

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 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

分担研究者：西田 奈央 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
上級研究員

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染患者群のゲノム解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス由来肝炎に関連するホスト側遺伝要因としてGWASにより同定したHLA-DP遺伝子の詳細な解析を実施した。その結果、B型肝炎慢性化に対して、進行性の関連を示すHLA-DPB1アレルを2種類、抵抗性の関連を示すアレルを3種類同定することができた。また、B型肝炎慢性化に対して抵抗性を示すHLA-DPB1*02:01は、肝発癌への病態進展に対しても抵抗性の関連を示すことを世界に先駆けて同定し、論文報告した。B型肝炎ウイルス由来肝発癌に対する関連遺伝子として中国人で同定されたKIF1B遺伝子は、アジア人集団で関連が再現できなかったことから、現段階では唯一のHBV由来肝発癌の関連遺伝子と言える。本研究に関連して、6報の論文報告、15報の学会発表、および1件の特許出願を行った。

A. 研究目的

B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、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主（ヒト）因子、治療効果に寄与する宿主因子、ウイルス感染感受性に寄与する宿主因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

以下の手順でサンプルの準備からゲノム解析まで実施した。

- (1) 各研究参加施設で採取した血液サンプルは連結可能匿名化した後、SRLにおいてゲノムDNAの抽出を行う。DNA・血清サンプルはSRLから国際医療研究センターへ送られ、同センター内に一括保管される。
- (2) 各研究参加施設で収集された患者情報は連結可能匿名化された後、国際医療研究センターへ送られ、患者データベース構築に使用される。
- (3) 上記の患者情報をもとに、(A) HBV持続感染、(B) HBV繊維化進展、(C) HBV関

連肝癌、(D) HBV再活性化、(E) HBV重症化(劇症化)、(F) 薬剤応答性、(G) ワクチン応答性、(H) HBV家族内感染の8グループに分類し、DNAサンプルと患者情報にゲノム解析用のIDを付与する。また、比較対照群として健常群500例を目標として収集する。

(4) 二重匿名化したDNAサンプルと患者情報は、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野へ搬送された後、同施設において約60万SNPが搭載されたAXIOM Genome Wide ASI Array Plates (Affymetrix)を用いたゲノムワイドSNP解析を実施する。AXIOM Genome Wide Array Platesは、アジア系集団での解析に適した約60万か所のSNPが搭載されている。

(5) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野が所有する連結不可能匿名化された日本人健常群420検体をAXIOM Genome Wide ASI Array Platesでタイピングし、本研究における日本人健常対照群として用いる。

(6) ゲノムワイド関連解析で使用しなかった検体は、続くReplication study（再現性確

認)において使用する。

(倫理面への配慮)

本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言(平成20年10月修正)を遵守する。かつ、臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)、およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年2月8日全部改正)に則って本研究を実施するものとする。研究遂行者の供与される情報は、個人識別情報を除き供与される。即ち、連結可能匿名化とする。個人情報に関しては、個人情報識別管理者(国府台病院:管理課長、国立国際医療研究センター病院:企画戦略室長)をおき、情報管理には細心の注意を払う。また、患者個人識別情報と検体との対応表は、独立の鍵が掛かる場所に厳重に保管する。さらに、個人情報の管理をパソコンで行う場合には、当該パソコンをネットに連結することなく単独で使用し、独立の鍵の掛かる場所に厳重に保管する。

C. 研究結果

以下に3年間の研究結果をまとめる。

(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。同一の 420 検体について、約 90 万種の SNP を搭載した Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 によるゲノムワイド SNP タイピングも完了した。昨年度にデータ取得を終えた Affymetrix AXIOM ASI array (約 60 万種の SNP を搭載) によるゲノムワイド SNP 解析データと合わせて、日本人集団のゲノム構造を解析するために必要となるデータ取得を完了した。

(2) 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 (論文(1)参照)。

(3) 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 (論文(2)参照)。

(4) 日本人健常群 420 検体について、*HLA* タイピング (*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-DRB1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DPB1*) を実施した。日本人健常群 420 検体の Affymetrix AXIOM ASI array の SNP データおよび *HLA* タイピングデータを用いて分子進化的解析を実施したところ、日本人集団において *HLA-DPB1*04:01* が強い Positive selection を受けたことを明らかにした。また、この成果を論文で報告した (論文(3)参照)。

(5) GWAS 後の Replication 解析に適した DigiTag2 法の技術改良を実施した。解析結果を得るまでに 13 時間を要していたが、技術改良により 7 時間で解析結果が得られるようになった。また、この成果を論文で報告した (論文(4)参照)。

