

201320018A

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

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド
関連解析の手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

(H25-肝炎- 一般-005)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	頁
C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の手法を用いた 宿主因子の解析に関する研究	1
(名古屋市立大学 大学院医学研究科 田中 靖人)	
II. 分担研究報告書	
1. ゲノムワイド関連解析によるC型肝炎の宿主遺伝要因の探索	13
(東京大学大学院 医学系研究科 徳永 勝士)	
2. 住民/患者コホートにおける病態進展に関わる遺伝因子の探索	16
(山形大学医学部消化器内科学 渡辺 久剛)	
3. 肝線維化進行関連因子の検討	20
(武蔵野赤十字病院 消化器科 黒崎 雅之)	
4. 遺伝子発現解析によるIFN-lambda シグナルの解析	22
(金沢大学医薬保健研究域保健学系 本多 政夫)	
5. 検体及び付帯臨床情報の収集と解析	26
(国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 小森 敦正)	
6. 発癌母地としての非癌部肝組織におけるmiRNAの関与およびエピゲネティックな変化に関する preliminaryデータの取得	28
(徳島大学消化器・移植外科 宇都宮 徹)	
7. 非B非C肝臓がん発生母地としての過栄養による肝臓のgenetic, epigeneticな異常の解析	32
(横浜市立大学附属病院・消化器内科 中島 淳)	
8. C型肝炎分子標的療法の効果・副作用に関連する遺伝子多型の解析.....	36
(北海道大学大学院医学研究科 消化器内科 中馬 誠)	
9. C型肝炎ウイルス性肝炎におけるmicroRNAの発現プロファイリングの特徴とその役割.....	39
(東北大学病院 消化器内科 近藤 泰輝)	
10. 次世代シーケンスデータの解析とアノテーション	41
(国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 池尾 一穂)	

III. 研究成果の刊行一覧	43
IV. 研究成果の刊行物・別冊	51

I. 総括研究報告書

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究代表者:田中 靖人 名古屋市立大学 大学院医学研究科 教授

研究要旨: HCV感染に対する自然経過、新規薬剤に対する応答性、病態進展(特に発癌)に関わる宿主要因を従来のSNP-/CNV(コピー数多型)-based GWASに加えて、次世代シーケンスを用いたSequencing-based GWASにより同定する。遺伝要因のみならず、HCV感染各ステージにおけるエピジェネティックな変化やmicroRNAの関与を解析し、新規診断法・治療法の開発を目標とする。

(1) 全国38施設から約5,000検体の肝疾患患者からのゲノムDNA、血清(血漿、PBMC)及び付帯情報を保有。(2) SNP-/CNV-based GWAS:Affy 6.0, AxiomASI, Illumina Omni 2.5Mを合わせた300万SNP/CNVのimputationを高い精度で行える環境にある。1,000人ゲノムプロジェクトの日本人データおよび自らのチームで獲得した全ゲノムシーケンス解析データを追加。肝疾患患者に関しても1,000人以上のタイピングが終了し、CNVのデータも取得済。(3) **ゲノムワイド関連解析:**① HCV自然治癒にIL28B以外にHLA-DQが関与。② 好中球減少、うつ病などIFN副作用及び、扁平苔癬に関連する遺伝子要因を同定。③ 肝癌関連要因:年齢あるいは感染期間など背景を揃えた複数の住民コホート(山形県コホート、国がん多目的コホート)や大規模病院コホートでの検討。また、IFN著効後の肝発癌に関連する遺伝要因:年齢・性別をマッチさせたCase-control studyを開始。④ IL28Bマイナーでは、IFN-λ4と肝内ISGsが有意に相関し、Wntシグナル・リガンドであるWnt5Aの発現亢進。⑤ PNPLA3遺伝子は、NASHのみならずC型肝炎線維化進展に関与。(4) **オミックス解析:**① 肝硬変のない非B非C型肝癌部と非癌部のオミックス解析(メチル化、miRNA)を開始した。② HCV感染各ステージにおけるPBMC中のmRNA発現パターン、血清中エクソソーム内miRNA解析。③ 次世代型シーケンサーを代表とする大規模配列データの解析に必要な解析フローを整備・検証を進めた。発癌母地としての非癌部肝組織を対象としてHCV感染病態をより細分化しIL28B SNP以外の宿主因子探索を行うことにより、新たな治療標的を同定し、肝病態進展の新規診断法や治療法を確立する。すなわち、高齢者の多いC型肝炎患者に対して、遺伝情報に基づいた個別化医療を目指すことで、社会福祉に貢献できる。

研究分担者

徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学 教授
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授
黒崎 雅之	武蔵野赤十字病院 消化器科部長
渡辺 久剛	山形大学医学部 消化器内科学 講師
宇都宮 徹	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 消化器・移植外科学 准教授
中島 淳	横浜市立大学附属病院 消化器内科 教授
近藤 泰輝	東北大学病院 消化器内科 助教
中馬 誠	北海道大学大学院医学研究科 消化器肝臓病学・消化器内科 講師
小森 敦正	国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター・肝臓内科 病態制御研究室長
池尾 一穂	国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 准教授

