

表 題 非肥満者に着目した非アルコール性脂肪性肝疾患のゲノムワイド関連解析と関連領域の機能的検証

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 吉田 健

担当指導教員氏名 教授 岩本 禎彦

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
環境生態学系専攻
環境生態医学専攻分野
分子遺伝学専攻科

2020 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

1	緒言	P.1
2	方法	
2.1	遺伝解析デザイン	P.5
2.2	ゲノムワイド関連解析	P.6
2.3	SNP タイピング	P.6
2.4	HLA タイピング	P.7
2.5	腸内細菌叢解析	P.8
2.6	動物実験	P.10
2.7	血液生化学検査	P.12
2.8	マウス肝臓からの脂質の抽出	P.12
2.9	オイルレッド O 染色	P.13
2.10	遺伝子発現解析	P.13
2.11	ウェスタンブロッティング	P.14
2.12	統計解析	P.14
3	結果	
3.1	GWAS に用いた母集団と leanest NAFLD パネルの臨床的特徴	P.16
3.2	GWAS の結果	P.17
3.3	第 6 番染色体 rs2076529 と HLA の関連性	P.22
3.4	HLA 多型と腸内細菌叢の関連性	P.28
3.5	第 13 番染色体 rs59980018 の機能的検証	P.35
3.6	Gpr180 ノックアウトマウスによる機能的検証	P.40
3.7	肝臓 RNA を用いたトランスクリプトーム解析	P.43

3.8	GPR180 のパスウェイ探索	P.43
4	考察	P.47
5	総括	P.52
6	引用文献	P.53

略語一覧

【日本語】

非アルコール性脂肪性肝疾患(Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)

ゲノムワイド関連解析(Genome wide association study: GWAS)

予測メタゲノム解析(Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States: PICRUSt)

【英語】

AAV (Adeno-associated virus)

ALDH2 (Aldehyde dehydrogenase 2)

ALT (Alanine aminotransferase)

AST (Aspartate transaminase)

BMI (Body Mass Index)

CILP2 (Cartilage intermediate layer protein 2)

DCT (Dopachrome tautomerase)

DNA (Deoxyribonucleic acid)

FPKM (Fragments per kilobase of exon per million mapped)

GCKR (Glucokinase regulator)

GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

Gpc6 (Glypican proteoglycan 6)

Gpr180 (G protein-coupled receptor 180)

HDL (High density lipoprotein)

KO (Knock out)

LDL (Low density lipoprotein)

LEfSe (Linear discriminant analysis effect size)

LYPLAL1 (*Lyso-phospholipase-like 1*)

MHNW (Metabolically healthy, normal-weight)

MCOR (Congenital microcoria)

MONW (Metabolically obese, normal-weight)

MYL2 (*Myosin regulatory light chain 2*)

NCAN (*Neurocan*)

OUT (Operational taxonomic unit)

PCR (Polymerase chain reaction)

PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain containing 3*)

PPP1R3B (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B*)

RNA (Ribonucleic acid)

SNP (Single nucleotide polymorphism)

Tgds (*TDP-glucose 4,6-dehydratase*)

VLDL (Very low density lipoprotein)

1. 緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患(Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)は、組織診断あるいは画像診断で脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など他の肝疾患を除外した病態の総称である。アルコール性肝障害を除外するため、純アルコール換算にて男性は 30g/日以下、女性は 20g/日以下の摂取が日本での診断基準となっている[1]。

NAFLD は非アルコール性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver: NAFL)から非アルコール性脂肪性肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis: NASH)へと進展することで、肝硬変や肝細胞癌のリスクが急増し、生命予後に重大な影響を与える。また、肝疾患だけでなく心・脳血管障害や慢性腎臓病の発症リスクとも考えられており[2]、その予防や治療は極めて重要である。世界的な NAFLD の有病率は 25.2%と推定されているが[3]、メタボリック症候群の世界的な増加により今後さらに患者数が増加することが懸念されている[4]。

他の生活習慣病と同様に NAFLD は遺伝要因と環境要因が複合的に病態に関与していると考えられており、双子を対象にしたメタ解析では NAFLD の遺伝率は 20-70%と推察されている[5]。NAFLD の遺伝的背景を明らかにするため、これまでいくつかのゲノムワイド関連解析(Genome wide association study; GWAS)が報告されている。ヨーロッパでの大規模な研究では *Patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3)*、*Neurocan (NCAN)-Cartilage Intermediate Layer Protein 2 (CILP2)*、*Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 3B (PPP1R3B)*、*Glucokinase regulator (GCKR)*、*Lyso-phospholipase-like 1 (LYPLAL1)*が NAFLD と関連ある遺伝子として報告された[6]。

PNPLA3 はこれまでの研究から最も強く NAFLD に関連していると考えられている遺伝子である。脂肪細胞内での中性脂肪の加水分解やリン脂質へのアシル

トランスフェラーゼ機能に関わっているとされるが、*PNPLA3* の I148M 多型ではこれらの機能が低下し、肝臓への脂肪蓄積が亢進する[7]。しかしながら、I148M 多型は肥満、耐糖能異常、脂質異常、高血圧など他のメタボリック症候群と関連せず、またその分子メカニズムの解明は十分とは言えない[8] [9]。

TM6SF2 は *NCAN-CILP2* 領域に位置しており、肝臓からの超低比重リポタンパク質(Very low density lipoprotein: VLDL)分泌に関わっている[10]。E167K 多型では肝臓からの VLDL の分泌が障害されるため、NAFLD のリスクファクターとなる一方で、心血管イベントリスクは抑制されると報告されている[11]。

GCKR はグルコキナーゼを阻害するグルコキナーゼ調節タンパク質を産生しており、肝臓での糖代謝を介して NAFLD に関連している[12]。また *LYPLAL1* の機能的役割はわかっていないが、*GCKR* のパスウェイに関与することで NAFLD に影響してものと考えられている[13]。

GWAS を中心とした遺伝解析によって、これまで NAFLD に関連する遺伝子はいくつも同定されてきたが、それらだけでは NAFLD の遺伝的背景について十分に説明することはできない。”Missing heritability”(見失われた遺伝性)の問題を解決するためには、これまでとは違ったアプローチが求められており、本研究では非肥満者の NAFLD に着目した。

NAFLD の最も重要な発症因子は肥満とされているが、日本を含むアジアでは非肥満者(Body Mass Index(BMI)<25kg/m²)における NAFLD の有病率が欧米に比べて高い特徴がある[14]。日本での過去の横断研究では非肥満者の NAFLD の有病率は 18.4%と報告されているが[15]、自治医科大学健診センターの横断研究においては、非肥満者における NAFLD の有病率は 30.2%であった。図 1 は BMI 階層別の NAFLD の症例数と有病率を男女別にまとめたものである。BMI 上昇とともに NAFLD の有病率が上昇するが、BMI が 25 以下の非肥満者であっても多

くの NAFLD 症例がいることがわかる。

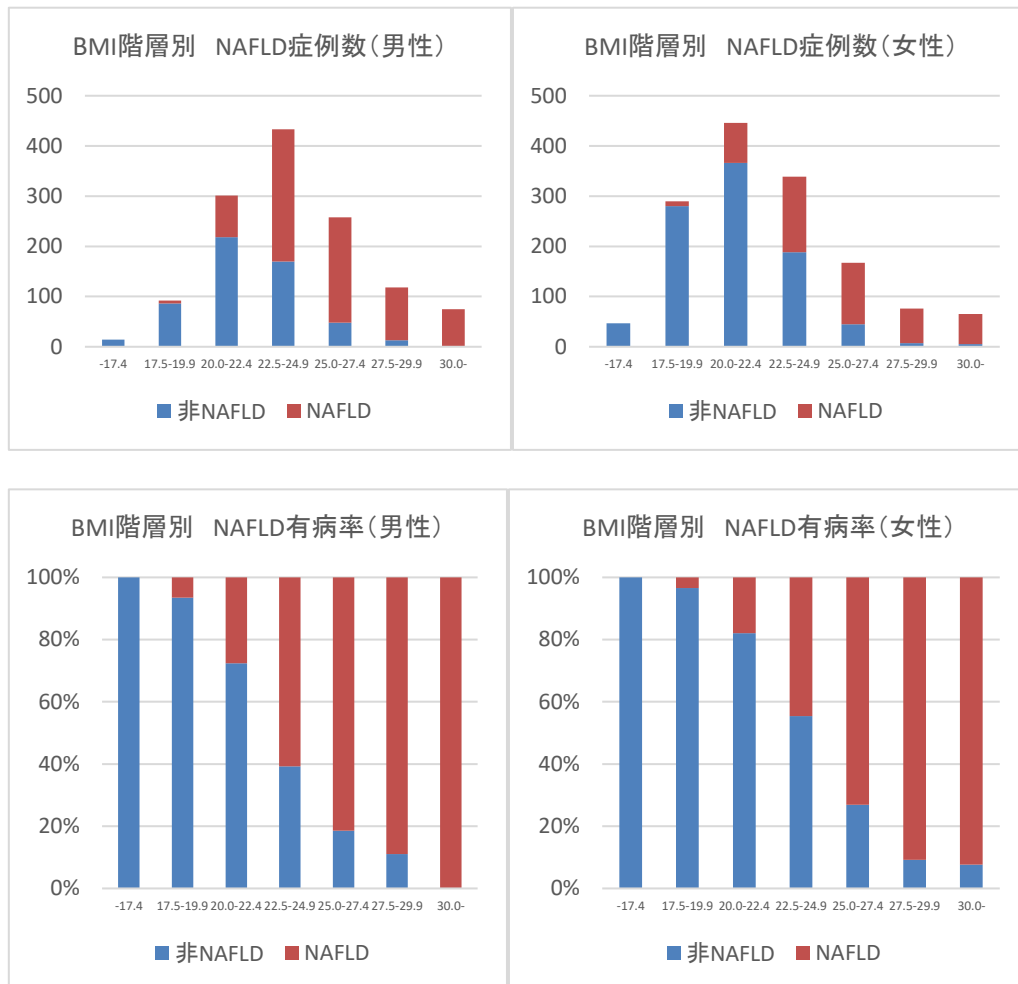


図 1 自治医大健診センターでの BMI 階層別の NAFLD 症例数および有病率（男女別）

横軸は BMI 階層を表しており、青は非 NAFLD 症例、赤は NAFLD 症例を表している。

非肥満者の NAFLD は lean NAFLD もしくは non-obese NAFLD と呼ばれ、しばしば肥満者の NAFLD とは区別して定義される[16]。病因や予後についてははっきりとわかっていないが、遺伝的要因が重要な役割を担っていると考えられている[17]。さらに、非肥満の NAFLD についてはプロファイルの違いから 2 つの

グループに分類して疾患を考えることが提唱されている[18]。1 つは”metabolically obese, normal-weight (MONW)”タイプで、もう 1 つは”metabolically healthy, normal-weight (MHNW)”タイプである。前者は正常体重であるが内臓脂肪や皮下脂肪が体内に沈着し、インスリン抵抗性が病態に深く関与するグループで、後者はメタボリック症候群で見られるような代謝異常を有しないグループである[19]。

非肥満者 NAFLD の中でも MHNW タイプは、インスリン抵抗性と関連が弱く、かつ NAFLD 易罹患性に関わる遺伝子群が集積していると推察され、コントロール群と比較した GWAS を行うことで、これまでに見つかっていない新たな遺伝子を同定できるのではないかと考えた。本研究の目的は、非肥満者 NAFLD の中でも MHNW タイプをケース群とした GWAS を行い、これまで明らかとなっていない NAFLD 全体に関連する遺伝子を同定し、その機能検証を行うことである。

2. 方法

2.1 遺伝解析デザイン

遺伝解析は自治医科大学で行われた以下の 3 つの横断研究の試料と情報を用いた。

横断研究Ⅰ：『内臓脂肪蓄積と血圧脈波波形に関する遺伝子解析研究』（承認番号；遺 16-変 39）参加者数 2229 名

横断研究Ⅱ：『大規模地域ゲノムバンクを用いた生活習慣病の分子遺伝学的解析』（承認番号；遺 09-16）、参加者数 3325 名

横断研究Ⅲ：『メタボリック症候群と腸内細菌叢の相互作用に影響する遺伝子解析研究』（承認番号；遺 16-003 号）参加者数 3420 名

3 つの横断研究参加者から、NAFLD の最も強力な説明変数である肥満関連指標が少ない順にそれぞれ男性 48 名、女性 48 名選出した(図 2)。横断研究Ⅰではインピーダンス法による内臓脂肪レベル、横断研究Ⅱでは BMI、横断研究Ⅲでは腹囲を肥満関連指標として用いた。3 つの横断研究から合わせて 288 人を選んだが、サンプリング不良や血縁関係などから 13 人を除外し、275 名が leanest NAFLD 群として GWAS のケース群となった。3 つの横断研究は全てヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で承認され、参加者全員からインフォームド・コンセントを得て実施した。

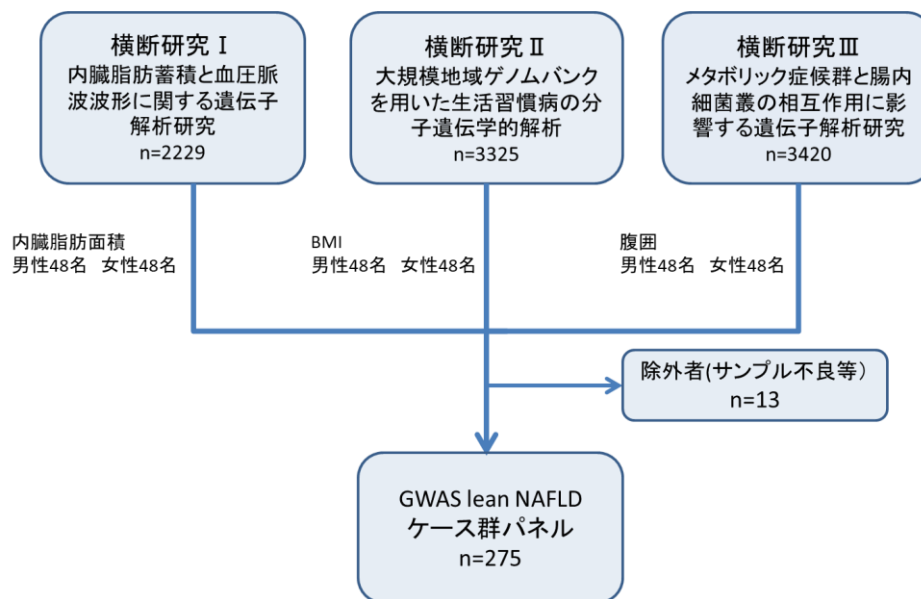


図 2 GWAS のケース群である leanest NAFLD 群の構築

2.2 ゲノムワイド関連解析

275 名のサンプルは末梢血から抽出した白血球 deoxyribonucleic acid(DNA)を用いて、ジャポニカアレイ v1(株式会社東芝、仙台)を使い、全ゲノムの Single nucleotide polymorphism (SNP)タイピングを行った[20]。タイピング結果を、性、年齢、アルコール摂取量がマッチした東北メディカルメガバンク非 NAFLD 症例 1411 名のコントロール群と比較した[21]。

2.3 SNP タイピング

GWAS で関連が示唆された領域については、横断研究IとIIIの合わせて 5649 名について TaqMan プローブ法を用いたリード SNP のタイピングを行い、全 NAFLD 群での再現性について評価した。TaqMan probe は以下のものを用いて解析をした。rs2076529 (C__2488469_1_), rs2189883 (C__2620047_10), rs2301610 (C__2538069_1_), rs66781047 (C__97772748_10), rs58542926 (C__89463510_10)

and rs738409 (C_____7241_10) (Life Technologies, Carlsbad, CA)

2.4 Human Leukocyte Antigen (HLA)タイピング

GWAS パネルである leanest NAFLD ケース群および東北メディカルメガバンクのコントロール群については、ジャポニカアレイのタイピング結果からインピュテーション法による HLA タイピングを行い[22]、ケース群とコントロール群間で 6 つ遺伝子座(*HLA-A*、*-B*、*-C*、*DRB1*、*DQB1*、*DPB1*)についてアレルの頻度に差があるかどうか検証した。

また横断研究IとIIIの 5649 名については、6 つの HLA 遺伝子座のエキソン 2、3 領域の増幅をさせるため表 1 に示すプライマーを設計し、Platinem Multiplex PCR Master mix (Life Technologies)を用いて multiplex polymerase chain reaction (PCR)を行った。バーコード配列を付与後に Agencourt AMPure XP beads(ベクマン・コールター株式会社)を用いてサンプル量のノーマライゼーションを行い、等量ずつ混合し次世代シーケンサ Miseq (Illumina)のシーケンス・ライブラリーとした。ペアエンド Fastq ファイルを HLA-HD ver1.1.02. [23]にて解析処理し、HLA タイプを同定した。

表 1 HLA プライマーリスト

HLA-A, Exon 2	FwAdaptor-CRGGTCTCAGCCACTSCTC RvAdaptor-CTCGGACCCGGAGACTGT
HLA-A, Exon 3	FwAdaptor-CTYGGGGGACYGGGCTGAC RvAdaptor-CCCAATTGTCTCCCCTCCTTG
HLA-B, Exon 2	FwAdaptor-CGCGTTTACCCGGTTTCATT RvAdaptor-GGATGGGGAGTCGTGACCT
HLA-B, Exon 3	FwAdaptor-GCGTTTACCCGGTTTCATT RvAdaptor-CGGCGACCTATAGGAGATGG
HLA-C, Exon 2	FwAdaptor-CTCTGSGGAGAGGARCGAGG RvAdaptor-TGAAACCGGGTAAAGGYGACT
HLA-C, Exon 3	FwAdaptor-CAAAATCCCCGCGGGTTGGT RvAdaptor-AGYGCTGATCCCATTTCCT
HLA-DRB1 Exon2	FwAdaptor-CTGTCMGTGTCTTCTCAGGA RvAdaptor-ATGCTCACCTCGCCGCTGCA
HLA-DRB1 Exon3	FwAdaptor-TTACTCTGTCTTCTGACTC RvAdaptor-CTGACACTCAGGATTAGCA
HLA-DPB1 Exon2	FwAdaptor-ATTAGATGAGAGTGGCGCCT RvAdaptor-CTAAGGTCCCTTAGGCCAAC
HLA-DPB1 Exon3	FwAdaptor-CTCSTAGTCCAGCCTAGGGT RvAdaptor-CTCTTCAGAGGTGGGGCTA
HLA-DQB1 Exon2	FwAdaptor-TTCCCCGAGAGGATTTTCGT RvAdaptor-GTGAAYRAACGGGGCTCAG
HLA-DQB1 Exon3	FwAdaptor-CAYTCTGGTCCAAGGAGGGA RvAdaptor-CCAYARTAACAGAACTCAATATC
FwAdaptor	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
RvAdaptor	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

