

200933013B

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19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総合研究報告書	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……………	17
	(東京大学 徳永 勝士)
2. 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……………	21
	(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……………	24
	(金沢大学 本多 政夫)
5. 扁平苔癬並びに口腔扁平上皮癌と重複癌におけるインスリン抵抗性 ……………	27
	(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……………	32
	(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…	47
	(名古屋市立大学 新井 理)
III. 研究成果の刊行一覧 ……………	49
IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……………	55
V. 参考資料……………	317

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書（平成19～21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・遺伝子解析研究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検体及び肝疾患群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。また、B型キャリア化に関連する*HLA-DPA1*、*HLA-DPBI*遺伝子を含む遺伝子領域に有意なSNPマーカーを検出した。

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：治療効果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 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	国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター長
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は高い。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、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 (P14) 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)。

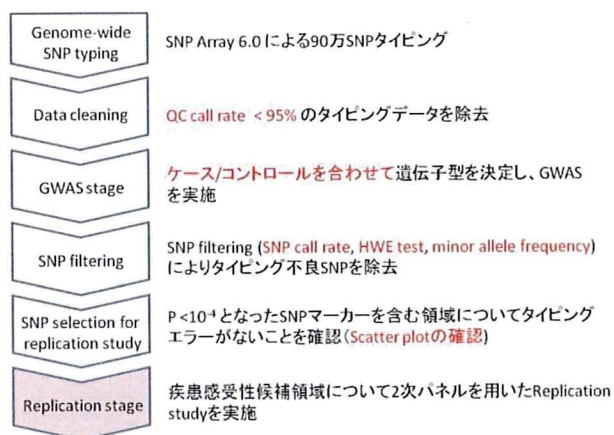


図 1 ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子同定までの流れ

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、肝がん症例や PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例について、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（図 2）。

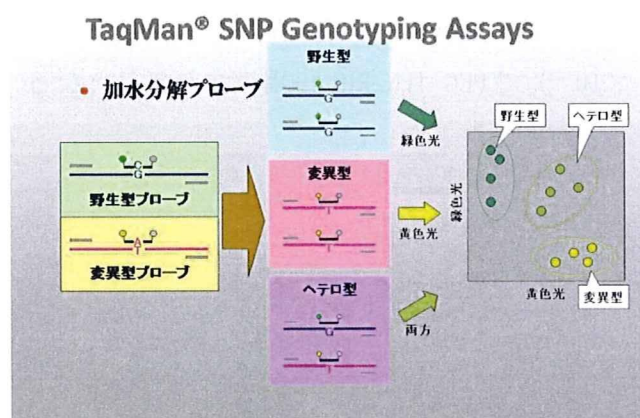


図 2 TaqMan SNP Genotyping Assays

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（90 例）と年齢・性別をマッチさせた無症候性キャリア群（82 例）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。ゲノムワイド解析により得られた病態進展に寄与する宿主因子とウイルス因子を統合し、肝癌ハイリスク群の囲い込みを目指す（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）。重複癌の定義は、(i) 個々の腫瘍は、明らかに悪性像を呈する、(ii) 個々の腫瘍は、別個に存在する、(iii) 一方の腫瘍は、他方からの転移ではないとした。第 1 癌と第 2 癌の診断間隔が 6 ヶ月未満を同時性、6 ヶ月以上を異時性とした。口腔内に複数の腫瘍が多発した場合は、同じ組織型は口腔多発癌、異なる組織型は重複癌とし、今回の検討では口腔多発癌は除外した。

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): 日本各地の全24施設から慢性ウイルス性肝疾患患者合計1,756検体を収集し、そのうちの641検体についてSNP array 6.0を用いたSNPタイピングを実施した。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。また、日本人健常者200検体について同一のSNP array 6.0を用いたSNPタイピングを実施し、QC call rateが95%を上回った184検体をゲノムワイド関連分析における健常対照群として用いた。