(6) 合計 3,136 例の日本人、韓国人、香港人、タイ人を含むアジア人集団を対象として、*HLA-DP* アリルタイピングを実施し、*HLA-DPA1* アリルおよび *HLA-DPB1* アリルを決定した。その結果、日本人において B 型肝炎慢性化に対して進行性の関連を示す *HLA-DP* アリルを 2 種類、また抵抗性の関連を示す *HLA-DP* アリルを 3 種類同定した。また、韓国人および香港人において検出された進行性、抵抗性の関連を示す *HLA-DP* アリルは日本人で検出されたアリルと共通するが、タイ人で検出されるアリルは他の 3 集団とは異なることが明らかとなった。加えて、日本人と韓国人において、病態進展に対して抵抗性の関連を示す共通の *HLA-DP* アリルを 1 種類同定した (論文(5)参照)。

D. 考察

アジア人集団において B 型慢性肝炎患者が多く存在することが知られているが、本研究において *HLA-DP* 遺伝子が B 型肝炎ウイルスの排除に重要な役割を果たすことを明らかにした。加えて、特定の *HLA-DP* ア

リルが B 型肝炎ウイルスの排除に対して抵抗性・感受性の関連を示すことが明らかとなったことから、*HLA-DP* 抵抗性アリルを有する肝癌進展患者を対象としてウイルス解析を実施することで、HBV 由来肝発癌に関連する新たなウイルス因子を同定することが可能となることが示唆される。

E. 結論

HLA-DP 遺伝子による B 型肝炎ウイルス排除の機序を解明することにより、肝発癌への進行を阻害する治療薬の開発につながると期待される。また、*HLA* 遺伝子は B 型肝炎のみでなく、多くの疾患関連遺伝子として報告されているが、複雑な遺伝子構造であるため *HLA* と疾患の関わりについて十分な研究がなされていない。本研究が *HLA* 解析のパイロットスタディーとなるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **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) 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
- (3) 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
 - (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*. 2012;7(1):e29967
 - (5) **Nao Nishida**, Hiromi Sawai, Koichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Masaya Sugiyama, Wai-Kay Seto, Man-Fung Yuen, Nawarat Posuwan, 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, Naohiko Masaki, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Yoriko Mawatari, Jun Ohashi, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami, New susceptibility and resistance *HLA-DP* alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One*. 2014 (in press)
- ##### 2. 学会発表
- (1) **Nishida N**, Sawai N, 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, Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2012, Taiwan, 2012.
 - (2) **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.
- (3) **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.
- (4) 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關与する遺伝要因の探索、第 56 回日本人類遺伝学会、幕張、2011
- (5) 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
- (6) **西田 奈央**、ウイルス性肝炎にみる宿主因子とウイルス因子、日本人類遺伝学会 第 57 回大会、京王プラザホテル、2012
- (7) **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
- (8) **Nao Nishida**, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Asako Koike, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, 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 Fransisco, 2012
- (9) **Nao Nishida**, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, 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
- (10) **Nao Nishida**, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, 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) 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) **Nao Nishida**, Development of DigiTag2 for determination of human SNPs, International Conference in Medicine and Public Health 2013, The Symposium on SNP typing: Application in human and TB, Faculty of Medecine Siriraj Hospital, Bangkok, 2013.6.24-28
- (13) **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

- (14) 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
- (15) 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

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

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 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

分担研究者：宮寺 浩子 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

分担研究課題：HLA-DP の機能解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染の罹患率には世界的に大きな地域差があり、日本を含む東アジア地域では顕著に高い。日本人を含む東アジア人集団を対象とした関連解析により、*HLA-DPA1*、*DPB1* 遺伝子領域内の多型がB型肝炎慢性化と非常に強く関連することが近年、報告された。このことは*HLA-DP* アリル特異的なHBV由来のペプチド断片提示がB型肝炎慢性化に強く関与していることを示唆する。本研究は、慢性B型肝炎感受性・抵抗性に関わる*HLA-DP* アリル産物の機能、および抵抗性アリルを介して提示されるHBs抗原領域を同定することを目的として、HLA-ペプチド相互作用解析を行った。

