

課題番号 : 26 指 107

研究課題名 :

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者における疾患感受性遺伝子候補としての HLA ハプロタイプ解析

-肝疾患診療連携拠点病院のネットワークを通じた大規模な遺伝子解析への展開-

主任研究者名 : 野崎雄一

分担研究者名 :

キーワード : NAFLD/NASH、メタボリックシンドローム、脂肪肝

研究成果 :

【研究計画と成果】

[本研究の研究計画の概要]

- 1) 本研究の第一段階として、NCGM を含めた数施設でのパイロット研究を先行させる。

NCGM(センター病院・国府台病院)以外には、横浜市立大学附属病院消化器内科、東京医科大学病院消化器内科、順天堂大学医学部附属順天堂医院消化器内科と共同研究をおこなう。

具体的な方法として、対象は肝生検による病理学的診断により NASH と確定された症例で、十分なインフォームドコンセントのもとでの書面での同意が得られた患者の約 300 症例を目標とする。

NASH 診断では、Matteoni 分類 (*Gastroenterology*.1999;116:1413-9.)、Brunt 分類 (*Am J Gastroenterol*.1999;94:2467-74.)、NAFLD activity score(NAS) (*Hepatology*.2005;41:1313-21.)を用いて専門病理医がおこなう。

それぞれの NASH 患者について、診断目的の肝生検時に採取された凍結肝組織あるいは末梢血単核球から抽出された DNA 検体を収集し、-80℃下で保管する(NCGM センター病院・国府台病院)。

収集・保管された DNA を用いて、HLA 遺伝子のタイピングをおこなう(肝炎・免疫研究センター)。

NASH 患者の HLA ハプロタイプの分布を、健常人における HLA ハプロタイプ(既在)のものと比較して、NASH に特徴的なタイプについて検討する。

この際、副次的に身体所見、問診データに加え、血清解析にて NASH 病態に関わる各種マーカー、SNP 解析では *PNPLA3* について解析し、データを収集・管理する。

本研究は、NASH 臨床研究における網羅的な遺伝子解析として既に NCGM 倫理委員会で承認されており(遺伝子:受付番号 131;平成 26 年 3 月 17 日承認 承認番号:NCGM-A-000131-01)、また既に UMIN 登録も完了している(UMIN 登録番号; UMIN000009841)。

- 2) この第一段階で、予想されるように HLA ハプロタイプと NASH との強い関連性が示唆されれば、その後は更に多くの肝疾患診療連携拠点病院を中心に構成された全国 NASH 研究グループの共同研究を通じて、大規模な臨床研究による検証とデータベースの構築をおこなう予定である。

NASH 病態進展の”2nd hit”にあたる NASH 肝炎と HLA を介する免疫機構との関係について機序解明の基礎研究を立案するというような、基礎と臨床の橋渡し研究の一環として予定する。

[初年度の研究計画・達成目標]

- 1) NCGM 倫理委員会にて本研究に関する承認を得る(NCGM 内研究については完了している:遺伝子:受付番号 131;平成 22 年 9 月 9 日承認)。
- 2) 上記研究の期間延長と多施設共同研究への移行の承認完了(遺伝子:受付番号 131;平成 26 年 3 月 17 日承認 承認番号:NCGM-A-000131-01)。
- 3) 臨床試験登録システムへの登録(UMIN 登録を完了:UMIN 登録番号; UMIN000009841)。

- 4) 共同研究の各施設での倫理委員会承認。
- 5) 症例登録と検体収集(NCGM センター病院での約 30 例は既に登録、使用可能な DNA 検体の収集保管が完了)。
DNA は凍結肝組織あるいは末梢血単核球から抽出したものを -80°C 保存とする。
- 6) 共同研究施設での症例登録と検体・データ提供を受ける。
- 7) 多施設共同でのデータベース作成。
- 8) 一定量の検体が収集された段階で適宜 DNA 検体を用いて HLA ハプロタイプ解析(肝炎・免疫研究センター)。
- 9) 途中解析により、蓄積症例数の評価。

[初年度の達成率・進捗状況・研究結果]

