

氏 名	吉 田 健
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 605 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 小 谷 和 彦 (委 員) 教授 興 梠 貴 英 准教授 海老原 健

論文内容の要旨

1 研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患（Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD）はメタボリック症候群の肝臓での表現型と考えられおり、その患者数の増加は世界的な問題となっている。NAFLD 全体のゲノムワイド関連解析(Genome-Wide Association Study : GWAS)は日本やヨーロッパで行われており、*PNPLA3* などが疾患関連遺伝子として報告されているが、これらの遺伝子だけで NAFLD の遺伝的背景を十分に説明することはできない。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での NAFLD の有病率が高い特徴があり、遺伝的背景を明らかにするための手がかりとなっている。

本研究の目的は、非肥満者 NAFLD の中でも”metabolically healthy, normal-weight (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 研究方法

GWAS のケース群は自治医科大学で行われた 3 つの横断研究から、内臓脂肪が少ないと推定される順に男性 48 名、女性 48 名をそれぞれ抽出した。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』ではインピーダンス法による内臓脂肪レベルを基準とし、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』と横断研究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』では、BMI および腹囲を代用の基準とした。合計 288 名を選出したが、サンプリング不良や血縁関係により 13 名を除外し、275 名を leanest NAFLD として最終的なケース群とし、ジャポニカアレイ v1 による全ゲノムの Single nucleotide polymorphism (SNP)タイピングを行った。

GWAS は性、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 名をコントロール群として比較した。

3 研究成果

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、第 6 番染色

体の lead SNP rs2076530 ($P=6.73E-08$)、第 7 番染色体の lead SNP rs2189883 ($P=4.25E-07$)、第 12 番染色体の lead SNP rs2071629 ($P=4.39E-07$) 第 13 番染色体の lead SNP rs59980018 ($P=5.43E-07$)、4 つの遺伝子座で suggestive level ($P<1.0E-06$)を満たした。

これら 4 つの遺伝子座については、非肥満 NAFLD だけでなく NAFLD 全体においても関連があるかどうかを検証するため、横断研究 I と III 合わせて 5649 サンプルで TaqMan 法による lead SNP のタイピングを行った。マイナーアレルの additive model で、性別と HbA1c を共変量にしたロジスティック解析を行うと、rs2076529(第 6 番染色体の secondary SNP)で有意な差を認め(OR 1.22, 95%CI 1.11-1.34, $P=2.84E-05$)、NAFLD 全体においても関連が明らかとなった。

第 6 番染色体の関連領域では疾患感受性遺伝子が HLA である可能性を考えて、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。その結果、HLA-B ($P=0.028$)、HLA-DQB1 ($P=0.0065$)、HLA-DRB1 ($P=0.00050$)でアレル分布に有意な差を認めた。さらに、横断研究 I と III を合わせた 5649 名のパネルで次世代シーケンサ法による HLA タイピングを行うと、HLA-B のアレル分布で有意な差を認めた($P=0.013$)。HLA-B の 4digit アレルのうち HLA-B*54:01 アレルは NAFLD 群で有意に高くなっており($P=0.0099$, OR=1.25)、リスクファクターである可能性が示唆された。

HLA 領域は腸内細菌叢を介して NAFLD に関与しているのではないかと仮説を立て、腸内細菌叢解析データが付随した横断研究 III を用いて関連解析を行うと、HLA-B*54:01 保有者で見られる腸内細菌叢の変化は、NAFLD 群と同様の傾向を示していた。

4 番目に関連が深かった第 13 番染色体 rs59980018 の関連領域は、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ため、マウスを用いた機能検証を行った。第 13 番染色体の関連領域周辺には *GPC6*、*DCT*、*TGDS*、*GPR180* の 4 遺伝子がマップされており、アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus :AAV)を用いたノックダウンの実験を行い、*Gpr180* のノックダウン群で肝臓の脂肪沈着が抑制されることを明らかにした。さらに *GPR180* の過剰発現の実験を行うと *Srebp1* をはじめとした脂肪酸合成に関係する遺伝子群が有意に発現上昇し、SREBP1 についてはタンパクレベルも発現上昇していることを明らかにした。

