

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

ウイルス性慢性肝疾患の病態に影響を与えるmiRNA多型の網羅的探索に関する研究

研究代表者 **三木 大樹** 独立行政法人理化学研究所 研究員

研究要旨：肝疾患の診療現場では、宿主のゲノム情報を活用した個別化医療が現実のものとなりつつあるが、依然として宿主の遺伝的要因が全て解明された訳ではないし、医療の個別化も満足いくものではない。最近、機能を持ったノン・コーディングRNAの存在が明らかになってきたが、中でもmiRNAは肝疾患を含む多くの疾患で新規バイオマーカーとして期待され、これを核酸医薬の標的としたC型慢性肝炎治療薬の臨床試験が進行中である。これまでのGWASやマイクロアレイの情報、複数の統合データベースを利用して包括的に解析することで、GWASでは明らかにできなかったウイルス性慢性肝疾患の病態へ影響を与えるmiRNA多型の同定を目指して研究を行っている。肝炎患者の表現型（量的・質的形質）に関するGWASデータを利用し、各解析で得られたシグナルの近傍に位置するmiRNA多型を網羅的に囲い込むと同時に、マイクロアレイや統合データベースから得られる発現量や組織特異性などの多面的な情報を利用して、解析候補となるmiRNA多型を抽出した。また、免疫関連遺伝子に注目し、それらを標的とするmiRNAを抽出し、多型解析候補とした。こうして抽出された100以上の候補SNPにつき、5,000人規模でのgenotypingを行い、表現型との関連について統計学的検証を行ったところ、既報のものも含め、いくつかの関連が確認できており、追認試験の準備を進めている。今後、追認試験を行った上で、多型と表現型との関連について再現性が確認できたものについては、順次、機能的な解析へと進める予定である。同時に、バイオマーカーとしての役割が期待できる多型に関しては、臨床的な有用性を評価して、臨床応用の可否を検討する。新規バイオマーカー開発や創薬に結びつく、あるいは個別化医療への貢献など、何らかの形で臨床応用に資する結果を目指して、本研究計画を進めて行く。

< 研究協力者 >

豊田成司

JA北海道厚生連 札幌厚生病院 院長

狩野吉康

JA北海道厚生連 札幌厚生病院 副院長

芥田憲夫

国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 医長

越智秀典

広島大学大学院 消化器・代謝内科学 講師

ヘイズ・ネルソン

広島大学大学院 消化器・代謝内科学 特任准教授

A . 研究目的

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、C 型慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療の効果を強く規定する *IL28B* 遺伝子多型が発見され、ガイドラインにも盛り込まれるなど、すでに臨床応用がなされている。他にも、GWAS は B 型慢性肝炎・C 型慢性肝炎の易罹患性、肝硬変・肝癌への進展などに関連する遺伝子多型あるいは一塩基多型 (SNP) を明らかにしてきた。しかし、GWAS ではカバーしきれないゲノム領域の存在や、統計学的検出力の不足などの問題が依然として残っている。一方で、機能を有するノン・コーディング RNA、中でも 21 ~ 25 塩基ほどの miRNA が肝疾患を含む多くの疾患で新規バイオマーカーとして期待され、これを核酸医薬の標的とした C 型慢性肝炎治療薬の臨床試験が進行中であるなど、注目が集まっている。わが国における肝炎対策が急務であるとい

う点では、臨床応用に比較的近い位置にあると考えられる miRNA を研究対象にすることは期待度が高いと思われる。また、医療の個別化を意識する点では、SNP 解析という実績のある手法を用いることは妥当であると思われる。発展目覚ましい種々の大規模データベースを活用することで、効率的に、これまでの GWAS では明らかにできなかったウイルス慢性肝疾患の病態・種々の表現型に関連する miRNA の多型の同定を目指す。

B . 研究方法

これまでの GWAS の成果を活かしながら、急速に増加・充実している種々のデータベースの情報 (miRNA 配列、人種別 SNP 頻度、遺伝子発現量、組織特異性、Gene Ontology、パスウェイ、等) を積極的に統合し、活用することで、GWAS では明らかにし得なかった miRNA 多型を効率的に拾い上げる。

1. 網羅的アプローチ : GWAS データあるいは公開されたデータベースを利用し、解析対象 SNP を網羅的に絞り込む。

2. 候補アプローチ : ウイルス性肝疾患の病態に重要であると考えられている免疫システムや炎症、線維化、癌関連の遺伝子を標的とし得る miRNA の近傍の SNP については、優先的に解析候補として扱う。

上記、1. および 2. によって SNP を抽出した。順次、スクリーニング用のサンプルを用いて PCR-based SNP genotyping (Invader assay) を行い、統計学的検定を行っている。