2.5 腸内細菌叢解析

腸内細菌叢の解析は、横断研究Ⅲの便潜血検査の余剰検体からバクテリア DNA を抽出し、16S リボソーム Ribonucleic acid (RNA)解析を行った。各便潜血検体容器（S 採便容器、栄研化学株式会社）の底に小さな穴を開け、イエローチップにて 200 μ L の糞便浮遊液を吸い出し(図 3)、DNA 抽出溶液(5ml 1M Tris-HCl(pH9.0), 4ml 0.5M EDTA, 5ml 10%SDS, 16ml ミリ Q) 300 μ L と混合したのちに、500 μ L の TE 飽和フェノールとガラスビーズを追加し、10 分間振盪を行った[24]。遠心分離後、水層を新しいエッペンドルフチューブに移し、エタノール沈殿法にて DNA の精製を行った。精製された DNA は illumina の 16S “Metagenomic Sequencing Library Preparation”ガイドに従い、16S リボソーム RNA V3-4 領域を polymerase chain reaction (PCR)にて増幅を行い、190 検体ごとに Miseq を用い

て塩基配列の決定を行った。



図3 便潜血検体チューブからのサンプリング

Miseq から出力された Fastq ファイルを、図4に示す解析パイプラインに沿い、サンプルプロファイルのカテゴリの群間での差異を統計的に評価した。まず、MacQIIME v1.9.1 アプリケーションにてペアエンドマージを行い、Linux ワークステーションにインストールした QIIME v1.9.1 を用いて OTU(Operational taxonomic unit)表および系統樹の作成を行った。それらをプロファイル毎に分類し、 α 、 β 多様性の評価や UniFrac 解析を行った。さらに β 多様性の解析で有意な変化が見られたカテゴリーを LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) による群間比較解析[25]および予測メタゲノム解析(Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States: PICRUSt) [26]を行った。LEfSe は QIIME で出力された Taxonomic table を Galaxy サーバー上で、PICRUSt は QIIME 出力 biom ファイルから機能予測テーブルを作成し Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) v2.1.3 アプリケーションでグラフィックデータとした[27]。

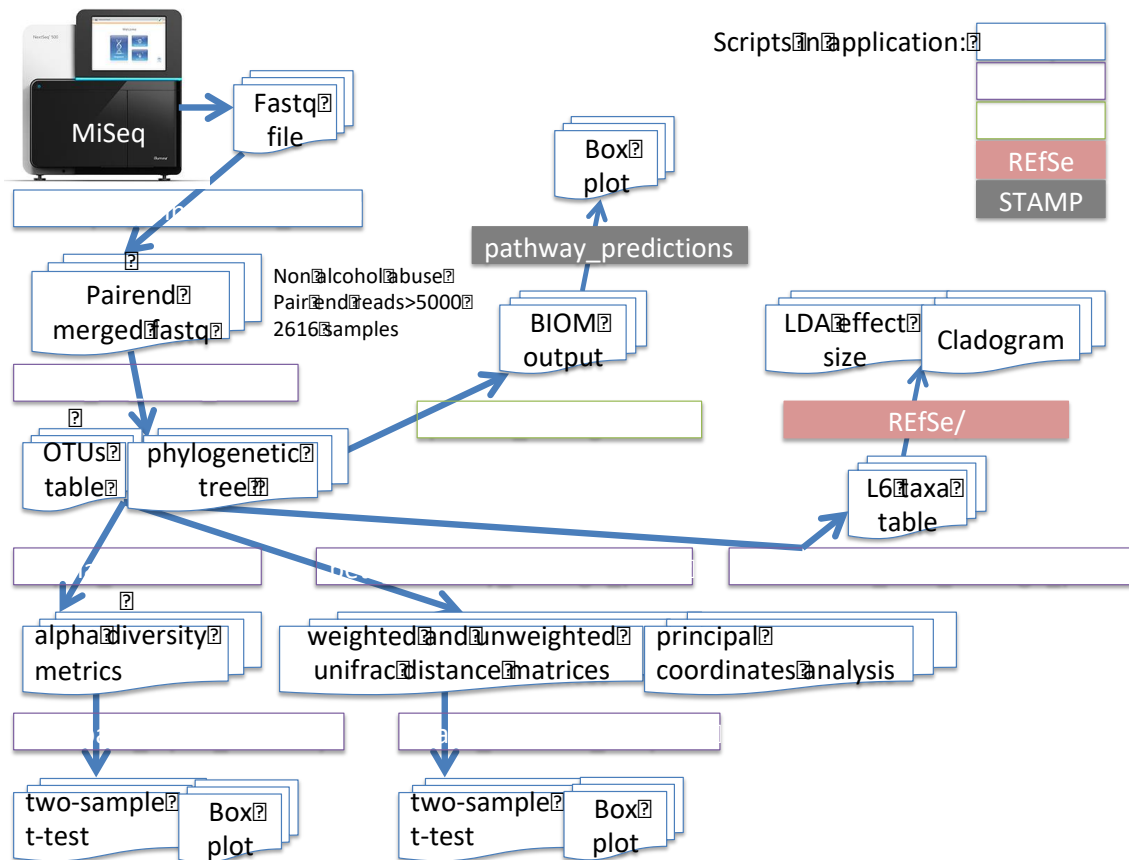


図 4 16s メタゲノム解析パイプライン

2.6 動物実験

13 番染色体に認められた関連領域近傍にマップされた遺伝子群から機能遺伝子を同定するために、AAV ベクターを用いたマウスでのノックダウン・スクリーニングと、機能的関連が認められた遺伝子のノックアウトマウス作製を行った。C57BL/6(日本クレア)マウスは明暗 12 時間サイクルの環境下で、水および餌は自由摂取できる状態で飼育した。

ノックダウン・スクリーニングの実験では *Dopachrome tautomerase (Dct)*、*Glypican proteoglycan 6 (Gpc6)*、*G protein-coupled receptor 180 (Gpr180)*、*TDP-glucose 4,6-dehydratase (Tgds)* 4 つの遺伝子の shRNA テンプレートを pAAV8-U6 に挿入し、コントロールの GFP を含めた 5 種類の AAV ベクター(AAV8-shDct、

shGpc6、shGpr180、shTgds、GFP)を作製した。また過剰発現実験では pW-CAG ベクターに *GPR180* あるいは GFP cDNA を挿入し、2 種類の AAV ベクターを作製した(図 5)。AAV の投与は尾静脈より行い、1 匹あたり 1×10^{11} vg/200 μ l となるように濃度調整を行った。実験には C57BL/6 マウス 8 週齢の雄を使用し、AAV ベクター投与から 1 週間後よりコリン欠乏メチオニン減量飼料(EP トレーディング株式会社、A06083101)を開始し、さらに 1 週間後に肝臓での脂肪沈着の評価を行った(図 6)。

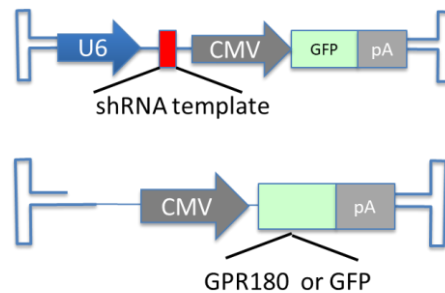


図 5 pAAV8-U6 と pW-CMV から作出される AAV8 ベクターの構造

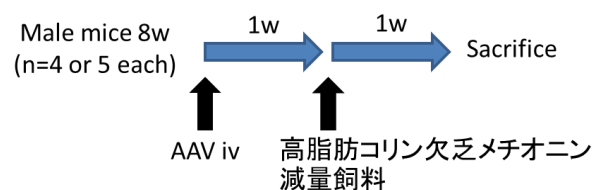


図 6 ノックダウンおよび過剰発現実験デザイン

Gpr180 ノックアウトマウスについては筑波大学生命科学動物資源センターに依頼して、CRISPER/CAS9 システムによる C57BL/6 ノックアウトマウスを作製した。Left target sequence:CCATGCAGCTCGTCATTTGTCAC、Right target sequence:TGAAATAATCGCCTTAATCCGGG のガイド RNA を用いて、エクソン 6

を 3 の倍数でない塩基の欠損によりフレームシフトさせるデザインとした。ノックアウトマウスのタイピングについてはエクソン 6 欠損部をプライマーが挟む形に設計し (forward primer:TGTGCTTCTACGGCAGGTGA、reverse primer:GAATGACTTTTAGGAAG CAGT)、PCR 産物のサイズによって判定を行った(図 7)。全ての動物実験は自治医科大学動物実験委員会での承認を得て行った。

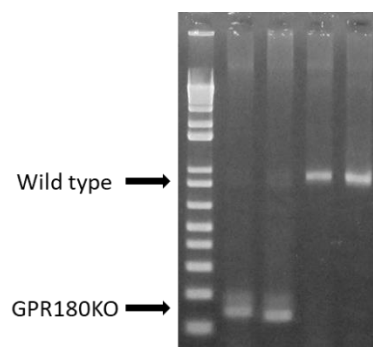


図 7 Gpr180 ノックアウトマウスのタイピング

2.7 血液生化学検査

マウスの血清中の総コレステロール、中性脂肪、Alanine aminotransferase (ALT) は富士ドライケムスライド(富士フイルム株式会社)を用いて測定した。血糖値は Accu-Check (ロシュ DC ジャパン株式会社)を使用した。

2.8 マウス肝臓からの脂質の抽出

深麻酔下に摘出した肝臓約 100mg をミリ Q 200μl 内で、バイオマッシャーII(株式会社ニッピ)を用いてホモジェナイズ後、クロロホルム・メタノール混液(2:1、v/v)を用いて脂質を抽出した。ドラフト内で 60℃加温により一晩かけて乾固させた後、10%Triton とイソプロパノール混液で再溶解し、LabAssay™ Triglyceride(富士フイルム和光純薬株式会社)で定量した。

2.9 オイルレッド O 染色

肝臓の凍結検体をクライオスタット(Leica)で 10 μ m の厚さで切り出し、10%ホルマリンにて 10 分室温で固定した。リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered salts: PBS)で 2 回洗浄したのちに、60%イソプロパノールで 1 分間置換し、オイルレッド O 染色液(武藤化学株式会社)で 15 分間染色した。染色後に再度 PBS で 2 回染色し、水溶性の封入剤 MOUNT-QUICK “AQUEOUS” (コスモバイオ株式会社)により観察標本とした。

2.10 遺伝子発現解析

肝臓採取後直ちに solution D 溶液内でホモジェナイズし、酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム法により肝臓の RNA の抽出を行った。

リアルタイム PCR は、抽出した RNA を逆転写酵素により cDNA とし、gene specific primer pair と KAPA SYBR Fast qPCR Kit を用いて Applied Biosystems ViiA7™ (Life Technologies)によりハウスキーピング遺伝子 36b4 に対する発現量を定量した。

マイクロアレイ解析は、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray v2 にハイブリダイゼーションを行い、Agilent Microarray Scanner で DNA マイクロアレイのイメージを読み取り、Feature Extraction Software (v.11.5.1.1) にて各スポットの蛍光シグナルを数値化した。P<0.05、発現差 2 倍以上の遺伝子群を対象として KEGG をプラットフォームに、DAVID によるパスウェイ解析を行った。

RNA-Seq 解析は、total RNA を illumina の TruSeq Staranded mRNA Library Prep Kit を用いてプロトコールに従ってライブラリー作成を行い、NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles)、NextSeq500 システムを用いて解析を行った。出力された Fastq ファイルは illumina が BaseSpace で提供しているコアアプリケ

ーションである TopHat Alignment を実行したのちに、Cufflinks Assembly & DE により Fragments per kilobase per million mappable (FPKM) ファイルおよび Differential expression (DIFF) ファイルを出力した。FPKM ファイルは、さらに Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイをプラットフォームに gene set enrichment analysis (GSEA) 解析を行い[28]、P 値 5%以下もしくは FDR が 25%以下のものを 2 群間で有意に変動した遺伝子群と判断した。

2.11 ウエスタンブロッティング

肝臓から抽出したタンパク質を PierceTM BCA Protein Assay Kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)にて濃度測定し、各サンプルが 30 μ g となるように調整した。SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、Immobilon メンブレン(Merck Millipore)にブロティング後、0.3% スキムミルクにて 1 晩ブロッキングを行った。1 次抗体に anti-GSK-3 β (D5C5Z) XP Rabbit mAb、anti-Phospho-GSK-3 β (Ser9)(D85E12) XP Rabbit mAb、anti- β -Catenin(6B3) Rabbit mAb、anti-Phospho- β -Catenin(Ser33/37/Thr41) Antibody、anti-Akt(pan)(E7J2C) Mouse mAb、anti-Phospho-Akt(Ser473)(D9E) XP Rabbit mAb(Biotinylated)、anti-mTOR(7C10) Rabbit mAb、anti-Phospho-mTOR(Ser2448)(D9C2) XP Rabbit mAb (CST ジャパン株式会社)、anti-SREBP1 (Santa Cruz) を用い、2 次抗体は HRP-labeled anti-Rabbit 抗体もしくは anti-Mouse 抗体を 2000 倍希釈で用いた。染色は SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)で行った。

2.12 統計解析

HLA アレルの頻度の解析には Fisher 正確確率検定を用いた。また GWAS で同

定された SNP と NAFLD の関連解析にはロジスティック回帰分析を用いた。統計解析は R v3.1.2 で行い、有意水準は $P<0.05$ とした。

3. 結果

3.1 GWAS に用いた母集団と leanest NAFLD パネルの臨床的特徴

3 つの横断研究および GWAS のケース群パネル 275 名の臨床的特徴を下に示す(表 2)。GWAS パネルの leanest NAFLD は BMI、腹囲、HbA1c が母集団に比べて有意に低かったが、LDL コレステロールは有意に高かった。さらに、leanest NAFLD 群と非 NAFLD 群を比較すると BMI と腹囲には差がなく、HbA1c は低かった。しかし、血中脂質レベルについては HDL コレステロールが低く、LDL コレステロール、中性脂肪が高い特徴が認められた。

表 2 3 つの横断研究および leanest NAFLD 群の臨床プロファイル

	横断研究 I	横断研究 II	横断研究 III	総数	leanest NAFLD	
対象者数	2229	3325	3420	8974	275	
性別(女性割合)	46.3%	55.9%	44.2%	49.0%	50.7%	
年齢	52.13 ± 9.43	59.18 ± 14.24	54.98 ± 9.82	55.81 ± 11.89	54.01 ± 9.91	**
BMI (kg/m ²)	23.55 ± 3.498	23.36 ± 3.461	23.48 ± 3.579	23.45 ± 3.516	21.67 ± 1.44	**
腹囲 (cm)	84.31 ± 9.452	81.52 ± 9.502	85.19 ± 9.712	83.62 ± 9.708	80.97 ± 4.77	**
収縮期血圧(mmHg)	123.9 ± 15.03	127.1 ± 18.59	123.9 ± 13.74	125.0 ± 16.04	123.7 ± 15.3	*
拡張期血圧 (mmHg)	78.19 ± 9.983	74.98 ± 10.66	76.84 ± 10.35	76.51 ± 10.45	75.02 ± 10.2	
総コレステロール(mg/dl)	210.1 ± 34.12	200.8 ± 34.98	208.8 ± 34.23	206.3 ± 34.71	213.5 ± 32.1	
中性脂肪(log10mg/dl)	1.99 ± 0.231	1.98 ± 0.214	1.96 ± 0.224	1.97 ± 0.223	1.97 ± 0.22	
HDLコレステロール (mg/dl)	63.54 ± 16.24	59.11 ± 16.22	67.71 ± 18.05	63.77 ± 17.38	65.47 ± 15.2	*
LDL コレステロール(mg/dl)	125.7 ± 29.68	120.3 ± 30.42	124.4 ± 29.50	123.4 ± 29.93	130.2 ± 28.5	*
HbA1c (%)	5.34 ± 0.619	5.45 ± 0.957	5.71 ± 0.621	5.53 ± 0.741	5.33 ± 0.52	**
喫煙者割合(%)	15.8%	14.8%	12.7%	14.3%	11.8%	
多飲酒者 (>30g/day, %)	14.3%	0%	12.5%	8.3%	0.0%	
糖尿病有病率 (%)	13.9%	11.0%	9.3%	11.1%	2.8%	
脂質異常症有病率(%)	11.8%	18.0%	20.9%	17.6%	13.5%	
高血圧有病率(%)	17.2%	32.2%	20.8%	24.1%	25.0%	

leanest NAFLD 群と総数とでスチューデント t 検定を行い、* P<0.05、** P<0.01 で示した。

3.2 GWAS の結果

今回の GWAS ではゲノムワイド有意水準 ($P < 5.0E-08$) を満たす遺伝子座は認めなかったが、suggestive level ($P < 1.0E-06$) で 4 つの遺伝子座を同定することができた (図 8)。

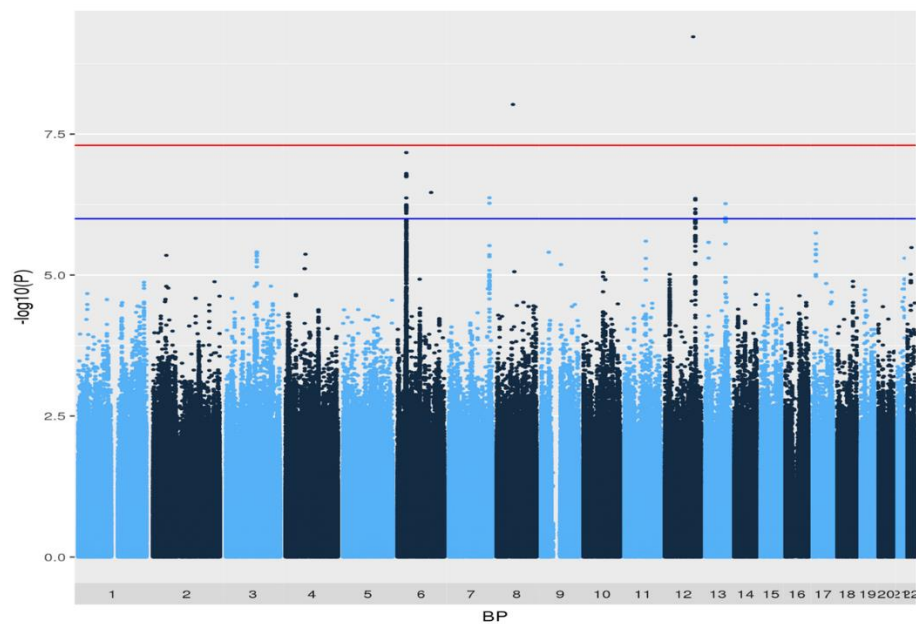


図 8 GWAS マンハッタンプロット

赤線がゲノムワイド有意水準($P=5.0E-08$)、青線が suggestive level ($P=1.0E-06$)を示している。第 6 番、第 7 番、第 12 番、第 13 番染色体の 4 つで suggestive level を満たす遺伝子座を同定した。なお第 8 番染色体および 12 番染色体のゲノムワイド有意水準を越える 2 つのプロットはタイピングエラーである。