慢性ウイルス性肝疾患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実施したところ、(1)PEG-IFN/RBV併用療法が有効(再燃例も含む)であった日本人患者(VR群)と無効であった患者(NVR群)のゲノムワイド関連分析、(2)HBV感染患者群と健常対照群のゲノムワイド

関連分析において、それぞれゲノムワイド有意水準に達する遺伝子領域を検出した。

NVR群78検体とVR群64検体のゲノムワイド関連分析の結果、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を2か所発見した(rs8099917: P 値= 3.11×10^{-15} 、OR=30.0、rs12980275: P 値= 1.93×10^{-13} 、OR=20.3)(図3、表1)。続いて、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を実施し、GWASで検出された2か所のSNPは、治療無効に強い関連があることが再現された(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、危険率が約30倍の確率(P 値= 2.68×10^{-32})でPEG-IFN/RBV併用療法が無効とな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)	1.93×10^{-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リル頻度 b. マイナーアリル優性モデルにおけるオッズ比 c. マイナーアリル優性モデルにおける χ^2 検定の P 値

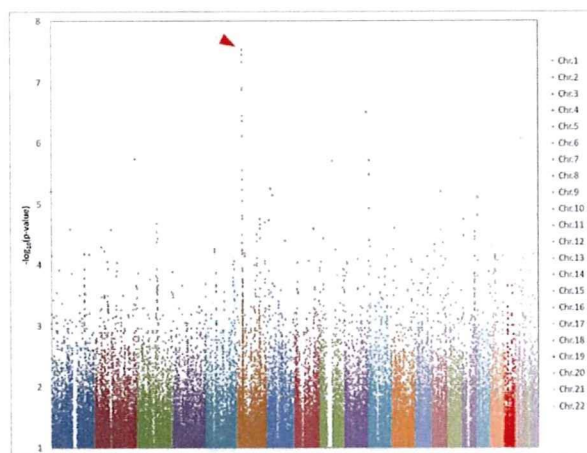


図 3 HBV 感染患者群 184 検体と健常対照群 184 検体のゲノムワイド関連分析の結果

DigiTag2 法による 16 か所の SNP タイピングの結果、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。また、ほぼ同時期に欧米のグ

ループから、PEG-IFN/RBV 併用療法の有効性に対して、*IL28B* 遺伝子上流約 3 kb に存在する rs12979860 (chr. 19: 44, 430, 627) が非常に強い関連を示すことが報告された。欧米のグループから報告された rs12979860 は、日本人における連鎖不平衡解析の結果から 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た。

HBV 感染患者群 184 検体と健常対照群 184 検体のゲノムワイド関連分析の結果からは、6 番染色体上の *HLA-DPA1*、*HLA-DPBI* 遺伝子周辺から慢性 B 型肝炎に関連する有意な SNP を 5 か所検出した (P 値 = $2.96 \times 10^{-8} \sim 4.75 \times 10^{-8}$) (図 3 および表 1)。

2009 年に、東京大学医科学研究所のグループが慢性 B 型肝炎患者 804 検体と 2,201 検体の健常対象者を用いたゲノムワイド関連分析から、*HLA-DPA1* 遺伝子と *HLA-DPBI* 遺伝子を含むゲノム領域内の 11 個の遺伝子多型と B 型肝炎との間に有意な関連があることを報告し

た (P 値= $3.62 \times 10^{-8} \sim 1.16 \times 10^{-13}$)。すなわち、慢性 B 型肝炎と *HLA-DPA1*、*HLA-DPBI* 遺伝子が有意な関連を示すことが独立の 2 グループから得られたことから、再現性が確認された。HLA-DP が関連する分子機序や慢性肝炎発症メカニズムの解明、また B 型慢性肝炎に関連する新規の疾患感受性遺伝子の探索を目指して、現在、東京大学医科学研究所と共同で研究を進める準備を整えた。

