

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	中嶋 駿介
<p>学位論文題目</p> <p>PTPRD遺伝子多型は非アルコール性脂肪性肝疾患の発症・進展に関与する</p> <p>Polymorphism of Receptor-Type Tyrosine-Protein Phosphatase Delta gene is associated with the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease.</p> <p>共著者名</p> <p>Hiroki Tanaka, Koji Sawada, Hidemi Hayashi, Takumu Hasebe, Masami Abe, Chitomi Hasebe, Mikihiro Fujiya, Toshikatsu Okumura</p> <p>Journal of Gastroenterology and Hepatology Volume 32 平成29年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) は、組織診断あるいは画像診断にて脂肪肝を認め、アルコール性肝障害などを除外した病態と定義され、一部は肝硬変や肝臓に進展する慢性肝疾患である。その基本病態としては遺伝的な要素を背景に、アディポサイトカインの調節異常、脂肪毒性、Toll-like receptor、腸内細菌叢の異常および鉄過剰など複数の因子が複合的に関与する multiple parallel hits hypothesis が提唱されている。近年 Genome-wide association studies (GWAS) により NAFLD に関連する Single nucleotide polymorphism (SNP) が報告されてきた。そのうちの1つである <i>patatin like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) rs738409 C>G (I148M)</i> が脂肪化、炎症、線維化および肝臓発症リスクに関与していることが報告された [1]。PNPLA3 rs738409 は日本人においても NAFLD のうち Matteoni 分類 Type 4 と相関があり、肝線維化との関連も示唆されている [2]。しかし、詳細な機序については明らかではなく、日本において PNPLA3 以外は強い相関を認める SNP の報告はない。今回我々は high-throughput sequencing を用いて 1,000 以上の遺伝子をターゲットとし、日本人 NAFLD 患者における病態発症や進展に関わる新規 SNP の探索とその機能について検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 研究対象と臨床データ</p> <p>本研究は旭川医科大学倫理委員会にて承認の上で研究を開始した。2012年12月から2014年7月までの間に旭川医科大学および旭川赤十字病院にて NAFLD と診断された患者、もしくは健常ボランティア (HV) のうち書面で同意が得られた症例が本研究に参加した。NAFLD の診断は日本肝臓学会のガイドラインに従って行われた。HV は B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス感染がなく、脂肪肝およびその他肝疾患がなく、肥満やアルコール多飲がないものとした。NAFLD 群においては病歴・生活習慣の聴取および血液検査を行い、肝線維化の指標である Fib-4 index を計算した。アルコール多飲による脂肪肝および薬剤性脂肪肝は除外し、自己免疫性疾患や原発性胆汁性胆管炎の患者は除外した。</p>			

2. アンプリコンシーケンスのプライマーデザイン

炎症、糖・脂質代謝異常、腫瘍性疾患および金属代謝に関連する1,031遺伝子(12,609アンプリコン)を論文検索により選出し、それらの遺伝子領域を増幅するプライマーセットをIon Ampliseq Designer software program (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)によりデザインした。

3. サンプル調整

全てのNAFLD群およびHV群から末梢血サンプルを採取し、Ficoll比重遠心法を用いて単核球を分離し、ゲノムDNAをDNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いて抽出・精製した。DNA濃度はQubit™ Fluorometer (Life technologies)を用いて測定した。ゲノムDNAの質はアガロースゲル電気泳動にて評価した。

4. データ解析

全てのデータはTorrent Suite Software program (Life technologies)のhuman reference genome sequence (GRCh37/hg19)にマッピングされた。変異遺伝子はTorrent Variant Caller plug-in for the software program (Life technologies)により抽出された。これらの情報はCLC Genomics Workbench software system (LCL bio, Aarhus, Denmark)にインポートされ、Fisher's exact testを行った。

5. 肝病理組織による評価

肝病理組織はHematoxylin-Eosin (HE)染色を行い、Matteoni分類およびBrunt分類にて評価した。肝脂肪沈着を0 (<5%)、1 (5-10%)、2 (10-34%)、3 (34-67%)、4 (>67%)の5群に分類して評価した[2]。免疫組織化学染色はRabbit polyclonal anti-PTPRD (GeneTex, Irvine, CA, USA)とRabbit monoclonal anti-phospho Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (pSTAT3) (Tyr705) (Cell-Signaling Technology)を用いて行った。

6. トランスフェクションとIL-6負荷試験

遺伝子発現ベクターpBApo-CMV Pur (Takara, Tokyo, Japan)にヒト野生型PTPRDおよびPTPRD R995CをコードしたcDNAを組み込んだベクターを作成した。それらのベクターを日本人由来ヒト肝癌細胞株Huh-7にLipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)を用いて導入し、puromycinによる選択培養で安定発現細胞株を樹立した。それぞれの細胞株に対して0.5 ng/mLのrecombinant interleukin-6 (IL-6)を含む培養液で3時間培養し、RIPAバッファーによりタンパク質を抽出し、Western blot法にてpSTAT3の発現を評価した。