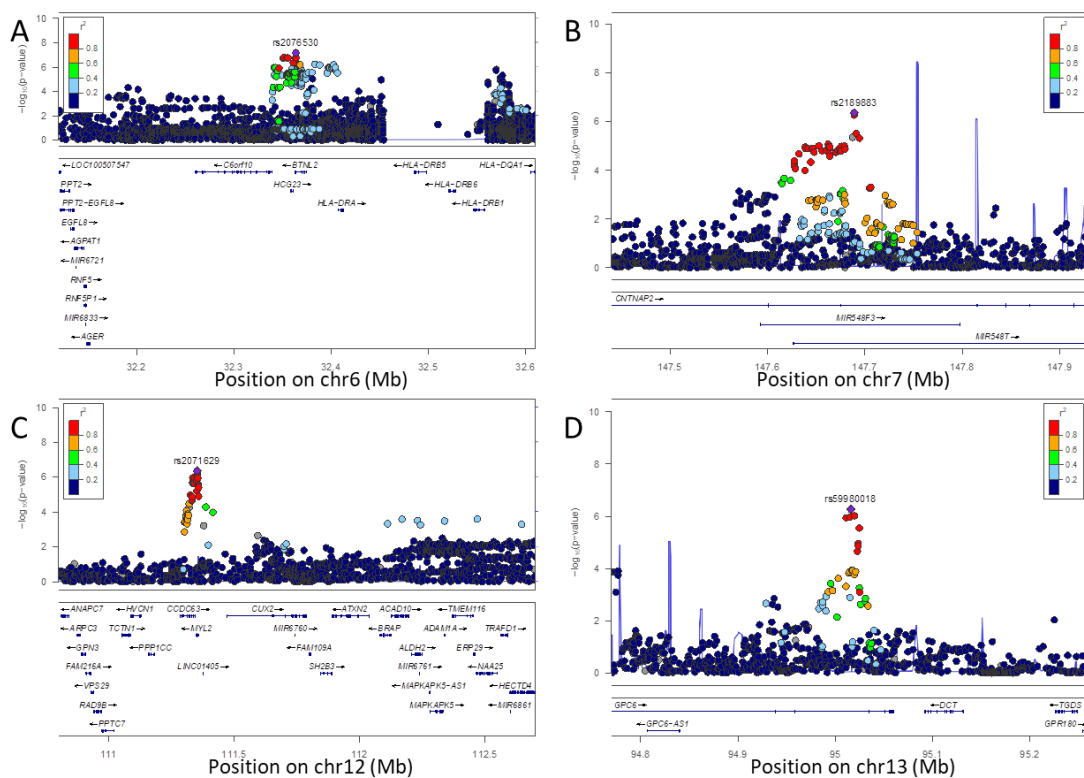


図9 GWASでsuggestive levelを示した4つの遺伝子座のローカスズーム

A. 第6番染色体 rs2076530 B. 第7番染色体 rs2189883

C. 第12番染色体 rs2071629 D. 第13番染色体 rs59980018

今回のGWASで同定された4つの遺伝子座のローカスズーム。縦軸は対数表示でP値が示されおり、横軸は染色体ポジションおよびそれに対応する遺伝子名が示されている。紫のプロットはリードSNPを表しており、その他のプロットはリードSNPに対する連鎖不平衡係数 r^2 が色で示されている。

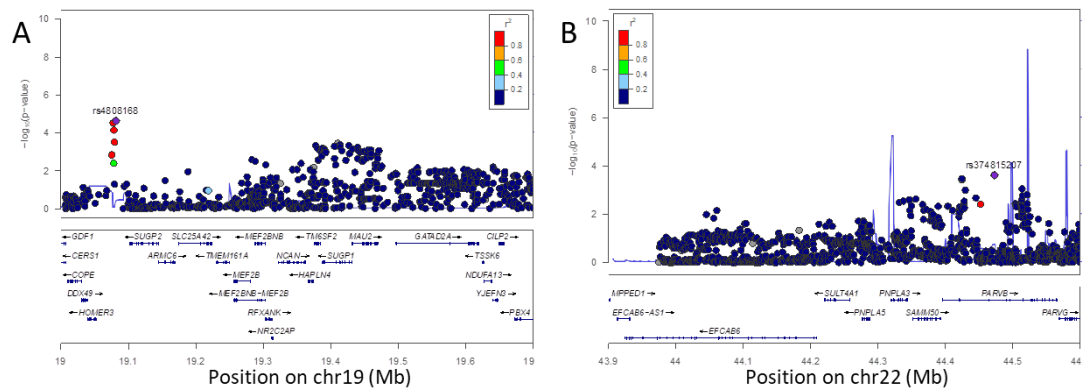


図 10 *TM6SF2* および *PNPLA3* のローカスズーム

A. *TM6SF2* (第 19 番染色) B. *PNPLA3* (第 22 番染色体)

最も強い関連が見られたのは第 6 番染色体の lead SNP, rs2076530 ($P=6.73E-08$) である。この SNP は *BTLN2* 遺伝子第 5 エキソンに位置しており、*HLA-B* と *HLA-DRB1* に挟まれて存在している(図 9A)。2 番目に関連が深かったのは第 7 番染色体の lead SNP, rs2189883 ($P=4.25E-07$)であり、microRNA である MIR548F3 のコアシーケンスに位置している (図 9B)。3 番目に関連が深かったのは第 12 番染色体の lead SNP, rs2071629 ($P=4.39E-0.7$)であり、*aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2)* にある飲酒量関連機能性 SNP, rs671 と連鎖不均衡にある *Myosin regulatory light chain 2(MYL2)* 遺伝子第 4 イン트ロンに位置している (図 9C) [29]。4 番目に関連が深かったのは第 13 番染色体の lead SNP, rs59980018 ($P=5.43E-07$)で *GPC6* 遺伝子のイントロン 6 に位置している (図 9D)。過去の NAFLD の GWAS において深い関連が明らかとなっていた *TM6SF2* と *PNPLA3* の機能性 missense SNP は、有意水準に達しなかった(図 10A、10B)。

次にこれら 4 つの遺伝子座が leanest NAFLD だけでなく全 NAFLD で関連を示すかどうかについて、横断研究 I と III の合わせて 5649 サンプルにおいて、ロジスティック回帰分析を行った(表 3、モデル 1)。第 6、12、13 染色体については

secondary lead SNP である rs2076529、rs2301610、rs66781047 のタイピングを行い、マイナーアレルの additive model を用いた。性別および HbA1c を共変量として解析を行うと、rs2076529 のマイナーアレル (OR 1.22, 95%CI 1.11-1.34, $P=2.84E-05$)は有意にリスクを上昇させ、また rs2189883 (OR 1.17, 95%CI 1.04-1.32, $P=1.02E-02$)は有意ではないがリスクを上げる傾向を示した。*TM6SF2* と *PNPLA3* の機能性 SNP についても同様に解析を行い、rs58542926 (OR 1.34, 95%CI 1.14-1.58, $P=4.47E-04$)、および rs738409 (OR 1.37, 95%CI 1.25-1.51, $P=3.77E-11$)のリスクアレルは、全 NAFLD では既報通り有意にリスク上昇を示した。

しかしながら、NAFLD の最も強力な説明変数である BMI を共変量に加えてロジスティック解析を行うと(表 3、モデル 2)、rs58542926 と rs738409 では関連が深くなるのに対して、rs2076529、rs2189883 では関連が弱くなった。さらに BMI を目的変数として分散分析 (analysis of variance: ANOVA) を行うと rs2076529、rs2301610、rs66781047 の 3 つの SNPs は男性もしくは女性において有意な関連を示した(表 4)。これらの結果から、今回見つかった 4 つの遺伝子座は肥満と交絡しながら NAFLD と関連する遺伝子座である可能性が示唆された。

表 3 GWAS 統計量および一般集団でのロジスティック回帰分析結果

SNP	chr	leanest NAFLD群 GWAS			モデル1 (性別+HbA1c)			モデル2(性別+HbA1c+BMI)			
		OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	HWE P #
rs2076529	6	1.66	(1.37-2.00)	1.73E-07	1.22	(1.11-1.34)	2.84E-05	1.19	(1.07-1.33)	1.34E-03	0.1672
rs2189883	7	1.77	(1.42-2.22)	4.25E-07	1.17	(1.04-1.32)	1.02E-02	1.21	(1.05-1.39)	1.03E-02	0.6676
rs2301610	12	1.70	(1.38-2.09)	7.67E-07	1.04	(0.94-1.15)	4.52E-01	1.10	(0.97-1.25)	1.21E-01	0.5596
rs66781047	13	1.74	(1.39-2.17)	9.59E-07	1.07	(0.95-1.21)	2.73E-01	1.03	(0.90-1.18)	6.81E-01	0.8348
rs58542926	19				1.34	(1.14-1.58)	4.47E-04	1.50	(1.24-1.82)	4.16E-05	0.0838
rs738409	22	1.251		0.04862	1.37	(1.25-1.51)	3.77E-11	1.55	(1.38-1.73)	1.99E-14	0.4656

モデル 1 は性別および HbA1c を共変量に、モデル 2 は性別、HbA1c、BMI を共変量としてロジスティック回帰分析を行った結果である。#はハーディーワインベルグ平衡検定の P 値を示している。

表 4 リード SNP と BMI との関連

	男性平均体重			P	女性平均体重			P
	メジャーアレルホモ	ヘテロ	マイナーアレルホモ		メジャーアレルホモ	ヘテロ	マイナーアレルホモ	
rs2076529	24.0±3.3	24.4±3.5	24.5±3.0	0.027	22.5±3.5	22.7±3.8	23.0±3.8	0.087
rs2189883	24.3±3.3	24.3±3.5	24.2±3.0	0.947	22.6±3.7	22.9±3.8	22.5±3.5	0.221
rs2301610	24.5±3.3	24.1±3.4	23.5±3.3	0.0021	22.7±3.7	22.6±3.7	23.0±4.4	0.693
rs66781047	24.3±3.4	24.1±3.2	24.3±3.7	0.447	22.6±3.7	22.8±3.8	23.7±3.7	0.023
rs58542926	24.3±3.3	24.5±3.6	22.8±2.8	0.112	22.7±3.7	22.8±3.6	21.6±3.2	0.373
rs738409	24.3±3.5	24.2±3.3	24.3±3.4	0.857	22.6±3.9	22.8±3.6	22.7±3.7	0.576

SNP 遺伝子型によって男女によって平均体重に差があるかどうか、ANOVA 検定を行い P 値を示した。平均値±標準偏差で値を示している。

3.3 第6番染色体 rs2076529 と HLA の関連性

最も強い関連が見られた第6番染色体の *BTLN2* を含むゲノム領域は HLA class I、class II をカバーする広い連鎖不平衡を示すことが知られており、真の疾患感受性遺伝子は HLA ではないかと仮説を立て、インピュテーション法による HLA タイピングを、GWAS パネルで行った。HLA 遺伝子座ごとに東北メディカルメगाバンクのコントロール群と leanest NAFLD 群間でアレル分布に差がないかどうか Fisher 正確確率検定を行い、HLA-B ($P=0.028$)、HLA-DQB1 ($P=0.0065$)、HLA-DRB1 ($P=0.00050$) においてアレル分布に有意な差を認めた(表 5A-F、study1)。さらに、それぞれの HLA アレルでは、HLA-B*40:01、-B*54:01、-C*03:04、-DRB1*04:04、-DRB1*04:05、-DRB1*12:02、-DQB1*04:01 で 2 群間に有意差を認めた。

さらなる HLA と NAFLD の関連性を評価するために横断研究 I と III を合わせたパネルで非 NAFLD 群と NAFLD 群でアレル頻度に差があるかどうか検証した。5649 名分の HLA タイピングを行うために HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1、-DPB1 のエクソン 2、3 を PCR にて増幅し、次世代シーケンサ法でタイピングを行った。しかしながら HLA-DRB1 についてはこれまでの日本でアレル頻度の分布と著しく異なっていたため[30][31]、タイピングエラーと判断し解析から除外した。その結果 HLA-DQB1 の分布では有意差を認めなかったが($P=0.433$)、HLA-B のアレル分布に有意差を認めた($P=0.013$) (表 5A-F、study2)。

さらに HLA-B の 4 digit アレルの中では HLA-B*54:01 に有意差が認められ($P=0.0099$, OR=1.25)、リスクアレルである可能性が明らかになった。

表 5A HLA-A と NAFLD の関連解析

A allele	Study1				Study2			
	control	leanestNAFLD	OR	P §	control	whole NAFLD	OR	P §
A*01:01	16	1	0.32	0.5029	21	15	1.01	1.0000
A*02:01	323	61	0.98	0.9416	492	366	0.97	0.6360
A*02:06	271	50	0.96	0.8735	382	315	0.86	0.0658
A*02:07	112	21	0.97	1.0000	179	124	1.04	0.7671
A*03:01	13	2	0.80	1.0000	11	11	0.72	0.5179
A*11:01	240	49	1.06	0.7392	469	328	1.03	0.6789
A*24:02	988	202	1.06	0.5220	1845	1373	0.95	0.2623
A*26:01	254	36	0.73	0.1105	366	262	1.01	0.9665
A*26:03	70	6	0.44	0.0563	137	87	1.14	0.3729
A*31:01	251	55	1.14	0.4187	458	289	1.16	0.0685
A*33:03	188	43	1.19	0.3566	375	260	1.04	0.6461
other	0	0			389	262	1.08	0.3864
total	2726	526			5124	3692		
P (Multiallelic)*	0.3613				0.3818			

P(multiallelic)*値は複数のアレルに対して行った Fisher 正確確率検定の値を、P§ は 1 つのアレルに対して 2x2 クロス表で行った Fisher 正確確率検定の値を表している。Study1 は GWAS を行ったパネルで、control は東北メディカルメガバンクのコントロール群を表している。また Study2 は横断研究IとIIIを母集団とするパネルで非 NAFLD 群を control としている。

表 5B HLA-B と NAFLD の関連解析

HLA-B Allele	Study1				Study2			
	control	leanestNAFLD	OR	P §	control	NAFLD	OR	P §
B*07:02	153	32	1.08	0.6818	261	210	1.12	0.2500
B*13:01	23	7	1.58	0.3158	46	42	1.26	0.2790
B*15:01	246	45	0.95	0.8031	407	332	1.14	0.0941
B*15:07	8	1	0.65	1.0000	26	30	1.59	0.1024
B*15:11	17	3	0.92	1.0000	36	41	1.58	0.0487
B*15:18	50	9	0.93	1.0000	78	53	0.94	0.7892
B*35:01	238	49	1.07	0.6766	366	281	1.07	0.4564
B*37:01	19	5	1.36	0.5750	23	22	1.32	0.3662
B*39:01	108	20	0.96	1.0000	161	121	1.04	0.7594
B*40:01	155	29	0.97	1.0000	243	166	0.94	0.5728
B*40:02	279	32	0.59	0.0054	340	236	0.96	0.6311
B*40:03	3	1	1.73	0.5065	24	8	0.46	0.0711
B*40:06	117	24	1.06	0.8152	183	120	0.90	0.4074
B*44:02	15	1	0.35	0.4941	24	21	1.21	0.5471
B*44:03	167	39	1.21	0.2862	360	246	0.94	0.4951
B*46:01	154	20	0.67	0.1105	238	155	0.90	0.3205
B*48:01	96	10	0.54	0.0781	143	108	1.04	0.7459
B*51:01	221	48	1.13	0.4915	383	250	0.89	0.1951
B*51:02	2	2	5.19	0.1255	9	10	1.54	0.3612
B*52:01	266	64	1.25	0.1386	690	520	1.05	0.4708
B*54:01	177	53	1.55	0.0100	316	281	1.25	0.0099
B*55:02	23	2	0.45	0.4117	115	65	0.78	0.1096
B*56:01	20	1	0.26	0.2330	50	25	0.69	0.1581
B*56:03	5	0	0.00	1.0000	11	2	0.25	0.0875
B*58:01	18	3	0.86	1.0000	29	21	1.00	1.0000
B*59:01	51	13	1.32	0.3909	84	61	1.00	1.0000
B*67:01	55	5	0.47	0.1112	51	27	0.73	0.2056
other	136	32	0.81	0.30	415	246	0.81	0.0098
total	2686	518			5112	3700		
P (Multiallelic)*	0.0285				0.0130			

表 5C HLA-C と NAFLD の関連解析

C Allele	Study1				Study2			
	control	leanestNAFLD	OR	P §	control	whole NAFLD	OR	P §
C*01:02	505	99	1.05	0.7170	804	589	0.99	0.8151
C*03:02	18	3	0.89	1.0000	33	20	1.19	0.5787
C*03:03	437	75	0.92	0.5572	518	382	0.98	0.7482
C*03:04	399	52	0.70	0.0179	591	390	1.11	0.1492
C*04:01	120	32	1.43	0.0893	260	202	0.93	0.4383
C*05:01	16	1	0.33	0.4995	15	13	0.83	0.7024
C*06:02	30	9	1.60	0.2657	41	37	0.80	0.3568
C*07:02	385	65	0.90	0.5341	583	406	1.04	0.5609
C*07:04	32	4	0.67	0.6441	47	31	1.10	0.7307
C*08:01	223	38	0.91	0.6593	312	223	1.01	0.9280
C*08:03	42	6	0.76	0.6901	65	49	0.96	0.8487
C*12:02	273	67	1.31	0.0634	631	479	0.94	0.3793
C*12:03	1	0	0.00	1.0000	15	11	0.98	1.0000
C*14:02	168	33	1.05	0.7660	291	195	1.08	0.4215
C*14:03	174	38	1.17	0.3848	380	267	1.03	0.7406
C*15:02	75	20	1.43	0.1572	126	106	0.85	0.2518
other	0	0			340	246	1.00	1.0000
total	2898	542			5052	3646		
P (Multiallelic)*	0.1054				0.6532			

表 5D HLA-DRB1 と NAFLD の関連解析

DRB1 Allele	Study1				Study2			
	control	leanestNAFLD	OR	P §	control	whole NAFLD	OR	P §
DRB1*01:01	171	35	1.09	0.62324	438	336	not tested	not tested
DRB1*03:01	3	0	0.00	1.00000	2	1		
DRB1*04:01	28	3	0.57	0.46252	2	0		
DRB1*04:03	76	18	1.27	0.38930	0	0		
DRB1*04:04	2	3	8.02	0.03072	0	0		
DRB1*04:05	302	93	1.65	0.00018	0	0		
DRB1*04:06	91	19	1.12	0.68978	0	0		
DRB1*04:10	49	8	0.87	0.85523	0	0		
DRB1*08:02	145	18	0.66	0.12035	273	195		
DRB1*08:03	255	34	0.71	0.07453	531	378		
DRB1*09:01	429	63	0.78	0.09391	1	0		
DRB1*10:01	20	4	1.07	0.78343	28	27		
DRB1*11:01	72	8	0.59	0.21080	144	77		
DRB1*12:01	101	17	0.90	0.79699	232	149		
DRB1*12:02	36	14	2.08	0.02972	82	72		
DRB1*13:01	17	3	0.94	1.00000	30	22		
DRB1*13:02	172	35	1.09	0.62481	424	270		
DRB1*14:03	55	4	0.39	0.06846	97	71		
DRB1*14:05	61	13	1.14	0.63045	96	66		
DRB1*14:06	50	6	0.64	0.35855	99	67		
DRB1*14:07	2	0	0.00	1.00000	65	39		
DRB1*14:54	95	13	0.73	0.34667	151	84		
DRB1*15:01	249	32	0.69	0.05777	415	316		
DRB1*15:02	252	68	1.44	0.13690	869	640		
DRB1*16:02	25	5	1.07	0.80376	69	34		
other	0	0			912	702		
total	2758	516			4518	3209		
P (Multiallelic)*	0.0005				not tested			

