

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）

統括研究報告書（平成 25 年度）

B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除に関連する遺伝要因について、HLA アリル
および免疫関連遺伝子群を網羅的に探索する研究

研究代表者：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
研究協力者：提嶋 恵美、馬場 菜津美、白橋 理恵子、中山 歩美、

研究要旨：本研究では、B 型肝炎の慢性化・病態進展に關与する遺伝要因を免疫関連遺伝子を中心として網羅的に探索すると共に、既知の遺伝要因である *HLA-DP* の詳細な検討を実施する事を目的とする。平成 25 年度は、22 か所の研究協力施設により収集された日本人検体約 1,300 検体に対して、*HLA-DPA1* および *HLA-DPB1* の HLA タイピングを実施した。また比較の為、韓国集団、香港集団、タイ集団合計約 1,800 検体についても HLA タイピングを実施した。

日本人集団の HBV 患者群と健常者群の *HLA-DPB1* アリルで関連解析を行ったところ、先行研究と同様の 2 つのアリルでの関連が見られた。またそれ以外にこれまでに報告されていない 2 つの抵抗性アリルと 1 つの感受性アリルで新たに関連が示された。韓国集団では日本集団と共通の 2 つのアリルが感受性・抵抗性に関連する事が示され、香港集団では共通のアリル 1 つが抵抗性に関連する事が示された。タイ集団では、日本集団とは異なるアリルの関連が示された。更に、B 型慢性肝炎患者群および無症候性キャリア群と肝硬変および肝癌患者群を用いた関連解析の結果、*HLA-DPB1*02:01* が慢性化のみならず病態進展にも関連するアリルとして同定された。アジアにおいて、慢性化および病態進展に関連するアリルの共通性と異質性を調べる事で、病態における *HLA-DP* の機能の理解に繋がると共に、日本およびアジアにおける治療方針決定に役立つ事が期待される。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染後の経過は多岐に渡り、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。近年、宿主遺伝要因についても候補遺伝子アプローチだけでなく位置的アプローチによる解析が進み、日本人を含むアジア人検体を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、HBV 持続感染やウイルス排除に *HLA-DPA1*, *-DPB1* の関連が示され、*HLA-DQ* の関与も示唆された。しかし GWAS ではそれ以外の強い遺伝要因は見つかっていない。

本研究では、B 型肝炎の慢性化・病態進展に關与する遺伝要因を免疫関連遺伝子を中心として網羅的に探索すると共に、既知

の遺伝要因である *HLA-DP* の詳細な検討を実施する。

B. 研究方法

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用いた検体収集・臨床情報の蓄積を行った。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た。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、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た。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 ID が付加された。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た。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、代表者である澤井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、本研究で使用した検体は徳永勝士を代表とする「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」において収集されたものであり、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

GWAS により HBV 持続感染およびウイルス排除に関連が示された *HLA-DP* 遺伝子の詳細な検討を目的とし、22 か所の研究協力施設により収集された日本人 HBV 患者群 489 検体、HBV 既往感染者群 335 検体、健常者群 467 検体 (計 1,291 検体) に対して、*HLA-DPA1* および *HLA-DPB1* の HLA タイピングを実施した。また、日本人での解析結果と比較する為、韓国集団計 586 検体 (HBV 患者群 340 検体、HBV 既往感染者群 106 検体、健常者群 140 検体)、香港集団計 661 検体 (HBV 患者群 281 検体、HBV 既往感染者群 190 検体、健常者群 190 検体) およびタイ集団計 629 検体 (HBV 患者群 390 検体、HBV 既往

感染者群 113 検体、健常者群 126 検体) についても HLA タイピングを実施した(表 1)。

日本人集団の HBV 患者群と健常者群の *HLA-DPB1* アリルで関連解析を行ったところ *HLA-DBP1*05:01* (感受性アリル)、*HLA-DPB1*04:02* (感受性アリル) で有意な関連が見られ、先行研究と同様の結果が得られた。また、それ以外にこれまでに報告されていない 2 つの抵抗性アリル (*HLA-DPB1*02:01*, OR = 0.71, P = 2.1x10⁻³; *HLA-DPB1*04:01*, OR = 0.34, P = 2.4x10⁻⁵) と 1 つの感受性アリル (*HLA-DPB1*09:01*, OR = 1.94, P = 3.7x10⁻⁶) で新たに関連が示された。*HLA-DPA1* アリルと *HLA-DPB1* アリルの組み合わせ (ハプロタイプ) についても関連解析を実施したが、特定のハプロタイプで関連が相加的に強まる傾向は見られず、*HLA-DPB1* の特定のアリルが HBV 持続感染に対する感受性および抵抗性に重要であることが示唆された。韓国集団、香港集団、タイ集団においても同様の解析を実施し、韓国集団では日本集団と共通のアリル (*HLA-DPB1*05:01*, *-DPB1*04:02*) が感受性・抵抗性に関連する事が示され、香港集団では共通のアリル (*HLA-DPB1*02:01*) が抵抗性に関連する事が示された。タイ集団では、日本集団とは異なるアリルの関連が示された。また、B 型慢性肝炎患者群および無症候性キャリア群計 261 検体と肝硬変および肝癌患者群計 207 検体を用いた関連解析の結果、*HLA-DPB1*02:01* が慢性化のみならず病態進展にも関連するアリルとして同定された。

約 60 万 SNP を搭載する免疫関連遺伝子群を含む Affymetrix 社のカスタムアレイのデザインを行った。このアレイは選択した免疫関連遺伝子の上流領域および下流領域をそれぞれ 50kb ずつカバーしている。このアレイを用いた SNP タイピングは来年度以降に予定している。

D. 考察

HBV 持続感染に関連する *HLA-DPB1* アリルが集団によって異なる要因としては、各国

表 1 HLA タイピングを実施したサンプル一覧

population	Japanese	Korean	Hongkongese	Thai
total number of	1,291	586	661	629
HBV patients	489	340	281	390
age ave.	57.1	44.7	57.9	52.0
(min-max)	(20-84)	(18-74)	(32-86)	(21-84)
gender (M/F/ND)	337/149/3	265/75/0	239/42/0	289/101/0
Resolved	335	106	190	113
age ave.	59.7	43.1	40.0	48.2
(min-max)	(18-87)	(12-66)	(18-60)	(39-66)
gender (M/F/ND)	173/162/0	61/45/0	113/77/0	83/30/0
Healthy controls	467	140	190	126
age ave.	39.0**	33.7	26.2	46.6
(min-max)	(23-64)	(1-59)	(16-60)	(38-79)
gender (M/F/ND)	370/97/0	67/73/0	87/103/0	73/53/0

における一般集団での HLA-DPB1 アリル頻度が大きく異なる事によると考えられる。一般集団におけるアリルの分布を更に詳しく調べると共に、更に検体数を増やした解析を実施する事で、HLA-DP アリルと病態の関わりをより詳しく調べる事が出来る。また、各国で感受性アリル・抵抗性アリルと同定された HLA-DP 分子の共通性を探る事で、病態における HLA-DP の機能を知る手掛かりとなる事が期待される。

E. 結論

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。アジアにおいて、慢性化および病態進展に關連するアリルの共通性と異質性を調べる事で、病態における HLA-DP の機能の理解に繋がると共に、日本およびアジアにおける治療方針決定に役立つ事が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. (* equal contribution). 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) 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.

2) 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

3) 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關わる 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

4) 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) 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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

