

201227021A

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

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、
網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究
(H23-肝炎-一般-005)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 25 (2013) 年 3 月

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

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、
網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究
(H23-肝炎-一般-005)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究 ----- 1
(東京大学大学院医学系研究科 徳永 勝士)
(資料) 別紙 1 HBV 研究体制、別紙 2 検体の収集・臨床情報の蓄積

II. 分担研究報告

1. 臨床検体及び付帯情報の収集 ----- 11
(国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター 溝上 雅史)
2. B型肝炎ウイルス感染の病態別におけるネットワーク解析 ----- 13
(国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 五條堀 孝)
3. ウイルス因子の解析 ----- 15
(国立感染症研究所 脇田 隆宇)
4. HBe抗原セロコンバージョン時点からの肝発癌因子の解析 ----- 17
(国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 八橋 弘)
5. 経口抗ウイルス剤耐性に関与する宿主因子の探索 ----- 19
(信州大学医学部附属病院 松本 晶博)
6. 血中HBV DNAレベルに及ぼす宿主規定因子の検討(慢性肝炎、自然経過・肝癌)
----- 21
(千葉大学大学院医学研究院 横須賀 収)
7. B型肝炎ウイルスの生体内における増殖速度を規定するウイルス側要因 ----- 23
(埼玉医科大学 持田 智)
8. 肝癌感受性遺伝子の同定 ----- 26
(東京大学大学院医学系研究科 小池 和彦)

9. B型肝炎関連肝癌の早期診断・悪性度診断法の基礎的研究 -----	30
(慶應義塾大学医学部 坂元 亨宇)	
10. 背景肝疾患から見た肝発癌の病態解析 -----	33
(北海道大学大学院医学研究科 武富 紹信)	
11. IL28B 遺伝子多型と B 型慢性肝炎の病態および治療応答性との関連についての検討 -----	36
(武蔵野赤十字病院 黒崎 雅之)	
12. HB ワクチン応答性に関する宿主の遺伝子研究 -----	39
(川崎医科大学 日野 啓輔)	
13. HB 感染集積家系における宿主因子の探索：北海道における家族内感染 -----	41
(北海道大学大学院医学研究科 坂本 直哉)	
14. B型肝炎ウイルス再活性化に関連する遺伝子解析の検体収集・臨床情報収集 -----	43
(名古屋市立大学大学院医学研究科 楠本 茂)	
15. B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析 -----	44
(東京大学医科学研究所 松田 浩一)	
16. B型肝炎ウイルス感染患者群のゲノム解析 -----	46
(国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター 西田 奈央)	
17. HLA-DP の機能解析 -----	50
(東京大学大学院医学系研究科 宮寺 浩子)	
18. B型肝炎ウイルス感染の病態別におけるトランスクリプトーム解析 -----	52
(金沢大学医薬保健研究域 本多 政夫)	
19. 多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発 -----	56
(統計数理研究所 間野 修平)	

20. ウイルス因子の解析：細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響 -----	58
(浜松医科大学医学部 鈴木 哲朗)	
21. ウイルスマーカーの臨床的有効性評価 -----	60
(名古屋市立大学大学院医学研究科 田中 靖人)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	77

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 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

研究代表者：徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)感染後の臨床経過のうち、HBV持続感染、HBV関連肝癌、HBV再活性化、HBV重症化(劇症化)、インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性に関連する宿主遺伝因子を網羅的に探索する為、班を4つのチーム (1. 臨床情報収集、2. ゲノム解析・機能解析、3. 統計解析・情報、4. ウイルス因子) から構成して研究を行った。1. では各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人について検体収集を実施した。2. では日本人健常群420検体を対象として、3種類のプラットフォームを用いたタイピングを実施し、精度の高いimputationシステムを構築した。ゲノム解析では、HLA-DPが肝炎慢性化だけでなくウイルス排除にも寄与する事を明らかにした。また、慢性化の新たな感受性遺伝子としてHLA-DQを同定し、肝癌感受性遺伝子としてMICAを同定した。一方、中国人で報告されたKIF1Bとの関連が他の東アジア集団では確認されなかった事を報告した。機能解析では、HLA-DPアリの組み換えタンパク発現系を構築すると共に組み換えタンパク質を精製した。また、日本を含む東アジア集団サンプル約3,200検体について大規模HLAタイピングを実施した。更に、B型慢性肝炎から肝癌発症に関わる階層クラスター解析および遺伝子ネットワーク解析を行い、慢性肝炎ではDNA修復・機能未知遺伝子が肝癌のAP1シグナルと関連しており、非癌部における遺伝子変化が肝癌発症と関連する事を示した。3. では臨床データとゲノム全域SNPタイピングのデータから、臨床情報とゲノム多型の交互作用の解析手法の評価を実施した。4. ではHBeAg陽性およびHBsAg陽性キャリアや、ラミブジン投与B型肝炎患者のHBVゲノム配列を決定し、変異解析を実施した。また新規のHBV変異も同定した。来年度も、病態毎の検体収集とゲノム全域探索、遺伝子発現解析・遺伝子機能解析およびウイルスゲノムの解析を実施し、新たな遺伝要因の同定と疾患発症機序の解明および新規治療法の開発への貢献を目指す。