Study2 においてタイピングが正確にできなかったため解析対象から除外した。

表 5E HLA-DQB1 と NAFLD の関連解析

DQB1 Allele	Study1				Study2			
	control	leanestNAFLD	OR	P §	control	whole NAFLD	OR	P §
DQB1*02:01	2	0	0.00	1.0000	1	2	2.38	0.5958
DQB1*03:01	357	50	0.76	0.0929	328	236	0.84	0.05406
DQB1*03:02	287	56	1.06	0.6970	259	239	1.11	0.2978
DQB1*03:03	474	70	0.80	0.1082	463	382	0.98	0.7626
DQB1*04:01	322	98	1.65	0.0001	328	311	1.15	0.1164
DQB1*04:02	104	16	0.83	0.6076	113	102	1.08	0.6248
DQB1*05:01	194	39	1.09	0.6412	171	163	1.14	0.2561
DQB1*05:02	81	14	0.94	1.0000	69	42	0.72	0.1016
DQB1*05:03	125	20	0.87	0.6399	96	86	1.07	0.7051
DQB1*06:01	518	102	1.07	0.5894	581	479	0.97	0.7037
DQB1*06:02	241	30	0.68	0.0529	170	148	1.04	0.7716
DQB1*06:03	16	3	1.02	1.0000	11	11	1.18	0.8309
DQB1*06:04	162	34	1.14	0.4807	168	128	0.90	0.4004
DQB1*06:09	13	2	0.83	1.0000	16	9	0.67	0.4219
other	0	0			19	14	0.87	0.7298
total	2896	534			2793	2352		
P (Multiallelic)*	0.0065				0.4333			

表 5F HLA-DPB1 と NAFLD の関連解析

DPB1 Allele	Study1				Study2 §			
	control	leanestNAFLD	OR	P §	control	whole NAFLD	OR	P §
DPB1*02:01	710	132	0.99	1.0000	641	556	1.05	0.5069
DPB1*02:02	124	23	0.99	1.0000	118	75	0.75	0.05581
DPB1*03:01	141	28	1.06	0.7468	87	68	0.93	0.6829
DPB1*04:01	107	24	1.20	0.4641	113	101	1.02	0.8888
DPB1*04:02	274	51	0.99	1.0000	227	194	1.02	0.8382
DPB1*05:01	1196	208	0.93	0.4311	882	747	1.02	0.8093
DPB1*06:01	4	0	0.00	1.0000	15	17	1.35	0.477
DPB1*09:01	242	58	1.28	0.1189	317	247	0.92	0.3702
DPB1*13:01	56	10	0.95	1.0000	28	29	1.24	0.426
DPB1*14:01	35	8	1.22	0.6726	27	26	1.15	0.6781
DPB1*19:01	15	2	0.71	1.0000	3	5	1.99	0.4816
other	0	0			308	253	0.98	0.8223
total	2904	544			2766	2318		
P (Multiallelic)*	0.8581				0.7366			

3.4 HLA 多型と腸内細菌叢の関連性

HLA 多型が生活習慣病と関連があるとの報告はあるがそのメカニズムについては十分にわかっていない。NAFLD と腸内細菌叢の関連性については近年注目されており、GWAS によって見いだされた HLA 領域は、その免疫制御のバリエーションが腸内細菌叢の dysbiosis(腸内細菌叢異常)を引き起こすことで、NAFLD に関与しているのではないかと仮説を立てた。

横断研究 III では腸内細菌叢の解析データが付随しており、これを用いて関連遺伝子座と腸内細菌叢の関連解析を行うこととした。この横断研究ではより多くの研究参加者を募るために便潜血残余検体を用いて腸内細菌叢の解析を行ったが、これに先立ち便潜血残余検体で腸内細菌叢の評価を行うことができるかどうかを 26 人の健常者ボランティアを用いて予備的実験を行った。便採取後に直ちに DNA 抽出処理をした検体(F)と、便潜血容器に採取して 1 日以上経過した検体(O)とで腸内細菌叢の構成に変化があるかどうかについて検討した(図 11)。その結果、主座標分析(unweighted) および taxonomy 解析において、便潜血残余検体は新鮮便サンプルとの高い類似性を示し、大規模解析において有用であると判断した。

横断研究 III の参加者 3420 人のうち、アルコール多飲者 (>20g/day) および 16s リード数が 5000 以下のサンプルを除外した 2616 人を対象に腸内細菌叢解析を行った。対象者を non-NAFLD 群、non-obese NAFLD 群、obese NAFLD 群の 3 つのグループに分け、その臨床的特徴を表 6 にまとめた。

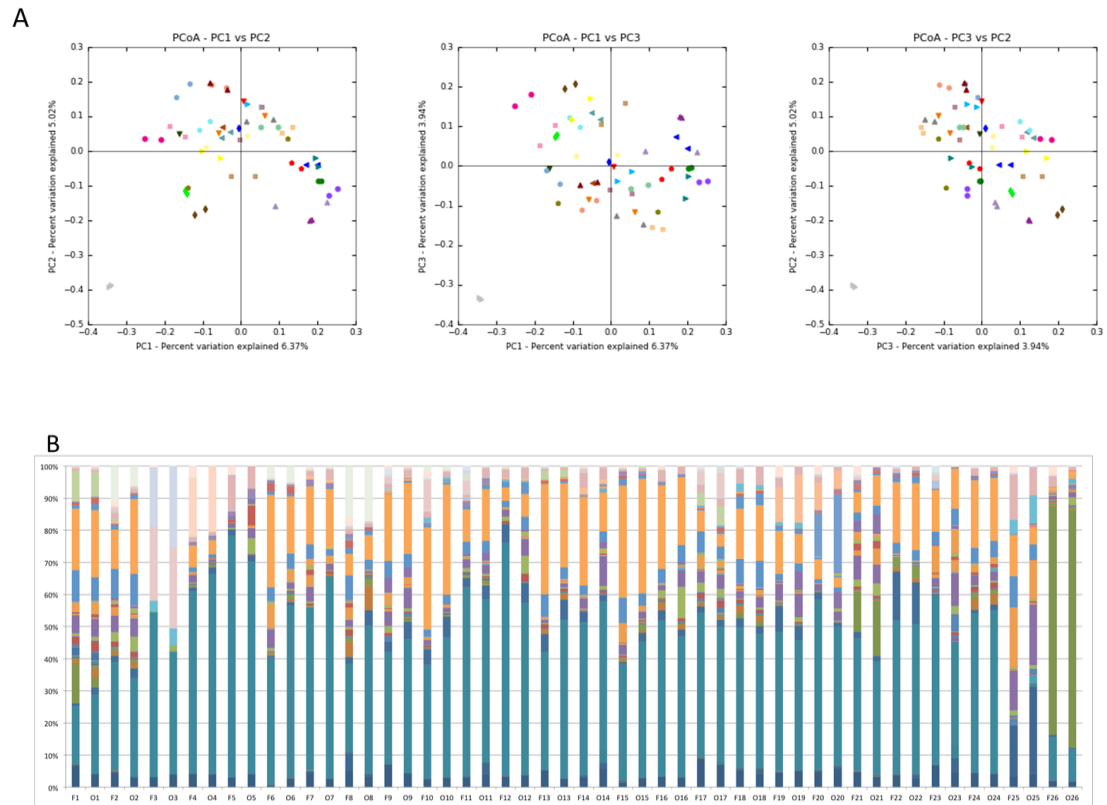


図 11 新鮮便と便潜血残余検体の taxonomy 解析および主座標分析

A.2 次元主座標分析(unweighted)。同一人物の 2 つの検体を同じ形と色でプロットし、腸内細菌叢の類似度を示している。B.新鮮便(F)と便潜血残余検体(O)として Family level での taxonomy 解析の結果。

表 6 腸内細菌叢解析 3 群の臨床的特徴

	non-NAFLD群	non-obese NAFLD群	t検定*	obese NAFLD群	t検定\$
対象者数	1509	599		643	
性別(女性割合)	62.7%	40.4%		39.2%	
年齢	54.13 ± 10.36	56.39 ± 9.43	<0.01	54.64 ± 9.09	>0.05
BMI (kg/m ²)	21.50 ± 2.55	23.10 ± 1.40	<0.01	28.20 ± 2.96	<0.01
腹囲 (cm)	79.43 ± 7.48	85.38 ± 4.92	<0.01	96.49 ± 7.90	<0.01
収縮期血圧(mmHg)	120.0 ± 13.87	124.4 ± 12.78	<0.01	128.3 ± 12.70	<0.01
拡張期血圧 (mmHg)	73.69 ± 10.16	77.00 ± 9.51	<0.01	80.23 ± 9.82	<0.01
総コレステロール(mg/dl)	209.4 ± 34.17	210.9 ± 34.29	>0.05	207.5 ± 35.12	>0.05
中性脂肪(log10mg/dl)	1.86 ± 0.19	2.03 ± 0.21	<0.01	2.07 ± 0.20	<0.01
HDLコレステロール (mg/dl)	74.53 ± 18.07	61.80 ± 14.91	<0.01	56.83 ± 12.50	<0.01
LDL コレステロール(mg/dl)	122.2 ± 28.65	129.4 ± 30.16	<0.01	129.6 ± 30.09	<0.01
HbA1c (%)	5.57 ± 0.46	5.79 ± 0.64	<0.01	5.99 ± 0.80	<0.01
喫煙者割合(%)	6.6%	12.0%		14.8%	
多飲酒者 (>30g/day, %)	0.0%	0.0%		0.0%	
糖尿病有病率 (%)	0.7%	1.5%		1.4%	
脂質異常症有病率(%)	14.6%	26.9%		33.1%	
高血圧有病率(%)	10.9%	22.4%		32.0%	

* : non-obese NAFLD と non-NAFLD のスチューデント t 検定の P 値、\$: obese NAFLD と non-NAFLD のスチューデント t 検定の P 値を示している。

まずは一つの環境での種多様性を示す尺度、 α 多様性について non-NAFLD 群と NAFLD 群 (non-obese NAFLD + obese NAFLD)間で比較してみると、これまでの報告と同様に NAFLD 群は α 多様性が有意に減少していることがわかった [32] [33]。次に non-NAFLD 群と non-obese NAFLD 群で比較すると、 α 多様性については non-obese NAFLD 群においても obese NAFLD 群と同様に低下していることがわかった(図 12)。

異なる環境間での種多様性を示す尺度である β 多様性については、組成比を考慮に入れない解析 (unweighted) と考慮に入れる解析 (weighted) のどちらの場合でも UniFrac 群間距離(non-NAFLD vs non-obese NAFLD)は群内距離(non-NAFLD vs non-NAFLD)よりも有意に遠く、non-obese NAFLD は non-NAFLD に比べ β 多様性が明確に異なることが明らかとなった(表 7)。

2 群間においてどの細菌群が変化しているかを評価するために LEfSe の解析を行った。その結果、non-obese NAFLD 群では non-NAFLD 群と比較して *Epsilonproteobacteria* と *Campylobacteriales* が有意に増加し、*Ruminococcaceae*、*Clostridia*、*Firmicutes*、*Feacalibacterium* が有意な減少を示した。この結果は、全 NAFLD 群を non-NAFLD 群と比較した結果と同様の傾向であった。non-obese NAFLD 群の non-NAFLD 群との平均 BMI 差はわずか 1.6 であるにも関わらず、obese NAFLD 群と同程度に腸内細菌叢の dysbiosis が引き起こされていることが初めて明らかになった。

rs2076529 のマイナーアレル保有者と非保有者について腸内細菌叢の解析を行うと、 α 多様性に変化はないが、 β 多様性は 2 群間で差を認めた(表 7)。LEfSe の解析では *Veillonellaceae*、*Fusobacteria* が上昇し、*Verrucomicrobia* は減少していた。また、HLA-B*54:01 の保有者と非保有者間での比較でも α 多様性の変化はないが、 β 多様性には有意に差があり、*Veillonella* や *Gammatimonadales* が増加し、*Verrucomicrobia* や *Akkermansia* が減少していた(図 13)。rs2076529 や HLA-B*54:01 保有者で見られた *Veillonellaceae*、*Fusobacteria*、*Gammatimonadales* の上昇と、*Verrucomicrobia* と *Akkermansia* の減少は NAFLD 群でも同様の傾向を示し、NAFLD のリスクファクターであるという先行研究の結果を支持するものであった。さらに non-obese NAFLD 群で見られた腸内細菌叢について PIRCRUSs 解析を行うと、糖、糖鎖、アミノ酸代謝パスウェイが亢進し、rs2076592 マイナーアレルキャリアは糖代謝パスウェイが亢進していた(図 14)。以上の結果から、HLA 遺伝子座は腸内細菌叢の調節を介して脂肪肝発症に関連している可能性が示唆された。

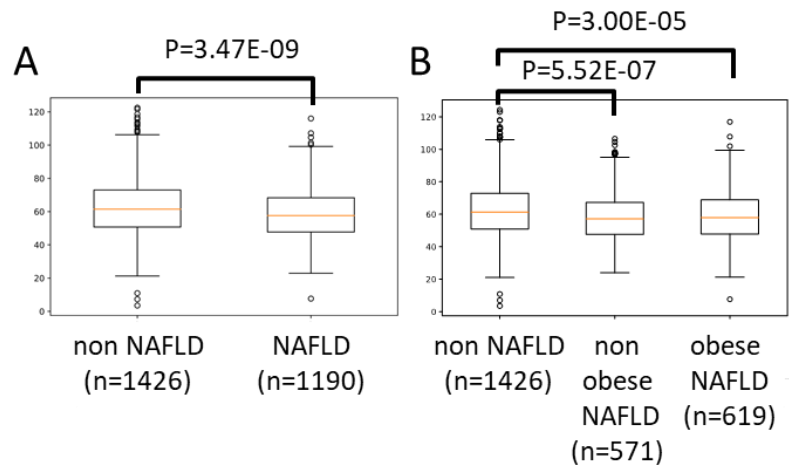


図 12 α 多様性の比較 (PD whole tree)

A. non-NAFLD 群と比較すると NAFLD 群では有意に α 多様性が低下していた。B. non-NAFLD 群と比較すると non-obese、obese NAFLD 両群とも同程度に α 多様性が有意に低下していた。

表 7 UniFrac 距離の比較

Group1(群内距離)	Group2(群間距離)	unweighted		weighted	
		t検定	p値	t検定	p値
non NAFLD vs non NAFLD	non NAFLD vs NAFLD	-58.80	<0.000001	-47.00	<0.000001
non NAFLD vs non NAFLD	non NAFLD vs non obese NAFLD	-30.79	<0.000001	-28.05	<0.000001
non NAFLD vs non NAFLD	non NAFLD vs obese NAFLD	-70.70	<0.000001	-55.36	<0.000001
noncarrier vs noncarrier	non carrier vs rs2076529 carrier	-7.59	<0.000001	3.85	0.0012
noncarrier vs noncarrier	non carrier vs HLA-B*54:01 carrier	-8.54	<0.000001	-2.78	0.054

Group1(群内距離)に比べて Group2(群間距離)に差があるかどうか両側スチューデント t 検定を行い、ボンフェロニー補正した P 値を unweighted と weighted それぞれ示した。UniFrac 距離が群内距離<群間距離で有意差があるときに β 多様性が変化していると判断する。

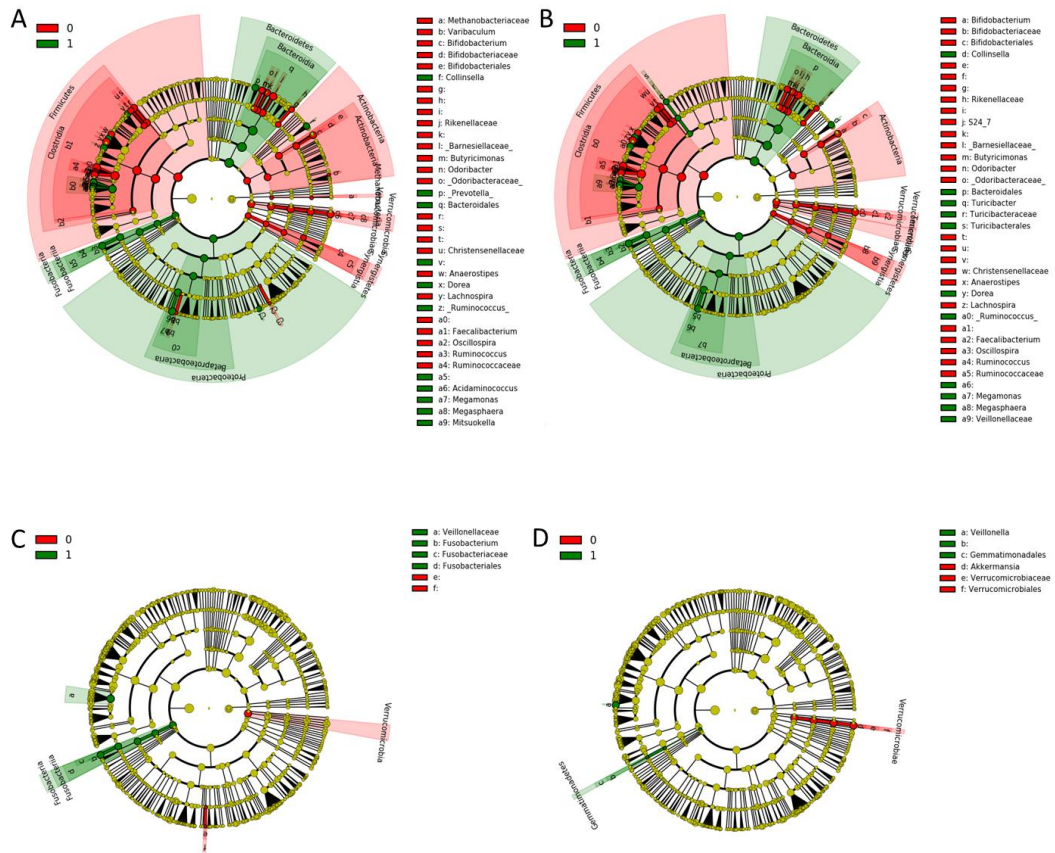


図 13 LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size)解析

A. non-NAFLD 群(0)と全 NAFLD 群(1) B. non-NAFLD 群(0)と non-obese NAFLD 群(1)

C. rs2076529 非保有者群(0)と保有者群 (1) D. HLA-B*54:01 非保有者群 (0)と保有者群(1)

生物分類学的クラドグラムを示し赤もしくは緑の領域は 0 もしくは 1 の群で豊富に存在する細菌群を示している。

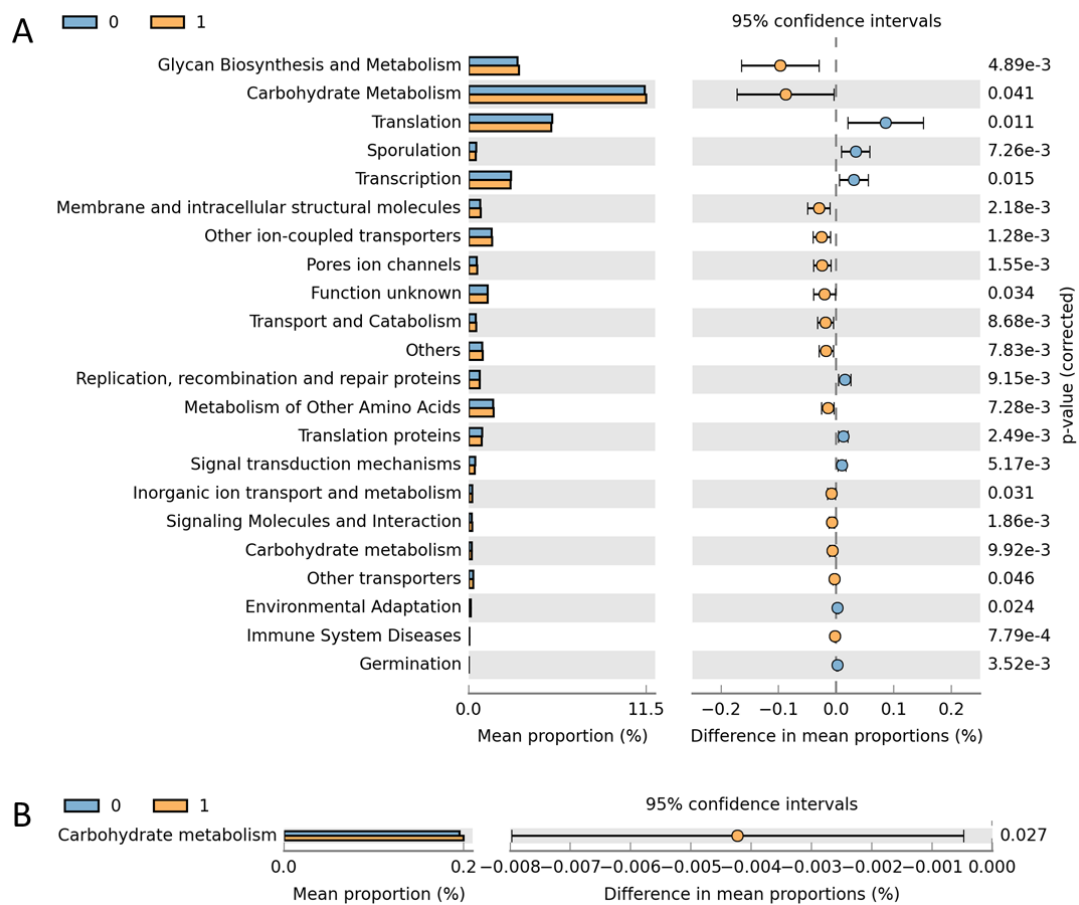


図 14 予測メタゲノム解析(PICRUSt)