A. 研究目的

B型肝炎慢性化と最も強く関連する遺伝子多型が*HLA-DPA1*、*DPB1* 遺伝子座位とその周辺領域内にあることが近年、報告された (Kamatani, et al. (2009) *Nat. Genet.*; Nishida, et al. (2012) *PLoS One*)。東アジア集団で高頻度に存在する*HLA-DPB1**05:01はB型肝炎慢性化と強く関連する。一方、ヨーロッパ集団で最も高頻度に存在する*HLA-DPB1**04:01, *04:02はB型肝炎慢性化抵抗性と強く関連する。これらの知見は*HLA-DP*によるHBV抗原提示が、B型肝炎慢性化の機序に関与することを示唆する。慢性B型肝炎抵抗性アリル(*HLA-DPB1**04:01, *04:02)産物はHBV表面抗原タンパク質(HBs抗原)の一部の領域をアリル特異的に提示していると推測されるが、B型肝炎慢性化の機序における*HLA-DP*の機能は不明である。本研究では、*HLA-DP*結合HBs抗原ペプチドを同定することを目的として、HBs抗原ペプチドと*HLA-DP*との相互作用解析を行った。

B. 研究方法

B 型肝炎慢性化に対する感受性・抵抗性

と関連する *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) cDNA を *HLA* 標準細胞株よりクローニングし、組換え *HLA-DP* タンパク質をバキュロウイルス発現系、昆虫細胞安定発現系、哺乳類繊維芽細胞株で発現した。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-DP* との結合を測定した。*HLA* タンパク質をマイクロプレート上に固相化し、ビオチン標識ペプチドの *HLA* への結合を同定した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

HLA-DP タンパク質の発現系を構築し、解析対象のすべてのアリルについて細胞表面発現を確認した。次に、先行研究がより多い *HLA-DR* タンパク質を用いて、ペプチド-*HLA* タンパク質相互作用測定系を構築した。具体的には、*HLA* タンパク質 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発現した。安定発

現株を培養し、界面活性剤可溶性分画を 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。ビオチン化ペプチドの HLA への結合を複数の陽性コントロールペプチドを用いて検証し、反応条件、検出システムを最適化した。この系を用いて、10-20 種類の HBs ペプチドと、HLA-DP アリル産物 (6 種類) との相互作用解析を行った (data not shown)。

D. 考察

本研究ではまず、複数の HLA アリル産物について、ペプチド結合能を網羅的にスクリーニングするための測定系を構築した。先行研究において、HLA クラス II タンパク質とペプチドとの相互作用解析は、多くの場合、精製 HLA タンパク質を用いて行われている。最も一般的に行われる方法は、精製 HLA タンパク質を 96 穴プレート上に抗 HLA 抗体を介して固定し、標識ペプチドの HLA タンパク質への結合を、ペプチド末端の蛍光標識、HRP 酵素反応等で検出する方法である。この方法は解析対象とする HLA アリルタンパク質の種類が一種類もしくは少数である場合は有効であるが、複数の HLA アリルタンパク質を解析対象とする場合、各アリル産物に対して抗 HLA 抗体を選択する必要がある、実験作業の煩雑さ、固定化出来る HLA タンパク質量のアリル間の差異などの問題点がある。本研究では解析対象とする 6 アリル産物について、ペプチドとの結合を同一プレート上で測定することが可能な系を構築した。今後は HBs 抗原に加え、HBc, HBe 抗原ペプチドについても解析対象を広げ、HLA-DP 結合ペプチドを網羅的に探索する。

E. 結論

慢性 B 型肝炎感受性及び抵抗性に関連する HLA-DP アリルの組換えタンパク質安定発現株を作成した。また、HLA-ペプチド結合測定系を構築し、HBs 抗原ペプチドとの結合解析を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析
第 20 回日本組織適合性学会大会
2011 年 8 月 29 日 静岡
- (2) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析
第 34 回日本分子生物学会大会
2011 年 12 月 14 日 横浜
- (3) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析
第 40 回日本免疫学会学術集会
2011 年 11 月 27 日 千葉
- (4) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士
Peptide binding studies on HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B in East Asian population
第 16 回国際 HLA ワークショップ、第 26 回欧州組織適合性学会合同大会
2012 年 6 月 1 日 英国・リバプール
- (5) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析
第 21 回日本組織適合性学会大会
2012 年 9 月 15 日 東京
- (6) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士
Functional analysis of HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B
第 41 回日本免疫学会学術集会
2012 年 12 月 7 日 神戸
- (7) Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子、徳永勝士
Interaction analysis of HLA-DP protein and HBV surface antigenic peptides in association to susceptibility of chronic hepatitis B
日本人類遺伝学会第 58 回大会
2013 年 11 月 21 日 仙台

