

201320005B

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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 26 (2014) 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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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 研究体制 -----	13
別紙2 検体収集・臨床情報蓄積 -----	14

II. 分担研究報告

1. 臨床検体及び付帯情報の収集 -----	15
(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 -----	19
(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 -----	22
(国立感染症研究所 脇田 隆宇)	
4. ① HBe抗原陽性B型慢性肝炎患者の肝発癌に寄与する因子の検討	
② 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	
③ 当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討 -----	26
(国立病院機構長崎医療センター 八橋 弘)	
5. B型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療耐性に関わる因子の解析 -----	31
(信州大学医学部附属病院 肝疾患診療相談センター 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)	
-----	34
(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 -----	37
(埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 持田 智)	

8. 肝癌感受性遺伝子の同定 -----	41
(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 -----	46
(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 -----	50
(北海道大学大学院医学研究科 消化器外科学分野 I 武富 紹信)	
11. B型慢性肝炎の病態と関連する宿主遺伝子の検討 -----	58
(武蔵野赤十字病院 消化器科 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 -----	61
(川崎医科大学 肝胆膵内科学 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 -----	64
(北海道大学大学院医学研究科 消化器内科 夏井坂 光輝)	
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 -----	67
(名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学 楠本 茂)	
15. B型肝炎関連肝移植に対するHBV ワクチンによる抗体陽転化予測における HLA-DP の遺伝子解析の意義 -----	69
(九州大学大学院 消化器・総合外科 調 憲)	
16. B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析 -----	71
(東京大学医科学研究所 松田 浩一)	
17. B型肝炎ウイルス感染患者群のゲノム解析 -----	75
(国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター 西田 奈央)	
18. HLA-DP の機能解析 -----	80
(東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 宮寺 浩子)	

19. 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 -----	83
(金沢大学医薬保健研究域 本多 政夫)	
20. 多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発 -----	89
(統計数理研究所 間野 修平)	
21. 1) 肝癌発症に関連する HBV 遺伝子の解析	
2) 宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響の解析	
3) オカルト HBV が疑われた核酸アナログ投与症例の HBV 遺伝子解析 -----	92
(浜松医科大学感染症学講座 鈴木 哲朗)	
22. ウイルスマーカーの臨床的有効性評価 -----	95
(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 -----	101
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	143

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23～25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、タイ、香港、台湾についても検体収集を実施した。2. のゲノム解析では、まず日本人健常群419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。また、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。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. 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 I	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

研究期間（研究期間については下記以外の分担研究者は平成23年4月から平成26年3月まで）

黒崎 雅之	平成24年4月から平成26年3月まで
日野 啓輔	平成24年4月から平成26年3月まで
楠本 茂	平成24年8月31日から平成26年3月まで
坂本 直哉	平成24年9月5日から平成25年3月まで
夏井坂 光輝	平成25年4月から平成26年3月まで(坂本直哉教授と交代)
調 憲	平成25年4月から平成26年3月まで

所属職名変更 武富 紹信（平成23年11月1日）

旧：九州大学大学院消化器・総合外科 講師

新：北海道大学消化器外科学分野Ⅰ（第一外科） 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)から構成し、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、武富、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及び血清）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受託会社にてDNAおよび血清を抽出・分離した後に国立国際医療研究センターへ送られる。既にDNAおよび血清を分離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。収集された臨床情報を元に病態毎に検体を分類し、ゲノム解析用の新たな

な ID が付加される。二重匿名化されたゲノム DNA と臨床情報は、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野に送られる。

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

各施設より収集された検体を用いて、約 90 万種の SNP を搭載した Affymetrix Genome-wide Human SNP Array 6.0、および約 60 万種の SNP を搭載した Affymetrix AXIOM ASI 1 Array を用いてゲノムワイド SNP タイピングを実施した。高精度 imputation システムに用いた日本人健常群 419 検体（東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野所持、連結不可能匿名化済）については上記の 2 プラットフォームに加えて、約 240 万種の SNP を搭載した Illumina Human OMNI2.5-8 BeadChip も用いてタイピングを実施した。

(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-DPA1 および DPB1 アリル、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, *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 ヘテロ二量体との結合を解析するため、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実験を行った。

3. 統計解析・情報（五條堀、間野）

臨床情報と SNP の交互作用の網羅的解析の手法を考察し、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）

本研究にて収集した検体についてウイルスゲノム解析を行い、臨床情報との関連解析を行うと共に、細胞・実験系の確立を目指す。

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。実験系に関しては、HBV 複製細胞として Hep2.2.15 細胞及び HepAD38 細胞を入手する。また、HBV 感染感受性細胞として HepaRG を入手し、HBV 感染感受性を検討すると共に初代培養ヒト肝細胞の HBV 感染感受性を検討する。HBV 感染動物モデルについては、ヒト肝細胞キメラマウスを作製し、ウイルス感染感受性を確認する。