GPR180 のさらなる機能解析のため *Gpr180* ノックアウト(以下、*Gpr180KO*)マウスを作製し、表現型についてコホート研究を行った。通常食では *Gpr180KO* 群と野生型で体重増加に差を認めないが、高脂肪食負荷を行うと *Gpr180KO* 群は体重増加が有意に抑制され(8 週齢と 15 週齢体重差、*Gpr180KO* 9.1 ± 2.0 vs 野生型 14.6 ± 3.1 g, $P<0.01$)、肝臓での脂肪沈着も抑制された。肝臓での RNA を用いたトランスクリプトーム解析を行うと、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)により Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway が *Gpr180KO* 群では有意に抑制されており、パスウェイのキータンパクである β -catenin や mTOR のリン酸化が *Gpr180KO* 群で亢進する傾向を認めた。

4 考察

今回の研究では非肥満者に着目した NAFLD の GWAS を行い、新たな 4 つの遺伝子座を同定した。GWAS で最も強い関連がみられた第 6 番染色体 rs2076529 についてはロジスティック解析においても強い関連を認めたが、BMI を共変量に加えると関連が弱くなり、肥満が交絡因子となっている可能性が示唆された。

GWAS パネルについてはインピュテーション法で、横断研究IとIIIについては次世代シーケンサ法で HLA タイピングを行い、HLA-B のアレル分布が有意に変化することを明らかにした。特に HLA-B*54:01 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。

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しており、その変化は NAFLD 群と同様の傾向で、HLA アレルが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。さらなる検証を行うためには、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、Major histocompatibility complex(MHC)をヒト化したノトバイオート動物による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のノックダウンと過剰発現の実験から *Gpr180* が疾患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* は G タンパク質共役受容体のスーパーファミリーに属しているが、その機能についてはほとんどわかっていない。*GPR180* は肝臓に発現している受容体を介して、直接的に脂肪肝形成に関わっているのではないかと予想していたが、実際には体重増加にも深く関与していることがマウスの実験で明らかとなった。さらに、その体重変化は通常食では観察されず、高脂肪食による負荷によってはじめて引き起こされた。*GPR180* タンパクは高脂肪食負荷による何らかのリガンドを感受し、肝臓内の Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway の活性化を介して脂肪肝形成に関与している可能性がある。

今回の研究の限界の一つは MHNW の NAFLD 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より大きなパネルを用いて GWAS を行う必要である。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 について次世代シーケンサ法で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。さらに、腹部超音波による脂肪肝の診断能には限界があり、MRI やファイブロスキャンによる正確な脂肪沈着の評価が大規模研究でも期待される。

5 結論

非肥満者に着目した NAFLD の GWAS を行い、suggestive level で 4 つの遺伝子座を同定した。そのうち、第 6 番染色体の関連領域は NAFLD 全体でも強い関連を認めた。

第 6 番染色体の機能的検証では、HLA 領域のうち HLA-B が NAFLD と関連していることを明らかにした。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、第 13 番染色体の機能的検証では *GPR180* が疾患感受性遺伝子と考えられ、ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷すると、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。肝臓での脂肪肝抑制のパスウェイには Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway が関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

本研究は、非肥満者に着目しての NAFLD の GWAS である。申請者らによって、関連性が示唆される 4 つの遺伝子座が検出された。特に第 6 番染色体の関連領域は（肥満の有無に拘わらない）NAFLD との関連性が期待され、HLA-B と腸内細菌叢を介しての NAFLD への影響を考案するようなユニークな成果を挙げた。また、第 13 番染色体では *GPR180* が疾患感受性遺伝子と考えられ、この機能から脂肪肝の抑制には Hedgehog signaling pathway や mTOR signaling pathway の関与を示唆する成果も挙げた。

本研究は、非肥満者を解析する着想や結果の新規性からみて、学術的意義を有した。また、NAFLD は地域医療において高頻度に見られ、心血管病の危険因子であることから、本研究の成果は、今後、NAFLD 研究の発展をもたらす可能性がある。以上から、委員が一致して、本学の学位論文として相応しいと判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者から、本研究に至る背景、方法、結果とその考察についてプレゼンテーションが行われ、その後に口頭試問が行われた。非肥満群を解析することで（肥満の有無に拘わらない）NAFLD の原因遺伝子を検出しようとする点が本研究のゴールであることについてはやや分かりにくかったため、この点の修正を求められた。一部の有意に検出した遺伝子と HLA との関係性のロジックについても丁寧な説明を求められた。さらに、NAFLD ケースの診断能について研究の限界として論じること求められた。これらについて、申請者は適切に対応した。口頭試問の様子から、申請者が主体的に研究を遂行したと思われた。

研究から得られた成果を含めて、申請者は本学大学院博士課程の最終試験の合格レベルにあると判断された。