A. 研究目的

[目的] HCV 感染に対する自然経過、新規薬剤に対する応答性、病態進展(特に発癌)に関わる宿主要因を従来の SNP-/CNV(コピー数多型)-based GWAS に加えて、次世代シーケンスを用いた Sequencing-based GWAS により同定する。遺伝要因のみならず、HCV 感染各ステージにおけるエピジェネティックな変化や microRNA の関与を解析し、新規診断法・治療法の開発を目標とする。(1) 年齢あるいは感染期間など背景を揃えた複数の住民コホートを対象として、HCV 感染に伴う病態進展(特に発癌)に関わる遺伝要因を最新の技術を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)により同定する。(2) HCV 感染各ステージにおけるエピジェネティックな変化や microRNA の関与を解析し、HCV 感染に伴う病態進展(線維化・肝癌)に関連する因子を同定・新規治療法の開発を目指す。(3) C 型肝炎の発癌母地としての非癌部肝組織に着目し肝発癌関連の宿主要因を明らかにし、新規診断法・治療法の開発を目指す。効率的な新規薬剤の開発につながるとともに、コンパニオン診断に基づいた治療戦略を実現する。

B. 研究方法

研究代表者である田中は、引き続き本研究の主研究施設である名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子解析倫理委員会の規定に基づいて、(1) 検体及び付帯情報の収集を継続(全国 38 施設から 5,000 検体以上)。(2) 国立がん研究センター多目的コホート研究グループ(主任研究者:津金昌一郎)との共同研究により肝発癌例と年齢をマッチさせたコントロール群の検体収集。(3) IL28B/ITPA SNP を TaqMan 法により測定し、各施設に情報提供:個別化医療の実現。(4) 好中球減少、うつ病、扁平苔癬など IFN 副作用に関連する遺伝要因探索。(5) IFN λ 機能解析を継続。

(1) ヒト SNPs を用いたゲノムワイド関連研究

(徳永):匿名化されたゲノム DNA と患者情報を、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野へ搬送し、同施設でゲノムワイド解析(GWAS)を実施。GWAS には、アジア系集団での解析に適した約 60 万か所の SNP を搭載した AXIOM Genome-Wide Array Plates (Affymetrix)を用いる。各種慢性ウイルス性肝疾患患者群の SNP タイピングを行い、患者群を病態および薬剤応答性に応じてサブグループに分類して GWAS を行う。GWAS で検出された疾患感受性候補遺伝子領域において、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析から TagSNP を選択し、DigiTag2 法を用いた再現性確認実験(Replication study)を実施することにより、疾患感受性遺伝子の同定を目指す(図 1)。

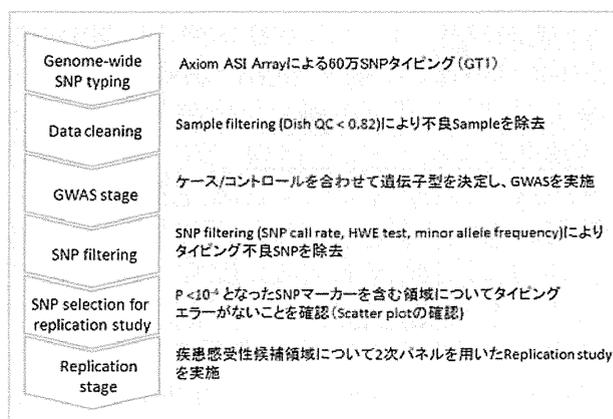


図 1

(2) 住民/患者コホートにおける病態進展に関わる遺伝因子の探索

a) 肝炎コホートにおける自然治癒関連因子の解析(渡辺): C型肝炎高浸淫地域住民 7,925 名を対象に HCV 抗体検査を行ったところ、HCV 抗体陽性者は 1,078 名(HCV 抗体陽性率 13%)であった。これら 1,078 名について当該自治体と連携し、追跡調査受診者の検体収集とともに、臨床情報の追加収集を行った。肝発がん状況の把握に超音波検査を実施し、肝線維化マーカーである FIB-4 index を用いて線維化進展を評価した。b) 遺伝子発現解析による IFN-λ シグナルの解析(本

多): PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した C 型慢性肝炎 91 症例において治療前の肝組織及び末梢血液の遺伝子発現プロファイリングを Affymetrics gene chip (133U Plus 2.0) にて解析した。15 例の治療前の肝組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション (LCM) にて肝小葉部と門脈域細胞浸潤を別々に採取し、遺伝子発現を解析した。c) **肝線維化進行関連因子の検討(黒崎)**: 複数回肝生検を施行した C 型慢性肝炎 157 例について、既報の線維化関連 SNP と肝線維化 Stage との関連、発癌との関連性を検討した。

(3) エピゲノム解析を含むオミックス解析:

宇都宮: 非 B 非 C 肝細胞癌 15 例 (HBcAb 陽性 8 例、HBcAb 陰性 7 例) と転移性肝癌 8 例 (正常肝) の肝切除標本における非癌部肝組織を用いて、

Infinium Human Methylation 450 BeadChip

(Illumina) を用いてメチル化解析を実施。**小森**:

2003 年 2 月からより国立病院機構長崎医療センターにて、OCT compound 包埋下 -80°C にて保存している肝生検組織 1,665 例を、主に背景肝病変、線維化により分類し、付帯臨床情報を解析/統合。

中島: 横浜市立大学および関連施設での非 B 非 C 肝臓がん患者の手術検体、血液検体を収集し、網羅的メチル化解析、GWAS を実施。**近藤**: C 型慢性肝炎 20 例、B 型慢性肝炎 20 例、健常人 10 例: TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit にてライブラリーを作成し、Single end 32 塩基、3 サンプル/1 レーンで Illumina GA IIx にて読み取りを行った。