(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。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。

C. 研究結果

研究代表者及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の構築およびシステムを利用した検体収集の実施

サンプル収集から解析までを効率的に行うためのシステムを構築した。全部で 10 ステップから構成され(別紙 2 参照)、①DNA・血清サンプルと臨床情報(簡易版)の登録(ステップ 1~3)、②臨床情報(詳細版)の追加作成(ステップ 4~6)、③SNP タイピングデータ取得と登録(ステップ 7~9)、④SNP タイピングデータを用いた解析結果の登録と共有(ステップ 10)の 4 段階に分類される。①と②では、サンプル登録および臨床情報取得を迅速かつ正確に行うため、臨床情報を 2 度に分けて登録する形式を採用した。臨床情報は全て電子媒体(パスワード付き)で管理し、そのままデータベースに蓄積可能にする事で、タイプミス等による不整合を防止した。③では、サンプル調製とプレート作成を自動化する事により、サンプルの取り違えを防止した。SNP タイピングデータ取得の方法は、1 度に大量の検体を処理する事が可能な AXIOM ASI Array を採用する。④では、サンプル情報、臨床情報(詳細版)、SNP タイピングデータをデータベース化して管理し、さらに統計解析結果を登録する。データベースには班員全員がアクセス制限された環境下で接続することができ、解析結果を共有する。

上記システムを用いて、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. 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

日本人健常群 419 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/慢性化に寄与する宿主遺伝要因の探索

GWAS 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 型肝炎の慢性化のみならず B 型肝炎ウイルスの排除に寄与することを報告した。また、B 型肝炎の慢性化に関連する新規の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。

2-3. 繊維化進展に寄与する宿主遺伝要因の探索

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。

2-4. 癌化に寄与する宿主遺伝要因の探索

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。

また、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。この報告の検証を、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再現されなかった。

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。

2-5. 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/Notch 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。

2-6. 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。またそれ以外に新たに 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、*DPBI*02:01* が病態の進展に関連する事が示された。

2-7. HLA-DP アリル組換えタンパク発現系の構築

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。

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、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 抗原の数カ所の領域について 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。

3. 交互作用解析手法の確立とその応用

データのクリーニングの手法を確立し、臨床データと全ゲノムタイピングのデータから疾患に関連する臨床情報とゲノム情報の交互作用の解析手法を確立することを目指した。具体的には、Lasso や Elastic Net を独自に実装し、その性能を評価するに留まらず、本年度に発表された *stability selection* を用いて多型を選択する手法も検討した。Group Lasso、ガウシアングラフィカルモデルについても、その有効性を考察した。それらの手法を研究代表者らが実施した GWAS のデータに適用し、有用性を評価した。

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. HBV 複製増殖細胞、感染感受性細胞および感染動物モデルの基礎検討とウイルスゲノム解析

HBV 複製細胞として Hep2.2.15 細胞および HepAD38 細胞を入手した。両細胞ともに培養上清にウイルス粒子を分泌していることを確認し、サザンブロットおよびリアルタイム PCR によるウイルスゲノムの検出系、ノザンブロットによる RNA の検出系を構築した。HepaRG 細胞は細胞を播種してから約 2 週間分化させることにより感染感受性を誘導できる。分化した状態で約 10% の細胞に感染を確認した。初代培養ヒト肝細胞に HBV を感染させると接種ウイルス量に依存してウイルス感染を確認した。uPA-NOG マウスを実験研の末水博士より供与いただき、ヒト初代培養肝細胞を移植して作製したヒト肝細胞移植したマウスに HBV を接種したところ持続的な感染が成立した。

また、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・臨床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。

健常者 419 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、まず日本人健常群 419 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。また、慢性化・繊維化進展・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。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、肝臓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関与する HLA-DPB1 アリルを同定した。更に、B 型肝炎から肝臓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発症と関連する事を示した。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. 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.
- (4) 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*. 7(1):e29967, 2012.
- (5) 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*. 13:47, 2012.
- (6) 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*. 7(6):e39175, 2012.
- (7) 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*. 7(9):e44743, 2012.
- (8) 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*. 7(10):e46806, 2012.
- (9) Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamura 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, Yatsuhashi 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*. 91(4):721-728, 2012.
- (10) Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y,

- Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, **Tokunaga K**, Mizokami M, Watanabe M; Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b., *J Med Virol.* 83(5): 871-8, 2011.
- (11) Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, **Tokunaga K**, Mizokami M: Genome-wide association study identified ITPA/DDR1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C., *Hum Mol Genet.* 20 (17): 3507-16, 2011.
- (12) Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, **Tokunaga K**, Mizokami M, Izumi N: Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther.* 16(5): 685-94, 2011.
- (13) Ogoshi K, Hashimoto SI, Nakatani Y, Qu W, Oshima K, **Tokunaga K**, Sugano S, Hattori M, Morishita S, and Matsushima K: Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics.* 98(4): 280-287, 2011.
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) **Tokunaga K**: 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) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, 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, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashima M, **Tokunaga K**, Mizokami M. 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
- (8) **Tokunaga K**: Genome-wide approaches to complex disease: advances and perspectives, Genomic Analysis of Diseases Workshop, Nature Conference, Hangzhou, China, 2012.5.