H27.04.17 時点での達成率：(100) %

初年度の研究計画及び達成目標は平成 27 年 04 月 17 日の段階で全て達成している。

NCGM 倫理委員会にて本研究に関する研究期間延長と多施設共同研究への移行に関する承認を完了し(遺伝子:受付番号 131;承認番号:NCGM-A-000131-01) (達成目標 1), 2)), 臨床試験登録システムへの多施設共同研究の形式にて新規登録を完了した(UMIN 登録:UMIN 登録番号: UMIN000014850) (達成目標 3))。共同研究施設として、横浜市立大学医学部肝胆膵消化器病学(平成 26 年 9 月 25 日開催、同 29 日承認通知)と東京医科大学消化器内科(平成 26 年 6 月 25 日承認通知:受付番号 2757)での倫理委員会承認。(達成目標 4))。

症例登録と検体収集に関して、末梢血単核球から抽出し -80°C 保存した DNA について、主施設の NCGM センター病院消化器内科の 50 例、共同研究施設の横浜市立大学肝胆膵消化器病学の 369 例、東京医科大学消化器内科の 2 例の計 **421 例** を症例登録と検体・データ収集し (達成目標 5), 6)), 多施設共同でのデータベース作成した (達成目標 7))。

現段階で収集された DNA 検体を用いて、肝炎・免疫研究センターにて HLA ハプロタイプ解析を実施(使用試

薬:TaqMan® SNP Assays, Human SM HLA complex group22)した (達成目標 8))。更なる症例登録の追加を図るため、主施設(NCGM センター病院に加え国府台病院消化器内科)、共同研究施設である東京医科大学消化器内科にて症例登録追加を進めている (達成目標 9))。

今後、JSNP database (http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html)などの公開データベースから得られる情報を用いて、健常コントロール群を設定し、途中解析に用いる疾患群の一覧は右上の通り。

研究経過の進捗は概ね良好と判断している。

n	306			
gender (M/F)				
age	50 ± 16			
BMI	28 ± 5			
NAS	3.5 ± 1.4			
	Matteoni 1	Matteoni 2	Matteoni 3	Matteoni 4
n	40	52	106	108
gender (M/F)				
age	46 ± 14	48 ± 17	48 ± 15	54 ± 15
BMI	26 ± 4	26 ± 4	28 ± 5	28 ± 5
Plt	26 ± 6	24 ± 6	23 ± 6	19 ± 6
AST	38 ± 31	44 ± 24	58 ± 34	72 ± 127
ALT	61 ± 45	74 ± 61	96 ± 59	84 ± 63
IV型コラーゲン	4.8 ± 1.4	5.0 ± 2.1	5.0 ± 1.4	5.4 ± 2.5
NAS	1.9 ± 0.8	2.5 ± 0.9	4.2 ± 1.1	4.0 ± 1.2

Subject No. : 26-Shi-107
Title : Analysis of the HLA Haplotype as a Candidate Gene Encoding the Disease Susceptibility in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)
-Progression into Large-Scale Gene Analysis via the Network of Core Hospitals for Linked Liver Disease Management-
Researchers : Yuichi Nozaki
Key word : NAFLD/NASH, metabolic syndrome, fatty liver
Abstract : Study Outcome:

[Study Plan and Outcome]

(Study Plan Outline)

- 1) As a preliminary step to this study, a pilot study shall be carried out at several facilities, including NCGM.

The study shall be conducted jointly by the Yokohama City University Hospital Department of Gastroenterology, the Tokyo Medical University Hospital Department of Gastroenterology and the Juntendo University Hospital Department of Gastroenterology, in addition to NCGM (Center Hospital, Kohnodai Hospital).

The goal is set at enrolling about 300 patients with a definitive diagnosis of NASH confirmed by pathological examination of biopsied liver tissue, who are willing to provide written informed consent after receiving a thorough explanation about the study.

The diagnosis of NASH shall be made by specialists in pathology, based on the Matteoni classification (*Gastroenterology*. 1999;116:1413-9), Brunt classification (*Am J Gastroenterol*. 1999;94:2467-74) and the NAFLD activity score (NAS) (*Hepatology*. 2005;41:1313-21).

In each patient with NASH, DNA shall be extracted from the frozen liver tissue (collected by liver biopsy for diagnosis) or from peripheral blood mononuclear cells, and stored at -80°C (NCGM Center Hospital/Kohnodai Hospital).

The DNA collected and stored thus shall be used for HLA gene typing (Research Center for Hepatitis and Immunology).