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 HCV RNA 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 4)。また、SVR 予測因子を同定するためのデータマイニング解析でも、IL28B が最も効率的に SVR を同定する因子であった。IL28B が Minor であれば SVR の確率はわずか 16%であったのに対し、Major では 51%であった。

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。さらに、遺伝子発現プロファイルにおいて、肝癌浸潤リンパ球の特徴が、全身の末梢組織を循環する PBMC において反映されていることが見出された。このことは、肝癌患者における PBMC の遺伝子発現解析によって、肝癌発生時における宿主の局所免疫応答を解析できる可能性を示唆するものであり、肝癌診断、また肝癌治療におけるその効果の判定に応用できる可能性を秘めていた。

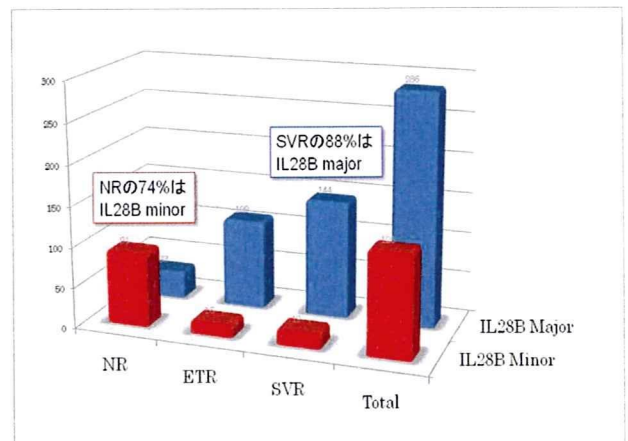


図 4: IL28B SNPs と治療反応性

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)：本邦に広く分布し予後不良とされる HBV genotype C (HBV/C) 症例において、年齢、性別、HBe 抗原陽性率をマッチさせた患者 (HCC グループ) ー対照 (non-HCC グループ) 研究を行った。全塩基配列を決定した結果、PreS2 領域の欠失 (26% vs. 13%; $p=0.043$)、S

領域の C373T 変異 (18% vs. 6%)、Polymerase 領域の C934A 変異 (70% vs. 6%; $p=0.031$)、X 領域の T1497V 変異 (28% vs. 8%; $p=0.0014$)、X 領域かつ box α の C1653T 変異 (54% vs. 32%; $p=0.0039$)、X 領域かつ BCP の T1753V、A1762T/G1764A 変異 (50% vs. 29%, 92% vs. 75%; $p=0.0081$, $p=0.0078$) が、HCC に寄与するウイルス変異であった。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 5)。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 5 : 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行われてこなかった。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/RBV併用療法において、*IL28B* (*IFNλ3*) 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のマイナーアリル(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/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。

今後も肝炎の発症や病態に関わる新たな遺伝要因の発見と分子機序の解明に向けた研究が期待される。すなわち、本研究で取得したQC call rateが95%を上回る585検体のタイピングデータについて、病態や薬剤応答性などの臨床情報に基づいてサブグループに分類したうえで関連分析を実施することにより、従来のゲノム解析手法では見つけだすことのできなかった、HBV感染およびHCV感染による様々な病態や薬剤応答性などに関与する新規の疾

患関連遺伝子を検出できる可能性がある。そのような成果が新たな治療薬の開発や疾患の予防につながることを目指したい。

データの由来、種類に依らない統一的なデータベース構造、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。近い将来、今回構築した肝炎ウイルス統合データベースを公開する予定であり、実際の臨床や各種研究に利用されたい。

E. 結論

C型肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用療法に対する応答性と*IL28B* (*IFNλ3*) 遺伝子の多型が強く関連することを発見し、また慢性B型肝炎と*HLA-DPA1*、*HLA-DPB1* 遺伝子の多型が関連することも確認した。

