

200933013A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

テーラーメイド治療を目指した肝炎ウイルス
データベース構築に関する研究

(H19-肝炎-一般-013)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
テーラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究 ……………	1
	(名古屋市立大学 田中 靖人)
II. 分担研究報告書	
1. ゲノムワイド関連分析による肝炎の宿主遺伝要因の探索……………	13
	(東京大学 徳永 勝士)
2. テーラーメイド医療を目指した肝炎の宿主遺伝要因の検査体制構築……………	17
	(国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター 溝上 雅史)
3. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN・RBV併用療法における治療効果規定因子の データマイニング解析……………	20
	(武蔵野赤十字病院 黒崎 雅之)
4. 肝炎の進展、治療反応性に寄与する宿主遺伝子発現データベースの構築……………	23
	(金沢大学 本多 政夫)
5. 口腔扁平上皮癌における重複癌の検討-HCV感染とインスリン抵抗性 ……………	25
	(久留米大学 長尾 由実子)
6. 肝炎ウイルス統合データベースの構築……………	28
	(国立遺伝学研究所 五條掘 孝)
7. ウイルス変異ーヒトSNPの結合解析・肝炎ウイルス統合データベースの構築…	34
	(名古屋市立大学 新井 理)
III. 研究成果の刊行一覧 ……………	37
IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……………	43
V. 参考資料……………	263

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書（平成21年度）

テーラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究

研究代表者：田中靖人 名古屋市立大学大学院 医学研究科 教授

研究要旨：

本研究は、肝炎ウイルス感染に対する応答性や薬剤応答性の個人差に関わるヒト及びウイルス両方の遺伝子要因を同一個体内で明らかにすることが大きな特徴である。さらにこれらのデータを網羅的に収集する組織作りを行い、統合的にデータベース化し解析することにより、ヒト側要因とウイルス側要因の両方を考慮した知見を得ることを目的とする。

1) 検体及び付帯情報の収集：ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い、全国24施設より検体及び付帯情報の収集を開始した。平成22年3月現在、慢性ウイルス性肝炎患者から合計1,756検体を得た。**2) ヒトSNPs解析**：健常対照者200検体及び肝炎患者群641検体について90万種のSNPタイピングを終了し、各SNPのアリル頻度、遺伝子型頻度等について健常者群、患者群、肝炎亜型患者群の間でゲノムワイド関連分析を行った。その結果、19番染色体上のIL28B遺伝子周辺にペグインターフェロン+リバビリン（PEG-IFN/RBV）併用療法無効に関連する有意なSNP（rs8099917: P 値=3.11×10⁻¹⁵、OR=30.0、rs12980275: P 値=1.93×10⁻¹³、OR=20.3）を発見した。**3) 肝炎テーラーメイド治療を目指した各種要因の解明**：
a) PEG-IFN/RBV併用療法の治療抵抗性因子の解明：治療無効を予測する因子を同定するためのデータマイニング解析ではIL28Bが最も効率的な予測因子であった。治療抵抗性であるIL28B minor群ではInterferon stimulated gene (ISG)を高発現しているケースが多く、IL28B major群ではISG低発現であり、IFN療法の反応が良好である傾向が認められた。b) IL28B SNPs測定法の確立。c) 肝炎ウイルス因子の同定：病態進展及び薬剤応答性に関連する領域の塩基配列を決定した。d) 肝炎ウイルス感染に伴う肝外病変：重複癌発生に関わる因子は、Stage IV、HCV抗体陽性、70歳以上の年齢層であった。**4) 肝炎ウイルス統合データベースの構築**：患者SNPs情報を、その臨床的背景情報とともに管理、解析するデータベースを構築し、収集したデータの登録を行った。併せて、必要とされるデータ解析手法について検討し、同データベースを利用してそれを遂行するインターフェースのプロトタイプを構築した。最終的には、肝炎テーラーメイド医療（治療）を目指した統合型肝炎ウイルスデータベースを公開する。

研究分担者

五條堀 孝	国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター 遺伝情報分析研究室 教授
徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学 教授
溝上 雅史	国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター センター長
本多 政夫	金沢大学医学部 先端医療技術学 教授
黒崎 雅之	武蔵野赤十字病院 消化器科 副部長
長尾 由実子	久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 准教授
新井 理	名古屋市立大学大学院 医学研究科 研究員

A. 研究目的

本邦における慢性肝疾患の原因ウイルスである B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアは約 150 万人、C 型肝炎ウイルス (HCV) キャリアは約 200 万人と推定され、その一部は慢性肝炎から肝硬変・肝細胞癌へ移行するがその機序は不明のままである。また、HCV にはペグインターフェロン・リバビリン併用療法が導入され、一定の効果は認められているが完治率は 50%程度でその副作用の発現率が高い。今回の研究の目的は、(1) 肝炎ウイルス感染に対する応答性 (発症感受性及び病態進展) や薬剤応答性の個人差に関わるヒト及びウイルス両方の遺伝子要因を同一個体内で解析する。(2) 各種データを統括する組織作り、統合的にデータベース化・解析からヒト及びウイルス側要因の両方を考慮した知見を得る。(3) 得られたデータをもとに、病態進展の予測 (ハイリスク群の囲い込み) 及び適切な薬剤の選択を行い、テーラーメイド治療を目指す。(4) 統合型データベース (DB) をすべて公開し、一般臨床でも活用しやすいようなプラットフォームを作成する。

B. 研究方法

研究代表者である田中は、引き続き本研究の主研究施設である名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子解析倫理委員会の規定に基づいて、検体の採取を継続した。これまでに 24 施設においてヒト遺伝子解析倫理委員会の規定に基づいて検体採取が開始され、平成 22 年 3 月現在、1,756 検体が東大の SNP (一塩基多型) センターに届けられている。上記目的を達成するための研究概要を図 (P9) に示す。

1) ヒト SNPs を用いたゲノムワイド関連研究 : 90 万種以上の SNP 解析用プローブが搭載された Affymetrix Genome-Wide Human SNP