研究分担者

溝上 雅史	国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター センター長
五條堀 孝	国立遺伝学研究所生命情報研究センター 教授
脇田 隆宇	国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長
八橋 弘	国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 臨床研究センター長
松本 晶博	信州大学医学部付属院 消化器内科 特任研究員
横須賀 収	千葉大学大学院 消化器・腎臓内科学 教授
持田 智	埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 教授
小池 和彦	東京大学大学院医学系研究科 消化器内科 教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部 病理学教室 教授
武富 紹信	北海道大学大学院医学研究科 消化器外科学分野 I 教授
黒崎 雅之	武蔵野赤十字病院 消化器科 消化器科部長
日野 啓輔	川崎医科大学肝胆膵内科学 教授

坂本 直哉	北海道大学大学院医学研究科	消化器内科学分野 I	教授
楠本 茂	名古屋市立大学院医学研究科	腫瘍・免疫内科学分野	講師
松田 浩一	東京大学医科学研究所	ヒトゲノム解析センター	准教授
西田 奈央	国立国際医療センター	肝炎・免疫研究センター	上級研究員
宮寺 浩子	東京大学大学院医学系研究科	人類遺伝学分野	助教
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系	先端医療技術学講座	教授
間野 修平	統計数理研究所	数理・推論研究系	准教授
鈴木 哲朗	浜松医科大学医学部医学科	感染症学講座ウイルス学	教授
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科	ウイルス学分野	教授

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)感染後の臨床経過は非常に個人差が大きい。臨床経過に影響を及ぼす因子としては、年齢、性別、他の肝炎ウイルスとの共感染、HBV 遺伝子型等が挙げられる。宿主の遺伝因子についても、慢性 B 型肝炎の発症については候補遺伝子アプローチにより幾つかの遺伝子の関与が示されており、さらにゲノムワイド関連解析により HLA-DP 遺伝子の関連が示された。しかしそれ以外の遺伝因子の関与についてはまだ殆ど解明されていない。

本研究では、HBV 持続感染、HBV 関連肝癌、HBV 再活性化、HBV 重症化（劇症化）、インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性などに関連する宿主遺伝因子を網羅的に探索する事を目的とする。

B. 研究方法

本研究では、班を 4 つの組織(1. 臨床情報収集、2. ゲノム解析・機能解析、3. 統計解析・情報、4. ウイルス因子)に分類し、研究を実施した(別紙 1 参照)。

1. 臨床情報収集(溝上、八橋、横須賀、持田、小池、松本、坂元、武富、黒崎、日野、坂本、楠本)

日本全国の研究協力施設から、サンプル(DNA および血清)を効率的に収集し、詳細な臨床情報と共に管理するシステムを構築した(別紙 2 参照)。新規に収集したサンプルは SRL にて DNA および血清を抽出した後、国立国際医療研究センターへ送られる。既に DNA および血清を抽出済のサンプル

については、各施設から直接国立国際医療研究センターに送られる。各施設で収集された臨床情報は、連結可能匿名化された後に国立国際医療研究センターに送られる。

2. ゲノム解析・機能解析(徳永、松田、西田、本多、宮寺)

1) ゲノムワイド関連解析

各施設より収集したサンプルを用いて、病態別にゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施し、新規の宿主遺伝要因も網羅的に探索した。ゲノムワイド SNP タイピングには、Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (約 90 万種の SNP を搭載)および AXIOM ASI Array (約 60 万種の SNP を搭載)を用いた。

2) 慢性肝炎から肝癌発症に関わる遺伝子群のネットワーク解析および検証

B 型慢性肝炎(CH-B)37 例、CH-B 関連肝癌(HCC-B)17 例および C 型慢性肝炎(CH-C)35 例、CH-C 関連肝癌(HCC-C)17 例の肝組織を用いた。またレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション(LCM)法により門脈領域の浸潤リンパ球(cells in the portal area: CPA)と肝小葉領域細胞(cells in liver lobules : CLL)を別々に採取し、領域特異的遺伝子発現のプロファイリングを検討した。各群における発現上昇・低下する遺伝子を選定し、各群での階層クラスターを行った。VIF(variance inflation factor)を stopping rule として用い、各群での至適階層クラスター数を決定した。各クラスターにおける発現プロファイルの平均を算出し、

偏相関係数を用いて各クラスター間の関係を検討した。高い偏相関係数を示すクラスター間には真の因果関係を有することより、クラスター間を結びグラフ化することでネットワーク構築を試みた。また、CH-B と HCC-B 間および CH-C と HCC-C 間における高い偏相関を示す遺伝子クラスター間で、MetaCore ツールにより既存の遺伝子間の相互関係を検証した。