これ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. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsushashi H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X, core promote mutations on hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C. *J Clin Microbiol.* 45(10):3191-7. 2007.
2. Ito K, Tanaka Y, Kato M, Fujiwara K, Sugauchi F, Sakamoto T, Shinkai N, Orito E, Mizokami M. Comparison of Complete Sequences of Hepatitis B Virus Genotype C between Inactive Carriers and Hepatocellular Carcinoma Patients before and after Seroconversion. *J Gastroenterol.* 42(10):837-44. 2007.
3. Tanaka Y, Hanada K, Hanabusa H, Gojobori T, Mizokami M. Increasing Genetic Diversity of Hepatitis C Virus in Hemophiliacs with Human Immunodeficiency Virus Coinfection. *J Gen Virol.* 88(Pt 9):2513-9. 2007.
4. Yuen MF, Tanaka Y, Shinkai N, Poon RT, But DYK, Daniel Fong YT, Fung J, Wong DKH, Yuen JCH, Mizokami M, Lai CL. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/ C, specific mutations of enhancer II/ core promoter/ precore regions and HBV DNA levels. *Gut.* 2007 in press.
5. Tanaka Y, Mizokami M. Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes. *J Infect Dis.* 195(1):1-4. 2007.
6. Hanada K, Tanaka Y, Mizokami M, Gojobori T, Alter HJ. A reduction in selective immune pressure during the course of chronic hepatitis C correlates with diminished biochemical evidence of hepatic inflammation. *Virology.* 361:27-33. 2007.
7. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology.* 136(2):652-662. 2009.
8. Yuen MF, Tanaka Y, Fong DYT, Fung J, Wong DKH, Yuen JCH, But DYK, Chan AOO, Wong BCY, Mizokami M, Lai CL. Independent Risk Factors and Predictive Score for the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B. *J Hepatol.* 50(1):80-88. 2009.
9. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol.* 82(16):8241-8242. 2008.
10. Togashi H, Hashimoto C, Yokozawa J,

- Suzuki A, Sugahara K, Saito T, Yamaguchi I, Badawi H, Kainuma N, Aoyama M, Ohya H, Akatsuka T, Tanaka Y, Mizokami M, Kawata S. What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit? *J Hepatol.* 49(1):17-24. 2008.
11. Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, Roman S, Takahashi S, Shirai T, Panduro A, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes. *Virology.* 376(2):408-415. 2008.
 12. Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Oynsuren T, Mizokami M. Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol.* 23(3):474-481. 2008.
 13. Yuen MF, Tanaka Y, Shinkai N, Poon RT, But DYK, Daniel Fong YT, Fung J, Wong DKH, Yuen JCH, Mizokami M, Lai CL. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/ C, specific mutations of enhancer II/ core promoter/ precore regions and HBV DNA levels. *Gut.* 57(1):98-102. 2008.
 14. 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.
 15. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 40(1):14-30. 2010.
 16. 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.* 54(2):882-9. 2010.
 17. 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.* 41(10):1105-9. 2009.
 18. 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.* 83(20):10538-47. 2009.
 19. 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. 59 (6): 1187-1193. 2009.