- (9) **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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) **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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) Nishida N, Sawai H, Sugiyama M, Matsuura K, Han K-H, Koike A, Ahn SH, **Tokunaga K**, Tanaka Y, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean, The 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei, 2012.
- (18) Sawai H, Nishida N, Matsuda K, Han K-H, Ahn SH, Matsuura K, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, **Tokunaga K**, No association for Chinese hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in Japanese and Korean populations, The 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei, 2012.
- (19) 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.
- (20) **Tokunaga K**, Lessons from genome-wide search for disease-related genes, The 20th Annual Conference of Korean Genome Organization, Gangoe-myeon, Korea, 2011.
- (21) Nishida N, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Koike A, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Mizokami M, **Tokunaga K**, A genome-wide association study identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, International Congress of Human Genetics 2011, Montreal, 2011.
- (22) Nishida N, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, **Tokunaga K**, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2011, San Francisco, 2011.

- (23) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上 雅史、徳永勝士、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎ウイルス排除機構に関する遺伝的要因の探索、第 56 回日本人類遺伝学会、幕張、2011
- (24) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上雅史、徳永勝士、B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除機構と HLA-DP との関連、日本組織適合学会第 20 回大会、三島、2011
- (25) 西田奈央、田中靖人、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、提嶋恵美、小笠原有子、石橋良美、馬場菜津美、溝上雅史、徳永勝士、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 34 回日本分子生物学会、横浜、2011