3) HLA-DP タンパク質の発現系構築

B 型肝炎慢性化に対する感受性・抵抗性と有意に関連を示す HLA-DP アリル、および、関連を示さない中立性アリル (HLA-DPA1*01:03, *02:01, *02:02, HLA-DPB1*02:01, *03:01, *04:01, *05:01, *09:01) の安定発現株を哺乳類繊維芽細胞株を用いて作成した。また、HLA-DR アリルと陽性コントロールペプチドを用いて、HLA-ペプチド結合測定系を確立した。

3. 統計解析・情報(五條堀、間野)

正則化回帰は、回帰係数にペナルティ項をつけ、回帰係数が小さくなる偏りを導入することで、推定量の分散を抑えて誤差の削減を図る手法である。本年度は、既存のデータについて、0 にする傾向の強い L1 正則化 (LASSO) に合わせて古典的な L2 正則化を用いる elastic net 正則化を実施した。さらに、選択される SNP の再現性を検証するための手法として、リサンプリング標本に対して変量選択を繰り返し行い、そのコンセンサスを検証する stability selection を実施した。

理論的検討を容易にするために、メンデル性の疾患について、配列データが得られている状況を想定し、標本における変異型の頻度のヒストグラム(頻度スペクトラム)を前提とし、GWAS において想定される非血縁の患者、健常者の二標本が得られたとき、疾患に関連が検出される SNP の数の期待値を考察した。

4. ウイルス因子(脇田、田中、鈴木)

HBV が持続感染している HBe 抗原陽性

無症候性キャリア 9 名の血清から、HBV DNA をクローニングしてその配列を決定した。データベース上の既報の HBV ゲノム配列との相同性を確認した。さらに 1.3 倍長のゲノムを再構築してウイルス増殖性を検討した。

また、HBs 抗原陽性の肝がん患者 80 例検体と、年齢を一致させた非肝がん患者 (無症候性キャリア、慢性肝炎) 100 例をコントロールとして、検体を採取、DNA 抽出、ウイルス遺伝子配列を決定し、肝がん特異的変異の有無を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、代表者である徳永の所属する東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会から承認を得た。また、各々の研究分担者及び研究協力者が所属する機関においても、倫理審査委員会から承認を得たのちにサンプル収集を開始した。

C. 研究結果

研究代表者である徳永は、最も頻用される 3 種類のゲノムワイド SNP タイピングプラットフォームを用いたタイピングを、日本人健常群 420 検体に対して実施し、精度の高い imputation システムを溝上、西田らと共同で構築した。また HBV 患者群、ウイルス排除群、および健常者群の検体を用いた GWAS を実施し、HLA-DP 遺伝子が B 型肝炎慢性化のみならずウイルス排除にも寄与する事を明らかにした (溝上、西田、田中らと共同)。さらに、東アジアの HBV 患者群における大規模 HLA タイピングおよび多型解析を実施した溝上、西田、田中らと共同)。KIF1B が日本人、韓国人、香港人では肝癌に関連しない事を示した (溝上、西田、田中らと共同)。研究代表者および分担者の主な研究結果を以下に示す。

1. 検体収集・臨床情報蓄積システムを利用した検体収集の実施(溝上、西田、徳永、八橋、横須賀、持田、小池、松本、坂元、武富、黒崎、日野、坂本、楠本)

各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人（健常者群およびHBV患者群）について検体収集を実施した。また、検体・臨床情報を補完するソフトウェア開発とサーバ整備も実施した。HBVの解析に利用予定のサンプルの収集状況は、日本人が1,792検体、韓国人が601検体、香港人が661検体、タイ人が629検体（健常者サンプル含む）で合計3,683検体となる。

2-1. 健常人420検体を対象としたSNPタイピングとimputationシステム構築(溝上、西田、徳永)

日本人健常群420検体を対象として、最も頻用される3種類のゲノムワイドSNPタイピングプラットフォーム(Illumina Human OMNI2.5-8 ReadChip, Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 6.0, Affymetrix AXIOM ASI array)を用いたタイピングを実施し、制度の高いimputationシステムを構築した。

2-2. HBV排除に寄与する遺伝要因の同定(溝上、西田、田中、徳永ら)

ゲノムワイド関連解析によるB型慢性肝炎患者群、健常対照群およびB型肝炎ウイルス排除群(HBsAg陰性、HBc抗体陽性)の比較から、HLA-DPA1/HLA-DPB1遺伝子がB型肝炎の慢性化およびB型肝炎ウイルスの排除に寄与することを報告した。

2-3. MICAとHBV陽性肝癌の関連(松田、溝上、田中、徳永)

MICA多型及び分泌型MICAのHBV陽性肝癌の発症リスクや予後に与える影響について検討した。解析に用いた症例は、HBV陽性肝癌症例407例、慢性B型肝炎症例699例、健常人コントロール5679症例である。また111名のHBV陽性肝癌患者血清を用いて血清中のsMICAをELISA法にて測定した。解析の結果、rs2596542がHBV陽性肝癌の発症リスクと関連を示すことが明らかとなった。さらにrs2596542とsMICA値も関連を示した。またsMICAが高値の肝癌症