A. non-NAFLD 群 (0) と non-obese NAFLD 群 (1) の比較。B. rs2076529 マイナーアレル非保有者群 (0) と保有者群 (1) の比較。KEGG パスウェイマップを用いたレベル 2 での予測メタゲノム解析 (PICRUSt)。

3.5 第 13 番染色体 rs59980018 の機能的検証

GWAS で 4 番目に関連が深かった第 13 番染色体 rs59980018 ($P=5.43E-07$)の関連領域は、横断研究 I と II から抽出した leanest NAFLD をケース群として行った予備的 GWAS 解析において、ゲノムワイド有意水準を満たして関連を示していた ($P=1.92E-08$) ため、マウスを用いた機能的検証を行った。

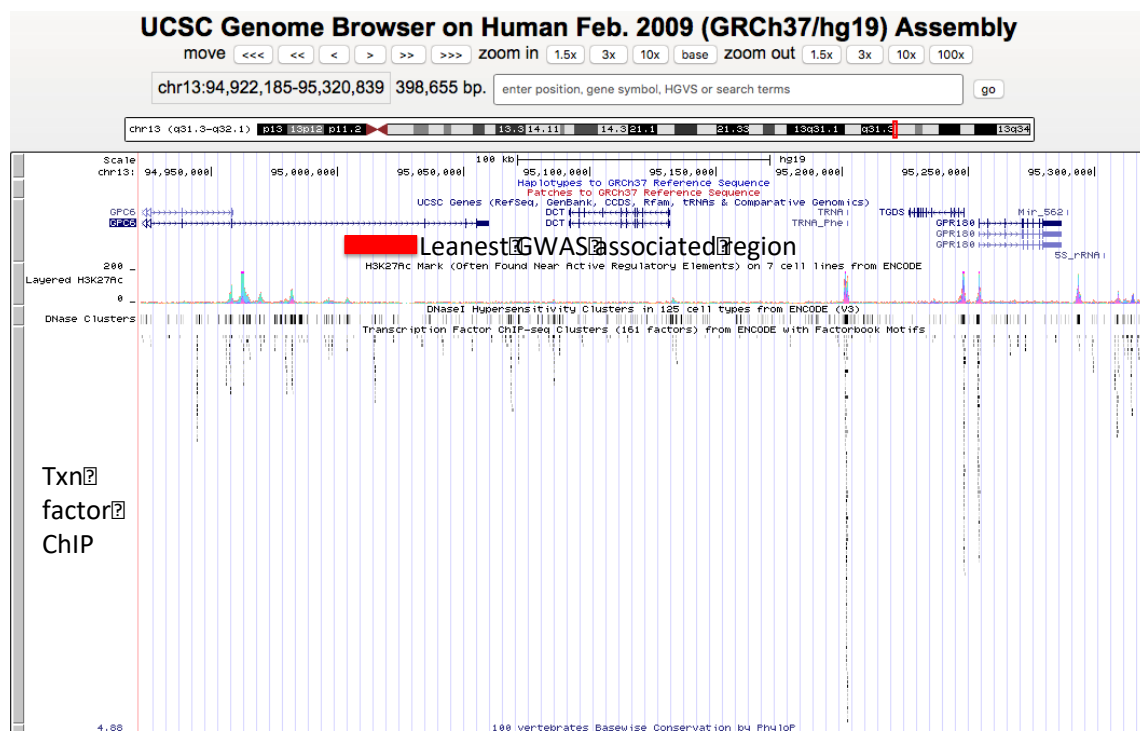


図 15 13 番染色体 GWAS 関連領域の ENCODE database

第 13 番染色体の関連領域は、GPC6 遺伝子 intron 6 に関連ピークを持ち、周辺には GPC6、DCT、TGDS、GPR180 の 4 つの遺伝子がマップされている。ENCODE database (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19>)を参照すると、関連ピーク近傍には転写因子結合を示唆するデータが存在し(図 15)、周辺遺伝子の発現制御領域として機能している可能性が考えられた。これを検証するため、これら 4 つの遺伝子に対してアデノ随伴ウイルス(Adeno-associated

virus:AAV)を用いて遺伝子のノックダウンの実験を行った。8週齢の雄マウスに各遺伝子の shRNA を導入した AAV を静注して、コリン欠乏メチオニン減量飼料を1週間摂取させたのち、肝臓の脂肪沈着を評価した。その結果、shGpr180 投与群で肝臓での脂肪沈着が抑制されることが明らかとなった。(図 16、図 17)

さらに *GPR180* の過剰発現させる AAV を作製し、ノックダウンの実験と同様に8週齢の雄マウスにそれぞれ AAV-CAG-GPR180 と-GFP を投与して肝臓での脂肪沈着を評価した。その結果、肝臓での脂肪沈着については2群間では差は見られなかったが、GFP 群4匹、CAG-GPR180 群4匹でマイクロアレイ解析を行うと、表 8 で示すように Fatty acid metabolism や NAFLD のパスウェイの発現の変動を認めた。

ノックダウン群、コントロール群、過剰発現群で脂肪酸代謝に関連する遺伝子のリアルタイム PCR を行うと、過剰発現群では脂肪酸合成のマスターレギュレーターである *Srebp1* をはじめとして、脂肪酸合成に係る *Acc1*、*Fas*、*Elovl6* 遺伝子の発現が有意に上昇していた(図 18)。また、SREBP1 はタンパクレベルにおいても有意な上昇があることを明らかにした(図 19)。

以上のことから *GPR180* は SREBP1 を介して脂肪酸代謝に関与し、NAFLD の発現に関わっていることが示唆された。

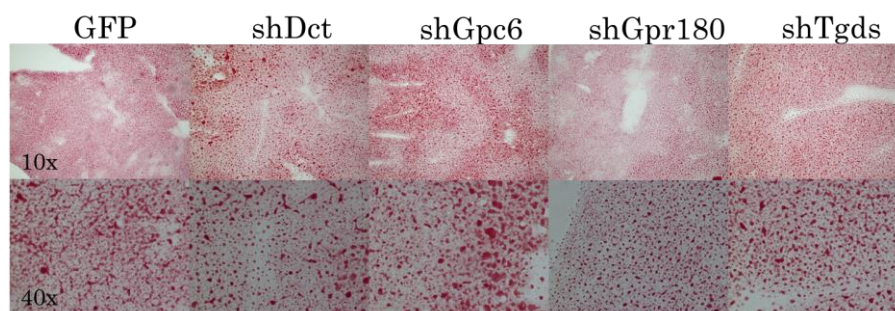


図 16 ノックダウン後の肝臓オイルレッド染色

肝臓の凍結切片についてオイルレッド O 染色を行うと、AAV8-shGpr180 群で脂肪の沈着が抑制される傾向を認めた。

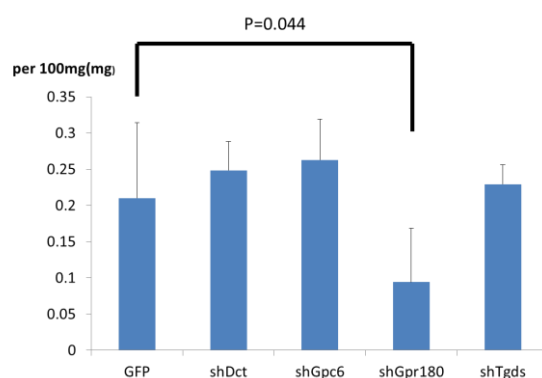


図 17 ノックダウン実験での肝臓 100mg あたりのトリグリセリド量

GFP 群(n=4)、shDct 群(n=3)、shGpc6 群(n=5)、shGpr180 群(n=4)、shTgds 群(n=4)の 5 群での肝臓 100mg あたりのトリグリセリドの量を比較した。ANOVA にて $P=0.019$ で有意差があり、GFP 群と shGpr180 群で片側 t 検定を行うと $P=0.044$ で有意に肝臓内のトリグリセリドの含有量が減少していた。

表 8 マイクロアレイによるパスウェイ解析

	P-value	BH法	Fold Enrich
Lysosome	2.20E-05	6.20E-03	2.22
Spliceosome	5.20E-05	7.50E-03	2.1
Focal adhesion	2.60E-04	2.50E-02	1.76
Central carbon metabolism in cancer	3.00E-04	2.10E-02	2.52
Selenocompound metabolism	3.30E-04	1.90E-02	4.48
Mismatch repair	5.10E-04	2.40E-02	3.85
Thyroid hormone signaling pathway	5.40E-04	2.20E-02	2.02
Metabolic pathways (中略)	6.30E-04	2.20E-02	1.24
Fatty acid metabolism	1.40E-02	1.40E-01	2.16
NAFLD	2.80E-02	2.00E-01	1.51

GFP 群と CAG-GPR180 群で有意に発現が変動しているパスウェイを P 値が低い順にリストアップし、BH(Benjamini & Hochberg)法による補正値を示した。Fatty acid metabolism や NAFLD は BH 法では有意ではないが、 $P < 0.05$ で発現の変動を認めた。

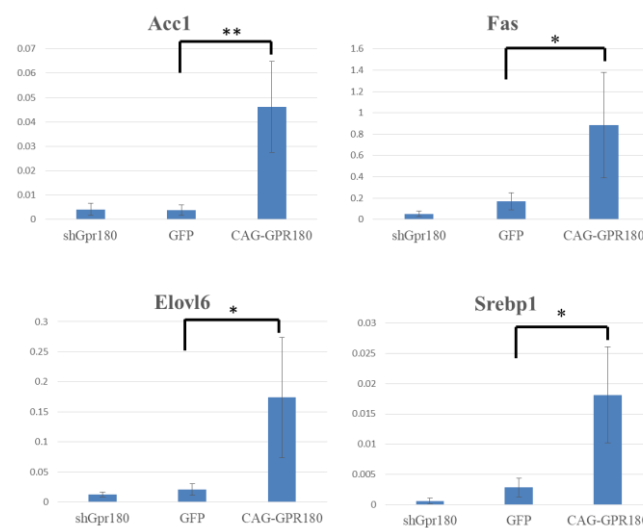


図 18 脂肪酸代謝関連遺伝子のリアルタイム PCR 解析

shGpr180(ノックダウン)群、GFP 群、CAG-GPR180(過剰発現)群、それぞれ $n=4$ にてリアルタイム PCR 施行し *Acc1*、*Fas*、*Elovl6*、*Srebp1* 遺伝子の発現量を棒グラフで示した。いずれも過剰発現で有意に発現上昇を認めた。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 。

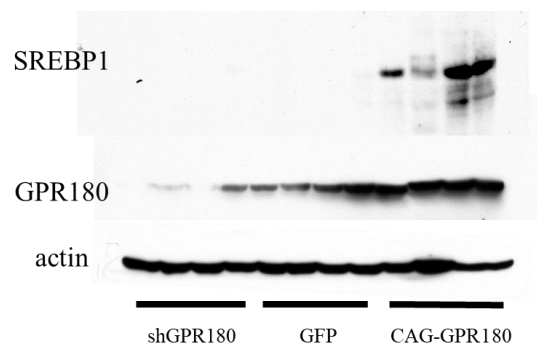


図 19 SREBP1 ウェスタンブロット

各群 n=4 として β -actin をコントロールにして GPR180 と SREBP1 のウェスタンブロットを行った。shGPR180 群では GPR180 タンパクは減少し、SREBP1 は検出感度以下であった。一方、CAG-GPR180 にて過剰発現した群では GPR180 タンパクが上昇し、SREBP1 タンパクは高発現であった。

3.6 Gpr180 ノックアウトマウスによる機能的検証

さらなる機能的検証を行うためゲノム編集法を用いて作製した Gpr180 ノックアウト(Knock out: KO)マウスを用いて、表現型について 8 週齢から 15 週齢までコホート研究を行った。

通常食では Gpr180KO 群(n=7)と野生型(n=7)間で体重増加に差を認めないが(図 20A)、高脂肪食負荷を行うと Gpr180KO 群(n=7)は野生型(n=7)に比べて体重増加が有意に抑制されることがわかった(図 20B、8 週齢と 15 週齢体重差、Gpr180KO 9.1 ± 2.0 vs 野生型 14.6 ± 3.1 g、 $P < 0.01$)。また、高脂肪食のマウスを AAV-CAG-GPR180 を静注したレスキュー群(n=5)と AAV-GFP 群(n=5)で体重変化について観察すると体重増加量はレスキュー群で減少する傾向を認め、15 週齢の体重差は有意差が見られた(図 20C、15 週齢体重、レスキュー群 29.0 ± 2.4 g vs GFP 群 32.4 ± 1.4 g、 $P < 0.05$)

16 週齢でマウスを屠殺し、肝臓の脂肪沈着を観察すると、高脂肪食負荷によって Gpr180 ノックアウト群で肝臓の脂肪沈着が抑制されていたが、通常食では有意な差は認めなかった(図 21)。また、生化学検査においては Gpr180KO 群において GOT および総コレステロールが有意に低下していたが、トリグリセリドについて差を認めなかった。

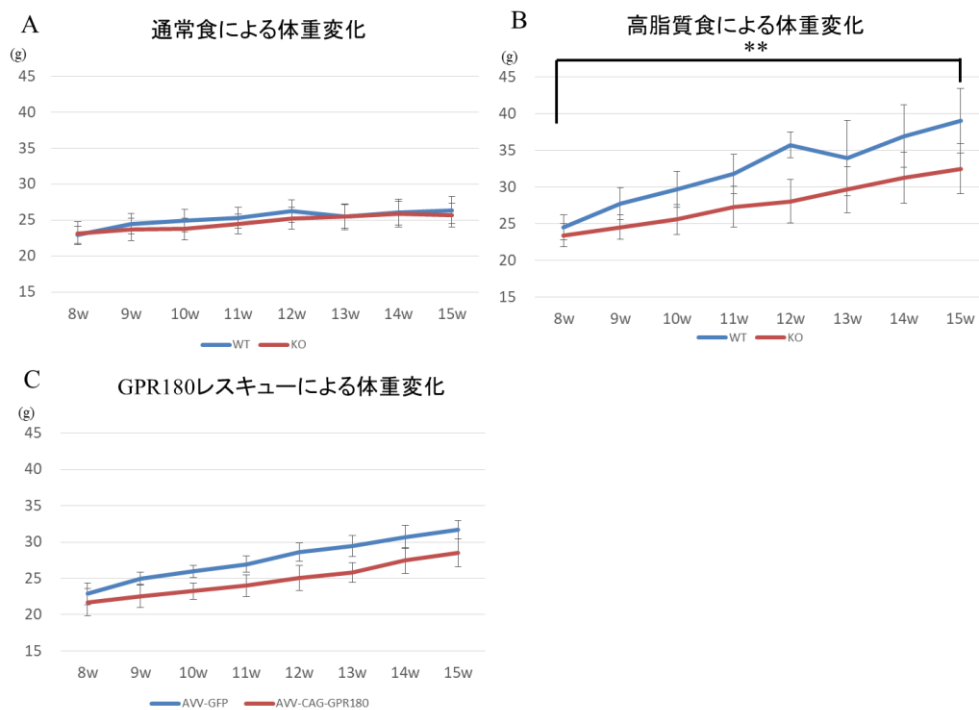


図 20 Gpr180 ノックアウトマウス体重変化

8 週から 15 週まで 1 週毎に体重測定を行った。縦軸は体重(g)、横軸は生後週数(w)で、エラーバーは標準偏差を表している。WT は野生型で KO は Gpr180 ノックアウトマウスである。

A.通常食では Gpr180 ノックアウトマウスと野生型では体重差は見られなかった。B.高脂質食では 8 週と 15 週での体重増加量の有意差を認めた(** P<0.01)。なお野生型の 12 週齢のみ n=4 のため外れ値となっている。C.Gpr180 ノックアウトマウスに AAV-CAG-GPR180 を投与してレスキューした群と GFP のコントロール群の比較。