中馬: HCC にて肝切除施行された 45 例 (早期再発 19 例、5 年以上無再発 26 例)、HCC を伴わない慢性肝炎 10 例、健常人 5 例、計 60 例に関して miRNA-microarray による網羅的解析を実施。**池尾**: 次世代シーケンスデータの大規模性と多様性に適応でき、なおかつ広く医学研究者が利用できるような解析手法とパイプラインを開発。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料の解析にあたり、新規試料については必ずインフォームドコンセントを取得し、既存試料についてはインフォームドコンセントの取得されたもののみを取り扱い、解析データの公表に際しては個人情報保護を徹底する。平成 19 年度に「テラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究」として名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子解析倫理委員会の承認を得ており (平成 19 年 3 月 30 日)、本研究課題を加え変更申請を行い承認をされている。研究分担者や連携研究者は各所属機関の倫理委員会において迅速審査を受けて承認を得ている。また、実験動物に対する動物愛護上の配慮を行い、研究施設委員会の承認を得て研究を行う。

C. 研究結果

・研究代表者

(1) 検体及び付帯情報の収集を継続 (全国 38 施設から 5,000 検体以上)。国立がん研究センター多目的コホート (主任研究者: 津金昌一郎) や山形県の住民コホートから HCV 検体を収集。(2) IL28B/ITPA SNP を TaqMan 法により測定し、各施設に情報提供 (H25 年度: 約 600 検体)。(3) PEG-IFN/RBV 併用療法の副作用に関連する遺伝要因同定のための研究デザイン (立案、実施): 好中球減少 (750 未満、600 未満)、うつ病 (後ろ向き・前向き研究の BDI-II テスト実施)。(4) 扁平苔癬スクリーニングの継続、検体採取 (久留米大学長尾先生との共同研究)。(5) **IFN λ 機能解析** 継続。

・研究分担者

(1) ゲノムワイド関連解析 (GWAS) (徳永): ① C 型肝炎自然治癒群 106 例と C 型肝炎慢性患者群 197 例を用いたゲノムワイド関連解析を実施し、IL28B 遺伝子近傍に存在する SNP (rs8099917) がゲノムワイド有意水準を満たす関連を示した。② 日本人 C 型肝炎自然治癒群 252 例および慢性肝

炎患者群 487 例を対象として、*HLA-DQ* タイピングを実施し、自然治癒に対して進行性の関連を示す *HLA-DQ* アリルを 2 つと、抵抗性の関連を示す *HLA-DQ* アリルを 1 つ同定。③HCV 関連の肝癌患者と慢性肝炎患者の比較をしたところ、肝癌に対して抵抗性の関連を示す *HLA-DQ* アリルを 1 つ同定した。

④C 型肝炎患者に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法による副作用の一つである好中球量減少、うつ病に関連する候補 SNPs を同定し、機能解析を開始。⑤HCV 由来扁平苔癬を対象とした GWAS を実施し、現在サブ解析を実施。

(2) 住民/患者コホートにおける病態進展に関わる遺伝因子の探索

(渡辺): FIB-4 低値例は PNALT で経過する例が多く、ウイルス自然陰性化の頻度も高い傾向にあった。肝がんは FIB-4 高値例においてその頻度が高かった。感染時期が明確である HCV 感染住民コホートにおいて、無症候性キャリア 500 名の検体採取と臨床情報の収集。病院コホート患者 1,400 名の中から年齢や感染期間をマッチさせた解析対象例を加え、データのスクリーニングと患者 DNA を抽出。

(本多): 治療前の肝組織を用いて LCM にて遺伝子発現を解析した結果、IL28B マイナーでは肝小葉部の ISG 発現が高値にかかわらず門脈域細胞浸潤の ISG 発現が低く肝小葉と門脈域間の細胞浸潤の障害が示唆された。また、IL28B マイナーでは、新規に発見された IFN- λ 4 と肝内 ISGs が有意に相関し、non-canonical wnt シグナル・リガンドである Wnt5A の発現亢進が認められた。

(黒崎): PNPLA3 遺伝子 CC では、有意に経時的な線維化の進行速度が速く、また多変量解析では、年齢とは独立した線維化進行リスク因子であった。

(3) エピゲノム解析を含むオミックス解析:

宇都宮: 関連 CpG サイトを用いて主成分分析を行った結果、非 B 非 C 肝細胞癌例の非癌部肝組織

に特徴的な DNA メチル化異常が存在。肝細胞癌の非癌部肝組織で高メチル化を示した Lrig1 の遺伝子発現は有意に低値、非癌部肝組織で低メチル化を示した LEF1 は、正常肝では発現を認めず肝細胞癌の非癌部肝組織のみで発現。

小森: 発癌を含めた 5 年超予後の解析が可能である 2003-2008 保存検体は計 1,157 例、内訳は C 型肝炎 598 例、B 型肝炎 212 例、非 BC 肝障害 332 例であった。Epigenome/miRNA 変化の解析: C 型肝炎線維化進展例(n=52)、C 型肝炎経過発癌例(n=31)、NASH 発癌例(n=13)。

中島: PNPLA3 の rs738409 の SNP が最も NASH に関与。Haplotype の分析では、PNPLA3 遺伝子が脂肪化と、PARVB 遺伝子が NAFLD activity score (NAS)・線維化と最も相関していた。近藤: 血清内において C 型肝炎において、低発現量を示した miRNA は、hsa-miR181a-2-3p, hsa-miR-374a-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR204-5p であった。