例では予後が不良であった。

2-4. 既報のHBV関連肝癌の遺伝要因の検証(徳永、溝上、田中ら)

HBV陽性肝癌患者群355検体と慢性肝炎患者群380検体を対象としたGWASから、*KIF1B*上のSNPが癌化に有意な関連を示すことが2010年に中国のグループより報告された。この結果の検証を、日本人、韓国人および香港人の検体を用いて行ったが、いずれの集団においても、中国の解析結果は再現されなかった。

2-5. HLA-DP アリルの組換えタンパク発現系の構築(宮寺)

解析対象とするHLA-DPアリル(HLA-DPA1*01:03, *02:01, *02:02, HLA-DPB1*02:01, *03:01, *04:01, *05:01, *09:01)について、安定発現株を作成し、HLA-DPタンパク質の細胞表面発現をフローサイトメトリーにて確認した。

HLA-ペプチド結合測定系の構築を、HLA-DRタンパク質および、結合親和性既知の15-merペプチド複数種類を用いて行った。HLAタンパク質はβサブユニットC末端にHisタグを付加し、哺乳類繊維芽細胞株を用いて組換えタンパク質として発現した。安定発現株から界面活性剤可溶性分画を調整し、これを96well NTA-Niコートプレート上でインキュベートしHLAタンパク質をHisタグを介してプレート上に固定した。さらに陽性コントロールペプチドを用いてHLA-ペプチド結合反応を行った。種々の条件検討（固定化タンパク質量・反応時間・バッファー組成・界面活性剤等）を行い、反応条件を最適化した。

2-6. 東アジア集団の大規模HLAタイピング(溝上、西田、徳永)

日本人、韓国人、香港人、タイ人の健常者群、HBV患者群、ウイルス排除群について検体収集を実施し(約3,200検体)、HLA-DPA1/DPB1のHLAタイピングを実施した。日本人の健常者群とHBV患者群のHLA-DPB1アリルで関連解析を行い、

HLA-DBP1*05:01, *04:02 で関連が見られ、先行研究と同様の結果が得られた。またそれ以外に 2 つのアリルでも関連が見られ、韓国人でも同様の傾向が示された。

2-7. 遺伝子ネットワーク解析の実施(本多)

CH-B と HCC-B において、順に 11、10 クラスターを用いた各群でのネットワーク構築が可能であった。HCC-B の遺伝子発現は細胞増殖群が多く、免疫応答群が少ない傾向が認められた。またこれら遺伝子発現と密接に関連する CH-B の遺伝子クラスターは CH-B の炎症に関わる遺伝子群のほか、主に肝細胞にて発現する DNA 修飾に関わる遺伝子や機能未知の遺伝子群であった。これらの遺伝子群は癌部での AP1 遺伝子の発現と関連しており、癌部に於ける多くの遺伝子が AP1 シグナルの制御を受けていた。さらに AP1 を含む遺伝子クラスター内に HBV の転写産物が含まれており、AP1 の活性化に HBV が関与している可能性が示唆された。慢性肝炎から肝癌へと経過を追えた症例に於いて、非癌部でのこれら癌化誘導遺伝子の発現は、その後の肝癌の発症と密接に関連していることが明らかとなった。

3. 変量選択に関する検討と検定における偽陽性の評価(間野)

既存のデータについては、ある箇所の SNP が elastic net によって選択されたものの、性別で層別化すると有意な関連は観察できず、実際、stability selection によると、安定して選択されることはなかった。ただし、関連が強いものは複数あるため、アルゴリズムに一層の工夫が必要と考えられた。本年度の研究で実施した Elastic net+stability selection による変量選択について、GWAS のデータサイズに耐える仕様で実装したソフトウェアを株式会社 BITS と共同で開発した。

非血縁患者のみの場合から始めて、非血縁健常者、同胞、不完全浸透や表型模写などについて、網羅的に検討した。統計学的に興味深い点は、分割表の検定と同型の問題であることであった。結果として、不完

全浸透や表型模写があったとしても、症例対照研究は偽陽性を著しく減らすことが分かった。

4. ウイルスゲノム配列決定(田中、脇田)

HBeAg 陽性および HBsAg 陽性キャリアや、ラミブジン投与 B 型肝炎患者の HBV ゲノム配列を決定し、変異解析を実施した。また、HBs 抗原陽性の肝がん患者 80 例検体と、年齢を一致させた非肝がん患者（無症候性キャリア、慢性肝炎）100 例をコントロールとして、ウイルス遺伝子解析を行った。C1653T 変異及び A1762T/G1764A 変異が肝がん患者で有意に高かった($p<0.01$)。更に新規の HBV 変異も同定した。

D. 考察

本プロジェクトで構築した検体収集・臨書情報の蓄積システムを利用して検体収集を開始した。収集されたサンプルは現時点で、日本、韓国、香港、タイを合わせると約 3,200 検体にのぼる。これらのサンプルは GWAS や GWAS の解析結果の検証に用いると共に HLA タイピングも実施する。GWAS により関連が示されている、B 型肝炎慢性化・ウイルス排除について HLA-DP の HLA タイプを詳細に検討する事で、病態の解明および予防方法の開発に役立つことが期待される。HLA-DP については組換えタンパク発現系の構築も進んでおり、抗原ペプチドとの複合体など、より詳細な解析が期待できる。

