

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 : 柳瀬 幹雄

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】

### 〔研究計画の概要〕

- 1) 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の疾患感受性遺伝子候補として、HLA ハプロタイプ解析をおこなう。本研究の第一段階として、当センター(NCGM センター病院・国府台病院・肝炎・免疫研究センター)を主施設とした多施設共同研究にてパイロット研究を先行させる。研究の対象は、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、HLA 遺伝子のタイピングをおこない、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、血液検査、画像検査データに加え、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* についての解析などを実施し、データを収集・管理する。健常コントロール群として、公開データベースを利用して健常者データを含めた統計解析も予定する。
- 2) 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。

### 〔達成度・成果〕

3年の研究計画の2年目終了の時点にて、各施設の倫理委員会での承認やUMIN登録を経た上で、登録症例数が目標症例数300症例に到達し、多施設共同での臨床データベースを作成した。収集されたDNA検体を用いて、NCGM肝炎・免疫研究センターにてHLAハプロタイプ解析を実施し、現在解析作業に入っている。今後、公開データベースから得られる情報などを用いて、健常コントロール群を設定し、更に詳細な解析を行う予定である。

以上から、研究経過の進捗は概ね良好と判断している。

Subject No.: 26-Shi-107  
Title: Analysis of HLA Haplotype as a Candidate Gene Encoding 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: Mikio Yanase  
Key words: NAFLD/NASH, metabolic syndrome, fatty liver  
Abstract: Study outcome:

#### [Study Plan and Outcome]

##### (Study Plan Outline)

1) We shall analyze HLA haplotype as a candidate gene encoding disease susceptibility in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). As a preliminary step to this study, a pilot study will be carried out at several facilities, including the main facility NCGM Central Hospital, Kohnodai Hospital and the Research Center for Hepatitis and Immunology. The goal is to enroll 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 full explanation about the study. The diagnosis of NASH will 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 NAFLD activity score (*Hepatology*. 2005;41:1313-21).

In each patient with NASH, DNA will be extracted from frozen liver tissue (collected by liver biopsy for diagnosis) or peripheral blood mononuclear cells, stored, and used for HLA gene typing to analyze the HLA types characteristic of NASH patients. This analysis will be accompanied by secondary analysis of the physical findings, history, blood tests, imaging, data on various markers of NASH obtained by serological testing, and data on the *PNPLA3* gene obtained by single nucleotide polymorphism analysis. Data collection and management will be conducted in this way. A healthy control group will be incorporated into the statistical analysis of this study, using the information available from open databases.

2) If a strong association between HLA haplotype and NASH is suggested, as anticipated, in this first step of the study, verification through a large clinical study and establishment of a database will 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 “second hit” of NASH progression).

#### [Goal Achievement Rate/Progress/Outcome]

We are in the second year of the 3-year project. We have received approval for this study from the ethics committee in each participating facility. We have completed registration with the Clinical Study Registration System (UMIN Registration). Case registration at all participating facilities and receipt of samples and data from these facilities have been completed for 300 cases. A clinical database has been created jointly by the participating facilities. HLA haplotype analysis has been conducted on the DNA samples collected to date at the Research Center for Hepatitis and Immunology, and the statistical analysis is in progress. From here, a healthy control group will be incorporated into the study,

Researchers には、分担研究者を記載する。

using the information available from open databases to perform the statistical analysis in more detail.

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： 柳瀬 幹雄

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Hepatitis B virus vaccination-related seroprevalence among health-care personnel in a Japanese tertiary medical center.	<u>Yanase M.</u> , et al.	Hepatol Res.	in press	2016
Generalized granuloma annulare successfully treated with narrowband ultraviolet B and anti-hepatitis C virus therapy.	Mikami E, <u>Yanase M.</u> , et al.	J Dermatol.	in press	2016
Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naive and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomised, phase 3 trial.	Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, Sakamoto N, Korenaga M, Mochizuki H, Nakane K, Enomoto H, Ikeda F, <u>Yanase M.</u> , et al.	Lancet Infect Dis.	15(6):645-53	2015
Deficiency of eNOS exacerbates early-stage NAFLD pathogenesis by changing the fat distribution.	<u>Nozaki Y.</u> , et al.	BMC Gastroenterol.	15(1):177. doi: 10.1186/s12876-015-0409-9	2015
Usefulness of Magnetic Resonance Imaging for the Diagnosis of Hemochromatosis with Severe Hepatic Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case Report.	<u>Nozaki Y.</u> , et al.	Intern Med.	in press	2016
Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease: Multicenter survey.	Tokushige K, Hyogo H, Nakajima T, Ono M, Kawaguchi T, Honda K, Eguchi Y, <u>Nozaki Y.</u> , Kawanaka M, Tanaka S, Imajo K, Sumida Y, Kamada Y, Fujii H, Suzuki Y, Kogiso T, Kario Y, Munekage K, Kuromatsu R, Ooeda S, <u>Yanase Y.</u> , et al.	J Gastroenterol.	in press	2015

## 研究発表及び特許取得報告について

### 学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

### 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
該当なし				

### 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。