中馬: 早期再発で高発現している 5 つの miRNA; miR-135a, miR-658, miR-665, miR-1246, miR-1915 を抽出した。HCC の早期再発の感度は 71.2%、特異度は 82.4%であった。池尾: 次世代型シーケンサーを代表とする大規模配列データの解析に必要な解析フローを整備。既に公開されている肝がん次世代シーケンスデータセットを用いて、解析フローの有用性の検証を進めた。

D. 考察

C 型肝炎患者(肝癌、慢性肝炎)のゲノム DNA および臨床情報を収集し、管理する体制が整った。今年度、新たに 424 検体のゲノム DNA を収集し、平成 24 年度までに収集した 2,973 検体のゲノム DNA と合わせて合計 3,397 検体のゲノム DNA を用いたゲノム解析を実施することが可能となった。すでに、HCV 自然治癒、HCV 関連扁平苔癬及び IFN 治療に伴う好中球減少やうつ病に関連する遺伝要因を同定しており、でき

るだけ早期に論文化を目指す。

また、インターフェロン治療歴のない住民コホートの年齢・感染期間をマッチさせた HCV コホート検体を用いて、経時的に生体分子を解析し、肝発癌や肝病態進展 (FIB-4 index) との関連性を比較検討するとともに、すでに保存されている病院コホート検体も本検討に加え、遺伝因子を含めた病態進展に関わる宿主因子を解析する予定である。

GWAS により得られた遺伝要因の機能解析も進めている。IL28B メジャータイプでは IFN 投与により有意に肝内の IFN λ 及び ISGs が誘導され、HCV 排除に向かう。一方、IL28B マイナーの治療反応性低下の機序として、肝小葉の免疫担当細胞浸潤抑制、治療前の ISGs 高値による新たな ISGs 誘導不良、及び Wnt5A に代表される HCV 複製支持蛋白の発現が明らかとなった。今後 GWAS により得られた複数の遺伝要因に関して機能解析を継続していく。

一方、肝病態進展には遺伝子変異のみならず、エピゲノム変異や miRNA の影響もあると考え、肝癌症例の癌部、非癌部の網羅的メチル化解析及び miRNA 解析を開始した。C 型肝炎の発癌母地としての非癌部肝組織に注目し、HCV 感染各ステージにおけるエピゲノム変化や microRNA の関与を解析し、HCV 感染に伴う病態進展 (線維化・肝癌) に関連する因子を同定・新規治療法の開発を目指す。

次世代シーケンスなどから得られる情報は膨大であり、蛋白質間相互作用ネットワーク解析などのパイプライン及び遺伝子発現情報等を組み合わせることによって、更に因子の絞り込みが可能となった。今後、更に方法を改良するとともに、自動化を図り、広く活用できるようにしていく。

E. 結論

HCV 感染に対する応答性 (自然治癒や病態

進展) や薬剤応答性の個人差に関わる遺伝要因を明らかにすることができた。遺伝要因に加えて、非遺伝要因 (エピゲノム、miRNA) や蛋白の各要素を組み合わせることで、より精度の高い診断が可能となる。さらに、機能解析を展開することで、新規治療法の開発にも繋がる。

HCV に対する抗ウイルス薬の開発は目覚ましく、今後は HCV 排除よりも背景肝 (線維化、NASH など) の改善が課題となる。すなわち、HCV の病態は多岐にわたることから、HCV 感染の各ステージに影響を及ぼす宿主因子を同定し、新規治療薬の開発に貢献したい。すなわち、発癌母地としての非癌部肝組織を対象として HCV 感染病態をより細分化し IL28B SNP 以外の宿主因子探索、新たな治療標的を同定し、肝病態進展 (発癌含む) の新規診断法や治療法を確立することで、予後の改善・医療費低減が期待される。従来の GWAS 単点解析に加えて、次世代シーケンサーデータなどを活用した遺伝子間相互作用や遺伝子パスウェイなどを加味した新しい統計解析手法を実施することで、より効率的な新規分子標的薬の開発につながるとともに、コンパニオン診断に基づいた治療戦略を実現する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, **Tanaka Y**, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2013;12(6):2630-40.
2. Gray RR, **Tanaka Y**, Takebe Y, Magiorkinis G, Buskell Z, Seeff L, Alter HJ, Pybus OG. Evolutionary analysis of hepatitis C virus gene