健常者 420 検体を対象とした 3 種のプラットフォームでのゲノムワイド SNP タイピングおよび高精度 imputation システムの構築により、これまで別々のプラットフォームで取得したデータをすべて用いての高精度な解析が可能になる。既に B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除や肝癌については一部新規遺伝要因を報告しているが、このシステムを用いて再解析を実施することで、新規の遺伝要因を同定する事が可能になると考えられる。同時に、遺伝子ネットワーク解析により同定された遺伝子群、ウイルスゲノム配列中の多型を組み合わせた解析も

期待される。

E. 結論

本研究では、班を 4 つの組織に分類し、研究を実施した。1) 各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人（健常者群、HBV 患者群およびウイルス排除群）について検体収集を実施した。2) 日本人健常群 420 検体を対象として、3 種類のゲノムワイド SNP タイピングプラットフォームを用いたタイピングを実施し、精度の高い imputation システムを構築した。ゲノム解析では、慢性肝炎群とウイルス排除群の GWAS から、HLA-DP が肝炎慢性化だけでなくウイルス排除にも寄与する事を明らかにした。また、慢性化の新たな感受性遺伝子として HLA-DQ を同定し、肝癌感受性遺伝子として MICA を同定した。一方、中国人で報告された KIF1B との関連が他の東アジア集団では確認されなかった事を報告した。機能解析では、HLA-DP アリルの組み換えタンパク発現系を構築すると共に組み換えタンパク質を精製し、結合実験を開始した。また、日本を含む東アジア集団サンプル約 3,200 検体について大規模 HLA タイピングを実施した。更に、B 型慢性肝炎から肝癌発症に関わる階層クラスター解析および遺伝子ネットワーク解析を行い、慢性肝炎では DNA 修復・機能未知遺伝子が肝癌の API シグナルと関連しており、非癌部における遺伝子変化が肝癌発症と関連する事を示した。3) 統計解析では、臨床データと全ゲノム SNP タイピングのデータから、臨床情報とゲノム多型の交互作用の解析手法の評価を実施した。4) ウイルス因子の同定では、HBsAg 陽性および HBsAg 陽性キャリアや、ラミブジン投与 B 型肝炎患者の HBV ゲノム配列を決定し、変異解析を実施した。また新規の HBV 変異も同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida N, Mawatari Y, Sageshima M, Tokunaga K. Highly parallel and short-acting amplification with locus-specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by the DigiTag2 assay. PLoS ONE. 2012, 7(1):e29967.
- 2) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 2012, 13:47.
- 3) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS ONE. 2012, 7(6):e39175.
- 4) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA Variation as Possible Prognostic Biomarkers for HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. PLoS ONE. 2012, 7(9):e44743.
- 5) Kawashima M, Ohashi J, Nishida N, Tokunaga K. Evolutionary Analysis of Classical HLA Class I and II Genes Suggests That Recent Positive Selection

Acted on DPB1*04:01 in Japanese Population. PLoS ONE. 2012, 7(10):e46806

- 6) Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamuta M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, Honda M, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Taniai M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsushashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. Am J Hum Genet. 2012, 91(4):721-728.
2. 学会発表
 - 1) Tokunaga K: Genome-wide approaches to complex disease: advances and perspectives, Genomic Analysis of Diseases Workshop, Nature Conference, Hangzhou, China, 2012.5.
 - 2) 徳永勝士 : 基調講演 : 疾患関連遺伝子のゲノム全域探索の現状と展望、「ワークショップ : 最近の遺伝子研究からみた肝臓病の現状と個別化医療への展望」第 48 回日本肝臓学会総会、金沢、2012.6.
 - 3) 澤井裕美、西田奈央、松田浩一、馬渡頼子、田中靖人、溝上雅史、徳永勝士 : HBV 陽性肝癌における感受性候補 SNP の東アジア集団での検証、第 21 回日本組織適合性学会大会、東京、2012.9.
 - 4) 西田奈央、田中靖人、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、徳永勝士、溝上雅史 : 日本人および韓国人における B 型肝炎慢性化、B 型肝炎ウイルス排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定、第 16 回日本肝臓学会大会、神戸、2012.10.
 - 5) 澤井裕美、西田奈央、松田浩一、馬渡頼子、田中靖人、溝上雅史、徳永勝士 : 中国集団における B 型肝炎由来肝癌感受性 SNP の東アジア集団での検証、第 16 回日本肝臓学会大会、神戸、2012.10.
 - 6) Nishida N, Tanaka Y, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Koike A, Matsuura K, Sugiyama M, Murata K, Korenaga M, Masaski N, Han KH, Tokunaga K, Mizokami M, The associations of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance are widely replicated in East-Asian populations, 61th Annual ASHG Meeting, San Francisco, 2012.11.
 - 7) Tokunaga K: Genome-wide Search for disease genes and drug response genes: Implications and perspectives, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry ISNAC2012, 名古屋, 2012.11.
 - 8) Nishida N, Tanaka Y, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Sugiyama M, Murata K, Korenaga M, Masaski N, Han KH, Tokunaga K, Mizokami M, Meta-analysis identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in East-Asian populations, American Association for the Study of Liver Diseases The Liver Meeting 2012, Boston, 2012.11.
 - 9) Nishida N, Tanaka Y, Sugiyama M, Mawatari Y, Ishii M, Tokunaga K, Mizokami M, Investigating the novel host genetic factors associated with treatment response for HCV patients, The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", KEIO Plaza Hotel, 2012.11.
 - 10) 馬渡頼子、西田奈央、中伊津美、徳永勝士、溝上雅史、DigiTag2 法における PCR プライマー設計パラメータの検証、第 35 回日本分子生物学会年、福岡、2012.12.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

