

・ 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 25 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

研究協力者：澤井 裕美 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 特任助教

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関連肝臓癌、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. 検体・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、日本人約3,000名に加えて、韓国人、タイ人、香港人についても検体収集を実施した。2. のゲノム解析では、1. のシステムで収集したHBV関連患者群1,356検体についてAXIOM ASI Arrayを用いたGWASを実施し、持続感染・線維化・癌化などの病態における関連候補SNPを同定した。HLA-DP多型解析では、日本人を含む東アジア集団の患者、健常者約3,200検体について大規模HLAタイピングを実施し、既報のHLAアリル以外に慢性化および病態進展と関連を示すアリルを新たに同定した。機能解析ではHLA-DPアリルの組み換えタンパク発現系を確立すると共に、HLA-ペプチド結合測定系を構築した。また、B型慢性肝炎から肝臓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臓癌の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臓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相互作用の解析手法を確立した。4. ではGWASに用いた検体のウイルスゲノム配列を決定し、肝臓癌要因としてC1653T、A1762T/G1764Aなど複数を同定した。

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	生命情報研究センター	特任教授
脇田 隆字	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	信州大学医学部附属病院	肝疾患診療相談センター	准教授
横須賀 収	千葉大学大学院医学研究院	研究院長	
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	消化器内科学	教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部	病理学	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	教授
黒崎 雅之	武蔵野赤十字病院	消化器科	部長
日野 啓輔	川崎医科大学	肝胆膵内科学	教授
夏井坂 光輝	北海道大学大学院医学研究科	消化器内科	助教
楠本 茂	名古屋市立大学院医学研究科	腫瘍・免疫内科学	講師
調 憲	九州大学大学院	消化器・総合外科	准教授
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	客員研究員
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・寄生虫学分野	教授
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科	病態医科学(ウイルス学)	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、持田、横須賀、小池、本多、松本、坂元、武置、黒崎、日野、夏井坂、楠本、調)

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。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に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。

また、アジア各国との共同研究体制を整え、東京大学および国立国際医療研究センターとの MOU 契約を取り交わした。

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

新規の宿主遺伝要因を探索する事を目的として、収集した HBV 関連患者群の合計約 3,000 検体のうち、1,356 検体を対象としてゲノムワイド SNP タイピングを実施した。タイピングには Affymetrix 社の AXIOM ASI 1 Array (約 60 万種の SNP を搭載)を用いた。Overall call rate の平均は 99.41%、DishQC の平均は 0.969 となった。タイピング結果に基づいて、持続感染・繊維化・癌化などの各病態についてゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施した。

(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解析を行った。また、高い相関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、クラスターを結びグラフ化することでネットワーク構築を試みた。さらに、HCC-B 及び HCC-C 各 10 症例の癌部のエクソーム解

析を次世代シーケンサーにて行った。

(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-DPBI*02:01, *03:01, *04:01, *04:02, *05:01, *09:01) の安定発現株を哺乳類線維芽細胞株、昆虫細胞株を用いて作成した。HBs 抗原の一部の領域について合成ペプチドを作製し、HLA-DP との結合を解析した。プレート上に固相化した HLA タンパク質への標識ペプチドの結合を測定することにより、HLA-ペプチド相互作用を検出した。

3. 統計解析・情報 (五條堀、岡野)

臨床情報と SNP の交互作用の網羅的解析の手続きを考察し、研究代表者らの GWAS データについて、臨床情報と全ての SNP の間の交互作用を探索した。具体的には、肝炎治療の奏功について、交互作用項のないロジスティックモデルと交互作用項のあるロジスティックモデルの尤度比を検定した。また、検出された交互作用の治療奏功における予測力の評価として、ROC 曲線の下面積の増加の意味で、交互作用の有るモデルが有意に奏功予測を改善するかどうかを検討した。

4. ウイルス因子 (脇田、田中、鈴木)

HBs 抗原陽性の肝がん患者 238 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) 171 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実施した。

C. 研究結果

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

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、台湾人(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。日本人検体については、全国より約 3,000 検体が収集され、そのほとんどに臨床情報(簡易)の付加が完了した。また海外検体については、合計 2,695 検体(韓国、香港、タイ、台湾)を収集した。