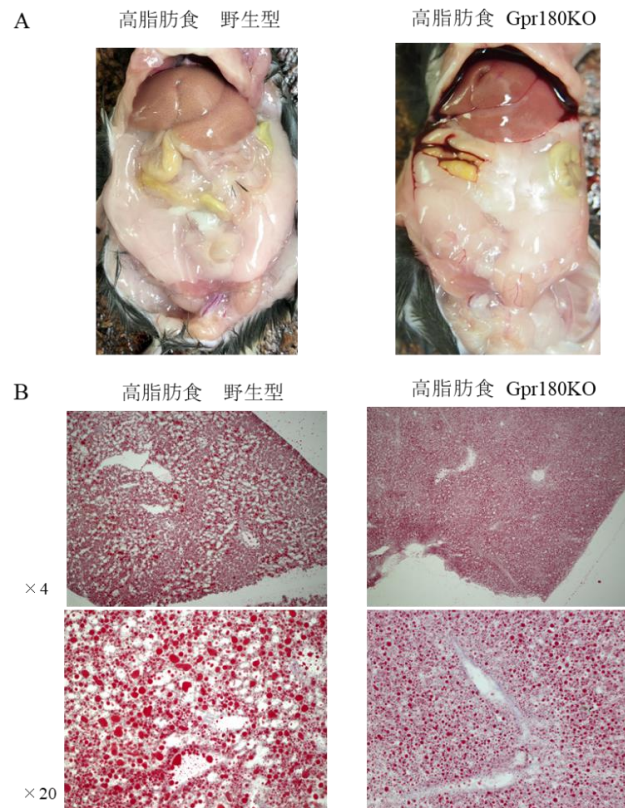


図 21 肝臓での脂肪沈着の評価

A マウス肝臓マクロ所見 B オイルレッドO 染色

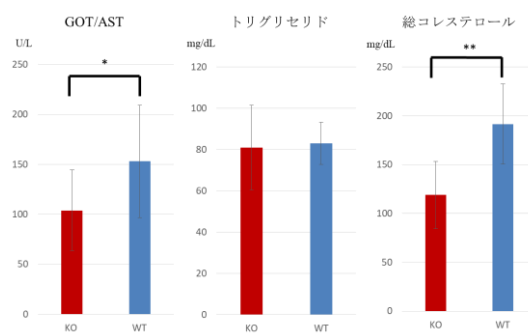


図 22 高脂肪食マウスの生化学検査

高脂肪食負荷の Gpr180 ノックアウト群と野生型の生化学検査に比較すると GOT において* $P<0.05$ で、総コレステロールにおいて** $P<0.01$ で有意に低下していたが、トリグリセリドにはついては差が見られなかった。

3.7 肝臓 RNA を用いたトランスクリプトーム解析

高脂肪食負荷による Gpr180 ノックアウトマウスにおいて体重増加や肝臓での脂肪沈着が抑制されるメカニズムを明らかにするため、肝臓での RNA を用いたトランスクリプトーム解析を行った。NextSeq500 によりシーケンスを行い、負荷した食事とマウスジェノタイプ、AAV でグループ分けした FPKM 値を Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)法によりパスウェイ解析を行った。P 値 5%もしくは FDR 25%をカットオフとした場合、Gpr180 ノックアウトマウスでは Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway が有意に抑制されていることが明らかとなった(表 9)。

3.8 GPR180 のパスウェイ探索

GPR180 の分子生物学的機能はわかっていないが、一般的に G タンパク質共役型受容体は細胞内シグナル伝達分子のリン酸化を介して細胞プログラムの調節を行う[34]。トランスクリプトーム解析の結果では Gpr180 ノックアウトマウスは Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway が有意に抑制されていたことから、パスウェイのキータンパクである GSK-3 β 、 β -Catenin、Akt、mTOR の 4 つのタンパクのリン酸化をウエスタンブロットによって半定量で評価した。

その結果、n=2 のためばらつきはあるものの Wnt signaling に関連する β -catenin や SREBP1 の活性制御する mTOR のリン酸化が Gpr180 ノックアウトマウスで亢進していた。

表 9 GSEA エンリッチメントリスト

Gene sets enriched in wild type(HFD) p-value<0.05	NOM p-value	FDR q-value	FWER p-value
KEGG_VASOPRESSIN_REGULATED_WATER_REABSORPTION	0	1	0.48
KEGG_GAP_JUNCTION	0	1	0.601
KEGG_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY	0.005703422	0.44550455	0.731
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	0.007722008	0.37847722	0.757
KEGG_MTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.007782101	0.3127094	0.795
KEGG_GNRH_SIGNALING_PATHWAY	0.009784736	0.32516834	0.847
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	0.011560693	0.2669396	0.899
KEGG_PROGESTERONE_MEDIATED_OOCYTE_MATURATION	0.01192843	0.33929422	0.792
KEGG_NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	0.013671875	0.34387088	0.782
KEGG_VEGF_SIGNALING_PATHWAY	0.013779528	0.44048095	0.693
KEGG_SPHINGOLIPID_METABOLISM	0.015625	0.8769261	0.633
KEGG_FC_EPSILON_RI_SIGNALING_PATHWAY	0.015936255	0.36280096	0.782
KEGG_PANCREATIC_CANCER	0.017509727	0.28935984	0.8
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_HEPARAN_SULFATE	0.01923077	0.28865877	0.885
KEGG_MELANOGENESIS	0.019569471	0.40484443	0.754
KEGG_MELANOMA	0.028901733	0.47496986	0.677
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	0.030303031	0.29800066	0.8
KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	0.033864543	0.28285444	0.89
KEGG_ACUTE_MYELOID_LEUKEMIA	0.035019454	0.33030272	0.792
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	0.041257367	0.3667071	0.757
KEGG_STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM	0.041666668	0.5505811	0.677
KEGG_CALCIIUM_SIGNALING_PATHWAY	0.044401545	0.3135893	0.847
KEGG_VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	0.045454547	0.25935087	0.948
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_DEGRADATION	0.04819277	0.74397445	0.663
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.04950495	0.2946315	0.879
Gene sets enriched in wild type(HFD) FDR<0.25	NOM p-value	FDR q-value	FWER p-value
KEGG_APOPTOSIS	0.0729783	0.23972881	0.923
KEGG_FC_GAMMA_R_MEDIATED_PHAGOCYTOSIS	0.075848304	0.23992202	0.944
KEGG_COLORECTAL_CANCER	0.0729783	0.24391398	0.944
KEGG_RENIN_ANGIOTENSIN_SYSTEM	0.07238095	0.24405979	0.941
KEGG_GLIOMA	0.0776699	0.2452865	0.923
KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY	0.07480315	0.24574172	0.907
KEGG_TYPE_II_DIABETES_MELLITUS	0.062015504	0.24842529	0.944
KEGG_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	0.078895465	0.24924217	0.907
Gene sets enriched in Gpr180KO(HFD) p-value<0.05	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val
KEGG_CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	0.020560747	0.52977806	0.591

高脂肪食を負荷した野生型と Gpr180 ノックアウトマウス群について GSEA 解析を行った。P 値 5%もしくは FDR25%をカットオフとすると、野生型では P 値基準では 25 つの遺伝子セットが、FDR 基準では 8 の遺伝子セットで発現上昇が見られた。また、ノックアウトマウスでは P 値基準で 1 つの遺伝子セットがノックアウト群で発現上昇みられた。

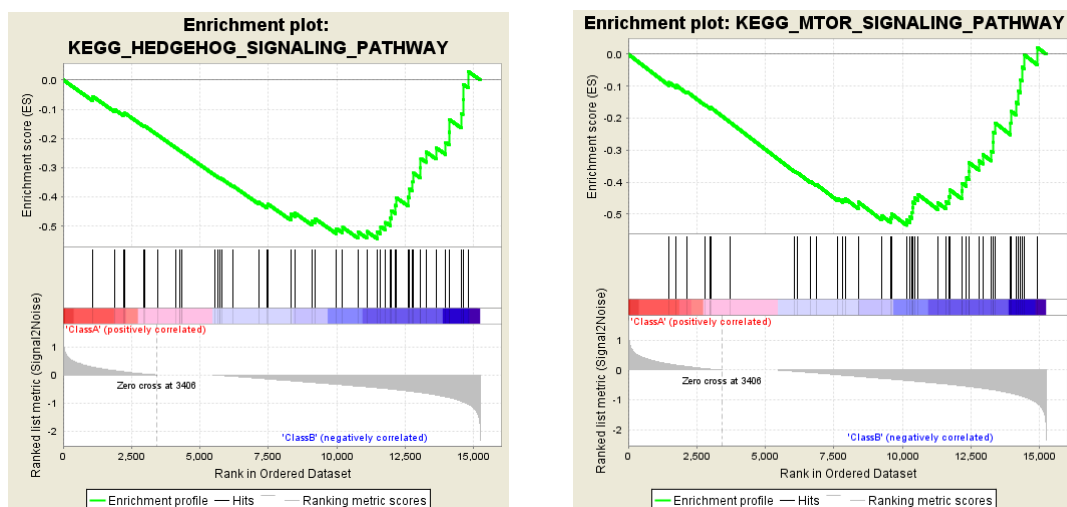


図 20 エンリッチメントプロット

classA は Gpr180 ノックアウトマウス群、classB は野生型である。Enrichment score はのピークは負の値で右に偏っており、classB の野生型で遺伝子群の発現が上昇し、classA の Gpr180 ノックアウトで発現が減少していることを示している。

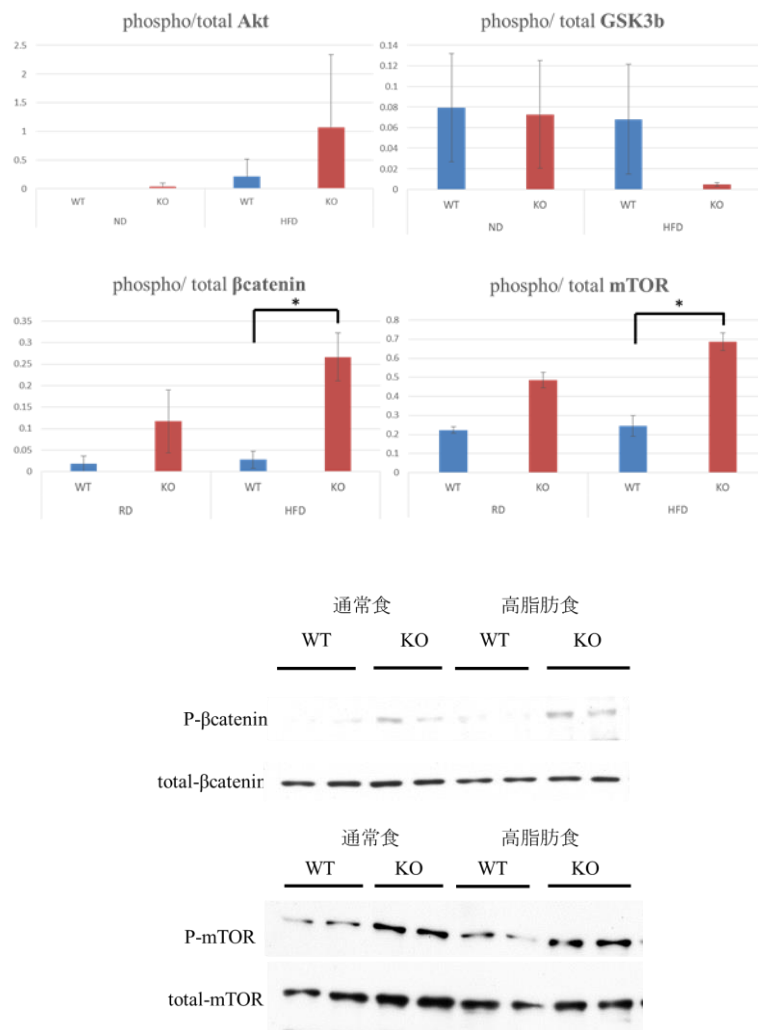


図 21 ウェスタンブロットおよびリン酸化タンパク測定

ウェスタンブロットによりタンパクを半定量化し、リン酸化タンパク (P)/総タンパク (total) の比を棒グラフで示した。RD は通常食、HFD は高脂肪食を示している。各群 $n=2$ のためばらつきはあるが HFD のノックアウト群で β catenin および mTOR のリン酸化の上昇が有意に見られた。* $P<0.05$ 。

4.考察

今回の研究ではこれまでに報告のない非肥満者に着目をした NAFLD の GWAS を行った。肥満やインスリン抵抗性に関連する遺伝子の影響できるだけ排除するため、ケース群を 3 つ横断研究の中から MHNW に絞って抽出した。表 7 で示したように non-obese NAFLD 群ではメタボリック症候群に関連するパラメーターが健常者に比べて高くなるが、GWAS のケース群として抽出した leanest NAFLD 群では non NAFLD 群と比べてメタボリック・パラメーターに大きな差はみられなかった。

GWAS により NAFLD と関連が疑われる 4 つの遺伝子座を同定したが、いずれもこれまでに報告されたものとは異なっていた。これらの遺伝子座が NAFLD 全体においても関連しているかどうかを評価するため、それぞれのリード SNP について標本全体でタイピングを行い、ロジスティック解析を行った。その結果、第 6 番染色体 rs2076529 で強い関連を、第 7 番染色体 rs2189883 で弱い関連を認めた。しかしながら、これら 2 つの遺伝子座は BMI を共変量に加えてロジスティック解析を行うと、いずれも関連が弱くなることから肥満が交絡因子となっている可能性が示唆された。4 つの遺伝子座について BMI と関連を分散分析したところ、rs2076529、rs2301610、rs66781047 の 3 つリード SNP で男女どちらかで肥満との相関を認めた。*HLA* および *MYL2* は東アジアの GWAS で肥満との関連を指摘されており [35] [36]、また *HLA* ならびに *MYL2*・*ALDH2* と同一の連鎖不平衡ブロックにマップされている *BRAP* は GWAS で血中脂質レベルとの関連が指摘されている [37]。*HLA* や *MYL2*・*ALDH2* 遺伝子座はまだ明らかになっていないメカニズムによって肥満、脂質異常症、NAFLD と多面的に影響を与えている可能性が考えられる。

GWAS で最も強い関連を認めた第 6 番染色体 rs2076530 は、*HLA class I* 領域と

classII領域に挟まれた *BTNL2* に位置している。*BTNL2* タンパクは免疫グロブリンスーパーファミリーの一種として T 細胞の活性化を制御に関わっており[38]、サルコイドーシスでは rs2076530 のマイナーアレルが *BTNL2* タンパクの未熟な切断(premature truncation)を促し、T 細胞活性化の機能を失うことが病態の中心であると考えられている[39]。しかしながら、1 型糖尿病や関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどの疾患では rs2076530 と深い関係がありながらも HLA 領域が巨大な連鎖不平衡ブロックを形成しているため、*BTNL2* と HLA のどちらが直接の原因遺伝子であるかどうかは結論が出ていない[40]。HLA-DQB1 は NAFLD と関連するとのトルコでの報告があり[41]、今回の研究では HLA がより中心的な役割を担っているのではないかと考えて、全 NAFLD における検証を行った。関連を認めた HLA-B54:01 と全 NAFLD との関連解析は、rs2076530 ($P=2.84E-05$, OR=1.22) に比べ、odds 比は若干の上昇を示すものの P 値は深くならなかった ($P=0.099$, OR 1.25)。さらなる大規模なゲノムパネルを用いた遺伝的検証が必要であるとともに、ノックマウスを用いた解析など機能的な検証が必要と考えられる。

GWAS で用いた leanest NAFLD ケース群およびコントロール群について HLA タイピングをインピュテーション法で行うと、HLA-B、HLA-DQB1、HLA-DRB1 の 3 つの領域でアレル頻度が有意に変化していた。また、次世代シーケンサを用いた全 NAFLD を対象とした HLA タイピングでは HLA-DRB1 はタイピングできなかったものの、HLA-B でアレル頻度が同様に有意に変化していた。特に B54:01 アレルについてはどちらの解析でも NAFLD との関連性を認め、リスクアレルとなっていることが強く示唆された。

ある特定の HLA アレルが NAFLD と関連するとの報告はあるが[41]、HLA アレルが NAFLD にどのように影響するかについては十分にわかっていない。HLA

が肝臓での免疫応答に直接関与して肝障害を引き起こす可能性が考えられるが、もう一つの可能性として腸内細菌叢を介して間接的に脂肪肝に影響している可能性がある。これまでの NAFLD と腸内細菌叢の研究では病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)、リポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS)、短鎖脂肪酸(short chain fatty acids: SCFAs)などの代謝産物を介して NAFLD に関連している可能性が示唆されている[42]。さらに強直性脊椎炎や関節リウマチは HLA-B27 と DRB1 アレルに関連した疾患であるが、これらの HLA アレルは腸内細菌叢の異常を引き起こし、その変化が疾患に影響を与える可能性が示唆されている[43]。

NAFLD のリスクアレルである HLA-B*54:01 はアレル保有者と非保有者で腸内細菌叢の β 多様性に変化をもたらすことを明らかにした。詳細な菌種について解析を行うとアレル保有者では *Verrucomicrobia* 門の *Akkermansia* 属が有意に減少し、*Gemmatimonadetes* 門が有意に増加していた。*Akkermansia* 属に属する *Akkermansia muciniphila* 種はムチン分解能を有しており、腸管でのエネルギー吸収を抑制することで、肥満や糖尿病を抑制する作用が報告されている[44]。HLA-B*54:01 アレル保有者では *Akkermansia* 属が有意に減少しており、その結果として NAFLD のリスクとなっている可能性が示唆された。HLA と腸内細菌叢の関係を明らかにするためには、腸内細菌叢データを持つより大規模なゲノムパネルが必要であるとともに、MCH をヒト化した gnotobiotic animal を用いた実験的検証が必要と考えられる。

4 番目に関連が深かった第 13 番染色体 rs59980018 の周辺領域についてはマウスを用いた機能的検証を行った。ノックダウンや過剰発現の実験から周辺にある 4 つの遺伝子群の中で *Gpr180* が感受性遺伝子と判断し、ノックアウトマウスの作製を行った。*GPR180* 遺伝子は G タンパク質共役受容体のスーパーファミ

リーに属する GPR180 をコードしているが、そのタンパク機能についてはほとんどわかっていない。GPR180 は筋上皮細胞を含む唾液腺、子宮内膜・筋層、前立腺、肺、肝臓などに強く発現しており[45]、血管平滑筋細胞のリモデリングや増殖に関わっているとの報告や[46]、GPR180 の欠損は先天性小瞳孔(Congenital microcoria :MCOR)を引き起こすとの報告はあるが[47]、肝臓での分子生物学的機能に関する報告はない。

GPR180 は肝臓で発現している受容体を介して脂肪肝形成に関わっていると予想していたが、実際には体重増加にも深く関与していることが明らかとなった。さらに体重変化については通常食では見られず、高脂肪食による負荷によってはじめて引き起こされた。しかしながら、肝臓特異的に発現する AAV8 を使ってノックアウトマウスのレスキュー実験を行うと、レスキュー群では体重増加が抑制される傾向を認め、肝臓だけに着目すると *Gpr180* の発現低下は体重増加に作用している可能性が示唆された。*Gpr180* は脂肪組織においても高発現しており[48]、*Gpr180* ノックアウトマウスによる体重変化は、肝臓と脂肪組織の複雑な相互作用によりコントロールされていることが推察される。