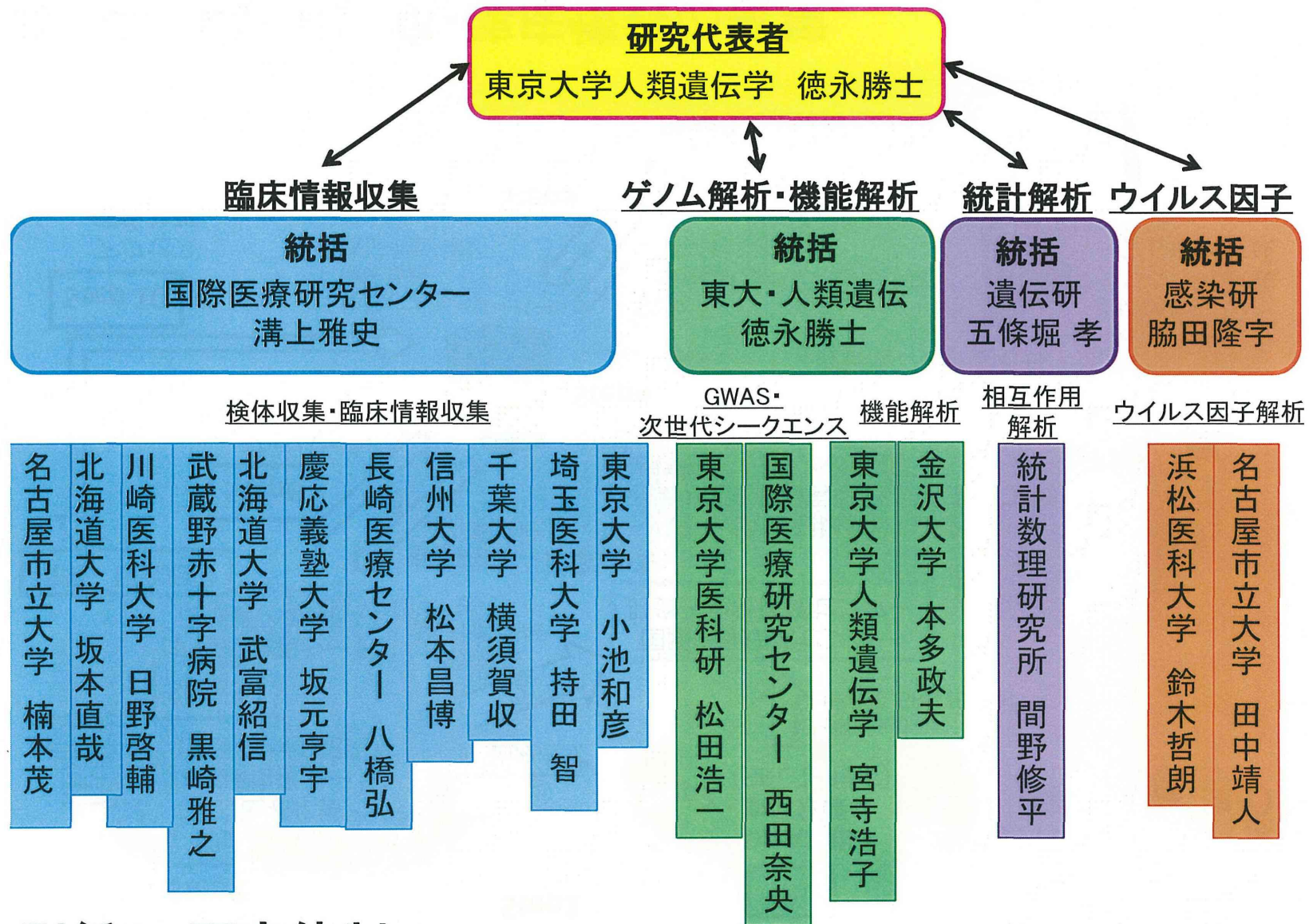
なし

2. 実用新案登録

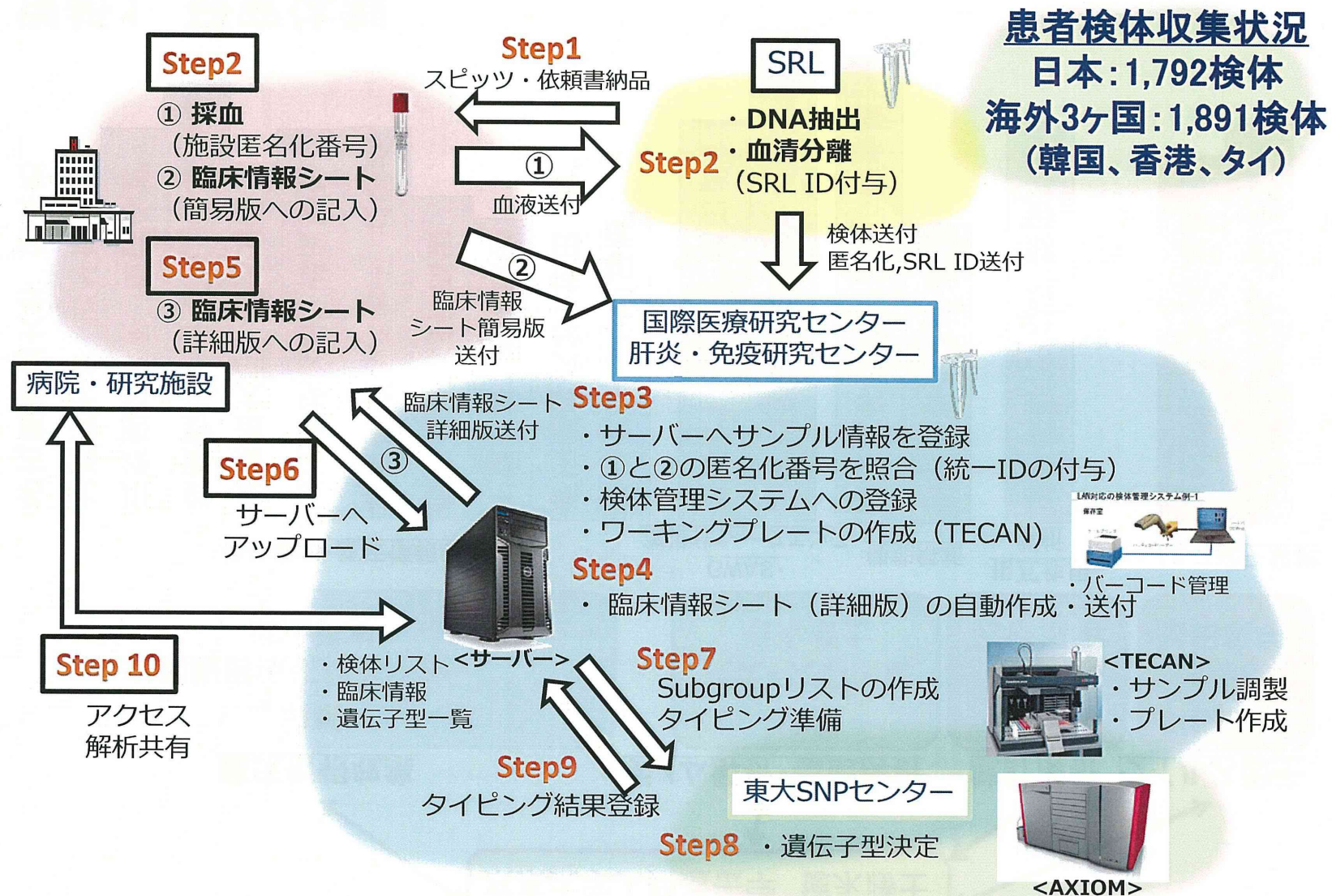
なし

3. その他

なし



別紙1 研究体制



別紙2 検体の収集・臨床情報の蓄積

Ⅱ. 分担研究報告書

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）

分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：溝上 雅史 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
センター長

分担研究課題：臨床検体及び付帯情報の収集

研究要旨：検体収集を担当する協力施設からゲノムDNA・血清を収集し、それらの検体の臨床情報を蓄積するシステム構築が完了した。また、収集したゲノムDNAの濃度測定・濃度調整や96ウェルプレートへの分注作業を自動化するシステムの構築も完了した。今年度は、SRL経由で204例を収集し、検体収集施設からの直送で135例を収集した。また、連結不可能匿名化された日本人健常群420検体を対象として、250万種のSNPをタイピングした。

A. 研究目的

班員から提出される臨床検体を収集・管理し、臨床情報や解析データを紐づけることのできるシステムを構築する。

B. 研究方法

検体収集の協力施設から臨床検体を収集する体制を整え、各協力施設から臨床情報をデータベース化する。データベースへの検体情報や臨床情報の登録が簡便かつ正確に実施できるように、収集する臨床情報の項目を選定し（簡易版データシート、詳細版データシート）、検体収集と共に情報収集を進める。