- sequences from 1953. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1626):20130168.
3. Michikawa T, Inoue M, Sawada N, Sasazuki S, **Tanaka Y**, Iwasaki M, Shimazu T, Yamaji T, Mizokami M, Tsugane S; for the Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Plasma Levels of Adiponectin and Primary Liver Cancer Risk in Middle-Aged Japanese Adults with Hepatitis Virus Infection: A Nested Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(12):2250-7.
 4. Watanabe T, Inoue T, Tanoue Y, Maekawa H, Hamada-Tsutsumi S, Yoshida S, **Tanaka Y**. Hepatitis C Virus Genotype 2 May Not Be Detected by the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, Version 1.0. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4275-6.
 5. Sugimoto K, Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Ando K, Kim KI, **Tanaka Y**, Yano Y, Kim SK, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Takashi H, Hotta H, Hayashi Y, Kudo M. Factors of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy and mechanism of viral clearance. *Dig Dis.* 2013;31(5-6):421-5.
 6. Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Sugimoto K, Kim SK, **Tanaka Y**, Hatae T, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hotta H, Kudo M. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotypes 2a and 2b and high viral load. *Dig Dis.* 2013;31(5-6):426-33.
 7. Sugimoto K, Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Fujioka H, Kim KI, **Tanaka Y**, Yano Y, Kim SK, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hatae T, Hotta H, Hayashi Y, Kudo M. Outcome of Double-Filtration Plasmapheresis plus Interferon Treatment in Nonresponders to Pegylated Interferon plus Ribavirin Combination Therapy. *Dig Dis.* 2013;31(5-6):434-9.
 8. Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagiwara A, Kawamura E, Thuy LT, **Tanaka Y**, Kawada N. Relationship between ITPA genotype and outcome of extended therapy in HCV patients with a LVR to PEG-IFN and RBV. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(1):201-7.
 9. Shimada N, Tsubota A, Atsukawa M, Abe H, Ika M, Kato K, Sato Y, Kondo C, Sakamoto C, **Tanaka Y**, Aizawa Y. α -Fetoprotein is a surrogate marker for predicting treatment failure in telaprevir-based triple combination therapy for genotype 1b chronic hepatitis C Japanese patients with the IL28B minor genotype. *J Med Virol.* 2014;86(3):461-72.
 10. Tajiri H, **Tanaka Y**, Takano T, Suzuki M, Abukawa D, Miyoshi Y, Shimizu T, Brooks S. Association of IL28B polymorphisms with virological response to peginterferon and ribavirin therapy in children and adolescents with chronic hepatitis C. *Hepatology Res.* 2013 in press.
 11. Ragheb MM, Nemr NA, Kishk RM, Mandour MF, Abdou MM, Matsuura K, Watanabe T, **Tanaka Y**. Strong prediction of virological response to combination therapy by IL28B gene variants rs12979860 and rs8099917 in chronic hepatitis C genotype 4. *Liver Int.* 2013 in press.

2.学会発表

1. **Tanaka Y**. New diagnosis and treatment for viral hepatitis: prevention from HCC. The 4th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting. July 5-7, 2013. Busan.
2. **Tanaka Y**. Interleukin 28B and inosine triphosphatase polymorphisms in the personalized treatment of chronic hepatitis C. The

- 2013 Annual Scientific Meeting. Aug. 3, 2013. Taipei.
3. Nishida N, **Tanaka Y**, Sugiyama M, Mawatari Y, Ishii M, Haga C, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of IL28B gene associated with treatment response for HCV patients. ASHG 2013 Annual Meeting. Oct. 22-26, 2013. Boston.
 4. Watanabe T, Inoue T, Tanoue Y, Maekawa H, Iio E, Matsunami K, Shinkai N, Yoshida M, **Tanaka Y**. Hepatitis C Virus Genotype 2 may not be detected by the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, version 1.0. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
 5. Matsuura K, Iijima S, Watanabe T, Iio E, Endo M, Shinkai N, Fujiwara K, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Suppressive genes expressions of interferon signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells associated with IL28B genetic variants and virological response to PEG-IFN, RBV plus NS3/4 protease inhibitor. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
 6. 西田奈央, **田中靖人**, 杉山真也, 馬渡頼子, 石井真由美, 徳永勝士, 溝上雅史. C型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索. 第49回日本肝臓学会総会. 平成25年6月6日～7日. 東京.
 7. 渡邊綱正, 飯島沙幸, **田中靖人**. IL28B 遺伝子多型によるC型肝炎ウイルス感染肝内免疫応答の差異. 第49回日本肝臓学会総会. 平成25年6月6日～7日. 東京.
 8. 松浦健太郎, 飯島沙幸, **田中靖人**. 3剤併用療法における早期HCV-RNA陰性化に関連する要因～血清IP-10値、末梢血単核球中のIFN誘導遺伝子群の発現を含めた解析～. 第49回日本肝臓学会総会. 平成25年6月6日～7日. 東京.
 9. 飯島沙幸, 林佐奈衣, 松浦健太郎, 渡邊綱正, **田中靖人**. C型慢性肝炎に対する3剤併用療法における薬剤投与直後のPBMC内ISG発現動態. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 平成25年11月10日～12日. 神戸.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究課題名：

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するための
ゲノムワイド関連解析の手法を用いた宿主因子の解析
に関する研究（研究代表者 田中靖人）

HCVに対する抗ウイルス薬の開発は目覚ましく、今後は
HCV排除よりも背景肝（線維化、NASHなど）の改善が課題

大規模コホート

- ・国がん多目的コホート
- ・住民コホート(山形)
- ・病院コホート(武蔵野、長崎)