(8) Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子、徳永
勝士
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連す
る HLA-DP の機能解析
第 42 回日本免疫学会学術集会
2013 年 12 月 12 日 幕張

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 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

分担研究者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域 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トランスクリプトーム解析

研究要旨：ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、B型肝炎ウイルス感染の病態や療法に対する反応性に寄与する宿主因子の違いが明らかにされることが期待される。また、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。B型慢性肝炎（CH-B）、B型肝炎癌（HCC-B）およびC型慢性肝炎（CH-C）、C型肝炎癌（HCC-C）の肝組織を用い、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、ネットワーク解析を行った。Graphical Gaussian modeling(GGM)により、非癌部での遺伝子変化と癌部での遺伝子変化の関連性が明らかとなった。CH-B ではDNA修復・機能未知遺伝子がHCC-B のAP1シグナルと関連し、CH-Cではケモカイン・インターフェロンシグナルとHCC-CのEGR1シグナルと関連していた。非癌部における遺伝子変化は肝癌発症と関連していると考えられた。

また、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。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。

A. 研究目的

B型肝炎の病態の進展や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。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、B型肝炎ウイルス感染の病態や療法に対する反応性に寄与する宿主因子の違いが明らかにされることが期待される。一方で、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。

B. 研究方法

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ならびに検証を試みた。B型慢性肝炎（CH-B）37例、CH-B関連肝

癌17例（HCC-B）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

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。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。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

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-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。

D. 考察

Bioinformatics の手法を用い CH-B 関連肝癌ならびに CH-C 関連肝癌での遺伝子発現ならびに遺伝子群のネットワークの違いが明らかとなった。今後の、SNP と関連する遺伝子発現変化を同定する上で、重要な知見と考えられた。また、次世代シーケンサーを用いた肝癌のエクソーム解析では CH-B 関連肝癌と CH-C 関連肝癌のゲノム異常の違いが示唆された。

遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を組み合わせることにより、病態の解明と新しい治療法開発が可能になると考えられる。

E. 結論

B 型慢性肝炎、肝癌ならびに C 型慢性肝炎、肝癌での遺伝子発現は異なっており、GWAS や次世代シーケンサーを用いたゲ

ノム異常と関連する遺伝子発現変化を同定する上で、重要な知見と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, **Honda M**, Kaneko S. *J Hepatol.* 60(1):127-134. 2014.
- (2) New susceptibility and resistance HLA-DPA1/DPB1 alleles to hepatitis B virus-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia', submitted to PLOS Genetics, on which you are listed as an author. Nishida N, Sawai H; Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, 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, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. *PLoS One.* 2014. in press.
- (3) The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Diabetologia.* DOI; 10.1007/s00125-013-3149-9. 2014. in press.
- (4) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. *Hepatology.* DOI; 10.1002/hep.26788. 2013. in press.
- (5) Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatol Res.* DOI; 10.1111/hepr.12266. 2013. in press.
- (6) MicroRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. Spaniel C, **Honda M**, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. *PLoS One.* DOI; 10.1371/journal.pone.0076867. 2013. in press.
- (7) Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. **Honda M**, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. *BMC Cancer.* DOI; 10.1186/1471-2407-13-191. 2013. in press.
- (8) Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Miyahara K, Nouse K, Morimoto Y, Takeuchi Y, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, **Honda M**, Kaneko S, Sato T, Sato S, Obi S, Iwadou S, Kobayashi Y, Takaguchi K, Kariyama K, Takuma Y, Takabatake H, Yamamoto K; Okayama Liver Cancer Group. *Br J Cancer.* 109(8):2072-2078. 2013.
- (9) Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, **Honda M**, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. *Eur J Immunol.* 43(11):2956-2968. 2013.
- (10) Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, **Honda M**,

- Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. *Hepatology*. 58(3):1133-1142. 2013.
- (11) ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. Komura T, Sakai Y, **Honda M**, Takamura T, Wada T, Kaneko S. *Cell Immunol*. 282(1):44-52. 2013.
- (12) MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. *J Virol*. 87(9):5270-5286. 2013.
- (13) Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Hodo Y, **Honda M**, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S. *Clin Cancer Res*. 19(7):1827-1837. 2013.
- (14) Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Yamashita T, **Honda M**, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology*. 57(4):1484-1497. 2013.
- (15) Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Ueda T, **Honda M**, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai S, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. *Genomics*. 101(4):238-48. 2013.
- (16) Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Sakai Y, Tatsumi I, Higashimoto M, Seki A, Nasti A, Yoshida K, Kawaguchi K, Wada T, **Honda M**, Komura T, Kaneko S. *Biochem Biophys Res Commun*. 428(1):36-43. 2012.
- (17) Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. 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, Tani 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. *Am J Hum Genet*. 91(4):721-728. 2012.
- (18) Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int*. 32(10):1516-26. 2012.
- (19) Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. 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. *PLoS One*. 7(6). e39175. 2012.
- (20) No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. 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. *BMC Med Genet.* 13: 47. 2012.
- (21) Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Okada H, **Honda M**, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. *Cancer Res.* 72(17):4459-71. 2012.
- (22) Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, **Honda M**, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. *Hepatol Res.* 42(6):523-542. 2012.
- (23) Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Metabolism.* 61(10):1388-94. 2012.
- (24) Coexpression network analysis in chronic hepatitis B and C hepatic lesions reveals distinct patterns of disease progression to hepatocellular carcinoma. He D, Liu ZP, **Honda M**, Kaneko S, Chen L. *J Mol Cell Biol.* 4(3):140-52. 2012.
- (25) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. Mizuno H, **Honda M**, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Liver Int.* 32(7):1146-55. 2012.
- (26) Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, Asahina Y, Izumi N, **Honda M**, Kaneko S, Enomoto N. *Hepatol Int.* 6(2):482-490. 2012.
- (27) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, **Honda M**, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol.* 167(3):532-42. 2012.
- (28) Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood. Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, **Honda M**, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K. *Biochem Biophys Res Commun.* 418(2):313-8. 2012.
- (29) A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. Okusaka T, Kasugai H, Ishii H, Kudo M, Sata M, Tanaka K, Shioyama Y, Chayama K, Kumada H, Yoshikawa M, Seki T, Saito H, Hayashi N, Shiratori K, Okita K, Sakaida I, **Honda M**, Kusumoto Y, Tsutsumi T, Sakata K. *Invest New Drugs.* 30(5):2015-25. 2012.
- (30) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, **Honda M**, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol.* 167(3):532-42. 2012.
- (31) Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, **Honda M**, Kaneko S. *Oncology.* 81(5-6):281-290. 2011.

- (32) Genome-wide association study identified ITPA/DDR1GK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi 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. Hum Mol Genet. 20(17):3507-16. 2011.
- (33) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. Hepatology. 53(4):1206-16. 2011.
- (34) Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. **Honda M**, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Gastroenterology. 141(1):128-40. 2011.
- (35) Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. J Gastroenterol Hepatol. 26(6):960-4. 2011.
- (36) Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, **Honda M**, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. J Hepatol. 54(3):439-48. 2011.
- (37) Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Sunagozaka H, **Honda M**,

Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Int J Cancer. 129(7):1576-85. 2011.

2. 学会発表

- (1) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. (口演 32242) 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2013). メルボルン 2013.
- (2) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. (口演 Parallel 35: HCV Pathogenesis) The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD 2013). ワシントン D.C. 2013.
- (3) Impaired Infiltration of Immune Regulatory Cells into Liver Lobules of Chronic Hepatitis C Patients with Interferon-Resistant IL28B Genotype. **Honda M**, Sakai A, Shirasaki T, Nakamura M, Yamashita T, Arai K, Shimakami T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. AASLD2012(63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012). ボストン 2012.

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

分担研究者：間野 修平 統計数理研究所 准教授
研究協力者：西野 穰 国立遺伝学研究所 特任研究員（平成24-25年度）
山田 隆行 統計数理研究所 特任助教（平成23年度）

分担研究課題：多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発

研究要旨：最近のGWASでは、多くの臨床情報と非常に多数のSNPを調べるため、標準的な統計解析を適用することが難しい。標準的解析を行うためには、まず考慮すべきSNPを絞らざるをえない。本研究は、主にこの状況におけるデータ解析の方法論の検討と開発に取り組んだ。平成23年度は、解析手法の確立を目的とした。具体的には、既存のデータによって、変量選択、グラフィカルモデルについて実装し、有効性を確認した。平成24年度は、変量選択に関する一層の検討と、全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価の二点を目的とした。Elastic net + stability selectionによる変量選択をGWASのデータサイズに耐える仕様で実装し、不完全浸透や表型模写があったとしても症例対照研究が著しく偽陽性を減らすことを示した。平成25年度は、残った問題である、全ゲノムのSNPと臨床情報の交互作用の検出を目的とした。提供されたデータを解析し、多重比較の調整を行ってもなお有意な効果として、年齢とSNPの交互作用が女性における治療奏功に関与することを示し、従来のIL28のSNPのみによる奏功予測を有意に改善することを示した。