Array 6.0 (以下、SNP Array 6.0) を用いて、慢性ウイルス性肝疾患患者群および健常対照群の SNP タイピングを行い、患者群を病態および薬剤応答性に応じてサブグループに分類してゲノムワイド関連分析を行う。ゲノムワイド関連分析は、徳永らが開発した GeneChip analysis ver2.0.10 ソフトウェアを用いて実施する。ゲノムワイド関連分析で検出された疾患感受性候補遺伝子領域において、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析から TagSNP を選択し、DigiTag2 法を用いた再現性確認実験 (Replication study) を実施することにより、疾患感受性遺伝子の同定を目指した。

最後に、第一義的な疾患感受性遺伝子多型を検出するために、Direct sequencing による変異スクリーニングと SNP タイピングを実施する (図 1) (徳永)。

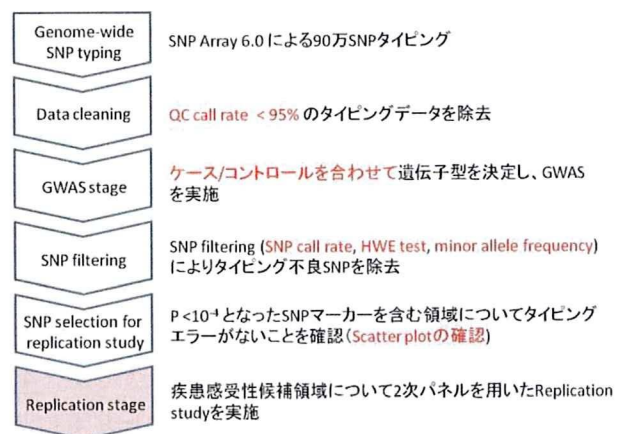


図 1 ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子同定までの流れ

2) 肝炎テーラーメイド治療を目指した各種要因の解明 :

a) ペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の治療抵抗性因子の解明 : PEG-IFN/RBV 併用療法施行した 500 例を集積し、ウイルス遺伝子変異 (ISDR 変異数、Core アミノ酸変異)、ウイルス量、IL28B 遺伝子 SNP

を含む、種々の要因を投入して、治療効果と関連する因子を決定木手法で解析した (SPSS Clementine 12.0 のアルゴリズム C5.0)。IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる (黒崎)。本多研究分担者は、昨年引き続き PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例につき、治療前の肝組織及び末梢血単核球(PBMC)の遺伝子発現プロファイリングを解析した。さらに IL28B 遺伝子多型と肝組織遺伝子発現の関連性を検討した。

b) IL28B SNPs 測定法の確立：標準法であるシーケンス法、簡易法として TaqMan PCR 法 (MGB プローブ) を用い、7900HP (ABI)により検出と比較検討を行った。

c) HBV・HCV ウイルス因子の同定：田中は溝上分担研究者と共同で、HBV 関連肝癌と年齢・性別をマッチさせた無症候性キャリア群を対象として、HBV の全塩基配列を決定することで、HBV 発癌に寄与する遺伝子変異の同定を行った (田中、溝上)。HCV の病態進展及び薬剤応答性・耐性に関連する領域の塩基配列も決定した。

d) HBV・HCV 感染に伴う肝外病変：1992年～1994年に口腔 SCC を発症し、初めて久留米大学病院を受診し入院加療した患者 60 例について、HCV 感染者と非感染者における重複癌ならびにインスリン抵抗性について検討した (長尾)。

3) 肝炎ウイルス統合データベースの構築：これまでに網羅的に収集されたヒト及びウイルスの情報を統合したデータベースを構築するが、これは未だ世界に存在せず、必要性が以前から唱えられていたものである。さらに、日本全国の肝臓病専門医から収集された付帯情報

を活用して、ウイルス性肝炎の特徴づけ(プロファイリング)を詳細に行い、肝炎テーラーメイド治療の確立を目指す(五條堀、溝上、新井)。今年度新たに解析対象となったデータは、昨年度までのゲノムワイド関連解析により発見された薬剤応答性と強い相関を示す SNP を対象に遂行された、DigiTag2 法による解析結果、および、それに関連する臨床情報である。昨年度までに構築したデータベーススキーマを基に、各種手法により収集された SNP データ、そのゲノムワイド関連解析結果、検体に付随する臨床情報を統一的に管理し、解析に供することのできるデータベースを構築する。それを基に、必要とされる解析手法を調査し、その利用者インターフェースを構築する。

C. 研究結果

研究代表者である田中は、本研究の主研究施設である名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子解析倫理委員会の規定に基づいて、検体の採取を継続した。これまでに 24 施設においてヒト遺伝子解析倫理委員会の規定に基づいて検体採取が開始され、平成 22 年 3 月現在、1,756 検体が東大の SNP センターに届けられた。

1) ヒト SNPs を用いたゲノムワイド関連研究 (徳永班員)：本年度は慢性ウイルス性肝疾患患者 246 検体を追加して SNP Array 6.0 を用いてタイピングした。これまでに取得したデータと合わせた患者群合計 641 検体のうち、585 検体は QC call rate が 95%以上となり、QC call rate の平均は 98.01%となった。

QC call rate が 95%以上となった 585 検体のうち、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法が有効 (再燃例も含む)であった日本人患

者 (VR) と無効であった患者 (NVR) の合計 142 検体について、ゲノムワイド関連分析を実施した結果、19 番染色体上の *IL28B* 遺伝子周辺に治療無効に関連する有意な SNP (rs8099917: P 値=3.11 × 10⁻¹⁵、OR=30.0、rs12980275: P 値=1.93 × 10⁻¹³、OR=20.3) を発見した (図 2 および表 1)。