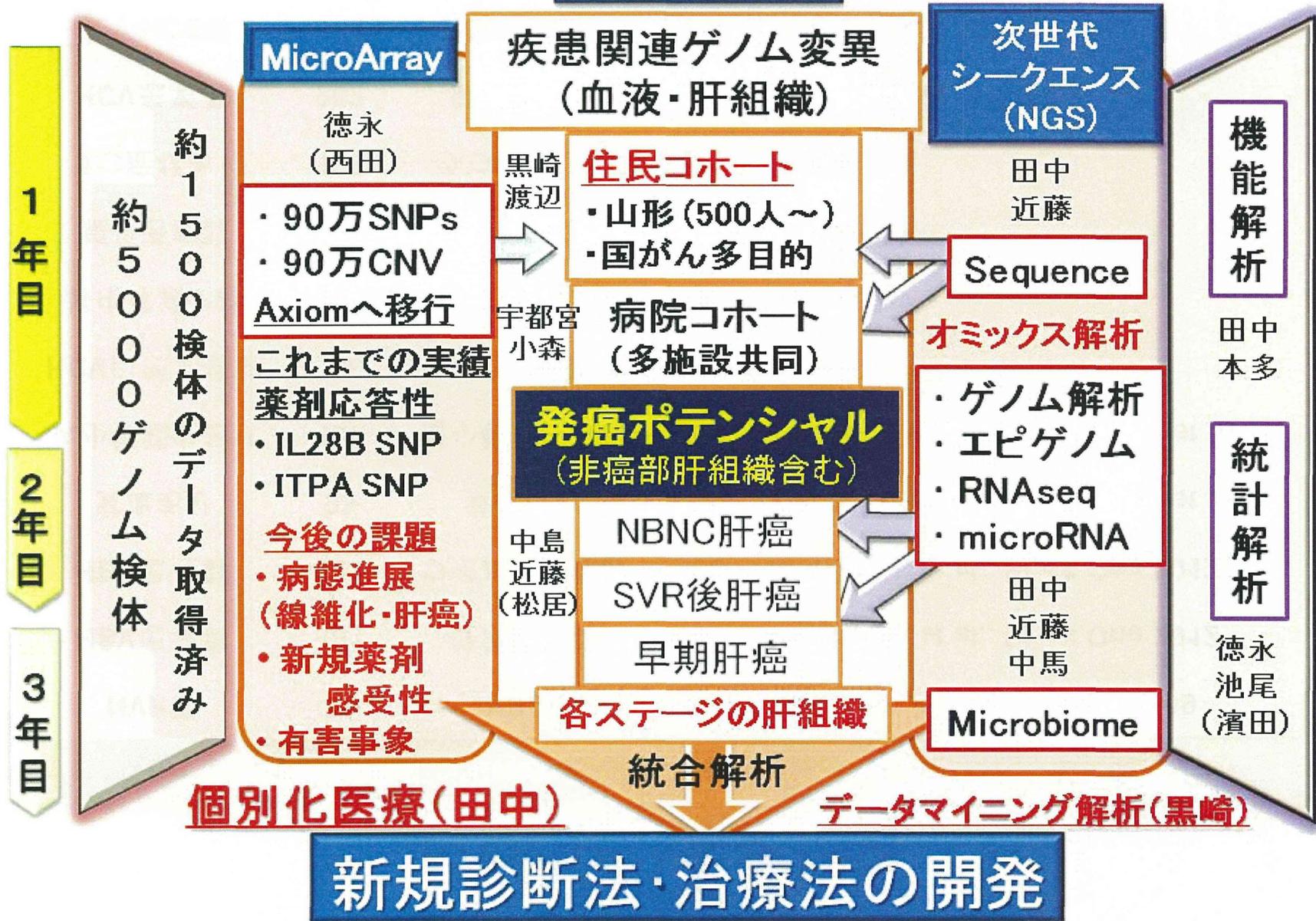
シリーズ検体

- ・背景肝組織(肝生検)
- ・血清, PBMC(ゲノムDNA)
- ・癌部 vs. 非癌部(手術)
- ・HCV vs. NASH

- ・SNP-based GWAS
- ・CNV-based GWAS
- ・次世代シーケンス(NGS)によるSequencing-based GWAS
→ゲノム、エピゲノム、miRNA

- ・データ処理(スパコンDEGIMA)
- ・統計解析(東大、遺伝研)
- ・パスウェイ(相互作用)解析
- ・データベース化

GWAS



GWASの進捗状況

Case	#Case	Control	#Control	研究経過・論文報告
NVR群	78	VR群	64	Tanaka Y, et al. Nat Genet 2009
HBV患者群	181	健常対照群	184	Nishida N, et al., PLoS One 2012
HBV患者群	181	ウイルス排除群	185	Nishida N, et al., PLoS One 2012
貧血あり	93	貧血なし	194	Tanaka Y, et al. Hum Mol Genet 2011
血小板減少あり	107	血小板減少なし	196	Tanaka Y, et al. Hum Mol Genet 2011
HCV自然治癒群	106	HCV-CH群	197	論文準備中
好中球減少群	114	減少なし	302	論文準備中
扁平苔癬群	99	扁平苔癬なし	155	解析継続中
うつ症状あり	199	うつ症状なし	431	解析継続中
HCV患者群	262	健常対照群	184	有望なSNP検出せず
HCV-HCC群	133	HCV-ASC群	200	有望なSNP検出せず
HBV-HCC群	71	HCV-HCC群	75	徳永班で継続



1. ゲノムDNA (5000検体以上)
2. 付帯情報
3. GWASデータ (1000検体以上)

全国38施設(研究協力)
 国立がん研究センター・山形大
 名市大・武蔵野・金沢大・北大

1. **ゲノムワイド関連解析 (GWAS)**
 ・HCV自然治癒、好中球減少、うつ病、
 扁平苔癬、肝癌 → 機能解析

2. 遺伝子検査に基づく個別化医療の実現

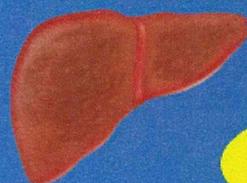
3. IL28Bマイナー解析、IFN-λ 機能解析

C型慢性肝炎

C型肝炎硬変

C型肝炎癌

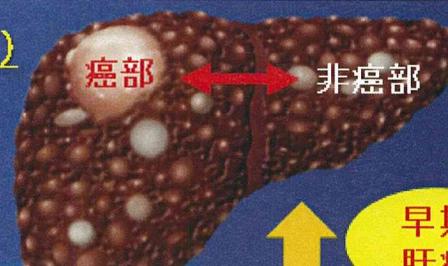
HCV感染期間あるいは年齢をマッチさせて解析(コホート研究)