肝臓での脂肪肝抑制メカニズムを明らかにするため RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を行い、*Gpr180* ノックアウト群では Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway 関連遺伝子群の発現が低下することを明らかにした。GPR180 は高脂肪負荷による何らかのリガンドを感受し、細胞内にシグナル伝達を行っていると考えられる。今回明らかとなった mTOR signaling pathway は、mTORC1 を介して脂肪酸合成マスターレギュレーターである SREBP1 の活性制御に関わっており[49]、過剰発現実験での SREBP1 タンパクの発現上昇の結果と合致する(図 19)。しかしながら、ウェスタンブロットによるリン酸化の半定量はサンプル数が少なくばらつきが大きかったため、現時点では結論を導くことは

できず再検証が必要である。

今回の研究の限界の一つは MHNW NAFLD の症例が少人数であったことである。ケース群が 275 名、コントロール群 1411 名であり、検出力を上げるためにはさらに大きなパネルを用いた GWAS が必要である。もう一つの限界は DRB3/4/5 の相同性や偽遺伝子のために HLA-DRB1 については正確なタイピングを行うことができなかったことである。正確なタイピングを行うためには HLA 領域のロングリードシーケンスが必要と考えられる[50]。

さらに NAFLD の診断には簡便さを考慮して腹部超音波所見を用いたが、その正確性には限界がある。腹部超音波での NAFLD の診断は、中等度以上の脂肪沈着では高い診断能を有しているが[1] [51]、脂肪沈着が軽度の場合には正確な評価が困難とされている[52]。横断研究IとIIIのうち、腹部超音波および腹部 CT の両方で肝臓の脂肪沈着を評価された 795 名について腹部超音波の精度を検証すると、CT での脂肪肝の診断が真の結果としたときの腹部超音波検査の感度は男性 0.882、女性 0.825 で、特異度は男性 0.822、女性 0.878 であった。現在は MRI の PDFF(proton-density-fat-fraction) 法 [53] やファイブロスキャンによる CAP(controlled attenuation parameter)[54]のように脂肪肝診断が正確にできるモダリティが開発されており、今後の大規模研究での活用が期待される。

5.総括

非肥満者に着目した NAFLD の GWAS を行い、NAFLD との関連が示唆される 4 つの遺伝子座を同定した。

最も深い関連の見られた第 6 番染色体 rs2076529 周辺領域については、HLA 領域の HLA-B が NAFLD と関連していることを明らかにした。中でも HLA-B*54:01 は NAFLD のリスクアレルであり、腸内細菌叢を介して NAFLD に影響している可能性が示唆された。

また、4 番目に関連が深かった第 13 番染色体 rs59980018 については、*GPR180* が感受性遺伝子と考えられ、*Gpr180* ノックアウトマウスでは高脂肪食による負荷で体重増加と脂肪肝形成が抑制されることを明らかにした。肝臓でのパスウェイには Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway が関与している可能性が示唆された。

6.引用文献

1. 日本消化器学会: Nafld / Nash 診療ガイドライン 2014. 南江堂. (2014)
2. Imajo, K., Yoneda, M.: 心・脳血管障害、慢性腎臓病など肝臓外への合併症. 日本内科学会誌. 105(1), 38-46 (2016).
3. Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M.: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 64, 73–84 (2016). <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
4. Khashab, M.A., Liangpunsakul, S., Chalasani, N.: Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 10, 73–80 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11894-008-0012-0>
5. Sookoian, S., Pirola, C.J.: Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Mol. Hepatol.* 23, 1–12 (2017). <https://doi.org/10.3350/cmh.2016.0109>
6. Speliotes, E.K., Yerges-Armstrong, L.M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L.J., Palmer, C.D., Gudnason, V., Eiriksdottir, G., Garcia, M.E., Launer, L.J., Nalls, M.A., Clark, J.M., Mitchell, B.D., Shuldiner, A.R., Butler, J.L., Tomas, M., Hoffmann, U., Hwang, S.J., Massaro, J.M., O'Donnell, C.J., Sahani, D. V., Salomaa, V., Schadt, E.E., Schwartz, S.M., Siscovick, D.S., Voight, B.F., Jeffrey Carr, J., Feitosa, M.F., Harris, T.B., Fox, C.S., Smith, A. V., Linda Kao, W.H., Hirschhorn, J.N., Borecki, I.B., McCullough, A., Bringman, D., Dasarathy, S., Edwards, K., Hawkins, C., Liu, Y.C., Rogers, N., Ruth Sargent, P.A.C., Stager, M., Diehl, A.M., Abdelmalek, M., Gottfried, M., Guy, C., Killenberg, P., Kwan, S., Pan, Y.P., Piercy, D., Smith, M., Chalasani, N., Bhimalli, P., Cummings, O.W., Klipsch, A., Lee, L., Molleston, J., Ragozzino, L., Vuppalanchi, R., Neuschwander-Tetri, B.A., Barlow, S., Derdoy, J., Hoffmann, J., King, D., Siegner, J., Stewart, S., Thompson, J., Brunt, E., Lavine, J.E., Behling, C., Clark, L., Durelle, J., Hassanein, T., Petcharaporn, L., Schwimmer, J.B., Sirlin, C., Stein, T., Bass, N.M., Bambha, K.,

Ferrell, L.D., Filipowski, D., Merriman, R., Pabst, M., Rosenthal, M., Rosenthal, P., Steel, T.,
 Sanyal, A.J., Boyett, S., Bryan, D., Contos, M.J., Fuchs, M., Graham, M., Jones, A., Luketic,
 V.A.C., Sandhu, B., Sargeant, C., Selph, K., White, M., Kowdley, K. V., Gyurkey, G., Mooney,
 J., Nelson, J., Roberts, S., Saunders, C., Stead, A., Wang, C., Yeh, M., Kleiner, D., Doo, E.,
 Everhart, J., Hoofnagle, J.H., Robuck, P.R., Seeff, L., Tonascia, J., Belt, P., Brancati, F., Colvin,
 R., Donithan, M., Green, M., Isaacson, M., Kim, W., Miriel, L., Sternberg, A., Ünalp, A., Van
 Natta, M., Wilson, L., Yates, K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G.,
 Jackson, A.U., Allen, H.L., Lindgren, C.M., Luan, J., Mägi, R., Randall, J., Vedantam, S.,
 Winkler, T.W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I.M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H.M.,
 Weedon, M.N., Wheeler, E., Wood, A.R., Ferreira, T., Weyant, R.J., Segrè, A. V., Estrada, K.,
 Liang, L., Nemesh, J., Park, J.H., Gustafsson, S., Kilpeläinen, T.O., Yang, J., Bouatia-Naji, N.,
 Esko, T., Kutalik, Z., Mangino, M., Raychaudhuri, S., Scherag, A., Welch, R., Zhao, J.H., Aben,
 K.K., Absher, D.M., Amin, N., Dixon, A.L., Fisher, E., Glazer, N.L., Goddard, M.E., Heard-
 Costa, N.L., Hoesel, V., Hottenga, J.J., Johansson, Å., Johnson, T., Ketkar, S., Lamina, C., Li, S.,
 Moffatt, M.F., Myers, R.H., Narisu, N., Perry, J.R.B., Peters, M.J., Preuss, M., Ripatti, S.,
 Rivadeneira, F., Sandholt, C., Scott, L.J., Timpson, N.J., Tyrer, J.P., van Wingerden, S.,
 Watanabe, R.M., White, C.C., Wiklund, F., Barlassina, C., Chasman, D.I., Cooper, M.N.,
 Jansson, J.O., Lawrence, R.W., Pellikka, N., Prokopenko, I., Shi, J., Thiering, E., Alavere, H.,
 Alibrandi, M.T.S., Almgren, P., Arnold, A.M., Aspelund, T., Atwood, L.D., Balkau, B.,
 Balmforth, A.J., Bennett, A.J., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R.N., Bergmann, S., Biebertmann, H.,
 Blakemore, A.I.F., Boes, T., Bonnycastle, L.L., Bornstein, S.R., Brown, M.J., Buchanan, T.A.,
 Busonero, F., Campbell, H., Cappuccio, F.P., Cavalcanti-Proença, C., Chen, Y.D.I., Chen, C.M.,
 Chines, P.S., Clarke, R., Coin, L., Connell, J., Day, I.N.M., den Heijer, M., Duan, J., Ebrahim, S.,
 Elliott, P., Elosua, R., Erdos, M.R., Eriksson, J.G., Facheris, M.F., Felix, S.B., Fischer-

Posovszky, P., Folsom, A.R., Friedrich, N., Freimer, N.B., Fu, M., Gaget, S., Gejman, P. V.,
 Geus, E.J.C., Gieger, C., Gjesing, A.P., Goel, A., Goyette, P., Grallert, H., Gräßler, J.,
 Greenawalt, D.M., Groves, C.J., Guiducci, C., Hartikainen, A.L., Hassanali, N., Hall, A.S.,
 Havulinna, A.S., Hayward, C., Heath, A.C., Hengstenberg, C., Hicks, A.A., Hinney, A., Hofman,
 A., Homuth, G., Hui, J., Igl, W., Iribarren, C., Isomaa, B., Jacobs, K.B., Jarick, I., Jewell, E.,
 John, U., Jørgensen, T., Jousilahti, P., Jula, A., Kaakinen, M., Kajantie, E., Kaplan, L.M.,
 Kathiresan, S., Kettunen, J., Kinnunen, L., Knowles, J.W., Kolcic, I., König, I.R., Koskinen, S.,
 Kovacs, P., Kuusisto, J., Kraft, P., Kvaløy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lanzani, C., Lecoeur, C.,
 Lehtimäki, T., Lettre, G., Liu, J., Lokki, M.L., Lorentzon, M., Luben, R.N., Ludwig, B., Manunta,
 P., Marek, D., Marre, M., Martin, N.G., McArdle, W.L., McCarthy, A., McKnight, B., Meitinger,
 T., Melander, O., Meyre, D., Midthjell, K., Montgomery, G.W., Morken, M.A., Morris, A.P.,
 Mulic, R., Ngwa, J.S., Nelis, M., Neville, M.J., Nyholt, D.R., O’Rahilly, S., Ong, K.K., Oostra,
 B., Paré, G., Parker, A.N., Perola, M., Pichler, I., Pietiläinen, K.H., Platou, C.G.P., Polasek, O.,
 Pouta, A., Rafelt, S., Raitakari, O., Rayner, N.W., Ridderstråle, M., Rief, W., Ruukonen, A.,
 Robertson, N.R., Rzehak, P., Sanders, A.R., Sandhu, M.S., Sanna, S., Saramies, J., Savolainen,
 M.J., Scherag, S., Schipf, S., Schreiber, S., Schunkert, H., Silander, K., Sinisalo, J., Smit, J.H.,
 Soranzo, N., Sovio, U., Stephens, J., Surakka, I., Swift, A., Tammesoo, M.L., Tardif, J.C., Teder-
 Laving, M., Teslovich, T.M., Thompson, J.R., Thomson, B., Tönjes, A., Tuomi, T., van Meurs,
 J.B.J., van Ommen, G.J., Vatin, V., Viikari, J., Visvikis-Siest, S., Vitart, V., Vogel, C.I.G., Waite,
 L.L., Wallaschofski, H., Bragi Walters, G., Widen, E., Wiegand, S., Wild, S.H., Willemsen, G.,
 Witte, D.R., Witteman, J.C., Xu, J., Zhang, Q., Zgaga, L., Ziegler, A., Zitting, P., Beilby, J.P.,
 Farooqi, I.S., Hebebrand, J., Huikuri, H. V., James, A.L., Kähönen, M., Levinson, D.F.,
 Macciardi, F., Nieminen, M.S., Ohlsson, C., Ridker, P.M., Stumvoll, M., Beckmann, J.S., Boeing,
 H., Boerwinkle, E., Boomsma, D.I., Caulfield, M.J., Chanock, S.J., Adrienne Cupples, L., Smith,

G.D., Erdmann, J., Froguel, P., Grönberg, H., Gyllenstein, U., Hall, P., Hansen, T., Hattersley, A.T., Hayes, R.B., Heinrich, J., Hu, F.B., Hveem, K., Illig, T., Jarvelin, M.R., Kaprio, J., Karpe, F., Khaw, K.T., Kiemeny, L.A., Krude, H., Laakso, M., Lawlor, D.A., Metspalu, A., Munroe, P.B., Ouwehand, W.H., Pedersen, O., Penninx, B.W., Peters, A., Pramstaller, P.P., Quertermous, T., Reinehr, T., Rissanen, A., Rudan, I., Samani, N.J., Schwarz, P., Spector, T.D., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A.G., Valle, T.T., Wabitsch, M., Waeber, G., Wareham, N.J., Watkins, H., Wilson, J.F., Wright, A.F., Carola Zillikens, M., Chatterjee, N., Mc, S.A., Purcell, S., Visscher, P.M., Assimes, T.L., Deloukas, P., Groop, L.C., Haritunians, T., Hunter, D.J., Kaplan, R.C., Mohlke, K.L., O'Connell, J.R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D.P., van Duijn, C.M., Wichmann, H.E., Frayling, T.M., Thorsteinsdottir, U., Abecasis, G.R., Barroso, I., Boehnke, M., Stefansson, K., North, K.E., McCarthy, M.I., Ingelsson, E., Loos, R.J.F., Dupuis, J., Langenberg, C., Saxena, R., Gloyn, A.L., Rybin, D., Henneman, P., Dehghan, A., Franklin, C.S., Navarro, P., Song, K., Egan, J.M., Lajunen, T., Grarup, N., Sparsø, T., Doney, A., Li, M., Kanoni, S., Shrader, P., Kumari, M., Zabena, C., Rocheleau, G., An, P., Elliott, A., McCarroll, S.A., Payne, F., Roccasecca, R.M., Pattou, F., Sethupathy, P., Ardlie, K., Ariyurek, Y., Barter, P., Benediktsson, R., Bochud, M., Bonnefond, A., Borch-Johnsen, K., Böttcher, Y., Brunner, E., Bumpstead, S.J., Charpentier, G., Cornelis, M., Crawford, G., Crisponi, L., de Geus, E.J.C., Delplanque, J., Dina, C., Fedson, A.C., Fischer-Rosinsky, A., Forouhi, N.G., Frants, R., Franzosi, M.G., Galan, P., Goodarzi, M.O., Graessler, J., Grundy, S., Gwilliam, R., Hadjadj, S., Hallmans, G., Hammond, N., Han, X., Heath, S.C., Hercberg, S., Herder, C., Hillman, D.R., Hingorani, A.D., Hung, J., Johnson, P.R.V., Antero Kesaniemi, Y., Kivimaki, M., Knight, B., Kyvik, K.O., Lathrop, G.M., Bacquer, O. Le, Li, Y., Lyssenko, V., Mahley, R., Manning, A.K., Martínez-Larrad, M.T., McAteer, J.B., McCulloch, L.J., McPherson, R., Meisinger, C., Melzer, D., Mukherjee, S., Naitza, S., Orrù, M., Pakyz, R., Palmer, C.N.A., Paolisso, G., Pattaro, C., Pearson, D., Peden,

- J.F., Pedersen, N.L., Pfeiffer, A.F.H., Posthuma, D., Potter, S.C., Province, M.A., Psaty, B.M., Rathmann, W., Rice, K., Roden, M., Rolandsson, O., Sandbaek, A., Sayer, A.A., Scheet, P., Seedorf, U., Sharp, S.J., Shields, B., Sigurðsson, G., Sijbrands, E.J.G., Silveira, A., Simpson, L., Singleton, A., Smith, N.L., Syddall, H., Syvänen, A.C., Tanaka, T., Thorand, B., Tichet, J., van Dijk, K.W., van Hoek, M., Varma, D., Vogelzangs, N., Wagner, P.J., Walley, A., Walters, G.B., Ward, K.L., Witteman, J.C.M., Yarnell, J.W.G., Zeggini, E., Zelenika, D., Zethelius, B., Zhai, G., Zillikens, M.C., Meneton, P., Magnusson, P.K.E., Nathan, D.M., Williams, G.H., Spranger, J., Cooper, C., Dedoussis, G. V., Lind, L., Morris, A.D., Palmer, L.J., Franks, P.W., Marmot, M., Pankow, J.S., Sampson, M.J., Erich Wichmann, H., Hamsten, A., Altshuler, D., Rotter, J.I., Ferrucci, L., Kong, A., Duijn, C.M., Aulchenko, Y.S., Cao, A., Scuteri, A., Waterworth, D.M., Vollenweider, P., Mooser, V., Sladek, R., Meigs, J.B., Florez, J.C.: Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet.* 7, (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001324>
7. Pingitore, P., Pirazzi, C., Mancina, R.M., Motta, B.M., Indiveri, C., Pujia, A., Montalcini, T., Hedfalk, K., Romeo, S.: Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1841, 574–580 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.006>
 8. Yuan, X., Waterworth, D., Perry, J.R.B., Lim, N., Song, K., Chambers, J.C., Zhang, W., Vollenweider, P., Stirnadel, H., Johnson, T., Bergmann, S., Beckmann, N.D., Li, Y., Ferrucci, L., Melzer, D., Hernandez, D., Singleton, A., Scott, J., Elliott, P., Waeber, G., Cardon, L., Frayling, T.M., Kooner, J.S., Mooser, V.: Population-Based Genome-wide Association Studies Reveal Six Loci Influencing Plasma Levels of Liver Enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 520–528 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.09.012>
 9. Palmer, N.D., Musani, S.K., Yerges-Armstrong, L.M., Feitosa, M.F., Bielak, L.F., Hernaez, R.,

- Kahali, B., Carr, J.J., Harris, T.B., Jhun, M.A., Kardia, S.L.R., Langefeld, C.D., Mosley, T.H., Norris, J.M., Smith, A. V., Taylor, H.A., Wagenknecht, L.E., Liu, J., Borecki, I.B., Peyser, P.A., Speliotes, E.K.: Characterization of european ancestry nonalcoholic fatty liver disease-associated variants in individuals of african and hispanic descent. *Hepatology*. 58, 966–975 (2013).
<https://doi.org/10.1002/hep.26440>
10. Kozlitina, J., Smagris, E., Stender, S., Nordestgaard, B.G., Zhou, H.H., Tybjærg-Hansen, A., Vogt, T.F., Hobbs, H.H., Cohen, J.C.: Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* 46, 352–356 (2014).
<https://doi.org/10.1038/ng.2901>
 11. Dongiovanni, P., Petta, S., Maglio, C., Fracanzani, A.L., Pipitone, R., Mozzi, E., Motta, B.M., Kaminska, D., Rametta, R., Grimaudo, S., Pelusi, S., Montalcini, T., Alisi, A., Maggioni, M., Kärjä, V., Borén, J., Käkälä, P., Di Marco, V., Xing, C., Nobili, V., Dallapiccola, B., Craxi, A., Pihlajamäki, J., Fargion, S., Sjöström, L., Carlsson, L.M., Romeo, S., Valenti, L.: Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology*. 61, 506–514 (2015). <https://doi.org/10.1002/hep.27490>
 12. Beer, N.L., Tribble, N.D., McCulloch, L.J., Roos, C., Johnson, P.R.V., Orho-Melander, M., Gloyn, A.L.: The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4081–4088 (2009). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp357>
 13. Bedi, O., Aggarwal, S., Trehanpati, N., Ramakrishna, G., Krishan, P.: Molecular and Pathological Events Involved in the Pathogenesis of Diabetes-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 9, 607–618 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.10.004>
 14. Shi, Y., Wang, Q., Sun, Y., Zhao, X., Kong, Y., Ou, X., Jia, J., Wu, S., You, H.: The Prevalence of Lean/Nonobese Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J.*