（倫理面への配慮）

本研究班で使用する検体については、各施設の倫理委員会で承認を得られたもののみとなっており、情報の管理と検体の管理については外部と切断されたデータサーバーを組むことで安全性を保った。

C. 研究結果

今年度の研究成果を以下にまとめる。

- 1) 日本人健常群 420 検体を対象として、約 240 万種の SNP を搭載した Illumina

Human OMNI2.5-8 BeadChip を用いたゲノムワイド SNP タイピングを実施した。

- 2) SNP タイピングデータを蓄積するためのサーバ構築、およびゲノムワイド関連解析を実施するためのソフトウェア開発を行った。
- 3) 国内の研究協力施設で採血した B 型肝炎患者のゲノム DNA、血清サンプルを SRL 経由で国立国際医療研究センター・国府台病院に収集・保管する検体・臨床情報収集システムを構築した。今年度は、このシステムを利用して 204 例を収集した。また、検体収集の効率を上げるために、各研究協力施設で抽出したゲノム DNA や血清サンプルを直接受け入れられるように検体・臨床情報収集システムの改良を行った。直接受け入れた検体として、今年度は 135 検体を収集した。
- 4) 収集したゲノム DNA の濃度測定、濃度調整、および 96 ウェルプレートへの分注作業を自動で行えるシステムを構築した。
- 5) ゲノムワイド関連解析による B 型慢性

肝炎患者群、健常対照群および B 型肝炎ウイルス排除群（HBsAg 陰性、HBc 抗体陽性）の比較から、HLA-DPA1/HLA-DPB1 遺伝子が B 型肝炎の慢性化および B 型肝炎ウイルスの排除に寄与することを論文報告した。

- 6) HBV 関連肝がんに関連すると報告された KIF1B 遺伝子が日本人、韓国人、香港人では関連が再現されないことを明らかにした。また、この成果を論文報告した。

D. 考察

臨床検体・臨床情報の管理システム構築が完了し、実際に運用を開始している。また、収集した DNA サンプルの濃度測定、濃度調整、および 96 ウェルプレートへの分注作業の自動化が完了し、これまでに収集した臨床検体の濃度調整および 96 ウェルプレートへの分注作業を進めている。

SRL 経由のゲノム DNA・血清サンプルの収集を開始しており、また、検体収集施設で収集したサンプルも受け入れる体制を整えた。来年度も継続して臨床検体・臨床情報を収集し、ゲノム解析を支援する体制が整った。

E. 結論

臨床検体・臨床情報を収集する体制が整っており、来年度中に大規模なゲノム解析を実施することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang

JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 2012

- 2) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One. 2012;7(6):e39175

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：五條掘 孝 国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 教授

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染の病態別におけるネットワーク解析

研究要旨： ヒトゲノムからB型肝炎ウイルス(HBV)感染に伴う複雑な病態がどのように産み出されているのかを、ゲノムネットワーク解析を行う事により明らかにすることを目的とする。国立国際医療研究センターおよび東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室が共同で進めている、検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行いながら、取得したデータを用いてネットワーク解析をおこなった。特に、HBVと相互作用をする可能性のある遺伝子について、そのネットワークがどこまで分かっているかの探索を行った。

A. 研究目的

本研究では、ヒトゲノムから B 型肝炎ウイルス(HBV)感染に伴う複雑な病態がどのように産み出されているのかを、多種多様な遺伝子やタンパク質間、そしてウイルス因子との相互作用における協調的ネットワークの解明を通じて明らかにする事を目的とする。

B. 研究方法

ゲノムネットワークの解明にはSNPタイピング結果の結合だけでなく、HBV感染に関わる臨床情報の新規および既知のデータを統合し、それら多様な情報を一元的に提供することが求められる。そのため、情報技術者と生命科学者の協同体制により研究を進める必要がある。ネットワーク情報システムの構築にあたっては、国際DNA配列データバンク(DDBJ/EMBL/GenBank:INSD)として長年培われてきた生命情報データベース構築に関する経験と知識を用いつつ、ヨーロッパ、アメリカ合衆国とのINSD活動で得られた国際性を利用して開発したプラットフォームを利用する。更に、別のプロジェクトで行われている技術を取り込むことにより、データ統合の質的向上を図り、か

つ我が国独自の研究基盤を構築する。

（倫理面への配慮）

今後ネットワーク解析を行う際データを使用するために、データを取得している各参加機関、さらに分担者が所属する国立遺伝学研究所の研究倫理審査委員会に申請を行っている。

C. 研究結果

平成 24 年度は、解析に必要となるゲノムワイド SNP タイピングデータ、臨床情報、サンプル情報等を取得した。そのため、国立国際医療研究センターおよび東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室が共同で進めている、検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行った。また、ヒトゲノムにおいて B 型肝炎ウイルスと相互作用をもつ可能性のある遺伝子とそのネットワークの構築を行った。

D. 考察

取得したゲノムワイド SNP タイピングデータを用いたネットワーク解析の方法に関して、本格的な研究開発に入った。