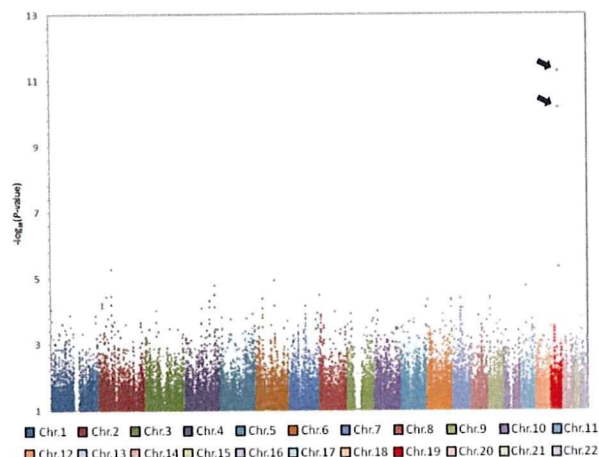


図 2 PEG-IFN α /RBV 併用療法を受けた日本人 HCV 患者 142 検体を用いたゲノムワイド関連解析の結果

GWAS で検出された *IL28B* 遺伝子領域について、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析を行い Tag SNP を含めて 16 か所の SNP を選択し、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施した。GWAS で用いた 142 検体とは独立の NVR 群 50 検体、VR 群 122 検体を用いた Replication study の結果、GWAS で検出された 2 つの SNP は、治療無効に強い関連があることが再現され (rs8099917: P 値=9.47 × 10⁻¹⁸、OR=27.4、rs12980275: P 値=5.46 × 10⁻¹⁵、OR=19.2)、特に rs8099917 のマイナーアレル (G) を持つ HCV 患者群は、危険率約 30 倍の確率 (P 値=2.68 × 10⁻³²) で Peg-IFN α +RBV 併用療法が無効となることが分かった。DigiTag2 法による 16 か所の SNP タイピング結果、および *IL28B* 遺伝子領域の変異スクリーニング/SNP タイピングの結果から連鎖不平衡解析を行ったところ、*IL28B* 遺

伝子を含む 19 番染色体上の約 11.3 kb (chr19: 44,424,341-44,435,661) の領域は非常に強い連鎖不平衡状態 ($r^2 > 0.96$) となっていることが明らかとなった。

2) 肝炎テーラーメイド治療を目指した各種要因の解明:

a) PEG-IFN/RBV 併用療法の治療抵抗性因子の解明 (黒崎班員、本多班員): 黒崎研究分担者は、PEG-IFN/RBV 併用療法中に HCVRNA が陰性化しない NVR は、解析集団全体では 30%であった。IL28B、Core70 アミノ酸変異は単変量では両者とも NVR と有意に関連したが、多変量解析では Core70 は有意因子ではなかった。その原因は、両者間の密接な相関関係であることが判明した。NVR 予測因子を同定するためのデータマイニング解析では IL28B が最も効率的な予測因子として同定された。IL28B が minor であれば NVR は 74%、major であれば 13%であった (図 3)。本多研究分担者は、PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した症例の治療前の肝生検組織では Interferon stimulated gene (ISG) を高発現している群と低発現している 2 群に群別されることが明らかとなった。興味深いことに、治療抵抗性である IL28B minor 群では ISG を高発現しているケースが多く、IL28B major 群では ISG 低発現であり、IFN 療法の反応が良好である傾向が認められた。

dbSNP rsID	Nearest gene	MAF ^a (allele)	Allele (1/2)	Stage	null responder (NVR)			responder (VR)			OR (95% CI) ^b	P-value ^c
					11	12	22	11	12	22		
rs12980275	IL28B	0.15 (G)	A/G	GWAS	20 (25.6)	54 (69.2)	4 (5.1)	56 (87.5)	8 (12.5)	0 (0.0)	20.3 (8.3-49.9)	1.93×10^{-13}
				Replication	10 (20.0)	37 (74.0)	3 (6.0)	101 (82.8)	21 (17.2)	0 (0.0)	19.2 (8.3-44.4)	5.46×10^{-15}
				Combined	30 (23.4)	91 (71.1)	7 (5.5)	157 (84.4)	29 (15.6)	0 (0.0)	17.7 (10.0-31.3)	2.84×10^{-27}
rs8099917	IL28B	0.12 (G)	T/G	GWAS	19 (24.4)	56 (71.8)	3 (3.8)	58 (90.6)	6 (9.4)	0 (0.0)	30.0 (11.2-80.5)	3.11×10^{-15}
				Replication	11 (22.0)	37 (74.0)	2 (4.0)	108 (88.5)	14 (11.5)	0 (0.0)	27.4 (11.5-65.3)	9.47×10^{-18}
				Combined	30 (23.4)	93 (72.7)	5 (3.9)	166 (89.2)	20 (10.8)	0 (0.0)	27.1 (14.6-50.3)	2.68×10^{-32}

表 1 Peg-IFN α +RBV 併用療法が有効であった日本人患者 (VR) と無効であった患者 (NVR) についての関連解析結果. a. 日本人健常群 184 検体におけるマイナーアレル頻度 b. マイナーアレル優性モデルにおけるオッズ比 c. マイナーアレル優性モデルにおける χ^2 検定の P 値

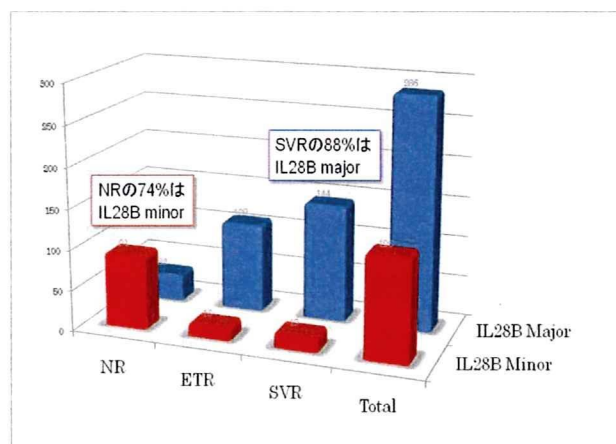


図 3: IL28B SNPs と治療反応性

b) IL28B SNPs 測定法の確立 (溝上班員) : 臨床検体 48 検体を用いた検討から、日本人で最も効果判定に有効と考えられる rs8099917 の簡易法による検出結果は、シーケンス法と完全に一致し、良好な結果であった。

c) HBV・HCV ウイルス因子の同定 (田中、溝上班員) : 昨年までの解析で肝発癌に寄与するエンハンサー、コアプロモーター領域を中心に塩基配列を決定した。現在、ゲノムワイド関連解析を行っており、SNPs などの宿主因子とウイルス因子を統合して解析する。HCV コア領域や NS5A ISDR の塩基配列を決定し、

