

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書（平成 25 年度）

肝疾患患者における肝がん発症に寄与する宿主遺伝要因の同定・
遺伝子機能解析を目指す研究

研究代表者：西田 奈央 国立国際医療研究センター 上級研究員

研究要旨：肝発癌に関わる宿主側遺伝要因として、アジア人集団において *HLA-DPBI*02:01* が肝発癌に対して抵抗性の関連を示すことを明らかにした。また、2型糖尿病患者群の中で、肝癌を発症する群と発症しない群と比較することで、2型糖尿病を背景とする肝発癌の関連遺伝子探索を実施した。日本人における2型糖尿病の関連遺伝子として論文報告された遺伝子上の32か所のSNPを対象として2群間（肝癌あり：72例、肝癌なし：122例）での関連解析を実施したところ、1か所のSNPで有意な関連を示した。

HLA-DP分子に認識されるHBs抗原ペプチドを明らかにする（ウイルス因子）ことで、B型肝炎慢性化や肝発癌の機序の解明を目指すと共に、2型糖尿病を背景とする肝発癌の宿主側関連遺伝子の同定を目指して、さらに症例数を増やした解析を実施する予定である。

A. 研究目的

日本は先進国中で肝がんが最も多い国であり、近年では肝炎ウイルスが原因の肝がん発症だけでなく、HBV、HCV 以外を背景とする肝がん患者が増加している。また、欧米だけでなく日本においても肥満と糖尿病の増加が社会的な問題の一つとなっており、肥満や糖尿病から肝臓がんが誘発されることが裏付けられていることから、糖尿病と肝がんの関わりを明らかにすることを本研究の目的とする。

本研究は2つの最終目標達成を目指す。1つは、「B型肝炎およびC型肝炎由来肝がんの関連遺伝子の同定およびその遺伝子機能の解明」とし、もう1つは「各種肝疾患における2型糖尿病発症の関連遺伝子の同定とその遺伝子機能の解明」とする。

B. 研究方法

研究全体の計画として、肝がん関連遺伝子および肝疾患患者における2型糖尿病発症関連遺伝子の同定を目指して、ゲノムワイド SNP 解析や NGS を用いたゲノム解析

を実施する。NGS を用いたゲノム解析では、100 検体程度の肝がん患者を対象として全 RNA 解析や全ゲノム解析を実施し、癌化に関連する融合遺伝子やゲノム変異、ゲノム構造異常などを探索する（平成 25-26 年度）。また、肝がん患者群を対象とした GWAS では多くの検体を必要とするため、FFPE サンプルが使用できる状態になった後でゲノムワイド SNP 解析を実施する（平成 26-27 年度、目標症例数：1,000 検体）。また、各種肝炎患者群の中で2型糖尿病を発症した群、発症しなかった群、肝疾患を有さない2型糖尿病患者群の3群に分けたGWASを実施することで、2型糖尿病発症の関連遺伝子の同定を目指す。2型糖尿病発症の関連遺伝子周辺における SNP 変異情報や全 RNA 解析結果、全ゲノム解析結果などのゲノム解析データと各検体の詳細な臨床背景を加えて統合的に解析することで、その遺伝子機能の解明を目指す（平成 27 年度）。

（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はらう。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

(1) アジア人 4 集団（日本人、韓国人、香港人、タイ人）の B 型肝炎患者群、ウイルス排除群、健常対照群の合計 3,167 例を対象として、*HLA-DP* タイピングを実施した。その結果、*HLA-DPBI*02:01* が肝発癌に抵抗性の関連を示すことを明らかにした（論文発表(1)参照）

(2) 2 型糖尿病関連遺伝子を文献から検索し、71 遺伝子領域の全 92 か所の SNP を選択した。それら 92 か所の SNP を対象として、DigiTag2 法による（Nishida et al. PLoS One, 2012）SNP タイピングセットを構築した。

(3) 92 SNP のうち、32 SNP を対象とした予備的な検証を日本人糖尿病患者 194 例（肝発癌あり：72 例、肝発癌なし：122 例）で実施し、有意水準を満たす SNP を 1 か所同定した。

D. 考察

B 型肝炎慢性化にすることが明らか（Nishida et al. PLoS One, 2012）となっていた *HLA-DPBI* 遺伝子が肝発癌にも関連することを世界に先駆けて発見し、報告した。また、2 型糖尿病関連遺伝子として報告されている遺伝子の中に、肝発癌との関連を

示す遺伝子を一か所同定することができた。しかしながら、2 型糖尿病患者における肝発癌発症については、193 症例という小規模な解析であるため、今後さらに症例数を増やした解析が必要と考えられる。

E. 結論

肝発癌に関連するホスト側遺伝要因として、*HLA-DP* と共に、2 型糖尿病関連遺伝子が同定された。今後さらに症例数を増やした解析を実施し、予備的な解析で同定された 2 型糖尿病関連遺伝子の関連が再現されるか確認するとともに、新たな肝発癌関連遺伝子の同定を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) **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 9(2): e86449, 2014

2. 学会発表

(1) **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 Medicine Siriraj Hospital, Bangkok, 2013.6.24-28

(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、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

(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、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

H. 知的所得権の出願・登録状況

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

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について

・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。

2. 「B. 研究方法」について

(1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。

(2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。

3. 「C. 研究結果」について

・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。

4. 「F. 健康危険情報」について

・研究分担者や研究協力者の把握した情報・意見等についても研究代表者がとりまとめて総括研究報告書に記入すること。

5. その他

(1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。

(2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。