A. 研究目的

ゲノム情報に基づく疾患研究においては、個体レベルの大量のデータを扱う必要がある。ここでは、従来の推測統計学の前提であった、少数のパラメタ、大きい標本、という状況に依拠できない。本研究は、現代的な統計解析手法の導入の試みである。

回帰モデルによる変量選択については、情報量基準によるステップワイズ法が標準的であるが、変量が非常に多く、いくつかの寄与を持つ変量があり、個々の寄与は強くない、というGWASにおいて想定される状況では、ステップワイズ法による変量選択は困難であることが指摘されており、最近では、L1正則化回帰を用いることが標準的である。

平成23年度は、既存のデータについて、L1正則化回帰による変量選択とガウシヤ

ン・グラフィカルモデルの推定を実施し、それらの有効性を確認したが、L1正則化回帰により選択される変量は、リサンプリング標本、層別化標本などにおいて再現性が低いことが観察されたので、平成24年度は、変量選択に関する一層の検討と、全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価の二点を目的とした。

前者については、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開発した。後者については、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を示した。

残った問題は、交互作用の網羅的検出であった。既存のアプローチは周辺効果に着目して選んだ因子に対して網羅的に交互作

用を検定することであるが、主効果がなければ上手くいかないことは明らかである。一方、SNP だけでなく、臨床情報も網羅的に取得されるようになってきている。臨床情報との交互作用は、医学的に非常に興味がある上に、遺伝子間の交互作用に比較すれば検定の数が少ないので、その検出は比較的容易であるにも拘わらず、それを認識した解析が行われていない。

そこで、平成 25 年度は、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、提供されたデータに適用することで、その評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 変数の選択に関する検討 (平成 23-24 年度)。Lasso や Elastic Net などの正則化回帰を用いることが基本である。さらに、グラフィカルモデルにより、多型と臨床情報をグラフ表示することで、推論に供することができる。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。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。

2) 全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価 (平成 24 年度)。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た。標本における変異型の頻度のヒストグラムを「頻度スペクトラム」とよぶ。この性質は測度値拡散過程によるモデリングによりよく知られている。そこで、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。

3) 交互作用を網羅的に検出するための手続きの検討 (平成 25 年度)。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、共変量として各々の SNP のアレルの数と臨床情報をとり、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。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。

(倫理面への配慮) 解析に供するデータを使用することについて、データを取得する各参加機関、分担者が所属する統計数理研究所の研究倫理審査委員会より承認を得た。

C. 研究結果

1) 変数の選択に関する検討。まず、データのクリーニングの手続きを確立した。続いて、Lasso や elastic Net を実装した。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。そこで 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。

2) 全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価。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。結果を専門国際誌に出版した。

3) 交互作用を網羅的に検出するための手続きの検討。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、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ところ、前者のROC曲線の下面積が0.839であるのに対し、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。

D. 考察

本研究は方法論の検討と開発を目的としたものであり、変数の選択、偽陽性の評価、交互作用の検出、という、ゲノム情報を用いた疾患研究の現場で必要度の高い3つの課題を考察した。それぞれの課題について、現代的な統計解析手法をある程度は導入することができたと考えている。具体的な医学的発見としても、がんのための分子標的薬の標的遺伝子を発見し、閉経後の女性において奏功確率が下がるという臨床的によく知られた事実を分子レベルでサポートするなどの成果を得ることができた。

E. 結論

1) 変数選択に関する検討。Elastic net + stability selection による変数選択について、GWAS のデータサイズに耐える仕様で実装した。

2) 全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価。症例対照研究は非常に偽陽性を減らす効果がある。その期待値を計算

する手続きを与えた。

3) 交互作用を網羅的に検出するための手続きの検討。最近のGWASにおいては、SNPだけでなく、臨床情報も網羅的に取得されるようになってきている。周辺効果の存在を仮定しない交互作用の網羅的検出の手続きを考案し、実際のデータにおいて機能することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishino, J. and **Mano, S.** (2013) “Expected number of selected SNVs in filtering approaches”, special issue of Statistical Analysis of Biomarkers for Personalized Medicine in *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013: 179761. 13pp
- (2) **間野修平**(2013)「ポストゲノム時代に遺伝疫学を考える」生物の科学「遺伝」67巻3号, 368-381.
- (3) Nishino, J., Sugiyama, M., Nishida, N., Tokunaga, K., Mizokami, M. and **Mano S.** “The SNP \times age interaction on response to interferon- α and ribavirin therapy in hepatitis C woman patients”, submitted to Journal of Medical Virology.

