

原発性胆汁性肝硬変のタイプ別重症化関連遺伝子の同定

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 稲嶺 達夫

[目的]

原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis: PBC)は、慢性非化膿性破壊性胆管炎による小葉間胆管の減少とそれに伴う肝内胆汁うっ滞を特徴とする慢性肝疾患である。PBC 治療において、自己免疫性疾患であるにもかかわらず免疫抑制剤が著効せず、ウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)が主な治療薬である。多くの PBC 患者は UDCA に反応し、健常者と同程度の予後を示すが、約 3 割の PBC 患者は重症化し、さらなる治療を要する。さらに、約 1 割弱の PBC 患者は UDCA に全く反応せず、10 年以内に肝不全に進行する。しかし、病態の重症化に関連する遺伝因子や治療効果を予測できるバイオマーカーは明らかになっていない。

現在までに多くの遺伝子多型と PBC の発症や重症化との相関が報告されている。その多くは免疫システムに関わる遺伝子を中心に行われている。本研究室では、以前、胆汁酸の排泄や無毒化に関与する胆管側 ATP-binding cassette トランスポーターである multidrug resistance protein 3 (MDR3) の遺伝子多型が PBC の重症化と相関することを明らかにした。さらに、病態の進行や重症化に免疫抑制剤が効かないことから、PBC の重症化に免疫系以外の機序が寄与していると考えられる。よって、本研究では MDR3 を手がかりとして胆汁酸のホメオスタシスに着目した。中でも、正常な胆管の形成や肝線維化に関わる integrin αv 、胆汁酸の合成に関わる遺伝子、胆汁酸の negative feedback に関わる遺伝子を候補遺伝子とし、これら遺伝子が PBC 発症や重症化に関わっているかを、single nucleotide polymorphisms (SNPs)を用いた相関解析によって明らかにした。さらに、同定した遺伝子多型がそれぞれ独立して PBC 発症や重症化に寄与し、発症や重症化を予測するバイオマーカーになりうるかも合わせて検証した。

[実験方法]

オリジナル解析のために、全国の国立病院で登録された PBC 患者 309 名とバリデーション解析のために九州大学で登録された PBC 患者 35 名および健常ボランティア 293 名を研究対象とした。PBC 患者 309 名を 2 種類の基準で 2 つの病期に分類した。予後良好で殆ど病態が進行しないか肝硬変以上に進行するかを基準に early stage と late stage に分類した。最も重症で肝不全まで進行するかしないかを基準に non-jaundice stage と jaundice stage に分類した。35 名の PBC 患者群は全て肝不全のために肝移植を受けていたので liver transplantation 群とし、先の jaundice stage と同じ重症度に相当する。候補遺伝子として (*ITGAV/CYP7A1/HNF4A/PPARGC1A/FXR/SHP/FGF19/FGFR4/KLB*)を選出した。候補遺伝子内に存在する single nucleotide polymorphisms (SNPs)を PCR-restriction fragment length polymorphism 法、PCR-direct DNA sequencing 法あるいは PCR-high resolution melting curve analysis 法でジェノタイプングした。PBC 群と健常者群間、および各病期間で多型の出現頻度を有意差検定した。最後に、同定した疾患感受性遺伝子の多型をバイオマーカーとして遺伝子診断に用いた場合の感度と特異度を算出した。

[結果]

- 1) PBC 患者の平均年齢は late stage 進行型で有意に高かった($P < 0.005$)。
- 2) *ITGAV* で、rs3911238 の C/C ジェノタイプの患者、rs10174098 の G/G ジェノタイプの患者、

rs1448427 の G アレルを持つ患者の割合はそれぞれ jaundice stage 群で有意に高かった(それぞれ $P = 0.003, 0.003, 0.031$)。

- 3) *ITGAV* で, rs1448427 の G アレルを持つ患者の割合は liver transplantaton 群においても有意に高かった($P = 0.033$)。
- 4) *CYP7A1* で, rs3824260 の A アレルを持つ患者の割合は late stage 群において有意に高かった ($P = 0.018$)。この SNP は, 既に機能が判明している rs3808607 と絶対連鎖($D' = 1.0, r^2 = 1.0$)の関係にあった。
- 5) *HNF4A* で, rs6017340 の T/T ジェノタイプの患者の割合は late stage 群で有意に高く, rs6031587 の T アレルを持つ患者の割合は early stage 群で有意に高かった($P = 0.011, 0.015$)。
- 6) *PPARGC1A* で, rs8192678 の A アレルを持つ患者の割合は late stage 群で有意に高かった ($P = 0.016$)。
- 7) *CYP7A1, HNF4A, PPARGC1A* で認めた相関は, 患者の年齢で補正しても独立して late stage 進行と相関していた。
- 8) Late stage への進行と相関を認めた 6 つの SNPs のうち, rs3824260, rs6017340, rs8192678 は, それぞれ独立して late stage への進行に寄与する因子であった。この 3 つの SNPs を用いて late stage への進行を予測した場合の感度は 10.3%で, 特異度は 98.2%であった。また, *CYP7A1* と *HNF4A* の組み合わせた場合では, 因子数は 2 つであるが, 3 つの場合とほぼ同定度の特異度 (97.8%)が得られ, 感度はわずかに高くなっていた (11.9%)。