2. 学会発表

1. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsunami H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X, core promote mutations on hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C2. *14th Japan-Korea Hepatitis Meeting*. June 16-17 2007, Fukuoka.
2. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsunami H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X, core promote mutations on hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C2. *17th APASL Conference*. March 27-30 2007. Kyoto, Japan.
3. Mukaide M, Tanaka Y, Orito E, Yuen MF, Ito K, Kurbanov F, Sugauchi F, Asahina Y, Izumi N, Kato M, Lai CL, Ueda R, Mizokami M, et al. Specific Mutations in Enhancer II/Core Promoter of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1/C2 Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma. *17th APASL Conference*. March 27-30 2007. Kyoto.
4. 日下部篤宣、田中靖人、溝上雅史. パネルディスカッション 1: B 型肝炎急性増悪に対する方策. 早期治療介入を目指した B 型肝炎予測ウイルス因子の検討. *第 37 回日本肝臓学会西部会*. 平成 19 年 12 月 7 日. 長崎. A496.
5. 菅内文中、田中靖人、溝上雅史. パネルディスカッション 1: B 型肝炎急性増悪に対する方策. 免疫抑制・化学療法後に発生する B 型肝炎ウイルス再活性化に対する方策. *第 37 回日本肝臓学会西部会*. 平成 19 年 12 月 7 日. 長崎. A498.
6. 田中靖人, Yuen Man-Fung, 溝上雅史. パネルディスカッション 5: エンテカビル治療効果及び耐性変異に関する検討. *第 11 回日本肝臓学会大会*. 平成 19 年 10 月 18-19 日. 神戸.
7. 新海登, 田中靖人, 伊藤清頭, 向出雅一, 長谷川泉, 大野智義, 朝比奈靖浩, 泉並木, 八橋弘, 城卓志, 溝上雅史. B 型肝炎ウイルス T1497V, C1653T, T1753V 変異と肝癌との関連性~153 例の B 型肝炎ウイルス全塩基配列の解析. *第 44 回日本肝臓学会総会*. 平成 20 年 6 月 5-6 日. 愛媛.
8. Noboru Shinkai, Yasuhito Tanaka, Kiyooki Ito, Motokazu Mukaide, Izumi Hasegawa, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Hiroshi Yatsunami, Etsuro Orito, Takashi Joh, and Masashi Mizokami. Complete genomic analyses of 153 hepatitis B virus genotype C2 strains in Japan reveal association of T1497V, C1653T and T1753V

mutations with hepatocellular carcinoma. *18th APASL 2008*

Conference. (APASL 2008 Korea).

9. 田中靖人、徳永勝士、溝上雅史. 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. **第13回日本肝臓学会大会**. (シンポジウム7) 平成21年10月14-15日. 京都.
10. 菅内文中、田中靖人、溝上雅史. 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. **第13回日本肝臓学会大会**. (シンポジウム10). 平成21年10月14-15日. 京都.
11. 杉山真也、田中靖人. IL28B 遺伝子多型とC型肝炎の治療反応性. **第83回日本薬理学会**. (シンポ). 平成22年10月6-8日. 大阪.
12. Kentato Matsuura, Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Shuhei Hige, Yasuhiro Asahina, Kiyooki Ito, Fuminaka Sugauchi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami. Identification of genetic variants in the *HLA-DP* locus associated with chronic hepatitis B in a genome-wide association study. **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」