The distribution of the HLA haplotypes in NASH patients shall be compared with the existing data on the HLA haplotype distribution in healthy individuals to analyze the HLA types characteristic of NASH patients.

This analysis shall be accompanied by secondary analysis of the physical findings, history, data on various markers of NASH obtained by serological testing, and data on the *PNPLA3* gene obtained by SNP analysis. Data collection and management shall be conducted in this way.

This study has been approved as a thorough gene analysis within the framework of clinical studies on NASH by the NCGM Ethics Committee (Genetic: Application No. 131; Approved on March 17, 2014, Approval No.: NCGM-A-000131-01). It has already been registered with UMIN (UMIN Registration No.: UMIN000009841).

- 2) If a strong association between an HLA haplotype and NASH is suggested, as anticipated, in this first step of the study, verification through a large-scale clinical study and establishment of a database will subsequently be undertaken through collaborative studies by the Nationwide NASH Study Group organized primarily by many core hospitals for linked liver disease management.

This study is planned within the framework of bridging research between basic and clinical fields, including planning of basic research for elucidation of the mechanism underlying the relationship between NASH hepatitis and the HLA-mediated immune system (corresponding to the “2nd hit” of NASH progression).

[First Year’s Study Plan/Goals]

Researchers には、分担研究者を記載する。

- 1) Acquisition of approval for this study by the NCGM Ethics Committee (this process has been completed for the study within the NCGM: Genetic: Application No. 131; Approved on September 9, 2010)
- 2) Completion of approval for extension of the period of the above-mentioned study and its transition to a multicenter study (Genetic: Application No. 131; Approved on March 17, 2014, Approval No.: NCGM-A-000131-01)
- 3) Completion of registration with the Clinical Study Registration System (UMIN Registration Completed: UMIN Registration No.; UMIN000009841)
- 4) Approval by the ethics committee of each participating facility
- 5) Case registration and sampling (Case registration and collection/storage of valid DNA samples completed for about 30 cases at the NCGM Center Hospital)
DNA extracted from frozen liver tissues or peripheral blood mononuclear cells are stored at -80°C.
- 6) Completion of case registration at all participating facilities and receipt of samples and data from these facilities
- 7) Creation of a database jointly by the participating facilities
- 8) HLA haplotype analysis using the DNA samples after collection of a certain number of samples (Research Center for Hepatitis and Immunology)
- 9) Interim analysis of the accumulated cases

[First Year's Goal Achievement Rate/Progress/Outcome]

Goal achievement rate as of April 17, 2015: (100)%

The study plan and all the goals for the first year have been achieved as of April 17, 2015.

Extension of the study period and transition of the study into a multicenter study have been approved by the NCGM Ethics Committee (Genetic: Application No. 131; Approval No.: NCGM-A-000131-01) (Goal 1), 2)). New registration of this study in the form of a multicenter study has been carried out with the Clinical Study Registration System (UMIN Registration: UMIN Registration No.; UMIN000014850) (Goal 3)). Regarding approval by the ethics committees of the other participating facilities, approval has been obtained from the Ethics Committee of the Yokohama City University School of Medicine Department of Gastroenterology and Hepatology (meeting held on September 25, 2014, approval announced on September 29 of the same year) and the Tokyo Medical University Department of Gastroenterology (approval announced on June 25, 2014: Application No. 2757) (Goal 4)).

Concerning DNA extracted from the peripheral blood mononuclear cells and stored at -80°C, case registration and sample/data collection have been completed for 421 cases in total, including 50 cases from the NCGM Center Hospital Department of Gastroenterology (main facility), 369 cases from the Yokohama City University Department of Gastroenterology and Hepatology (one of the participating facilities), and 2 cases from the Tokyo Medical University Department of Gastroenterology (another participating facility) (Goal 5), 6)). A database has been created jointly by multiple facilities (Goal 7).

HLA haplotype analysis has been conducted on the DNA samples collected to date at the Research Center for Hepatitis and Immunology (reagents used: TaqMan® SNP Assays, Human SM HLA complex group22) (Goal 8). To increase the number of cases registered, additional case registration is now under way at the main facilities (Kohnodai Hospital Department of Gastroenterology in addition to the NCGM Center Hospital) and one of the participating facilities (Tokyo Medical University Department of Gastroenterology) (Goal 9)).