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

- (1) 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

別紙1 研究体制

研究代表者
 東京大学人類遺伝学 徳永勝士

臨床情報収集

統括
 国際医療研究センター
 溝上雅史

ゲノム解析・機能解析

統括
 東大・人類遺伝
 徳永勝士

統計解析

統括
 遺伝研
 五條堀 孝

ウイルス因子

統括
 感染研
 脇田隆字

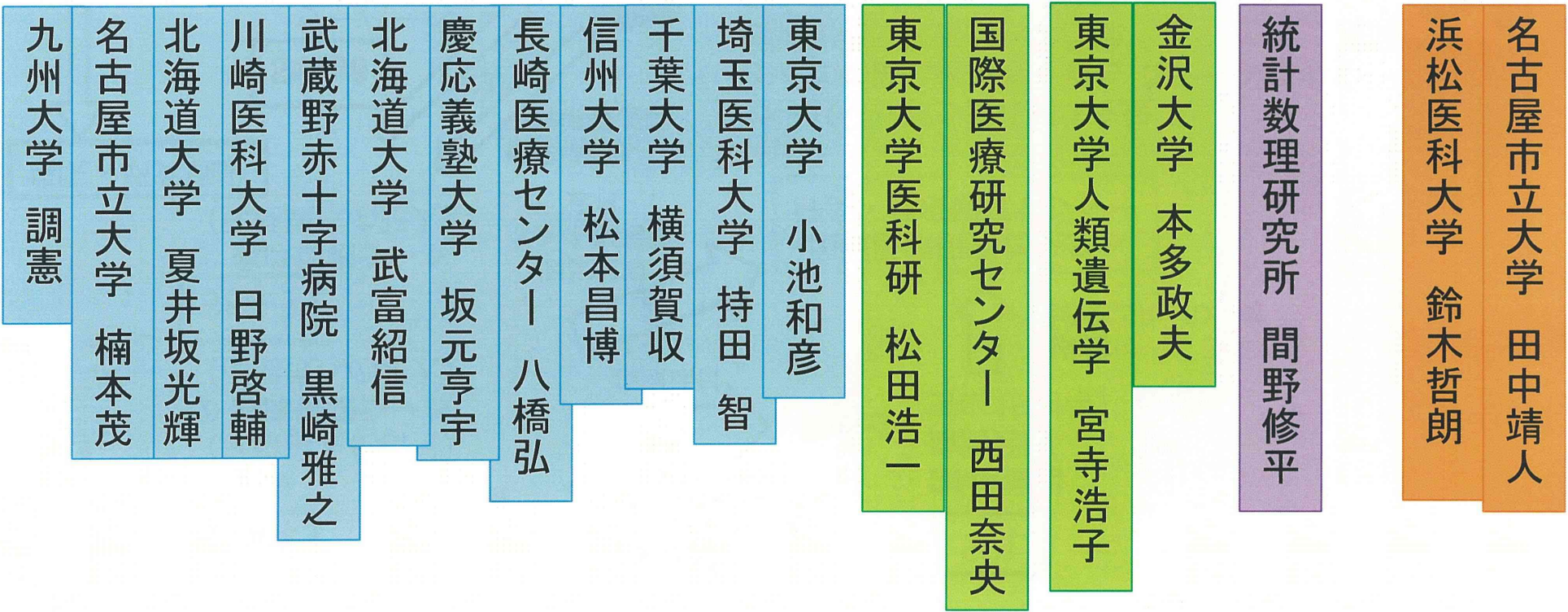
検体収集・臨床情報収集

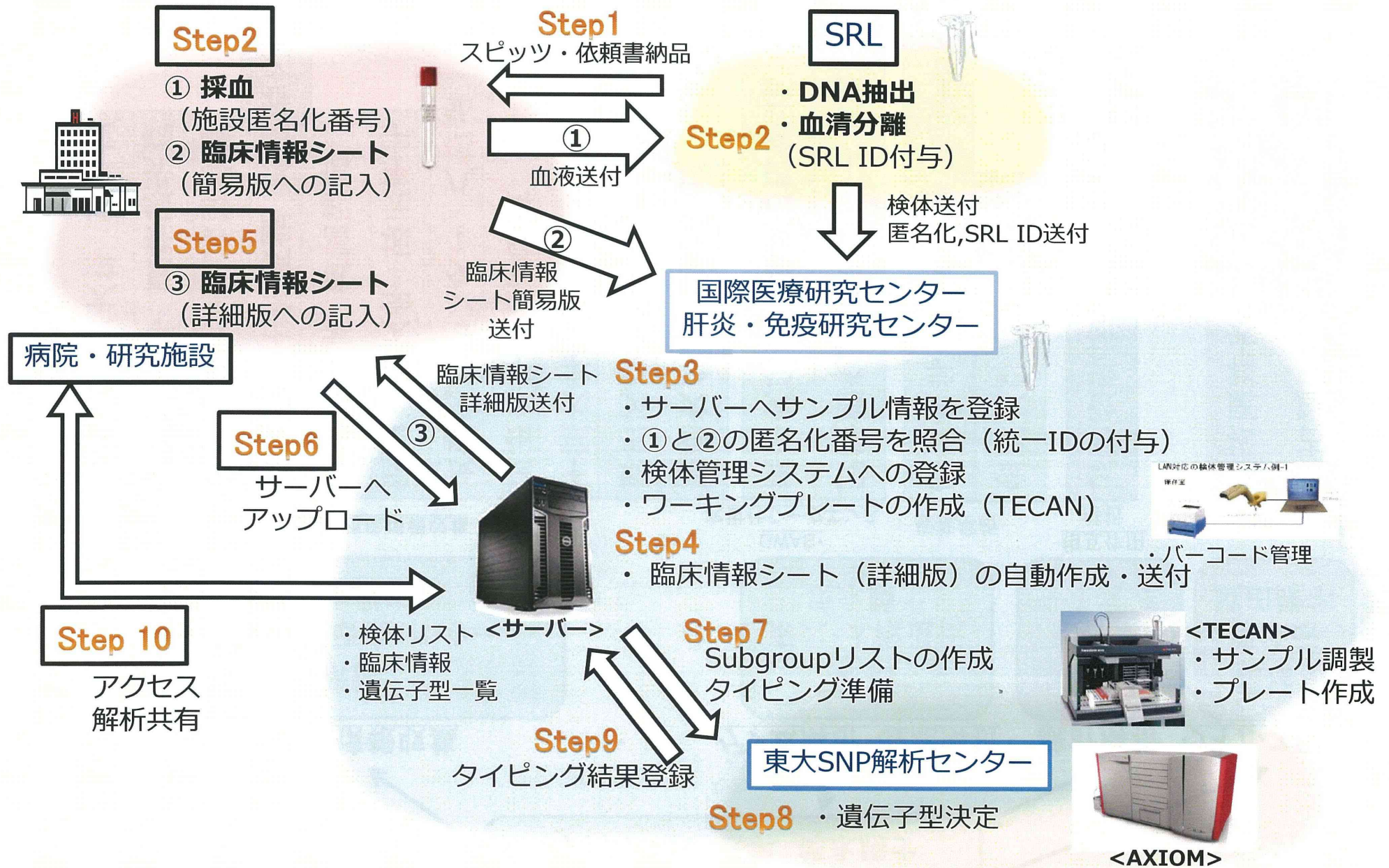
GWAS・
 次世代シーケンス

機能解析

相互作用
 解析

ウイルス因子解析





別紙2 検体収集・臨床情報蓄積と解析の手順

Ⅱ. 分担研究報告書