2. 学会発表

- (1) 山田隆行, 溝上雅史, **間野修平**「全ゲノム交互作用解析により見つかったC型肝炎のインターフェロン・リバビリン併用治療における年齢と薬剤奏功の交互作用」日本人類遺伝学会第56回大会.

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 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

分担研究者：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授
研究協力者：伊藤 昌彦 浜松医科大学感染症学講座 助教
小林 良正 浜松医科大学内科学第二講座 講師

- 分担研究課題：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

研究要旨：

1) ウイルス因子解析グループとして、本研究班で収集されたHBV陽性肝疾患患者血清中のHBV遺伝子解析、特に肝癌の発症リスクに関与するHBV変異を解析した。肝細胞がん癌症例群と慢性肝炎+無症候性キャリア群で比較解析を行った結果、HBx/Enhancer II領域に含まれるC1653Tの変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

2) ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いがHBV複製許容性に影響するかを、独自に樹立したHdo細胞と親細胞HuH-7を用いて解析した。遺伝子型A-Dの混合DNAを導入してHBV複製を調べた結果、Hdo細胞では4 HBVクローンとも同程度に複製するのに対し、HuH-7では遺伝子型Bが特に高複製を示した。HBV DNA複製において、ウイルス遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在するのかもしれない。

3) ラミブジンの長期間投与に伴ってHBs抗原が検出限界以下となったもののHBV DNA陽性が持続する慢性B型肝炎患者について、オカルトHBVと薬剤耐性変異の可能性を考え、HBs抗原領域及びポリメラーゼ領域のHBV遺伝子配列を解析した。その結果、HBs抗原に2カ所の変異：A194V及びI195Mを見出した。また、HBVポリメラーゼのL526MとM550Vの変異を検出した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの数は、世界的には3億5000万人にのぼると推定される。HBVの持続感染、病態進展、治療薬応答性などに関与する宿主側及びウイルス側の両遺伝要因が明らかとなることにより新たな診断技術、治療法の開発へ繋がるのが期待される。

本研究では、ウイルス因子解析グループとして、本研究班で収集されたHBV陽性肝疾患患者血清中のHBV遺伝子解析、特に肝癌の発症リスクに関与するHBV変異

等を解析した。また、ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いがHBV複製許容性に影響するかの解析を行った。

B. 研究方法

QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて血清より total DNA を抽出し、PCRにてHBV DNA断片を得、ダイレクトシーケンシングにて遺伝子配列を決定した。

HBVゲノムの1.24倍長を含むプラスミド（遺伝子型A, B, C, D）は国立国際医療研

究センター溝上先生より分与された。両プラスミドをリプログラミング化細胞株 Hdo#17, Hdo#23 及び parental の Huh7 細胞へトランスフェクションし、経時的に培養上清また細胞を回収し、ELISA 法により HBe 抗原 IHBs 抗原を測定また HBV 塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施した。提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存した。

C. 研究結果

1) 肝癌発症に関連する HBV 遺伝子の解析
本研究班の 15 施設で収集され匿名化の上提供された HBV 陽性肝疾患患者血清について HBV 遺伝子解析を行った。これまでに患者 67 検体について、HBx, Enhancer II, Basal Core promoter, PreC/C 領域を含む nt1360 から nt2062 領域の HBV DNA 配列を決定した。ウイルス因子解析グループ（国立感染症研、名古屋市立大、浜松医大）の全成績をまとめ、肝細胞がん発症例群と慢性肝炎+無症候性キャリア群で比較解析を行った結果、HBx また Enhancer II に含まれる C1653T の変異頻度が肝癌発症例群で有意に高いことが見出された。

2) 宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響

ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いが HBV 複製許容性に影響するかを解析している。昨年度、肝がん細胞 Huh7 のリプログラミング化によって肝臓実質細胞及び胆管上皮細胞に分化しうるオーバル様細胞 (Hdo#17, Hdo#23) を樹立した。HBV 遺伝子型 A と C をそれぞれ導入したところ、この細胞株は HBV 複製許容性を維持していることを見出した。本年度、細胞の分化度の違いが複