From now on, a healthy control group will be incorporated in the study, using the information available from open databases such as the JSNP database

n	306			
gender (M/F)				
age	50±16			
BMI	28±5			
NAS	3.5±1.4			
	Matteoni 1	Matteoni 2	Matteoni 3	Matteoni 4
n	40	52	106	108
gender (M/F)				
age	46±14	48±17	48±15	54±15
BMI	26±4	26±4	28±5	28±5
Plt	26±6	24±6	23±6	19±6
AST	38±31	44±24	58±34	72±127
ALT	61±45	74±61	96±59	84±63
TypeIV collagen	4.8±1.4	5.0±2.1	5.0±1.4	5.4±2.5
NAS	1.9±0.8	2.5±0.9	4.2±1.1	4.0±1.2

(http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html). The diseases covered by the interim analysis are listed in the upper right column.

We judge that the progress of the study to date is reasonably acceptable.

【目的と必要性】

本邦で急増するメタボリックシンドローム患者の予後に大きく関わる進行型NASHの病態解明を進める。

多因子疾患であるNASH病態には環境因子、遺伝的因子双方の強い関与が明らかであるが、本研究ではNASHの疾患感受性遺伝子として、免疫に関与するヒト白血球抗原(HLA)のハプロタイプに注目する。



【方法】

NCGMを主とした多施設共同研究の形式で、NASH診療に携わる複数施設の検体提供のもと、肝炎・免疫研究センターにおいてNASH患者の遺伝子解析をおこない、NASHとHLAハプロタイプとの関連性とその意義について検討する。



【期待される成果】

NASH病態の中でも、関連性の強い遺伝子因子としてHLAの関与を明らかにすることで、NASH病態進展に影響する「炎症」との機序解明に繋がる。

n	306			
gender (M/F)				
age	50 ± 16			
BMI	28 ± 5			
NAS	3.5 ± 1.4			
	Matteoni 1	Matteoni 2	Matteoni 3	Matteoni 4
n	40	52	106	108
gender (M/F)				
age	46 ± 14	48 ± 17	48 ± 15	54 ± 15
BMI	26 ± 4	26 ± 4	28 ± 5	28 ± 5
Plt	26 ± 6	24 ± 6	23 ± 6	19 ± 6
AST	38 ± 31	44 ± 24	58 ± 34	72 ± 127
ALT	61 ± 45	74 ± 61	96 ± 59	84 ± 63
IV型コラーゲン	4.8 ± 1.4	5.0 ± 2.1	5.0 ± 1.4	5.4 ± 2.5
NAS	1.9 ± 0.8	2.5 ± 0.9	4.2 ± 1.1	4.0 ± 1.2

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 26指107

研究課題名： 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者における疾患感受性遺伝子候補としてのHLAハプロタイプ解析
-肝疾患診療連携拠点病院のネットワークを通じた大規模な遺伝子解析への展開-

主任研究者名： 野崎雄一

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid accumulation-independent liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis mouse model.	Nozaki Y, et al.	BMC Gastroenterology	in press	2015
A case of diffuse liver metastasis of small cell lung cancer presenting as acute liver failure and diagnosed by transjugular liver biopsy: a rare case in which no nodular lesions were detected by enhanced CT examination.	Misima S, Nozaki Y, et al.	Case Reports in Gastroenterology	9:81-87	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Tendency to Develop Acute Hepatitis B and its Outcome in HIV Coinfection: Comparison with HIV Infection Alone	Nozaki Y, et al.	65th AASLD	Boston, USA	2014年11月
当院での肝硬変症例におけるアルコール性肝障害とNASHとの成因別の比較検討	野崎雄一ほか	第40回日本肝臓学会東部会	東京	2014年11月
HIV重複感染における急性B型肝炎の発生動向と転帰について -単独感染との比較-	野崎雄一ほか	第22回JDDW	神戸	2014年10月
NASHスクリーニングにおける123I-BMIPP脂肪酸シンチグラフィの有用性	野崎雄一ほか	第100回日本消化器病学会総会	東京	2014年4月
非アルコール性脂肪性肝炎由来の肝硬変患者の血小板値の検討	三島沙織、野崎雄一ほか	第22回JDDW	神戸	2014年10月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
Investigation of the usefulness of scintigraphy measuring fatty acid metabolism in staging diagnosis of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD)	Nozaki Y, et al.	18th Japan-Korea Hepatitis Meeting	Seoul, Korea	2014年7月26日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。