7. データ解析・統計処理

アンプリコンシーケンスにおける有意差検定はFisher's exact testを用い、 $p < 0.05$ でアミノ酸置換を伴うものを候補遺伝子とした。その他のデータはMann-Whitney U testまたはFisher's exact testを用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

成 績

1. NAFLD患者とHV群の臨床背景

NAFLD群36例、HV群27例、合計63例が本研究に参加した。NAFLD群は16例が男性、20例が女性であった。年齢中央値は60.5歳であった(28-80歳)。23例が肝生検を施行され、5例が肝硬変の診断であった。Matteoni分類Type 3/4はそれぞれ10例、7例であった。

2. NAFLD患者とHV群の臨床背景

NAFLD群およびHV群末梢血中の単核球からDNAを抽出し、高出力シーケンサにて多型解析を行い、Fisher's exact testにて $p < 0.05$ でかつアミノ酸置換を伴う7遺伝子7か所のSNPsが同定された。次にこれら7つのSNPsに対してTaqMan SNP genotyping assayを行い、Cohen's kappa係数0.8以上の一致率が高い遺伝子多型を4つ(*EXO1* rs1047840、*PTPRD* rs35929428、*IFNAR2* rs2229207、*FAM3B* rs111988437)抽出した。その後PROVEAN prediction (<http://provean.jcvi.org/index.php>)によりアミノ酸置換が蛋白質機能に影響を及ぼすか検討したところ、*Receptor-Type Tyrosin-Protein Phosphatase Delta (PTPRD)* rs3929428 (R995C)のみが機能異常ありと判定された。

3. TaqMan SNP genotyping assayによるPTPRD多型頻度の検討

NAFLD群17例、HV群14例を追加し、NAFLD群53例およびHV群41例でPTPRD rs35929428の多型頻度をTaqMan genotyping assayにて検討した。NAFLD群では29例において肝生検が施行され、7例で肝硬変と診断を受けていた。組織学的にMatteoni分類Type 3または4と診断されるNASHは22例であった。TaqMan genotyping assayではPTPRD rs45929428のGA群はNAFLD群がHV群よりも有意に多かった ($p=0.015$ 、OR=5.00、95%CI: 1.33-18.70)。

4. PTPRD rs35929428と肝線維化および脂肪沈着との関連

NAFLD群53例のうちPTPRD rs35929428のGG群(38例)とGA群(15例)では年齢、性別、血液検査所見、メタボリック症候群、肝癌発症率および肝生検症例における肝組織所見には有意差は認めなかったが、肝線維化進展の指標であるFib-4 indexが1.45以上の症例はGA群の割合が有意に多かった (Fib-4 index < 1.45 vs Fib-4 index \geq 1.45: 7.1% vs 35.9%, $p < 0.05$)。肝生検組織標本における脂肪沈着の程度はGG群に比してGA群で強く認めた ($p < 0.05$)。

5. NAFLD患者におけるPTPRD発現

PTPRD rs35929428のGG群(15例)とGA群(11例)の肝組織標本を用いてNAFLD患者の肝組織におけるPTPRD蛋白発現を評価するため、免疫組織化学染色を行ったところ肝組織の肝細胞にPTPRD蛋白の陽性像を認めたが、GG群とGA群では陽性率に差は認めなかった。

6. PTPRD rs35929428 R995C蛋白の機能解析

ヒト肝癌細胞株 (Huh7) にPTPRD rs35929428がコードする蛋白PTPRD R995Cを発現させ、STAT3のリン酸化に与える影響について検討した。その結果wild type PTPRDを導入したHuh7ではIL-6刺激によりSTAT3のリン酸化が亢進しているのに対し、PTPRD R995Cを導入したHuh7ではSTAT3のリン酸化が減弱していた。次にNAFLD患者の肝組織において16例のPTPRD GG群と9例のPTPRD GA群で免疫組織化学染色を行いSTAT3のリン酸化を評価したところ、GG群の方がGA群よりも肝細胞核に強くリン酸化STAT3を認め、pSTAT3陽性細胞数はGA群がGG群より減少していた ($p < 0.05$)。

考 案

本研究では、炎症性疾患、エネルギー代謝、発癌および金属代謝・輸送に関わる1,031遺伝子12,609 ampliconを抽出してオリジナルパネルを作成し、high-throughput sequencerを用いてNAFLD患者における新規遺伝子多型の探索を行い、EXO1 rs104780、IL23R rs1884444、CPOX rs1131857、IL10RA rs2228055、PTPRD rs35929428、IFNAR2 rs2229207およびFAM3B rs111988437の7種類の遺伝子を抽出した。そのうち蛋白機能解析からPTPRD rs35929428を日本人NAFLDにおける新規SNPとして新たに同定した。