住民
コホート



発癌ポテンシャル



癌部

非癌部

早期
肝癌

Microbiome

肝組織(癌部、非癌部) 200ペア、血清・PBMC

非B非C型肝炎癌

徳島大・九大・長崎医セ・名市大・東北大

5. **パイプラインの充実:**
 次世代型シーケンサー
 を代表とする大規模配列
 データの解析に必要な
 解析フローの整備

4. **オミックス解析**
 網羅的メチル化解析
 網羅的microRNA
 (アレイ、次世代シーケンス)
 Microbiome解析

各ステージ
の肝組織



癌部

HCV除去後
の発癌増悪
因子の解明

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 25 年度）

C 型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の手
法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：徳永 勝士 東京大学大学院 医学系研究科 教授

研究協力者：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：ゲノムワイド関連解析による C 型肝炎の宿主遺伝要因の探索

研究要旨：国内の研究協力施設において採血した C 型肝炎患者（肝癌、慢性肝炎）のゲノム DNA を収集し、患者情報を紐付けて管理する体制を整えた。今年度は HCV 患者群を新たに 424 検体収集し、これまでに収集済みの 2,973 検体と合わせて合計 3,397 検体を対象としたゲノム解析が可能となった。今年度は、(1) C 型肝炎自然治癒症例、(2) C 型肝炎患者に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法による副作用の一つである好中球量減少症例、(3) C 型肝炎ウイルス由来扁平苔癬発症症例、(4) C 型肝炎患者に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法による副作用の一つであるうつ病発症症例、を対象としたゲノムワイド関連解析を実施した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象としたゲノムワイド関連分析を行うことにより、宿主側の肝病態進展に寄与する遺伝因子、治療効果に寄与する遺伝因子、ウイルス感染感受性に寄与する遺伝因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

以下の手順でサンプルの準備からゲノム解析まで実施する。

- a. 各研究参加施設で採血したサンプルは、各施設において連結可能匿名化された後、各施設において、又は SRL に送られてゲノム DNA を抽出する。抽出されたゲノム DNA は、研究協力施設である国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センターへ送られ、同センター内に一括保管される。
- b. 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、国立国際医療研究センター肝炎・免疫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。患者データベースへの登録時に、患者情報に新たな ID を付与する。

- c. 二重匿名化されたゲノム DNA と患者情報を、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野へ搬送し、同施設でゲノムワイド解析（GWAS）を実施する。GWAS には、アジア系集団での解析に適した約 60 万か所の SNP を搭載した AXIOM Genome-Wide Array Plates (Affymetrix) を用いる。
- d. 日本人比較対象群には、既に東京大学にて AXIOM でのタイピングデータ取得済みである約 800 検体の健常者群（すべて連結不可能匿名化されている）を使用する。
- e. GWAS で使用しなかった検体については、Replication study に使用する。GWAS から

Replication study までの流れを図 1 にまとめる。

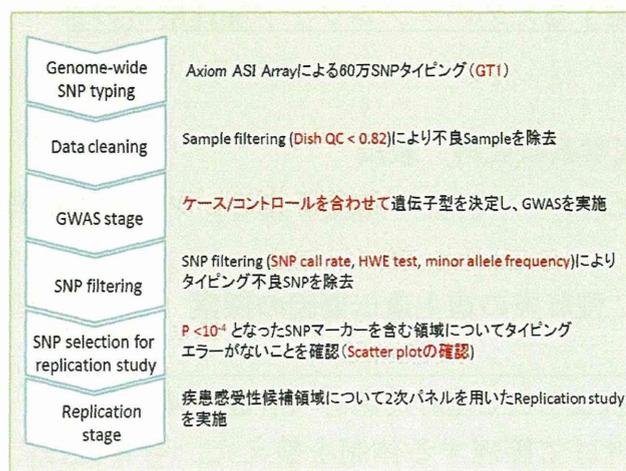


図 1 GWAS の実施手順

C. 研究結果

本年度の研究結果を以下にまとめる。

1. 研究課題名「C 型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の手法を用いた宿主因子の解析に関する研究」に関して、東京大学医学系研究科・医学部倫理委員会から研究実施の承認を得た（平成 25 年 10 月 31 日承認）。
2. 国内の研究協力施設において採血した C 型肝炎患者（肝癌、慢性肝炎）のゲノム DNA を SRL 経由で収集し、管理するためのシステムを構築した。また、各研究協力施設が収集する臨床情報を、保管しているサンプル情報と紐付けて管理するためのサーバーを構築した。平成 25 年度は、研究協力 6 施設が HCV 患者群を合計 424 例収集した。また、臨床情報の収集に向けて、統一のフォーマットを準備中である。
3. 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。
4. C 型肝炎自然治癒群 106 例と C 型肝炎慢性患者群 197 例を用いたゲノムワイド関連解析

を実施し、*IL28B* 遺伝子近傍に存在する SNP (rs8099917) がゲノムワイド有意水準を満たす関連を示すことを明らかとした。現在、投稿論文を準備している。