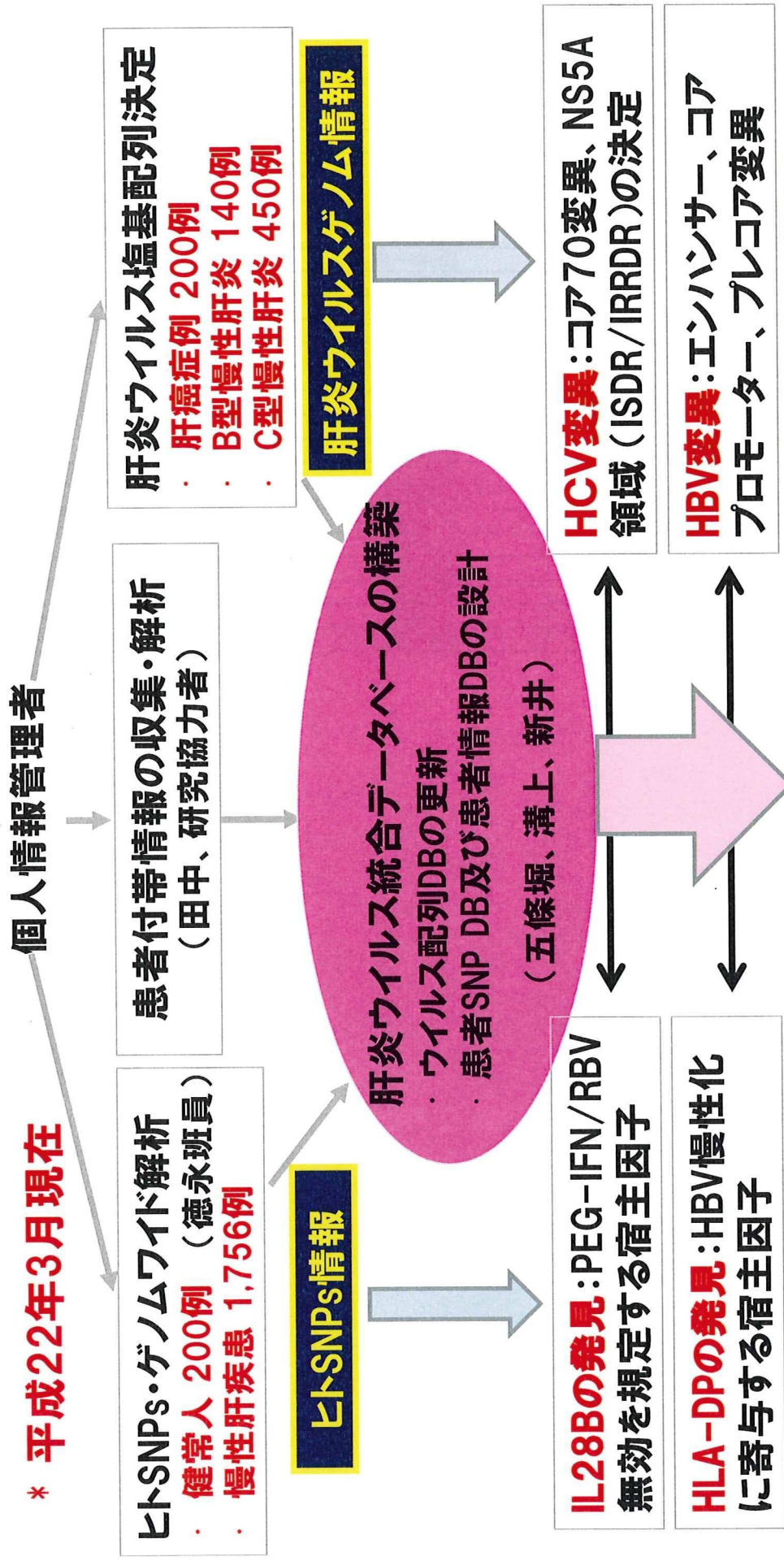
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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)



* 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

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

ヒトSNPs情報

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



IL28B(インターフェロン λ)領域遺伝子多型(SNPs)

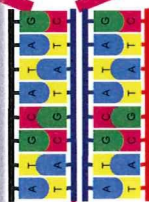
予想的中率 80~90%

メジャーアリル
(通常の遺伝子)

有効

ペグインターフェロン
+リバビリン併用療法
(±プロテアーゼ阻害薬)

SNPs同定



血液

1. 対費用効果
2. 高齢者
3. 副作用

予想的中率 80~90%

マイナーアリル
(低反応遺伝子)

無効

前治療: 再燃例

ペグインターフェロン
+リバビリン
プロテアーゼ阻害薬
(ポリメラーゼ阻害薬)

新規治療薬
少量長期IFN or
肝庇護療法
(高齢者)

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19～21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。慢性ウイルス性肝疾患患者群641検体および健常対照群200検体のタイピングが完了し、患者群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、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 $\times 10^{-32}$, OR=27.1) を示すことが明らかとなった。また、B型慢性肝炎患者184検体と健常対照群184検体を用いたゲノムワイド関連分析から、*HLA-DPA1*、*HLA-DPB1*遺伝子を含む遺伝子領域からGenome-wide significant ($P < 8.07 \times 10^{-8}$) に達するSNPマーカを検出した。

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

慢性ウイルス性肝疾患患者群および健常対照群について、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。続いて、ゲノムワイド関連分

析で検出された候補遺伝子領域について、2次パネルを用いた再現性確認実験（Replication study）を実施し、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を行う上で、解析の大きな障害となる偽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。