前述のデータマイニング解析に用いた。

d) HBV・HCV 感染に伴う肝外病変 (長尾班員) : 口腔 SCC 患者 60 例において、多重複癌発生率は 35%、HCV 抗体陽性率は 26.7%であった。HCV 抗体陽性者における多重複癌発生率 (62.5%) は、HCV 抗体陰性者 (25%) よりも有意に高率であった。HCV 抗体陽性者における多重複癌として最も認められた臓器は肝臓 (肝細胞癌) であり、HCV 抗体陰性者では胃 (腺癌) であった。多変量解析により重複癌発生に関わる因子は、Stage IV、HCV 抗体陽性、70 歳以上の年齢層であった。

3) 肝炎ウイルス統合データベースの構築

(五條堀班員、新井班員) : Affymetrix GeneChip による SNP 解析結果 520 件、それを基にした 6 組のゲノムワイド関連解析結果、DigiTag2 法による SNP 再解析結果 314 件をデータベース登録した。臨床情報は匿名化の上、SNP 解析結果に関連付けて登録した。収集した全データを SNP 情報および関連解析結果の統計値より検索可能で、外部データベースを

容易に参照できる。また、臨床情報、ウイルス情報から検索する機能は、検体のサブグループ定義にも利用可能で、その定義は case-control 関連解析の再実行に利用できる (図 4)。また、1997 年以降、肝炎ウイルスデータベースは進化し続けており、現在では 5 種類の肝炎ウイルス、HAV 4,014 件、HBV 28,303 件、HCV 85,142 件、HDV 1,083 件、HEV 3,622 件について、塩基配列を網羅的に収集、系統解析により整理しデータベース化して一般に公開している。



図 4：肝炎統合データベースの機能

D. 考察

ウイルス性肝疾患は肝炎ウイルス感染症であるのでホストのヒト側要因と病原体であるウイルス側要因の両方の相互関係で病態は決定される。したがって、これら両方の要因を同時に検討しないことにはウイルス性肝疾患の本体を明らかにできない。しかしながら現在まで主にウイルス側要因に関する研究しかなされてこなかった。その理由として、ヒト側要因は多くの要因が複雑に絡み合っていることが予想されるがそれらを網羅的に解析する手法が存在しなかったからである。

近年、そのヒト側要因を一度に網羅的に約 90 万個の SNPs で測定するゲノムワイド関連解析 (GWAS) が可能となった。C 型慢性肝炎に対する標準治療である Peg-IFN α +RBV 併用療法において、*IL28B* (*IFNL3*) 遺伝子領域内に存在する遺伝子多型が治療効果と強い関連 (P 値= 2.68×10^{-32} , OR=27.1) を示すことを明らかにした。さらに、データマイニング解析により、治療前効果判別アルゴリズムを構築した結果、*IL28B* が最も重要な治療抵抗性因子であった。このデータマイニング解析結果に基づき、現状の標準治療では効果が見込めない症例を見分けることが可能であり、患者状態に応じた個別化治療の判断基準になるアルゴリズムが作成できた。

IL28B 遺伝子は、通常の C 型肝炎の治療に使用される IFN- α や IFN- β とは異なる IFN- λ の 1 種で、IFN 誘導遺伝子群を誘導して抗ウイルス効果をもたらすことが知られている。rs8099917 のマイナーアレル (G) を持つ患者群では、*IL28B* 遺伝子の発現量が有意に低いことから、これが原因となって治療効果が不十分になっている可能性が考えられる。今後、この *IL28B* を増強する新規薬剤を開発することで、現在 Peg-IFN α +RBV 併用療法が効かない患者群や効果不十分な患者群も根治が望める可能性がある。また、MGB プローブを用いた簡易法は、シーケンス法に比べ、方法が簡便で判定が容易のため検査時間 (人件費軽減) が短縮され、処理能力の向上 (多検体処理可能) と試薬が安価なので検査費用の軽減が図れる可能性が高いと考えられた。

データの由来、種類に依らない統一的なデー

データベース構造、操作の共通化を図った利用者インターフェースを構築することで、利便性の向上が実現できたと考えられ、これを利用して利用者が独自の解析を容易に遂行することが期待できる。

E. 結論

今年度までに明らかとされたウイルス遺伝子情報、SNP 情報、臨床情報はすでに統合され、肝炎ウイルス統合データベースのプロトタイプは完成した。将来的には、遺伝子発現データとの統合、さらにはデータマイニング解析によりウイルス、宿主、臨床情報(病態、治療効果)の各因子を統合して解析することが可能である。臨床の分野においては、本データベースを参照することにより、患者 SNPs とウイルス変異の組み合わせから病態進展の予測及びハイリスク群の抽出が可能となり、テーラーメイド治療への展開が期待される。従って、適切な治療法の選択および新たな治療法の開発で患者の予後を改善するのみならず、肝硬変・肝癌という高度な医療が必要な患者数を減らすことにより、医療費の低減に繋がり、社会の福祉に寄与することができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Interferon λ s and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res*, in press.
2. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of

the human hepatitis B virus. *Hepatol Res*. 2010. 40(1):14-30.

3. Mukaide M, Tanaka Y, Shin-I T, et al. Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. 54(2):882-9.
 4. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009. 41(10):1105-9.
 5. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009. 83(20):10538-47.
 6. 田中靖人, 徳永勝士, 溝上雅史. IL28B: C型肝炎治療効果を規定する遺伝子多型C型肝炎に対するテーラーメイド治療の確立を目指したゲノムワイド関連解析肝胆膵 2009. 59 (6): 1187-1193.
- ### 2. 学会発表
1. ゲノムワイド関連分析による肝炎の宿主遺伝要因の探索. 田中靖人、徳永勝士、溝上雅史. 第13回日本肝臓学会大会(シンポジウム7)
 2. B型肝炎に対する Adefovir、Entecavir

の治療成績と多剤耐性変異株に対する Tenofovir の有効性. 菅内文中、田中靖人、溝上雅史. 第13回日本肝臓学会大会 (シンポジウム 10)