2-1. HBV 感染に伴う各病態の宿主遺伝要因同定を目的としたゲノムワイド関連解析

B 型肝炎の慢性化に関連する宿主遺伝要因の探索を目的とし、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 523 検体をケース群、健常者群 640 検体をコントロール群として GWAS を実施した。既報の HLA-DP を含む HLA 領域で 471SNP、それ以外の領域で 58SNP が関連候補 SNP として選ばれた。また、繊維化進展に関連する遺伝要因の探索を目的とし、肝硬変患者群 211 検体をケース群、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 523 検体をコントロール群として GWAS を実施した。その結果、59SNP が関連候補 SNP として選ばれた。更に、癌化に関連する遺伝要因の探索を目的とし、HBV 陽性肝癌患者群 473 検体をケース群、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 516 検体をコントロール群として GWAS を実施した。その結果、110SNP が関連候補 SNP として選ばれた。

2-2. HLA-DP アリルの組換えタンパク発現系の構築

HLA-DP アリル産物 6 種類を哺乳類細胞、昆虫細胞を発現宿主として発現し、組換え HLA-DP タンパク質を得た。HBs 抗原の数力所の領域について 10-15mer の合成ペプチドを作製し、HLA-ペプチド結合解析を行った。

2-3. 東アジア集団の大規模 HLA タイピング

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 (*DPB1*09:01*, *DPB1*02:01*) でも関連が見られ、韓国人でも同様の傾向が示された。また、慢性肝炎患者群と肝硬変および肝癌患者群の比較から、*DPB1*02:01* が病態の進展に関連する事が示された。

2-4. 遺伝子ネットワーク解析の実施

CH-B、CH-C、HCC-B、HCC-C それぞれにおいて、順に 11、7、10、12 クラスタを用いた各群でのネットワーク構築が可能であった。HCC-C では発現上昇を 4 つの遺伝子クラスターで認め、これらはそれぞれ細胞増殖群、間質系細胞群、免疫応答群、腫瘍マーカー群であり、LCM 解析から CPA で発現する遺伝子を多く含んでいた。一方、発現低下のクラスター群の多くは代謝関連遺伝子にて形成されており、これらの遺伝子は主に CLL で発現する遺伝子であった。これらの遺伝子発現と密接に関連する CH-C の遺伝子クラスターは、ケモカインを中心とした炎症に関わるクラスターであった。遺伝子クラスター間の関連を MetaCore にて既報の遺伝子間関連と照合すると、非癌部でのこれらの遺伝子発現と癌部での *EGR1* 遺伝子の関連性が示唆された。癌部では *EGR1* シグナルが細胞増殖・代謝シグナルを制御していた。一方、HCC-B の遺伝子発現は HCC-C とは異なり、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。さらに興味深いことに 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。HCC-B 及び HCC-C 各 10 症例の癌部のエクソーム解析を次世代シーケンサーにて行った結果、HCC-B 及び HCC-C 共通して Wnt シグナルの変異が認められ、HCC-B では P53/Noctch シグナル、HCC-C では JNK/PI3K の経路に遺伝子変異が多い傾向が見られた。今後、トランスクリプトーム解析と併せた詳細な解析が必要と考えられた。

3. 臨床情報と SNP の相互作用解析

女性において、共変量として年齢と各 SNP の型をとり、それらの交互作用を探索したところ、SNP rs1287948 において、 $P=7 \times 10^{-8}$ と Bonferroni の多重比較の補正の下でもなお有意な交互作用が検出された。さらに、ROC 曲線の下面積を計算したところ、交互作用のないモデルでは 0.704、交互作用のあるモデルでは 0.867 であり、交互作用のあるモデルは交互作用のないモデルを DeLong の検定の意味で有意に優越した。したがって、rs1287948 と年齢の交互作用は女性における治療奏功の予測因子であると考えられた。

次に、共変量として、研究代表者らにより発見された IL28 の近傍の SNP の型と年齢を用いる場合と、さらに rs1287948 と、その年齢との交互作用を追加して用いる場合の予測力の比較を検討した。前者の ROC 曲線の下面積が 0.839 であるのに対して、後者では 0.934 であり、本研究で発見された rs1287948 を用いたモデルは、用いない既存のモデルを有意に優越した。

4. ウイルスゲノム解析

肝がん患者238例検体と、非肝がん患者171例について付帯情報を比較した結果、男性の割合とgenotype Cの割合が肝がん患者で有意に高かった($p < 0.0001$)。これらの内、ウイルス遺伝子データが得られた肝がん患者156例検体と、非肝がん患者138例について解析を行った結果、A1762T/G1764A変異が肝がん患者で有意に高かった($p < 0.05$)。

