHap 1/Hap 3を持つ患者は重症のjaundice stageに進行しやすかった⁴⁾。
- (6) 有意差の認めたdiplotypes (Hap 2/Hap 2 in MDR3とHap 3/Hap 4 in FXRおよびHap 1/Hap 3 in RXR β)がjaundice stageへの進行に対して独立した危険因子risk biomarkerであるかを検証するために行った多変量解析の結果が下の表4-1である⁴⁾。

Table 4-1. Multivariate analysis of factors associated with the progression to jaundice stage in PBC patients

Factor	Factor comparison*	
	OR (95% CI)	P value
Possessing Hap 2/Hap 2 in <i>MDR3</i>	19.72 (2.21-176.39)	0.008
Possessing Hap 3/Hap 4 in <i>FXR</i>	1.23 (0.004-359.38)	0.943
Possessing Hap 1/Hap 3 in <i>RXRβ</i>	21.87 (3.37-142.03)	0.001

*Factor were statistical analyzed by multivariate logistic regression analysis.

OR: odds ratio; CI: confidence interval

Table 4-2. Multivariate analysis of the combination effect of *MDR3* and *RXRβ* diplotypes for the susceptibility to the progression to jaundice stage in PBC patients

<i>MDR3</i>	<i>RXRβ</i>	
	Hap 1/Hap 3	Others
Hap 2/Hap 2	34.25 (2.80-418.96)	8.375 (1.33-52.80)
Others	7.00 (1.73-28.30)	0.04 (0.01-0.18)

Odds ratio and 95% confidence interval of each diplotype combination against

MDR3 and *RXRβ* are shown.

- (7) 危険因子として Hap 2/Hap 2 in *MDR3* と Hap 1/Hap 3 in *RXRβ* が独立して PBC の進行に関与していることがわかったので、この 2 つの diplotype 多型を共に持つ PBC 患者、どちらか一方を持つ患者、そして両方とも持たない患者に対して odds ratio (OR) と 95% confidence interval (CI) を二項ロジスティック回帰分析で求めた結果を前のページの下段の表 4-2 に示している⁴⁾。

[考察]

MDR3 と *RXRβ* は重症化感受性遺伝子である可能性が示唆された。今後これらの遺伝子の機能解析が進めば、重症化する病態生理学的機構を解明する手掛かりとなるかもしれない。さらに、分子機序まで解明できれば、それを分子標的としたゲノム創薬によって本疾患の治療薬の開発に繋がる。肝移植しか治療法のない jaundice stage の PBC 患者にとって、治療薬により進行が止まったり、あるいは少しでも進行を遅らせることができれば福音となるだろう。

また、これらの遺伝子多型を biomarkers として遺伝子診断への応用が期待できる。家族集約性を認める疾患であるだけに、家族や親類内で発症しやすい人を検出できる発症前診断

や, PBC 発症時に遺伝子診断することで, 重症化して予後不良になりやすい患者, つまり高リスク群の患者を発症初期より検出・同定できるかもしれない。今後も biomarker となる遺伝子多型を同定し, それらを組み合わせることにより, より精度の高い遺伝子診断法を確立し, 多くの患者を用いた cohort 研究へと進めていきたい。そしてテーラーメイド医療の実現に繋げたい。

[基礎となった学術論文]

1. Ohishi Y, Nakamura M, Iio N, Higa S, Inayoshi M, Aiba Y, Komori A, Omagari K, Ishibashi H, Tsukamoto K. Single-nucleotide polymorphism analysis of the multidrug resistance protein 3 gene for the detection of clinical progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, in press.
2. Ohishi Y, Nakamura M, Iio N, Higa S, Inayoshi M, Noguchi F, Inamine T, Aiba Y, Komori A, Omagari K, Ishibashi H, Tsukamoto K. Haplotypes of bile salt export pump (BSEP) are associated with the susceptibility to the clinical progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. In preparation.
3. Inamine T, Nakamura M, Iio N, Higa S, Noguchi F, Ohishi Y, Aiba Y, Komori A, Omagari K, Ishibashi H, Tsukamoto K. A diplotype, Hap 3/Hap 4, of the farnesoid X receptor gene is a risk biomarker for the clinical progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. In preparation.
4. Iio N, Nakamura M, Ohishi Y, Higa S, Noguchi F, Inamine T, Aiba Y, Komori A, Omagari K, Ishibashi H, Tsukamoto K. Strong genetic variation of the retinoid X receptor beta gene as a susceptibility to the clinical progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Hepatology*, in submission.