3. IL28B 遺伝子多型と C 型肝炎の治療反応性. 杉山真也、田中靖人. 第 83 回日本薬理学会 (シンポ)
4. Identification of genetic variants in the *HLA-DP* locus associated with chronic hepatitis B in a genome-wide association study. Kentato Matsuura, Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Shuhei Hige, Yasuhiro Asahina, Kiyooki Ito, Fuminaka Sugauchi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston 2009.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
「C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー及びC型肝炎の治療効果の予測を行う方法並びにC型肝炎の予防又は治療剤」
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ヒトゲノム倫理委員会承認状況(現時点:24施設)

	施設名	代表	ヒトゲノム倫理委員会	担当者
1	名古屋市立大	田中靖人	○ (2007.3.30)	田中靖人
2	国立国際医療センター	溝上雅史	○	正木尚彦、伊藤清顕
3	東京大	徳永勝士	○	西田奈央、上原靖加
4	武蔵野赤十字病院	黒崎雅之	○	黒崎雅之
5	金沢大	本多政夫	○	酒井明人
6	久留米大	長尾由実子	○	長尾由実子
7	北海道大	髭修平	○	髭修平
8	岩手医大	鈴木一幸	○	阿部弘一
9	山形大	河田純男	○	渡辺久剛
10	埼玉医大	持田智	○	持田智
11	東京医科歯科大	坂本直哉	○	中川美奈
12	山梨大	榎本信幸	○	前川伸哉
13	信州大	田中榮司	○	松本晶博
14	国立大阪医療センター	三田英治	○	三田英治
15	大阪市立	河田則文	○	田守昭博
16	京都府立医大	伊藤義人	○	西村健
17	兵庫医大	西口修平	○	榎本平之
18	鳥取大	村脇義和	○	大山賢治
19	川崎医大	日野啓輔	○	是永匡紹
20	岡山大	山本和秀	○	池田房雄
21	山口大	坂井田功	○	坂井田功
22	愛媛大	恩地森一	○	日浅陽一
23	長崎医療センター	八橋弘	○	八橋弘
24	鹿児島大	坪内博仁	○	宇都浩文

これまでの研究成果

全国24施設からの検体提供(各施設で匿名化)

個人情報管理者

* 平成22年3月現在

ヒトSNPs・ゲノムワイド解析

- ・ 健康人 200例 (徳永班員)
- ・ 慢性肝疾患 1,756例

ヒトSNPs情報

患者付帯情報の収集・解析

(田中、研究協力者)

肝炎ウイルス塩基配列決定

- ・ 肝癌症例 200例
- ・ B型慢性肝炎 140例
- ・ C型慢性肝炎 450例

肝炎ウイルスゲノム情報

肝炎ウイルス統合データベースの構築

- ・ ウイルス配列DBの更新
- ・ 患者SNP DB及び患者情報DBの設計

(五條堀、溝上、新井)