5. 欧米人において C 型肝炎自然治癒に関連すると報告された *HLA-DQ* 遺伝子近傍の SNP の関連が、日本人でも再現されることを確認した（C 型自然治癒群 252 例と慢性肝炎患者群 487 例との比較）。現在、投稿論文を準備している。
6. 日本人 C 型肝炎自然治癒群 252 例および慢性肝炎患者群 487 例を対象として、*HLA-DQ* タイピングを実施し、自然治癒に対して進行性の関連を示す *HLA-DQ* アリルを 2 つと、抵抗性の関連を示す *HLA-DQ* アリルを 1 つ同定した。現在、投稿論文を準備している。
7. C 型肝炎ウイルス関連の肝発癌患者と慢性肝炎患者の比較をしたところ、肝発癌に対して抵抗性の関連を示す *HLA-DQ* アリルを 1 つ同定した。現在、投稿論文を準備している。
8. C 型肝炎患者に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法による副作用の一つである好中球量減少に関連する遺伝子を同定した。現在、投稿論文を準備している。
9. C 型肝炎ウイルス由来扁平苔癬を対象とした GWAS を実施し、有望な候補遺伝子領域を検出した。
10. C 型肝炎患者に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法による副作用の一つである、うつ病の発症に関連する関連遺伝子を同定した。

D. 考察

C 型肝炎患者（肝癌、慢性肝炎）のゲノム DNA および臨床情報を収集し、管理する体制が整った。今年度、新たに 424 検体のゲノム DNA を収集し、平成 24 年度までに収集した 2,973 検体のゲノム DNA と合わせて合計 3,397 検体のゲノム DNA を

用いたゲノム解析を実施することが可能となった。

E. 結論

C型肝炎ウイルスを背景とする肝発癌の発症機序を明らかにするためには、C型肝炎患者の詳細な患者情報を網羅的に解析する必要がある。本研究では、ゲノムDNAおよび患者情報に加えて、様々なゲノム解析結果まで紐付けて管理することが可能となっている。網羅的なゲノム解析を実施することで、HCV感染に対する自然経過、新規薬剤に対する応答性、病態進展（特に発癌）に関わる遺伝要因の同定を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishida N, **Tokunaga K**, Mizokami M, Genome-Wide Association Study Reveals Host Genetic Factors for Liver Diseases. Journal of Clinical and Translational Hepatology 1:45-50, 2013
- (2) 西田奈央、**徳永勝士**、溝上雅史、高密度マイクロアレイによるゲノムワイド関連解析（GWAS）の実際、肝胆膵67(1)：7-14, 2013

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) **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.

- (3) **徳永勝士**、溝上雅史：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.
- (4) 西田奈央、**徳永勝士**、溝上雅史、IL28B遺伝子によるC型肝炎の治療効果予測と、第二の関連遺伝子の探索、第17回日本肝臓学会大会、品川、2013
- (5) 西田奈央、田中靖人、杉山真也、馬渡頼子、石井真由美、**徳永勝士**、溝上雅史、C型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索、第49回日本肝臓学会総会、新宿、2013
- (6) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Chieko Haga, **Katsushi Tokunaga**, Masashi Mizokami, Understanding of IL28B gene associated with treatment response for HCV patients, 61th Annual ASHG Meeting, Boston, 2013

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の手法を用いた宿主因子の解析に関する研究班

研究分担者：渡辺 久剛 山形大学医学部消化器内科学 講師

分担研究課題：住民/患者コホートにおける病態進展に関わる遺伝因子の探索

研究要旨：感染時期が明確である HCV 感染住民コホートにおいて、HCV RNA 陽性約 500 名の検体採取と臨床情報の追加収集を行った。対象住民コホートは HCV 感染暴露後 40 年以上経過している集団であるが、無治療自然経過観察例からの肝発癌例は 2012 年度までの調査では計 78 名であった。一方、病院コホートで経過追跡可能な肝発がん例は 120 名であった。軽度肝線維化を示唆する FIB-4 index 1.45 未満例と、高度肝線維化を示唆する FIB-4 index 3.25 超の両群において臨床像を比較すると、初診時 FIB-4 index により、その自然経過に違いが見られる傾向にあり、次年度に向け、他の宿主遺伝要因等も含めた更なる解析が必要であると考えられた。

A. 研究目的

病態の進展や肝発癌に関わる宿主要因については近年報告が散見されるが、住民コホートを基にした遺伝要因の解析結果についてはほとんど明らかにされていない。HCV 感染者の病態進展に関わる遺伝因子の解析には感染期間が重要であり、感染時期がほぼ特定されているコホート集団の中で、病態進展群の特徴を比較する必要がある。

分担研究者らは、1991 年より 20 年にわたって続けられている C 型肝炎高浸淫地域の住民コホートにおいて、HCV 感染の疫学や HCV 自然治癒に関わる宿主因子の解析を行い (*J Epidemiol* 1996, *Liver* 1999, *Tohoku J Exp Med* 1999, *J Med Virol* 2003, *Biochem Biophys Res Commun* 2004)、本コホートにおいて IL-28B 遺伝子多型がウイルス排除に最も寄与する因子であることを明らかにした (JDDW2011、AASLD2011)。本コホートは

1967~1973 年にかけて肝炎が多発した地域であり、住民の出入りも少ない特徴を持つ。

そこで感染時期がほぼ特定されている住民コホートにおいて、HCV 感染による病態進展に関わる遺伝的要因を GWAS あるいは次世代シーケンサーにより探索し、診断に有用な新規のマーカーを見出すことを分担研究の目的とした。今年度は、住民ベースの HCV 感染による肝線維化進展について検討した。

B. 研究方法

1991 年より現在まで山形県南に位置する自治体（人口 15,364 人）と連携して、C 型肝炎高浸淫地域において、HCV RNA 陽性者をコホート追跡し、HCV 感染の疫学や HCV 自然経過に関わる因子の解析を行った。

まず 1991-1995 年まで地域全体（6 歳以上：4,655 人、30 歳以上：10,709 人）の HCV 感染調