- Clin. Gastroenterol. 00, 1 (2019). <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001270>
15. Eguchi, Y., Hyogo, H., Ono, M., Mizuta, T., Ono, N., Fujimoto, K., Chayama, K., Saibara, T.: Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: A multicenter large retrospective study. *J. Gastroenterol.* 47, 586–595 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0533-z>
 16. Molina-Molina, E., Krawczyk, M., Stachowska, E., Lammert, F., Portincasa, P.: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Individuals: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 43, 638–645 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2019.04.005>
 17. Kim, D., Kim, W.R.: Nonobese Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 474–485 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.08.028>
 18. Wang, A.Y., Dhaliwal, J., Mouzaki, M.: Lean non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Nutr.* 38, 975–981 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.08.008>
 19. Stefan, N., Schick, F., Häring, H.U.: Causes, Characteristics, and Consequences of Metabolically Unhealthy Normal Weight in Humans. *Cell Metab.* 26, 292–300 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.008>
 20. Kawai, Y., Mimori, T., Kojima, K., Nariai, N., Danjoh, I., Saito, R., Yasuda, J., Yamamoto, M., Nagasaki, M.: Japonica array: Improved genotype imputation by designing a population-specific SNP array with 1070 Japanese individuals. *J. Hum. Genet.* 60, 581–587 (2015). <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.68>
 21. Kuriyama, S., Yaegashi, N., Nagami, F., Arai, T., Kawaguchi, Y., Osumi, N., Sakaida, M., Suzuki, Y., Nakayama, K., Hashizume, H., Tamiya, G., Kawame, H., Suzuki, K., Hozawa, A., Nakaya, N., Kikuya, M., Metoki, H., Tsuji, I., Fuse, N., Kiyomoto, H., Sugawara, J., Tsuboi, A., Egawa, S., Ito, K., Chida, K., Ishii, T., Tomita, H., Taki, Y., Minegishi, N., Ishii, N., Yasuda, J., Igarashi, K., Shimizu, R., Nagasaki, M., Koshihara, S., Kinoshita, K., Ogishima, S., Takai-Igarashi,

- T., Tominaga, T., Tanabe, O., Ohuchi, N., Shimosegawa, T., Kure, S., Tanaka, H., Ito, S., Hitomi, J., Tanno, K., Nakamura, M., Ogasawara, K., Kobayashi, S., Sakata, K., Satoh, M., Shimizu, A., Sasaki, M., Endo, R., Sobue, K., Yamamoto, M.: The Tohoku Medical Megabank Project: Design and mission. *J. Epidemiol.* 26, 493–511 (2016). <https://doi.org/10.2188/jea.JE20150268>
22. Khor, S.S., Yang, W., Kawashima, M., Kamitsuji, S., Zheng, X., Nishida, N., Sawai, H., Toyoda, H., Miyagawa, T., Honda, M., Kamatani, N., Tokunaga, K.: High-Accuracy imputation for HLA class I and II genes based on high-resolution SNP data of population-specific references. *Pharmacogenomics J.* 15, 530–537 (2015). <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.4>
 23. Kawaguchi, S., Higasa, K., Shimizu, M., Yamada, R., Matsuda, F.: HLA-HD: An accurate HLA typing algorithm for next-generation sequencing data. *Hum. Mutat.* 38, 788–797 (2017). <https://doi.org/10.1002/humu.23230>
 24. Matsuki, T.: Procedure of DNA extraction from fecal sample for the analysis of intestinal microflora. *J. Intest. Microbiol.* 20, 259–262 (2006)
 25. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C.: Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60 (2011). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
 26. Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepille, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., Beiko, R.G., Huttenhower, C.: Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31, 814–821 (2013). <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
 27. Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G.: STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics.* 30, 3123–3124 (2014). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
 28. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A.,

- Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P.: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–15550 (2005). <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
29. Sakiyama, M., Matsuo, H., Nakaoka, H., Yamamoto, K., Nakayama, A., Nakamura, T., Kawai, S., Okada, R., Ooyama, H., Shimizu, T., Shinomiya, N.: Identification of rs671, a common variant of ALDH2, as a gout susceptibility locus. *Sci. Rep.* 6, 1–5 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep25360>
 30. Nakajima, F., Nakamura, J., Yokota, T.: Analysis of HLA haplotypes in Japanese, using high resolution allele typing. *MHC.* 8, 1–32 (2001). <https://doi.org/10.12667/mhc.8.1>
 31. Ikeda, N., Kojima, H., Nishikawa, M., Hayashi, K., Futagami, T., Tsujino, T., Kusunoki, Y., Fujii, N., Suegami, S., Miyazaki, Y., Middleton, D., Tanaka, H., Saji, H.: Determination of HLA-A, -C, -B, -DRB1 allele and haplotype frequency in Japanese population based on family study. *Tissue Antigens.* 85, 252–259 (2015). <https://doi.org/10.1111/tan.12536>
 32. Jiang, W., Wu, N., Wang, X., Chi, Y., Zhang, Y., Qiu, X., Hu, Y., Li, J., Liu, Y.: Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 5, 1–7 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep08096>
 33. Kim, H.-N., Joo, E.-J., Cheong, H.S., Kim, Y., Kim, H.-L., Shin, H., Chang, Y., Ryu, S.: Gut Microbiota and Risk of Persistent Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *J. Clin. Med.* 8, 1089 (2019). <https://doi.org/10.3390/jcm8081089>
 34. Watari, K., Nakaya, M., Kurose, H.: Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. *J. Mol. Signal.* 9, 1–9 (2014). <https://doi.org/10.1186/1750-2187-9-1>
 35. Wen, W., Kato, N., Hwang, J.Y., Guo, X., Tabara, Y., Li, H., Dorajoo, R., Yang, X., Tsai, F.J., Li, S., Wu, Y., Wu, T., Kim, S., Guo, X., Liang, J., Shungin, D., Adair, L.S., Akiyama, K.,

- Allison, M., Cai, Q., Chang, L.C., Chen, C.H., Chen, Y.T., Cho, Y.S., Choi, B.Y., Gao, Y., Go, M.J., Gu, D., Han, B.G., He, M., Hixson, J.E., Hu, Y., Huang, T., Isono, M., Jung, K.J., Kang, D., Kim, Y.J., Kita, Y., Lee, J., Lee, N.R., Lee, J., Wang, Y., Liu, J.J., Long, J., Moon, S., Nakamura, Y., Nakatochi, M., Ohnaka, K., Rao, D., Shi, J., Sull, J.W., Tan, A., Ueshima, H., Wu, C., Xiang, Y.B., Yamamoto, K., Yao, J., Ye, X., Yokota, M., Zhang, X., Zheng, Y., Qi, L., Rotter, J.I., Jee, S.H., Lin, D., Mohlke, K.L., He, J., Mo, Z., Wu, J.Y., Tai, E.S., Lin, X., Miki, T., Kim, B.J., Takeuchi, F., Zheng, W., Shu, X.O.: Genome-wide association studies in East Asians identify new loci for waist-hip ratio and waist circumference. *Sci. Rep.* 6, 2–10 (2016).
<https://doi.org/10.1038/srep17958>
36. Wen, W., Zheng, W., Okada, Y., Takeuchi, F., Tabara, Y., Hwang, J.Y., Dorajoo, R., Li, H., Tsai, F.J., Yang, X., He, J., Wu, Y., He, M., Zhang, Y., Liang, J., Guo, X., Sheu, W.H. ue. H., Delahanty, R., Guo, X., Kubo, M., Yamamoto, K., Ohkubo, T., Go, M.J. i., Liu, J.J. u., Gan, W., Chen, C.C., Gao, Y., Li, S., Lee, N.R., Wu, C., Zhou, X., Song, H., Yao, J., Lee, I. Te, Long, J., Tsunoda, T., Akiyama, K., Takashima, N., Cho, Y.S. hi., Ong, R.T. h., Lu, L., Chen, C.H., Tan, A., Rice, T.K., Adair, L.S., Gui, L., Allison, M., Lee, W.J., Cai, Q., Isomura, M., Umemura, S., Kim, Y.J. i., Seielstad, M., Hixson, J., Xiang, Y.B., Isono, M., Kim, B.J., Sim, X., Lu, W., Nabika, T., Lee, J., Lim, W.Y., Gao, Y.T., Takayanagi, R., Kang, D.H., Wong, T.Y. i., Hsiung, C.A. gne., Wu, I.C., Juang, J.M.J. imm., Shi, J., Choi, B.Y. ou., Aung, T., Hu, F., Kim, M.K. yun., Lim, W.Y. e., Wang, T.D., Shin, M.H., Lee, J., Ji, B.T., Lee, Y.H., Young, T.L., Shin, D.H. oo., Chun, B.Y., Cho, M.C., Han, B.G., Hwu, C.M., Assimes, T.L., Absher, D., Yan, X., Kim, E., Kuo, J.Z., Kwon, S., Taylor, K.D., Chen, Y.D.I., Rotter, J.I., Qi, L., Zhu, D., Wu, T., Mohlke, K.L., Gu, D., Mo, Z., Wu, J.Y., Lin, X., Miki, T., Tai, E.S., Lee, J.Y., Kato, N., Shu, X.O., Tanaka, T.: Meta-analysis of genome-wide association studies in East Asian-ancestry populations identifies four new loci for body mass index. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5492–5504 (2014).

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu248>

37. Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A. V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J., Johansen, C.T., Fouchier, S.W., Isaacs, A., Peloso, G.M., Barbalic, M., Ricketts, S.L., Bis, J.C., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., Feitosa, M.F., Chambers, J., Orho-Melander, M., Melander, O., Johnson, T., Li, X., Guo, X., Li, M., Shin Cho, Y., Jin Go, M., Jin Kim, Y., Lee, J.Y., Park, T., Kim, K., Sim, X., Twee-Hee Ong, R., Croteau-Chonka, D.C., Lange, L.A., Smith, J.D., Song, K., Hua Zhao, J., Yuan, X., Luan, J., Lamina, C., Ziegler, A., Zhang, W., Zee, R.Y.L., Wright, A.F., Witteman, J.C.M., Wilson, J.F., Willemsen, G., Wichmann, H.E., Whitfield, J.B., Waterworth, D.M., Wareham, N.J., Waeber, G., Vollenweider, P., Voight, B.F., Vitart, V., Uitterlinden, A.G., Uda, M., Tuomilehto, J., Thompson, J.R., Tanaka, T., Surakka, I., Stringham, H.M., Spector, T.D., Soranzo, N., Smit, J.H., Sinisalo, J., Silander, K., Sijbrands, E.J.G., Scuteri, A., Scott, J., Schlessinger, D., Sanna, S., Salomaa, V., Saharinen, J., Sabatti, C., Ruukonen, A., Rudan, I., Rose, L.M., Roberts, R., Rieder, M., Psaty, B.M., Pramstaller, P.P., Pichler, I., Perola, M., Penninx, B.W.J.H., Pedersen, N.L., Pattaro, C., Parker, A.N., Pare, G., Oostra, B.A., O'donnell, C.J., Nieminen, M.S., Nickerson, D.A., Montgomery, G.W., Meitinger, T., Mcpherson, R., McCarthy, M.I., Mcardle, W., Masson, D., Martin, N.G., Marroni, F., Mangino, M., Magnusson, P.K.E., Lucas, G., Luben, R., Loos, R.J.F., Lokki, M.L., Lettre, G., Langenberg, C., Launer, L.J., Lakatta, E.G., Laaksonen, R., Kyvik, K.O., Kronenberg, F., König, I.R., Khaw, K.T., Kaprio, J., Kaplan, L.M., Johansson, Å., Jarvelin, M.R., Cecile, A., Ingelsson, E., Igl, W., Kees Hovingh, G., Hottenga, J.J., Hofman, A., Hicks, A.A., Hengstenberg, C., Heid, I.M., Hayward, C., Havulinna, A.S., Hastie, N.D., Harris, T.B., Haritunians, T., Hall, A.S., Gyllenstein, U., Guiducci, C., Groop, L.C., Gonzalez, E., Gieger, C., Freimer, N.B., Ferrucci, L., Erdmann, J., Elliott, P., Ejebe, K.G., Döring, A., Dominiczak, A.F., Demissie, S., Deloukas, P., De Geus, E.J.C., De Faire, U., Crawford, G., Collins, F.S.,

- Chen, Y.D.I., Caulfield, M.J., Campbell, H., Burt, N.P., Bonnycastle, L.L., Boomsma, D.I., Boekholdt, S.M., Bergman, R.N., Barroso, I., Bandinelli, S., Ballantyne, C.M., Assimes, T.L., Quertermous, T., Altshuler, D., Seielstad, M., Wong, T.Y., Tai, E.S., Feranil, A.B., Kuzawa, C.W., Adair, L.S., Taylor, H.A., Borecki, I.B., Gabriel, S.B., Wilson, J.G., Holm, H., Thorsteinsdottir, U., Gudnason, V., Krauss, R.M., Mohlke, K.L., Ordovas, J.M., Munroe, P.B., Kooner, J.S., Tall, A.R., Hegele, R.A., Kastelein, J.J.P., Schadt, E.E., Rotter, J.I., Boerwinkle, E., Strachan, D.P., Mooser, V., Stefansson, K., Reilly, M.P., Samani, N.J., Schunkert, H., Cupples, L.A., Sandhu, M.S., Ridker, P.M., Rader, D.J., Van Duijn, C.M., Peltonen, L., Abecasis, G.R., Boehnke, M., Kathiresan, S.: Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 466, 707–713 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09270>
38. Nguyen, T., Liu, X.K., Zhang, Y., Dong, C.: BTNL2, a Butyrophilin-Like Molecule That Functions to Inhibit T Cell Activation. *J. Immunol.* 176, 7354–7360 (2006). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7354>
39. Morais, A., Lima, B., Peixoto, M.J., Alves, H., Marques, A., Delgado, L.: BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis. *Respir. Med.* 106, 1771–1777 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.08.009>
40. Orozco, G., Eerligh, P., Sánchez, E., Zhernakova, S., Roep, B.O., González-Gay, M.A., López-Nevot, M.A., Callejas, J.L., Hidalgo, C., Pascual-Salcedo, D., Balsa, A., González-Escribano, M.F., Koeleman, B.P.C., Martín, J.: Analysis of a Functional BTNL2 Polymorphism in Type 1 Diabetes, Rheumatoid Arthritis, and Systemic Lupus Erythematosus. *Hum. Immunol.* 66, 1235–1241 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.003>
41. Doganay, L., Katrinli, S., Colak, Y., Senates, E., Zemheri, E., Ozturk, O., Enc, F.Y., Tuncer, I., Doganay, G.D.: HLA DQB1 alleles are related with nonalcoholic fatty liver disease. *Mol. Biol. Rep.* 41, 7937–7943 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3688-2>

42. Safari, Z., Gérard, P.: The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1541–1558 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03011-w>
43. Asquith, M., Sternes, P.R., Costello, M.E., Karstens, L., Diamond, S., Martin, T.M., Li, Z., Marshall, M.S., Spector, T.D., le Cao, K.A., Rosenbaum, J.T., Brown, M.A.: HLA Alleles Associated With Risk of Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis Influence the Gut Microbiome. *Arthritis Rheumatol.* 71, 1642–1650 (2019). <https://doi.org/10.1002/art.40917>
44. Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., Kayser, B.D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., Dumas, M.E., Rizkalla, S.W., Doré, J., Cani, P.D., Clément, K., Le Mouhaër, S., Cotillard, A., Kennedy, S.P., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Galleron, N., Batto, J.M., Renault, P., Zucker, J.D., Ehrlich, S.D., Blottière, H., Leclerc, M., Juste, C., De Wouters, T., Lepage, P.: *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut.* 65, 426–436 (2016). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778>
45. Shyamsundar, R., Kim, Y.H., Higgins, J.P., Montgomery, K., Jorden, M., Sethuraman, A., van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P.O., Pollack, J.R.: A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. *Genome Biol.* 6, (2005). <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-3-r22>
46. Iida, A., Tanaka, T., Nakamura, Y.: High-density SNP map of human ITR, a gene associated with vascular remodeling. *J. Hum. Genet.* 48, 170–172 (2003). <https://doi.org/10.1007/s10038-003-0002-x>
47. Fares-Taie, L., Gerber, S., Tawara, A., Ramirez-Miranda, A., Douet, J.Y., Verdin, H., Guilloux, A., Zenteno, J.C., Kondo, H., Moisset, H., Passet, B., Yamamoto, K., Iwai, M., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kimura, W., Bole-Feysot, C., Vilotte, M., Odent, S., Vilotte, J.L., Munnich, A., Regnier, A., Chassaing, N., De Baere, E., Raymond-Letron, I., Kaplan, J., Calvas, P., Roche, O.,

- Rozet, J.M.: Submicroscopic deletions at 13q32.1 cause congenital microcoria. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 631–639 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.01.014>
48. Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjostedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C.A.K., Skogs, M., Ottosson Takanen, J., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F., Uhlen, M.: Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 13, 397–406 (2014). <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
 49. Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.L., Schulze, A.: SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metab.* 8, 224–236 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>
 50. Suzuki, S., Ranade, S., Osaki, K., Ito, S., Shigenari, A., Ohnuki, Y., Oka, A., Masuya, A., Harting, J., Baybayan, P., Kitazume, M., Sunaga, J., Morishima, S., Morishima, Y., Inoko, H., Kulski, J.K., Shiina, T.: Reference grade characterization of polymorphisms in full-length HLA Class I and II genes with short-read sequencing on the ION PGM system and long-reads generated by single molecule, real-time sequencing on the PacBio platform. *Front. Immunol.* 9, 1–15 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02294>
 51. Hernaez, R., Lazo, M., Bonekamp, S., Kamel, I., Brancati, F.L., Guallar, E., Clark, J.M.: Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: A meta-analysis. *Hepatology.* 54, 1082–1090 (2011). <https://doi.org/10.1002/hep.24452>
 52. Bohte, A.E., Van Werven, J.R., Bipat, S., Stoker, J.: The diagnostic accuracy of US, CT, MRI and 1H-MRS for the evaluation of hepatic steatosis compared with liver biopsy: A meta-analysis. *Eur.*

- Radiol. 21, 87–97 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00330-010-1905-5>
53. Caussy, C., Reeder, S.B., Sirlin, C.B., Loomba, R.: Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDFF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology*. 68, 763–772 (2018). <https://doi.org/10.1002/hep.29797>
 54. Masaki, K., Takaki, S., Hyogo, H., Kobayashi, T., Fukuhara, T., Naeshiro, N., Honda, Y., Nakahara, T., Ohno, A., Miyaki, D., Murakami, E., Nagaoki, Y., Kawaoka, T., Tsuge, M., Hiraga, N., Hiramatsu, A., Imamura, M., Kawakami, Y., Aikata, H., Ochi, H., Takahashi, S., Arihiro, K., Chayama, K.: Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases. *Hepatol. Res.* 43, 1182–1189 (2013). <https://doi.org/10.1111/hepr.12094>