IL28Bの発見: PEG-IFN/RBV
無効を規定する宿主因子

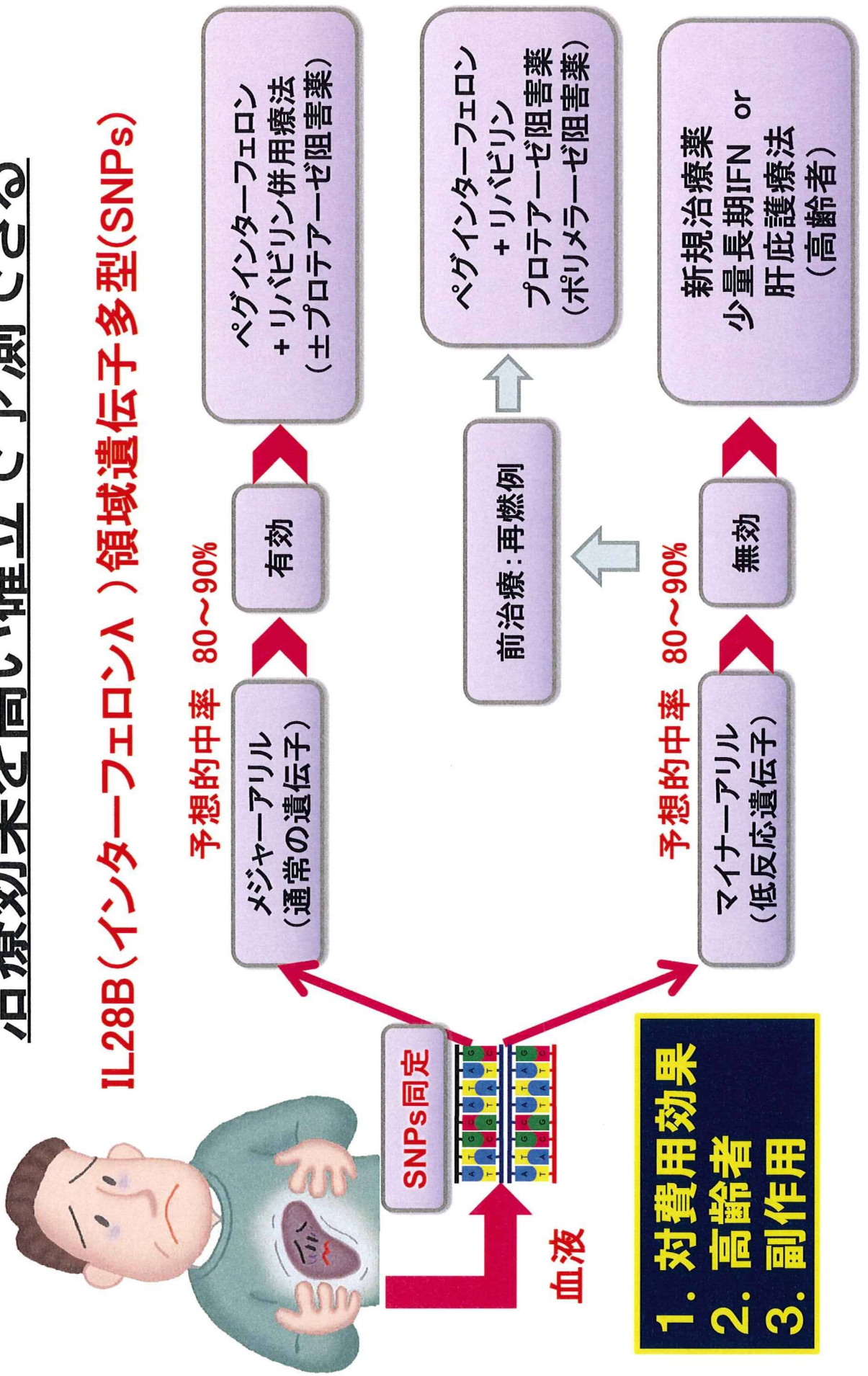
HLA-DPの発見: HBV慢性化
に寄与する宿主因子

HCV変異: コア70変異、NS5A
領域 (ISDR/IRRDR)の決定

HBV変異: エンハンサー、コア
プロモーター、プレコア変異

臨床応用 ⇒ テーラーメイド医療実現へ

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法 治療効果を高い確立で予測できる



- 1. 対費用効果
- 2. 高齢者
- 3. 副作用

II. 分担研究、研究協力報告書

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

テーラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究

分担研究者：徳永勝士 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学 教授
西田奈央 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学 特任助教

分担研究課題：ゲノムワイド関連分析による肝炎の宿主遺伝要因の探索

研究要旨：肝炎ウイルスに感染した宿主側の病態促進因子及び薬剤応答性を規定する遺伝要因の解明を目的として、90万種類以上のSNPを対象としたゲノムワイド関連分析を実施した。本年度は慢性ウイルス性肝疾患患者246検体を追加して解析した。これまでに取得した患者群合計641検体のうち585検体でQC call rateが95%以上となり、QC call rateの平均は98.01%となった。患者群を病態および薬剤応答性に応じてサブグループに分類し、健常対照群200検体とともにゲノムワイド関連分析を実施したところ、ゲノムワイド有意水準に達する遺伝子領域を複数か所検出した。このうち特に、C型肝炎に対する標準治療であるPeg-IFN α +RBV併用療法において、*IL28B* (*IFN λ 3*) 遺伝子領域内に存在する遺伝子多型が治療効果と強い関連 (P 値= 2.68×10^{-32} 、OR=27.1) を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象としたゲノムワイド関連分析を行うことにより、宿主側の肝病態進展に寄与する遺伝因子、治療効果に寄与する遺伝因子、ウイルス感染感受性に寄与する遺伝因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

90万種以上のSNP解析用プローブが搭載されたAffymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0（以下、SNP Array 6.0）を用いて、慢性ウイルス性肝疾患患者群および健常対照群のSNPタイピングを行い、患者群を病態および薬剤応答性に応じてサブグループに分類してゲノムワイド関連分析を行う。

本研究では、まずゲノムワイド関連分析により候補遺伝子領域を検出し、引き続いて2次パネルを用いた再現性確認実験（Replication study）を実施することにより、疾患感受性遺伝子の同定

を目指した(図1)。

ゲノムワイド関連分析における擬陽性関連の発生を効果的に抑えるために、(1)QC call rateが95%以上となったタイピングデータのみを用いて、(2)対象群と対照群を合わせて Genotyping Console ver3 ソフトウェアによる遺伝子型を決定する。続いて、SNP Array 6.0 に搭載された全90万SNPの中に含まれる、日本人では頻度が低く統計解析に不適切なSNPやタイピング精度の低いSNPなどをSNP filteringにより除去する。最後に、統計解析の結果から P 値 $<10^{-4}$ となったSNPについてタイピング生データである散布図を確認し、擬陽性関連が疑われるSNPを除去する。

ゲノムワイド関連分析は、われわれが開発した GeneChip analysis ver2.0.10 ソフトウェアを用いて実施する。ゲノムワイド関連分析で検出された疾患感受性候補遺伝子領域において、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析から TagSNP を選択し、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施する。DigiTag2 法は、複数か所のSNPを

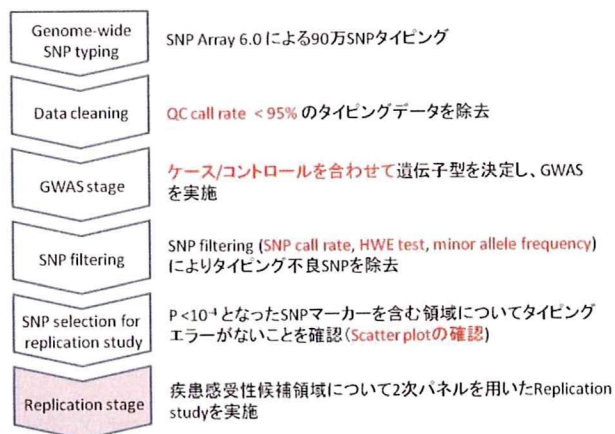


図 1 ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子同定までの流れ

同時に解析することができるため、ゲノムワイド関連解析で検出された複数の疾患感受性遺伝子候補領域の中から、真の疾患感受性遺伝子を効率よく特定することができる(図2)。

DigiTag2法は、(1)マルチプレックスPCR、(2)エンコード反応、(3)ラベリング反応、(4)DNAチップを用いた検出の4つの工程でマルチプレックスSNPタイピングを行う。エンコード反応では、マルチプレックスPCR産物内に存在するSNP特異的配列上に設計したSNP特異的な上流プローブ(5'クエリープローブ)と下流プローブ(3'クエリープローブ)のライゲーション反応を行う。2種類のプローブには23塩基長のオリゴDNAタグ(図2中、EDおよびD1)が付加されており、ラベリング反応ではオリゴDNAタグをプライマーとしたPCRを行う。この際、アリルタイプに応じて異なる波長を持った蛍光分子が導入される。最後に、SNPの種類に応じたオリゴDNAタグ(D1_i)を検出用プローブとして固定したDNAチップを用いて、ラベリング産物のハイブリダイゼーションを行うことにより、各SNPの遺伝子型が異なるスポットから遺伝子型に応じた色(赤:アリル1ホモ、緑:アリル2ホモ、黄:ヘテロ)で検出される。