肝線維化の指標であるFib-4 indexが高値の症例においてPTPRD rs35929428 GA群の割合が有意に多く、肝線維化進展との関連が示唆された[3]。また、肝組織標本を用いた検討では、GA群において高度の肝脂肪沈着を認めていることから、PTPRD遺伝子多型はNAFLDの主病態である肝細胞脂肪沈着と肝線維化の進展に関与している可能性が示唆された。

PTPRDはチロシン残基の705番目のSTAT3を脱リン酸化させる1回膜貫通型蛋白質であり、STAT3を脱リン酸化することで転写因子としての機能を抑制することにある。STAT3は肝組織における脂肪蓄積、炎症、肝再生および線維化の調節において中心的な役割を有している。In vitroの検討からPTPRD R995CはIL-6刺激によるSTAT3のリン酸化を減弱させており、PTPRD R995CはSTAT3脱リン酸化作用のgain of functionを有していることが示された。さらに肝組織におけるpSTAT3陽性細胞率はPTPRD rs35929428 GG群に比較しGA群で低値であり、in vitroの検討を支持する結果であった。以上からPTPRD遺伝子多型はSTAT3の脱リン酸化抑制を介して肝細胞脂肪化や線維化に関与する可能性が示唆された。

結 論

本研究では日本人NAFLD患者における疾患感受性遺伝子多型として新規にPTPRD

rs35929428を同定した。*PTPRD* rs35929428は肝組織におけるSTAT3のリン酸化を減弱させることにより肝線維化、および肝脂肪化に関与していることが示唆された。なお、本研究の成果は「NASH/NAFLDの疾患感受性遺伝子多型の同定と診断への応用」で特許出願中である（特願2015-061455）。




引 用 文 献

1. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-1465.
2. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphism of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One* 2012; 7: e38322
3. Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, et al. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 2.

参 考 論 文

1. Hasebe T, Tanaka H, Sawada K, **Nakajima S**, et al. Bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator of liver sinusoidal endothelial cells induces iron overload in a fatty liver mouse model. *J Gastroenterol* 2017; 52: 341-351.
2. Hasebe T, Sawada K, **Nakajima S**, et al. Effective control of relapsing disseminated intravascular coagulation in a patient with decompensated liver cirrhosis by recombinant soluble thrombomodulin. *Intern Med* 2014; 53: 29-33.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	中嶋 駿介
		審査委員長	西川 祐司 
		審査委員	古川 博之 
		審査委員	谷口 隆信 
学位論文題目			
<p>Polymorphism of Receptor-type Tyrosine-Protein Phosphatase Delta Gene Is Associated with the Development and Progression of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (PTPRD 遺伝子多型は非アルコール性脂肪性肝疾患の発症・進展に関与する) 掲載雑誌: Journal of Gastroenterology and Hepatology (受理済み、印刷中)</p>			
<p>(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)</p> <p>非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症には遺伝的な要素が重要であると考えられているが、詳細は不明である。これまで NAFLD の病態に関連する single nucleotide polymorphism (SNP) が複数報告されてきたが、日本人患者と相関を示すものは PNPLA3 rs738409 のみであった。本研究は日本人の NAFLD 患者 36 例および健康ボランティア 27 例を、高出力シークエンサーによる遺伝子多型解析 (1031 遺伝子)、TaqMan SNP genotyping assay、PROVEAN prediction の組み合わせにより調べ、receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta (PTPRD) rs3929428 を同定した。この多型は肝線維化および脂肪沈着とも有意に関連しており、NAFLD の発症、進展に深く関わっていると推定された。</p> <p>PTPRD は蛋白チロシン脱リン酸化酵素としての機能を持ち、肝線維化や脂肪化に影響を与える STAT3 の脱リン酸化に関わることが知られている。上記 SNP では 995 番目のアミノ酸にアルギニンからシステインへの変換が生じるが、これは蛋白機能に影響している可能性が高い。実際に、申請者らは野生型 PTPRD 遺伝子と変異型 PTPRD 遺伝子をヒト肝癌細胞株 HuH7 に発現させ、interleukin-6 による STAT3 リン酸化が変異 PTPRD により抑制されることを見出した。この結果は、変異により PTPRD の脱リン酸化活性が亢進することを示唆している。</p> <p>本研究は日本人 NAFLD に関連する新規の SNP を発見した点できわめて大きな意義を有している。また、変異蛋白の機能的変化も実験的に示し、STAT3 制御を介した NAFLD の発症、進展メカニズムを考える上で重要な情報を提供している。申請者は審査委員の質問に適切に応答し、関連領域の知識も十分であると考えられた。審査委員会は慎重な討議の結果、本論文は学位論文にふさわしいとの結論に至った。</p>			