Associations between rs1448427 in *ITGAV* and the progression of PBC among study subjects

SNP	Inheritance model	OR	95% CI		P value
			Low	High	
rs1448427	Nonjaundice stage vs. jaundice stage				
	<i>Allele model</i>	2.16	1.02	4.56	0.040
	<i>Recessive model</i>	1.97	0.23	16.48	0.526
	<i>Dominant model</i>	2.87	1.06	7.78	0.031
	Nonjaundice stage (PBC cohort I) vs. liver transplantation (PBC cohort II)				
	<i>Allele model</i>	1.80	1.03	3.16	0.037
	<i>Recessive model</i>	1.91	0.39	9.20	0.414
	<i>Dominant model</i>	2.13	1.05	4.31	0.033

CI, confidence interval. OR, odds ratio.

Gene-gene and gene-environment interactions between SNPs and age for susceptibility to the progression to late stage

Factor	Early stage vs. Late stage			
	OR	95% CI		P value
		Low	High	
Age	1.04	1.01	1.07	0.002
A/A or A/G of <i>CYP7A1</i> rs3824260	2.41	1.14	5.07	0.021
C/C of <i>HNF4A</i> rs6017340	3.21	1.17	8.78	0.023
A/G or A/A of <i>PPARGC1A</i> rs8192870	2.24	1.16	4.34	0.016

CI, confidence interval. OR, odds ratio.

The combination effect of *CYP7A1*, *HNF4A*, and *PPARGC1A* genotypes for the progression to late stage in PBC cohort I.

Risk factors	Factor comparison			Sensitivity (%)	Specificity (%)	
	OR	95% CI				P value
		Low	High			
<i>CYP7A1</i> + <i>HNF4A</i>	5.92	1.96	17.88	0.0004	11.9	97.8
<i>HNF4A</i> + <i>PPARGC1A</i>	4.36	1.50	12.66	0.0035	10.7	97.3
<i>PPARGC1A</i> + <i>CYP7A1</i>	2.37	1.38	4.07	0.0015	71.4	48.7
All	6.60	1.97	22.06	0.0015	10.3	98.2

CI, confidence interval. OR, odds ratio.

[考 察]

日本人における PBC の重症化に関連する 4 つの遺伝子を同定した。*ITGAV* は jaundice-type progression に特異的な重症化関連遺伝子であった。また、*CYP7A1*, *HNF4A*, *PPARGC1A* は late stage への進行の重症化関連遺伝子であった。

ITGAV のリスク遺伝子型を持つ PBC 患者では、integrin αV の機能低下が起こっており、それに伴って肝障害時の胆管再生が遅延し、急激に重症化して最も重症の jaundice stage に進行すると考えられる。Jaundice-type progression の原因は明らかになっていないため、今回の発見が今後の機構解明の一助になるかもしれない。

CYP7A1, *HNF4A*, *PPARGC1A* のリスク遺伝子型を持つ患者では、胆汁酸合成が亢進し、肝細胞内の胆汁酸の蓄積が促進されるために、late stage に進行しやすくなると考えられる。既に、*CYP7A1* および *PPARGC1A* のリスク遺伝子型が、それぞれの転写産物の機能を亢進することが分かっている。今後は、胆汁酸ホメオスタシスに関わる遺伝子群をさらに検索することで、late stage 重症化を招く分子機序を解明し、その中から分子標的となる新規治療薬の開発に繋げていきたい。そして、新しい新薬が複数開発されると、次に UDCA 耐性例や新規治療薬著効例を治療前に選別できる遺伝子診断法を確立する必要性が出てくる。よって、今後も、PBC の発症や重症化に関連する遺伝子を同定していきたい。

[基礎となった学術論文]

1. Inamine T, Tsukamoto K, et al. A polymorphism in the integrin αV subunit gene affects the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J. Gastroenterol.* 2011, in press.
2. Inamine T, Tsukamoto K, et al. The strong evidence of polymorphisms of the genes involved in bile acids synthesis as biomarkers for susceptibility to the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. (in preparation)
3. Inamine T, Tsukamoto K, et al. Genetic variations of the genes involved in the feedback system of bile acids are not associated with the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. (in preparation).