解析対象となるSNPの遺伝子型を決定するた

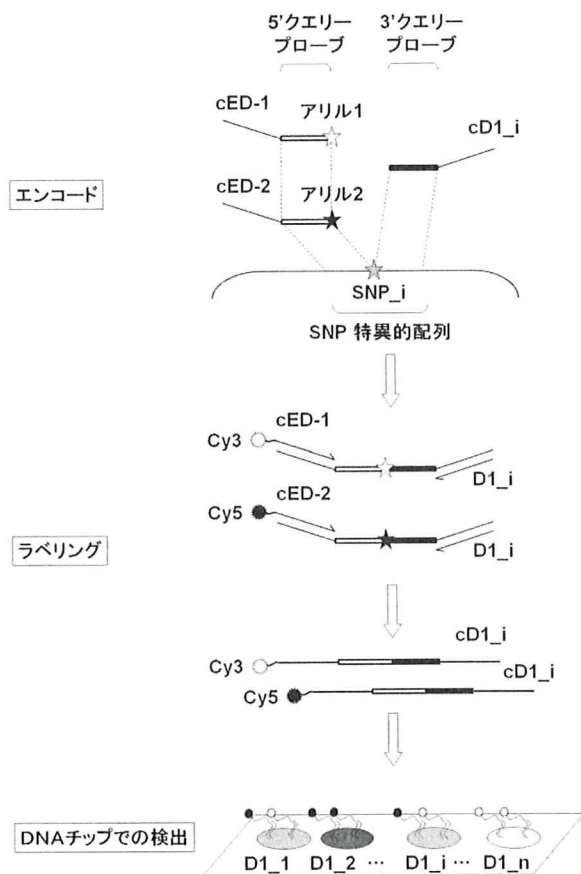


図 2 DigiTag2法による Multiplex SNP typing

96種(もしくは32種)のSNPの遺伝子型をオリゴDNAタグ(EDおよびD1)に変換することで、高い精度で複数のSNPを同時に解析する

めのソフトウェアとして、われわれはSNP Starver0.1.0.0ソフトウェアを開発した。決定された遺伝子型に基づいて、アリル頻度、遺伝子型頻度、劣性モデル、優性モデルの4つの統計解析結果を得る。

最後に、第一義的な疾患感受性遺伝子多型を検出するために、Direct sequencingによる変異スクリーニングとSNPタイピングを実施する。

C. 研究結果

本年度は慢性ウイルス性肝疾患患者246検体を追加してSNP Array 6.0を用いてタイピングした。これまでに取得したデータと合わせた患者群合計641検体のうち、585検体はQC call rate

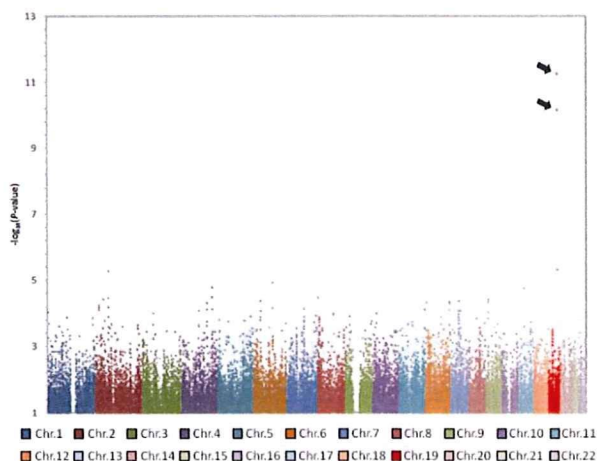


図 3 PEG-IFN α /RBV 併用療法を受けた日本人 HCV 患者 142 検体を用いたゲノムワイド関連解析の結果

が 95%以上となり、QC call rate の平均は 98.01% となった。

QC call rate が 95%以上となった 585 検体のうち、ペグインターフェロン+リバビリン (Peg-IFN α +RBV) 併用療法が有効(再燃例も含む)であった日本人患者 (VR) と無効であった患者 (NVR) の合計 142 検体について、ゲノムワイド関連解析を実施した結果、19 番染色体上の *IL28B* 遺伝子周辺に治療無効に関連する有意な SNP (rs8099917: P 値=3.11 $\times 10^{-15}$ 、OR=30.0、

rs12980275: P 値=1.93 $\times 10^{-13}$ 、OR=20.3) を発見した (図 3 および表 1)。

ゲノムワイド関連解析で検出された *IL28B* 遺伝子領域について、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析を行い Tag SNP を含めて 16 か所の SNP を選択し、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施した。GWAS で用いた 142 検体とは独立の NVR 群 50 検体、VR 群 122 検体を用いた Replication study の結果、GWAS で検出された 2 つの SNP は、治療無効に強い関連があることが再現され (rs8099917: P 値=9.47 $\times 10^{-18}$ 、OR=27.4、rs12980275: P 値=5.46 $\times 10^{-15}$ 、OR=19.2)、特に rs8099917 のマイナーアレル (G) を持つ HCV 患者群は、危険率約 30 倍の確率 (P 値=2.68 $\times 10^{-32}$) で Peg-IFN α +RBV 併用療法が無効となることが分かった。

DigiTag2 法による 16 か所の SNP タイピング結果、および *IL28B* 遺伝子領域の変異スクリーニング/SNP タイピングの結果から連鎖不平衡解析を行ったところ、*IL28B* 遺伝子を含む 19 番染色体上の約 11.3 kb (chr19: 44,424,341-44,435,661) の領域は非常に強い連鎖不平衡状態 ($r^2 > 0.96$) となっていることが明らかとなった。

dbSNP rsID	Nearest gene	MAF ^a (allele)	Allele (1/2)	Stage	null responder (NVR)			responder (VR)			OR (95% CI) ^b	P-value ^c
					11	12	22	11	12	22		
rs12980275	IL28B	0.15 (G)	A/G	GWAS	20 (25.6)	54 (69.2)	4 (5.1)	56 (87.5)	8 (12.5)	0 (0.0)	20.3 (8.3-49.9)	1.93 $\times 10^{-13}$
				Replication	10 (20.0)	37 (74.0)	3 (6.0)	101 (82.8)	21 (17.2)	0 (0.0)	19.2 (8.3-44.4)	5.46 $\times 10^{-15}$
				Combined	30 (23.4)	91 (71.1)	7 (5.5)	157 (84.4)	29 (15.6)	0 (0.0)	17.7 (10.0-31.3)	2.84 $\times 10^{-27}$
rs8099917	IL28B	0.12 (G)	T/G	GWAS	19 (24.4)	56 (71.8)	3 (3.8)	58 (90.6)	6 (9.4)	0 (0.0)	30.0 (11.2-80.5)	3.11 $\times 10^{-15}$
				Replication	11 (22.0)	37 (74.0)	2 (4.0)	108 (88.5)	14 (11.5)	0 (0.0)	27.4 (11.5-65.3)	9.47 $\times 10^{-18}$
				Combined	30 (23.4)	93 (72.7)	5 (3.9)	166 (89.2)	20 (10.8)	0 (0.0)	27.1 (14.6-50.3)	2.68 $\times 10^{-32}$