製しやすい HBV 株が異なるかを明らかにするため、HBV 遺伝子型 A, B, C, D の各ゲノムを同量混和し、HuH-7, Hdo#17, Hdo#23 にそれぞれ導入して経時的に各細胞内の HBV DNA を解析した。遺伝子導入後 6 日目まで、各細胞内の HBV DNA は 4 種類の HBV 株ともほぼ同じ割合で検出された。しかしながら、9 日目では、Hdo#17, Hdo#23 では 4 HBV 株ともほぼ同等に検出されたのに対し、HuH-7 では遺伝子型 B (Bj) 株が全 population の半数以上を占めた。

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

浜松医大病院にてラミブジン等を行った慢性 B 型肝炎患者の中でオカルト HBV が疑われた症例における HBV 遺伝子の解析を行なった。当該患者は、治療開始前、HBs 抗原 35497 IU/mL, HBV DNA 8.8 以上 (log copies/mL) と高値を示し、投与開始後、6 ヶ月で HBs 抗原 493 IU/mL, HBV DNA 2.7 log copies/mL まで低下した。その後、HBs 抗原は陰性化を認めたものの、HBV DNA は $10^2 \sim 10^3$ copies/mL を推移した。このことから、ラミブジン長期間投与に伴って HBs 抗原検出系に低感受性/非感受性の HBV 変異が生じた可能性を考えた。そこで、ラミブジン投与前及び投与 72 ヶ月後の患者血清中の HBV について PreS1/PreS2/S 領域とそれに対応するポリメラーゼ領域の遺伝子配列を決定した。その結果、図 1 のように HBs 抗原のアミノ酸 194, 195 番の Ala, Ile (投与前) がそれぞれ Val, Met (投与後) に置換する変異 (A194V, I195M) が見出された。また、ポリメラーゼのアミノ酸 526 番 Leu が Met \rightarrow (L526M)、550 番 Met が Val \rightarrow (M550V) の置換変異が認められた。

D. 考察

1) 本研究班で収集された HBV 陽性患者検体について、肝がん発症と関連しうる HBV 変異をウイルス因子解析グループで共同解析した。文献的には、T1464G, C1485T, 1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, G1896A などの点変異と肝癌発症との関連

が報告されている。今回の解析からそのうち C1653T 変異が肝癌発症と有意に関連することが示された。この変異は Enhancer II 配列また HBx の変異であり、HBV 遺伝子発現制御に影響が生じる可能性は考えられるもののこれまでその機序は明らかにされていない。同変異が間接的に細胞増殖等影響する可能性も含め詳細な分子機構解析が必要である。

2) 昨年度、肝癌細胞のリプログラミング化操作によって樹立した Hdo 細胞は、肝実質細胞、胆管上皮細胞へ誘導可能な bipotential な性質を有するオーバル細胞(成体肝幹細胞とも呼ばれる)に近似していた。本年度は、この低分化細胞株と親細胞 HuH-7 を駆使して、細胞の分化度の違いが HBV 増殖性に及ぼす影響を調べた。その結果、一部の HBV 株(遺伝子型 B)は、Hdo 細胞よりも HuH-7 細胞で明らかに高増殖性を示すことが見出された。HBV の遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在する可能性が考えられる。キーとなる宿主側及びウイルス側要因を解明したい。

3) HBs 抗原検出試薬に対する反応性の低下に寄与する HBs 抗原変異としては、アミノ酸 116, 120, 126, 129, 130, 133, 145, 159, 183 番目等の変異がこれまで報告されている。オカルト HBV の要因となりうる新たな HBs 抗原変異として今回 A194V 及び I195M が見出された。A194V 及び I195M を持つ組換え HBs 抗原を作製し、検出試薬に対する感受性への影響を調べることにより本変異の意義が明らかとなる。一方、HBV ポリメラーゼの L526M (B-domain) と M550V (YMDD motif)はラミブジン耐性変異として報告されている (Bock et al,

Gastroenterol (2002)) ものと一致した。

E. 結論

1) HBx/Enhancer II 領域に存在する C1653T の HBV DNA 変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

2) HBV 複製において、遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在する可能性が示された。

3) ラミブジン長期間投与 B 型肝炎症例における HBV 遺伝子解析の結果、オカルト HBV に関与する可能性のある新たな HBs 抗原変異を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, **Suzuki T**, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. J Biosci. Bioeng (in press).

2. 学会発表

(1) 中島謙治、伊藤昌彦、李媛、孫鎖鋒、**鈴木哲朗**. B 型肝炎ウイルス (HBV) プレゲノム RNA 核外移行機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月.

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