サンプルと付随する臨床情報は虎の門病院、札幌厚生病院、広島大学病院とその関連病院といった研究協力施設で収集されており、解析対象とする種々の表現型については、各研究協力者からのアドバイスを受けながら選別を行った。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて、インフォームド・コンセントが得られた検体を用いて実施した。所属研究機関の倫理委員会の承認を得て実施した。

C．研究結果

まず、我々が行った日本人ウイルス性慢性肝疾患の GWAS データから、種々の病態との関連が示唆される遺伝子座位の近傍に位置する miRNA のうち、pri-miRNA あるいは pre-miRNA あるいは mature miRNA 上に SNP を有するものをデータベースから検索した。このうち、アジア人におけるマイナーアレル頻度が 1%以上の SNP を対象とした。また、miRNA 発現の組織特異性など、公開された複数の統合データベースから得られる情報も含めて、多面的な評価を行った上で優先順位を付け、解析候補となる miRNA 多型を抽出した。

網羅的アプローチと並行して、すでに他国から報告のあった肝疾患関連 miRNA 多型や、免疫システムなどの有望な候補遺伝子あるいはパスウェイを制御し得ることが seed 配列との相補性等から予測される miRNA 多型を、解析候補として抽出した。肝疾患の病態形成に重要と考えられるその他の遺伝子を標的とし得る miRNA についても現在、検討中である。

このようにして、これまでに約 200 個の SNP を解析候補として抽出した。順次、それぞれの解析対象となる表現型に対応したスクリーニング用サンプル（最大で HBV および HCV 関連肝疾患患者各 2,000 人、健常人 1,000 人の規模）を用いて、SNP genotyping を行っている。すでに統計学的検定を行ったものの中で、発癌やウイルス量等との関連が示唆される miRNA 多型を複数認めた。これらについては、次年度に追認試験を行い、慎重に再現

性を確認していく。再現性が確認できたものについては、表現型に影響を与えるメカニズムを明らかにするための機能解析を予定する。

一方で、網羅的アプローチとしての候補 miRNA 多型の絞込みを行う際に利用するさまざまな表現型に関する GWAS データの解析において、本年度中にいくつかの新たな成果があった。C 型慢性肝炎から肝硬変への進展、C 型慢性肝炎の易罹患性について、HLA の多様性が重要であることを遺伝学的に示すことができた。

また、今後予定され得る miRNA の機能解析を行う上での、*in vitro* あるいは *in vivo* の実験系も段階的に構築を進めている。

D．考察

本研究計画初年度である本年度の研究は概ね当初の予定通り進捗した。現在は候補 miRNA 多型の選択とスクリーニングセットでの genotyping をほぼ終えた段階に過ぎず、次年度以降の追認試験の結果を踏まえて慎重に評価する必要があると考えられるものの、既報のものも含めて、表現型との関連が示唆されるものが複数認められている。

また、GWAS データの解析において得られた「HCV 感染の慢性化には HLA-DQB1*03 を規定する SNP が強く関連している」という知見と、「その HLA と、世界共通で HCV 持続感染に重要と考えられている *IFNL4* 多型とが相互作用している可能性がある」という知見を得たため、これについても、現在、解析中である。この経路における miRNA の持つ影響力についても、多型解析の視点から迫ってみたい。

ウイルス性肝疾患の多様な表現型について、網羅的に miRNA の多型との関連を検討するような、包括的・体系的な研究はこれまでに行われておらず、本研究から新しい、臨床に有用な成果を見出せる

可能性は十分にあると考えている。

E . 結論

GWASデータや公共のデータベースを活用して解析候補となるmiRNA関連のSNPを抽出し、実際に相当数のサンプルを用いてgenotypingを行った結果、ウイルス性慢性肝疾患の病態との関連が示唆されるSNPを複数同定することができたが、今後の追認試験の結果がさらに重要である。

GWAS解析の結果、C型慢性感染においてHLA-DQB1およびIFNL4の遺伝子多型が重要であること、およびそれらの相互作用を示唆する知見を得た。

ウイルス性肝疾患の様々な病態を明らかにするため、主にmiRNAや免疫系について、遺伝子多型解析を進めて行くこととした。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miki D, Ochi H, Takahashi A, Hayes CN, Urabe Y, Abe H, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Akuta N, Suzuki F, Ikeda K, Kumada H, Karino Y, Toyota J, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HLA-DQB1*03 confers susceptibility to chronic hepatitis C in Japanese: a genome-wide association study. *PLoS One*. 8(12):e84226, Dec, 2013.
- 2) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C,

- Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 441(1):230-5, Nov, 2013.
- 3) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol*. 48(10):1188-204, Oct, 2013.
 - 4) 茶山 一彰, 越智 秀典, 三木 大樹. 肝疾患の疾患関連遺伝子 GWAS を含めた最近の知見から. *日本消化器病学会雑誌* 110 巻 9 号 Page1577-1590 (2013.09)
 - 5) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A translational study of resistance emergence using sequential direct-acting antiviral agents for hepatitis C using ultra-deep sequencing. *Am J Gastroenterol*. 108(9):1464-72, Sep, 2013.
 - 6) Lange CM, Miki D, Ochi H, Nischalke HD, Bojunga J, Bibert S, Morikawa K, Gouttenoire J, Cerny A, Dufour JF, Gorgievski-Hrisoho M, Heim MH, Malinverni R, Müllhaupt B, Negro F, Semela D, Kutalik Z, Müller T, Spengler U, Berg T, Chayama K, Moradpour D, Bochud PY; Hiroshima Liver Study Group; Swiss Hepatitis C Cohort Study Group. Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development. *PLoS One*. 8(5):e64053, May,

2013.

7) Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 85(5):789-98, May, 2013.

8) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. *J Hepatol*. 58(5):875-82, May, 2013.

9) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One*. 8(4):e61279, Apr, 2013.

10) Nakano Y, Chayama K, Ochi H, Toshishige M, Hayashida Y, Miki D, Hayes CN, Suzuki H, Tokuyama T, Oda N, Suenari K, Uchimura-Makita Y, Kajihara K, Sairaku A, Motoda C, Fujiwara M, Watanabe Y, Yoshida Y, Ohkubo K, Watanabe I, Nogami A, Hasegawa K, Watanabe H, Endo N, Aiba T, Shimizu W, Ohno S, Horie M, Arihiro K, Tashiro S, Makita N, Kihara Y. A

nonsynonymous polymorphism in semaphorin 3A as a risk factor for human unexplained cardiac arrest with documented ventricular fibrillation. *PLoS Genet*. 9(4):e1003364, Apr, 2013.

2. 学会発表

1) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Akuta N, Suzuki F, Ikeda K, Kumada H, Karino Y, Toyota J, Chayama K. HLA-DQ confers susceptibility to chronic hepatitis C in Japanese: a genome-wide association study. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/5

2) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Hiraga N, Abe H, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. Integrative analysis of early and late changes in microRNA and gene expression profiles in human hepatocyte chimeric mice following infection with hepatitis B virus or hepatitis C virus. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/5

3) Karino Y, Nakajima T, Ozeki I, Hige S, Kimura M, Arakawa T, Kuwata Y, Sato T, Ohmura T, Toyota J, Ochi H, Miki D, Chayama K. Analysis of the usefulness of HCV core amino acid substitution, serum IP-10 level and IFNL4 genotype as the predictive factor of anti-HCV effect in triple therapy including protease inhibitor. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/5

4) Kawaoka T, Imamura M, Aikata H, Miki D,

Ochi H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. Relationship between survival rate at 10 years and virological response to IFN therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/4

5) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Hiraga N, Abe H, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. Early and late changes in gene expression profiles following infection with hepatitis B or C virus in human hepatocyte chimeric mice. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/4

6) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Miki D, Tsuge M, Ochi H, Chayama K. Expression levels of IFNL4 and other IFN-lambdas are determined by dinucleotide polymorphism of IFNL4 and correlate with basal expression levels of interferon stimulated genes and effect of interferon. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/4

7) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Ochi H, Hayes CN, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Monitoring serum HBV RNA is useful for predicting rebound of hepatitis after the discontinuation of nucleotide analogue therapy in chronic hepatitis B patients. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/3

8) Murakami E, Tsuge M, Hiraga N, Kawaoka T, Ono A, Miki D, Abe H, Imamura M, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Antiviral effect of

tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones and different susceptibility between HBV genotype A and C. *The Liver Meeting 2013*. Washington DC, USA. 2013/11/3

9) 三木大樹、越智秀典、茶山一彰．肝細胞癌における宿主および腫瘍のゲノムワイド解析．*JDDW2013*．東京．2013/10/9

10) 三木大樹、相方浩、卜部祐司、柘植雅貴、川上由育、中村祐輔、茶山一彰．DEPDC5 遺伝子座位は日本人の HBV 関連肝細胞癌および C 型慢性肝炎とは関連しない．*第 72 回日本癌学会学術総会*．東京．2013/10/5

11) 阿部弘美、ヘイズ・ネルソン、平賀伸彦、今村道雄、柘植雅貴、三木大樹、高橋祥一、越智秀典、茶山一彰．ヒト肝細胞キメラマウスと次世代シーケンサーを用いた新規抗ウイルス薬に対する HCV ゲノムの解析．*第 49 回日本肝臓学会総会*．東京．2013/6/7

12) 三木大樹、大石和佳、越智秀典、ヘイズ・ネルソン、阿部弘美、柘植雅貴、今村道雄、鎌谷直之、中村祐輔、茶山一彰．HCV Genotype 1・高ウイルス量症例に対するペグ IFN 2b・リバビリン併用療法の治療効果と血中アディポサイトカイン濃度についての検討．*第 50 回日本臨床分子医学会学術集会*．東京．2013/4/12

H．知的財産権の出願・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