表 1 Peg-IFN α +RBV 併用療法が有効であった日本人患者 (VR) と無効であった患者 (NVR) についての関連解析結果. a. 日本人健常群 184 検体におけるマイナーアレル頻度 b. マイナーアレル優性モデルにおけるオッズ比 c. マイナーアレル優性モデルにおける χ^2 検定の P 値

D. 考察

IL28B 遺伝子は、通常の C 型肝炎の治療に使用される IFN- α や IFN- β とは異なる IFN- λ の 1 種で、IFN 誘導遺伝子群を誘導して抗ウイルス効果をもたらすことが知られている。rs8099917 のマイナーアレル (G) を持つ患者群では、*IL28B* 遺伝子の発現量が有意に低いことから、これが原因となって治療効果が不十分になっている可能性が考えられる。今後、この *IL28B* を増強する新規薬剤を開発することで、現在 Peg-IFN α +RBV 併用療法が効かない患者群や効果不十分な患者群も根治が望める可能性がある。また、Peg-IFN α +RBV 併用療法の前に、C 型肝炎患者の rs8099917 の遺伝子型を解析することにより、根治を見込める患者群および治療効果が期待できない患者群を 80% という高い中率で選別することが可能になると期待される。

E. 結論

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の有効性に対して *IL28B* 遺伝子が非常に強い関連を示すことは、ほぼ同時に欧米からも報告された。このことから *IL28B* 遺伝子は日本人だけでなく他の集団においても、Peg-IFN α +RBV 併用療法の有効性に強く関連する共通の遺伝要因であることが明らかとなった。欧米から報告された SNP(rs12979860) は、*IL28B* 遺伝子から約 3 kb 上流に存在し、日本人における連鎖不平衡解析結果から rs8099917 と同じ連鎖不平衡ブロック内 ($r^2=0.98$) に存在することが明らかとなっている。現段階では、*IL28B* 遺伝子領域内のどの SNP が第一義的に薬剤の応答性に寄与しているかは明らかとなっておらず、今後のさらなる研究が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西田奈央、徳永勝士：疾患感受性遺伝子と

ゲノムワイド関連解析、治療学、43(3)：13-18 (2009)

- 2) 西田奈央、徳永勝士：テラーメイド医療をめざした疾患感受性遺伝子のゲノムワイド探索、遺伝子医学 MOOK：191-195 (2009)
- 3) 西田奈央、徳永勝士：疾患関連遺伝子を探し出すための SNP 解析、肝胆膵 2009、59(6)：1131-1138 (2009)
- 4) Koike A., Nishida N., et al.: Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project, J. Hum. Genet., 54(9): 543-546 (2009)
- 5) Tanaka Y., Nishida N., et al.: Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C, Nat. Genet., 41(10): 1105-1109 (2009)

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

分担研究者：溝上雅史 国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター
センター長

分担研究課題：テーラーメイド医療を目指した肝炎の宿主遺伝要因の検査体制構築

研究要旨：C型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象とした宿主側の肝病態進展や治療効果に寄与する遺伝要因の迅速で安価な検査方法を開発し検査体制を構築する。本年度は、C型肝炎に対する標準治療である Peg-IFN α +RBV 併用療法の薬剤応答性と強い関連のあることが明らかとなった IL28B (IFN λ 3) 遺伝子領域に存在する遺伝子多型 rs8099917 の検出方法の検討を行った。検出方法には、標準法であるシーケンス法、簡易法として TaqMan PCR法 (MGBプローブ) を用い、7900HP (ABI)により検出と比較検討を行った。臨床検体43検体を用いた検討から、日本人でもっとも効果判定に有効と考えられる rs8099917 の検出結果は、シーケンス法と完全に一致し、良好な結果であった簡易法は、シーケンス法に比べ、方法が簡便で判定が容易のため検査時間（人件費軽減）が短縮され、処理能力の向上（多検体処理可能）と試薬が安価なので検査費用の軽減が図れる可能性が高いと考えられた。

共同研究者氏名

田中靖人、向出雅一

名古屋市立大学大学院医学研究科

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象とした迅速な簡易 SNP s 解析法を行う検査体制を構築する。さらに、事前にその治療効果に寄与する宿主側の要因を検査することで、テーラーメイド医療を実現する。

B. 研究方法

C型肝炎患者の血液 43 検体を用いた。DNA 抽出は、DNA 抽出キット Genomix (Talent 社) を用い患者血液のバフィーコート精製した。田中らによりゲノムワイド関連分析により発見された、Peg-IFN α +RBV 併用療法の薬剤応答性と強い関連のある IL28B (IFN λ 3) 遺

伝子領域に存在する遺伝子多型 rs8099917 の SNP s 検出を、シーケンス解析により決定した。さらに、簡易法として TaqMan[®] SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) を用い、7900HP により検出と比較検討を行った。TaqMan[®] SNP Genotyping Assays は、高い信頼性と多くの実績を持つ、中～小規模の SNP タイピング実験用試薬で、特異性・再現性が高い。検証済みの 40X primer/minor groove binder (MGB) probe mix として AB 社から供給されている。簡便な操作で高い再現性の SNP タイピングを可能としている。プライマーと、それぞれのアリルに対応した 2 種類の TaqMan[®] プローブを利用して解析した。図 1 に示すように 3 つの STEP からなり、TaqMan Genotyping Master Mix (2 \times)、TaqMan[®] SNP Genotyping Assays (40 \times)、滅菌蒸留水を混合し、温度を上昇させ変性とアレル特異的 MGB probe と