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 5,700 検体にのぼり、さらに共同研究グループが約 1,300 検体を保有する。今後これらの検体は、より大規模な GWAS やその結果の検証に用いることが期待される。また、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、病態の解明およびリスク予測遺伝子検査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。

既に B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除や肝臓については一部新規遺伝要因を報告しているが、今後はこのシステムを用いてより大規模な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。また、線維化進展や癌化においても新規遺伝要因の同定が期待される。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 つの組織から構成し、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、台湾人（健常者群、HBV 患者群およびウイルス排除群）約 5,700 検体を収集した。2) ゲノム解析では、慢性化・線維化進展・癌化に関連する宿主遺伝要因

を網羅的に探索し、各病態について関連候補 SNP を検出した。機能解析では、HLA-DP アリルの組み換えタンパク発現系を哺乳類繊維芽細胞株および昆虫細胞株を用いて構築し、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、慢性化及び病態進展に關与する HLA-DPB1 アリルを同定した。更に、B 型慢性肝炎から肝臓発症に關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臓の AP1 シグナルと關連しており、非癌部における遺伝子変化が肝臓発症と關連する事を示した。3) 統計解析手法については、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を実施した。4) ウイルス因子の同定では、肝臓患者および非肝臓患者の HBV ゲノム配列を決定し、肝臓癌連変異を同定した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishida N, **Tokunaga K**, and Mizokami M: Genome-wide association study reveals host genetic factors for liver diseases. J. Clin. Translat. Hepatol. (in press)
- (2) **Tokunaga K**: Lessons from genome-wide search for disease-related genes with special reference to HLA-disease associations. Genes 5: e84-96, 2014.
- (3) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wai-Kay, Yuen Man-Fung, Nawarat Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn Sang Hoon, Han Kwang-Hyub, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Jong-Hon Kang, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M,

Tokunaga K., and Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. PLoS One. 9(2): e86449, 2014.

2. 学会発表

- (1) **徳永勝士**：ゲノム・遺伝子解析研究がもたらす革新（教育講演）第 62 回日本医学検査学会、香川、2013.5.18.
- (2) 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 HBV 陽性肝癌感受性候補 SNP の東アジア集団での検証、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.7.
- (3) **Katsushi Tokunaga**: Single nucleotide polymorphisms(SNPs) in humans: Associations with disease susceptibilities and drug responses, International Conference in Medicine and Public Health 2013 (ICMPH2013) “Healthy Society beyond Frontiers”, Mahidol University, Bangkok, 2013. 6.25.
- (4) Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Masaya Sugiyama, Wai-Kay Seto, Man-Fung Yuen, Yong Poovorawan, Sang Hoon Ahn, Kwang-Hyub Han, Kentaro Matsuura, Yasuhito Tanaka, Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Jong-Hon Kang, Shuhei Hige, Tatsuya Ide, Kazuhide Yamamoto, Isao Sakaida, Yoshikazu Murawaki, Yoshito Itoh, Akihiro Tamori, Etsuro Orito, Yoichi Hiasa, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Eiji Mita, Kazuyuki Suzuki, Keisuke Hino, Eiji Tanaka, Satoshi Mochida, Masaaki Watanabe, Yuichiro Eguchi, Masaaki Korenaga, Yoriko Mawatari, Minae Kawashima, **Katsushi Tokunaga**, Masashi Mizokami, Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2013, Washington DC, 2013
- (5) **徳永勝士**：肝炎の診断と治療、(シンポジウム「GWAS 成果と応用」) 第 58 回

日本人類遺伝学会大会、仙台、2013.11.21.

- (6) 西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、**徳永勝士**、溝上雅史、B 型肝炎慢性化および病態進展に関わる HLA-DP 遺伝子のアジア人集団における横断的解析、日本人類遺伝学会 第 58 回大会、仙台、2013
- (7) 西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、**徳永勝士**、溝上雅史、アジア人集団における B 型肝炎患者を対象とした HLA-DP 遺伝子の横断的解析、第 36 回日本分子生物学会年、神戸、2013

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：B 型肝炎の慢性化の素因の検出方法

発明者：**徳永勝士**、澤井裕美、溝上雅史、西田奈央

出願日：2013 年 8 月 30 日

出願番号：特願 2013-179634

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし