

201423012A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
(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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 靖人

平成 27 (2015) 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線維化進展に関わる因子の検討	16
(山形大学医学部消化器内科学 渡辺 久剛)	
3. 遺伝子発現解析によるIFN-lambda シグナルの解析	19
(金沢大学医薬保健研究域保健学系 本多 政夫)	
4. 肝線維化進行と発がん関連因子の検討	23
(武蔵野赤十字病院 消化器科 黒崎 雅之)	
5. 非B非C肝癌の発癌および進展に関与するDNAメチル化異常の解析	26
(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 島田 光生)	
6. 検体及び付帯臨床情報の収集と解析	31
(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)	
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	34
(横浜市立大学附属病院・肝胆膵消化器病学教室 中島 淳)	
8. C型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	38
(東北大学病院 消化器内科 近藤 泰輝)	
9. 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53

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業)
総括研究報告書(平成26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) IL28B/ITPA SNPs及びNS5A変異を一括測定し、各施設に情報提供、個別化医療を実践。(3) **ゲノムワイド関連解析:**新たにAxiom ASIで取得したタイピングデータを用いて、① 住民コホートにおいて肝発癌を対象としたGWAS、② SVR後の肝発癌を対象としたGWASを実施し、疾患感受性候補SNPを絞り込み。③ HCV自然治癒及びIFN治療に伴う好中球減少に関連する遺伝要因を同定し、論文報告。④ IL28Bで特異的に誘導されるLECT2は自然免疫を活性化し、HCV複製を抑制した。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 非B非C型肝炎例に関してオミックス解析を実施した結果、癌部においてメチル化レベルの低下が顕著な領域として、miRNAコーディング領域があり、発癌への関与が示唆された。② 癌部で最も強い高メチル化を示したのはTBX15であり、肝癌組織での低発現群で有意に無再発生存率が不良。③ C型肝炎において低発現のmiRNAの中で、miR146b-5pは単球系細胞で低下。miR146-5p inhibitorを導入するとCXCL10とTGF-beta、IL10発現が有意に増加。④ 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。

研究分担者

徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科 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 講師
島田 光生	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 教授
中島 淳	横浜市立大学大学院医学研究科 主任教授
近藤 泰輝	東北大学病院 消化器内科 助教
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 難治性疾患研究部長
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

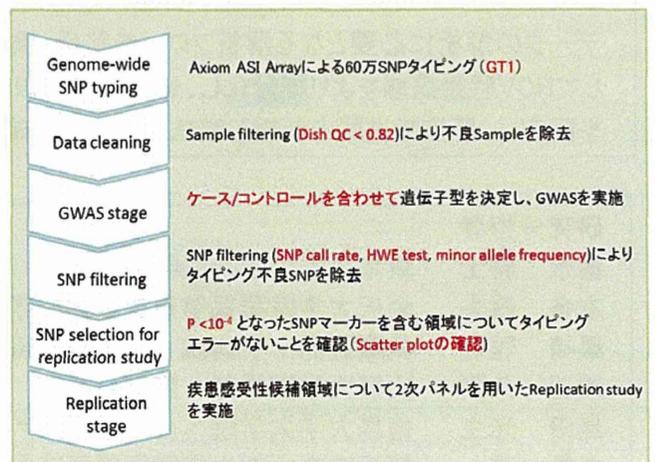
[背景と目的] 我々は、全国 38 施設から集めた 5,000 検体以上の肝疾患患者のゲノムをすでに保有しており、ゲノムワイド関連解析(GWAS)により、C 型肝炎(HCV)に対する標準的治療である PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果に関連する IL28B SNPs (Tanaka Y, Nat Genet.2009) 及び貧血/血小板減少に関連する ITPA SNP を同定し (Tanaka Y, Hum Mol Genet.2011)、個別化医療を実現した。現在、新規薬剤の登場により、HCV は完全排除可能な時代に突入したが、ウイルス排除(SVR)後の過栄養(肥満)や肝発癌の問題が表面化し、その対策が急務である。本研究班では、HCV 感染に対する新規薬剤に対する応答性、病態進展(特に SVR 後発癌)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(NGS)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、得られた情報を従来法および新規の相互作用解析、パスウェイ解析を行う。また、C 型肝炎の発癌母地としての非癌部肝組織に着目することで肝発癌関連の宿主要因を明らかにし、新規診断法・治療法の開発を目標とする。

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) : SVR 後発癌例やトルバプタン投与例のゲノム採血。発癌例は凍結組織及びパラフィン切片を収集。(2) 非 B 非 C 型肝炎例の凍結組織及びパラフィン切片を収集、オ

ミックス解析を実施。(3) IL28B / ITPA SNP や NS5A 変異を測定し、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 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): HCV 抗体陽性 1,078 名について、追跡

調査受診者の検体収集、超音波検査およびフィブrosisをスキャンを実施。また病院コホートでは新規糖鎖マーカーである M2BPGi を測定。b) **遺伝子発現解析による IFN-λシグナルの解析(本多)**: 初代ヒト肝細胞に IFN α 及び IL28B を添加し、Gene Chip にて遺伝子発現を解析。c) **肝線維化進行と発癌関連因子の検討(黒崎)**: C 型慢性肝炎で複数回肝生検を施行した 176 症例を対象として、肝疾患の病状との関連が報告されている候補 SNP をタイピングし、経時的な線維化進行、発癌との関連性を検証。

(3) **エピゲノム解析を含むオミックス解析**

(**島田**): 非 B 非 C 肝細胞癌 15 例と正常肝 8 例の非癌部肝組織を用いて DNA methylation microarray (Infinium Human Methylation 450 BeadChip, illumina)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 肝臓癌患者の手術検体、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、解析。アダプター配列を除去した後 miRBase ヘマッピングし発現量を計算した。(池尾): GWAS 解析の結果から宿主因子を絞り込むために遺伝子相互作用、パスウェイ解析や遺伝子発現データの統合的利用を行うための解析フローを開発するとともに他の分担者と協力してゲノムワイド NGS データの解析。

(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。すでに、「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」に関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)、修正版を申請し承認されている。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(**田中**)

(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)。SVR 後肝発癌患者 127 例および SVR 後非肝発癌患者 337 例のゲノム採血、発癌例に関しては切除切片(凍結、パラフィン)を収集し、解析を開始。(2) 肝硬変のない非 B 非 C 型肝炎例の凍結組織 24 ペアに関してオミックス解析を実施した結果、癌部においてメチル化レベルの低下が顕著な領域として、miRNA コーディング領域があり、クラスター化している領域ではその傾向が顕著。さらに、有意な miRNA 発現レベルを多数例(パラフィン切片)で検証中。(3) IL28B/ITPA SNP (1,059 例) 及び NS5A 変異 (1,231 例)を測定し、各施設に情報提供。(4) C 型肝炎患者に対する PEG-IFN/RBV 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として、PSMD3 遺伝子を同定した(Iio E.

et al, Hum Genet. 2015)。(5) IFN λ 機能解析継続 (in vitro, in vivo)。

・研究分担者

(1) ゲノムワイド関連解析 (GWAS) (徳永):① 平成 26 年度は、研究協力 29 施設から HCV 患者群を 551 例収集。昨年度と合わせて 975 例の付帯情報を収集。② C 型肝炎自然治癒に対して HLA-DQB1*03:03 と DQB1*04:01 を新たな疾患感受性アリルとして同定(投稿中)。③ HCV コホートにおける肝癌に関連する SNPs を同定し、Replication 解析中。④ SVR 後肝癌と非発癌例を対象に GWAS 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): M2BPGi による層別化を行うと、累積肝癌率に差を認めた。一方、初回受診時 M2BPGi 値が高いほど、コホート経過観察期間中の ALT 値持続正常化率は低く、HCV RNA の自然陰性化率も低かった。**(本多):** IL28B で特異的に誘導される遺伝子群を同定した。その中の分泌蛋白である LECT2 は自然免疫を活性化し、HCV 複製を抑制した。

(黒崎): PNPLA3 遺伝子多型は、肝線維化ステージ、経時的な線維化進行速度と有意に関連。PNPLA3 と年齢を組み合わせると、若年かつ PNPLA3 が CC と比較し、高齢かつ PNPLA3 が non-CC では線維化進行リスクが 4.5 倍であった。

(3) エピゲノム解析を含むオミックス解析

(島田): 肝癌組織で低メチル化を示すのは 3108 サイト、高メチル化は 31 サイトであり、明らかな Global hypomethylation を確認した。最も強い高メチル化を示したのは TBX15 であり、肝癌組織での低発現群で有意に無再発生存率が不良 ($p=0.01$)。

(小森):① SVR 後発癌例の癌部・非癌部凍結組織をオミックス解析用に提供。② NASH を対象とした 'N-of-1 personal omics 変動解析' を開始。

(中島): PNPLA3、SAMM50、PARVB の SNPs が NAFLD/NASH の進展に関与。PNPLA3 の調節領域にある CpG99 の高メチル化と PARVB variant 1 の上流にある CpG26 の低メチル化は NAFLD の疾患感受性に関与。**(近藤):** C 型肝炎特異的に発現変動がみられたものが 5 つあったが、その中で miR146b-5p は PBMC 内で強く発現。特に、CD14 陽性単球系細胞にて強く抑制されていたので、単球系細胞株である THP-1 細胞に miR146-5p の inhibitor を導入すると CXCL10 と TGF-beta、IL10 発現が有意に増加。**(池尾):**① GWAS 解析による有力候補 SNP に関して、その影響を推定するための統合解析。② 少量サンプルからの NGS による遺伝子発現解析と miRNA の発現変動解析のサポート。

D. 考察

今年度も IL28B/ITPA SNPs 及び NS5A 変異を一括測定し、各施設に情報提供、個別化医療を実践した。また、年齢、ALT に加えて PNPLA3、IL28B の Genotype を測定することで、線維化進行のリスクを把握でき、高リスク症例の囲い込みが可能となった。

GWAS 研究としては、約 2 年間で収集した 975 例の C 型肝炎患者のサンプルのうち、745 例においてコール率 95% 以上のゲノムワイド SNP タイピングデータを取得することができた。新たに取得したタイピングデータを用いて、1) 肝発癌を対象とした GWAS、2) SVR 後の肝発癌を対象とした GWAS を実施し、疾患感受性候補 SNP の絞り込み作業に進むことが可能となった。また、HCV

自然治癒及びIFN治療に伴う好中球減少に関連する遺伝要因を同定し、論文報告した。

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 解析を開始している。非 B 非 C 型肝癌例に関してオミックス解析を実施した結果、癌部においてメチル化レベルの低下が顕著な領域として、miRNA コーディング領域があり、発癌への関与が示唆された。また、C 型肝炎において低発現の miRNA の中で、miR146b-5p は、単球系細胞で強い低下がみられた。また、miR146b-5p の阻害と導入により炎症性サイトカインの発現が変化したことより病態に影響を与えている可能性が示された。

さらに、少量サンプルからの NGS による遺伝子発現と miRNA の発現変動を解析する方法を改良、検証が必要であるが、得られた解析結果には、有力な候補因子が含まれることが明らかになった。さらに、少量血液サンプルを用いた遺伝子発現解析に関しても、十分な精度の結果が得られることが確認されており、症例数をさらに増やして検討する。

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。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Zheng LS, Hitoshi S, Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, **Tanaka Y**, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K. Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem Cell Reports*. 2014;3(1):73-84.
2. Matsuura K, **Tanaka Y**, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsunashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. *J Viral Hepat*. 2014;21(7):466-474.
3. Matsuura K, Watanabe T, Iijima S, Murakami S,

- Fujiwara K, Orito E, Iio E, Endo M, Kusakabe A, Shinkai N, Miyaki T, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Serum interferon-gamma-inducible protein-10 concentrations and IL28B genotype associated with responses to pegylated interferon plus ribavirin with and without telaprevir for chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2014;44(12):1208-1216.
4. Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, **Tanaka Y**, Nishida N, Tokunaga K, Tsubouchi H. Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. *J Med Virol*. 2014;86(11):1877-1885.
5. Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, **Tanaka Y**, Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M. Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(12):1996-2005.
6. Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Influence of Genes Suppressing Interferon Effects in Peripheral Blood Mononuclear Cells during Triple Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118000.
7. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsuhashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, **Tanaka Y**. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet*. 2015 ;134(3):279-289.
8. 渡邊綱正, **田中靖人**. C型肝炎治療効果に影響するIL28B遺伝子多型と肝内自然免疫応答の解析. *NAGOYA MEDICAL JOURNAL*. 2014;54(1):45-50.
2. 学会発表
1. Zeuzem S, Jensen DM, Carvalho A, Diago M, Feinman SV, Kowdley KV, Kao JH, Maevskaya M, Negro F, Mantry P, **Tanaka Y**, Forton D, Genné D, Paik SW, Zehnter E, Kuboki M, Lee WM, Peng CY, Yatsuhashi H, Stern JO, Datsenko Y, Drulak M, Voss F, Böcher W, Ferenci P. No effect of faldaprevir on renal function in treatment-naïve patients with chronic HCV genotype-1 infection: Pooled data from two phase III trials. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr.9-13,2014. London.
2. Foster GR, Cooper C, Dieterich D, Ferenci P, Crespo J, Diago M, Dufour JF, Lee WM, Maevskaya M, Müllhaupt B, Wright D, Schuchmann M, Wright M, Bourlière M, Nishiguchi S, Abergel A, Streinu-Cercel A, **Tanaka Y**, Tomita E, Stern JO, Scherer J, Olson S, Gallivan JP, Jensen DM. Pharmacokinetic-response analysis of faldaprevir in treatment-naïve patients with chronic HCV genotype-1 infection: A pooled analysis of two

- phase III trials. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Apr.9-13,2014. London.
3. Iio E, Ocho M, Togayachi A, Shinkai N, Nojima M, Kuno A, Ikehara Y, Hasegawa I, Fujiwara K, Nojiri S, Joh T, Mizokami M, Narimatsu H, **Tanaka Y**. A novel glycobiomarker: Wisteria floribunda agglutinin Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor for predicting carcinogenesis and survival of liver cirrhosis patients. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.7-11,2014. Boston.
4. Iio E, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Shinkai N, Ikehara Y, Fujiwara K, Nojiri S, Joh T, Mizokami M, Narimatsu H, **Tanaka Y**. A novel glycobiomarker: Wisteria floribunda agglutinin⁺ - Mac-2 binding protein for predicting carcinogenesis and survival of liver cirrhosis patients. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Mar.12-15,2015. Istanbul.
5. Matsui T, Nojima M, Iio E, Tamori A, Kubo S, Shirabe K, Kimura K, Shimada M, Utsunomiya T, Kondo Y, Ochiya T, **Tanaka Y**. DNA methylome and cancer-specific expression change of clustered miRNAs in non-B non-C hepatocellular carcinoma. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Mar.12-15,2015. Istanbul.
6. 飯島沙幸, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 飯尾悦子, 村上周子, 林佐奈衣, 五十川正記, **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24回抗ウイルス療法研究会総会. 平成26年5月7日~9日. 山梨.
7. **田中靖人**, 西口修平, 小俣政男. 標準治療抵抗性C型慢性肝炎患者に対するファルダプレビルナトリウム+PegIFN/Ribavirin 3剤併用療法による国際共同第III相試験(STARTVerso3). 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
8. 飯尾悦子, **田中靖人**, 雄長誠, 梶谷内晶, 渡邊綱正, 城卓志, 溝上雅史, 成松久. 新規糖鎖マーカーWisteria floribunda agglutinin⁺-H1-12は肝硬変患者の予後予測に有用である. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
9. **田中靖人**, 渡邊綱正, 五十川正記. 肝炎ウイルス感染と生体応答~C型肝炎の克服とB型肝炎の再興. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 平成26年6月19日~20日. 札幌.
10. 松浦健太郎, 飯島沙幸, **田中靖人**. 3剤併用療法における末梢血単核球中のインターフェロン誘導遺伝子群の応答性とIL28B遺伝子多型・治療反応性との関連. 第18回日本肝臓学会大会. 平成26年10月23日~24日. 神戸.
11. 可児里美, 松波加代子, 小川慎太郎, 大根久美子, 大橋実, 五藤孝秋, 脇本幸夫, 井上貴子, 新海登, **田中靖人**. C型慢性肝炎患者に対するIL28B遺伝子多型およびC型肝炎ウイルスNS5A変異解析に基づいた個別化治療の試み. 第61回日本臨床検査医学会学術集会. 平成26年11月22日~25日. 福岡.
12. 飯尾悦子, 松浦健太郎, **田中靖人**. NS5A変異株はプロテアーゼ阻害剤を含む3剤併用療法が有効である. 第40回日本肝臓学会東部会. 平成26年11月27日~28日. 東京.
- 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

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、国がん）
- ・病院コホート（武蔵野、長崎）

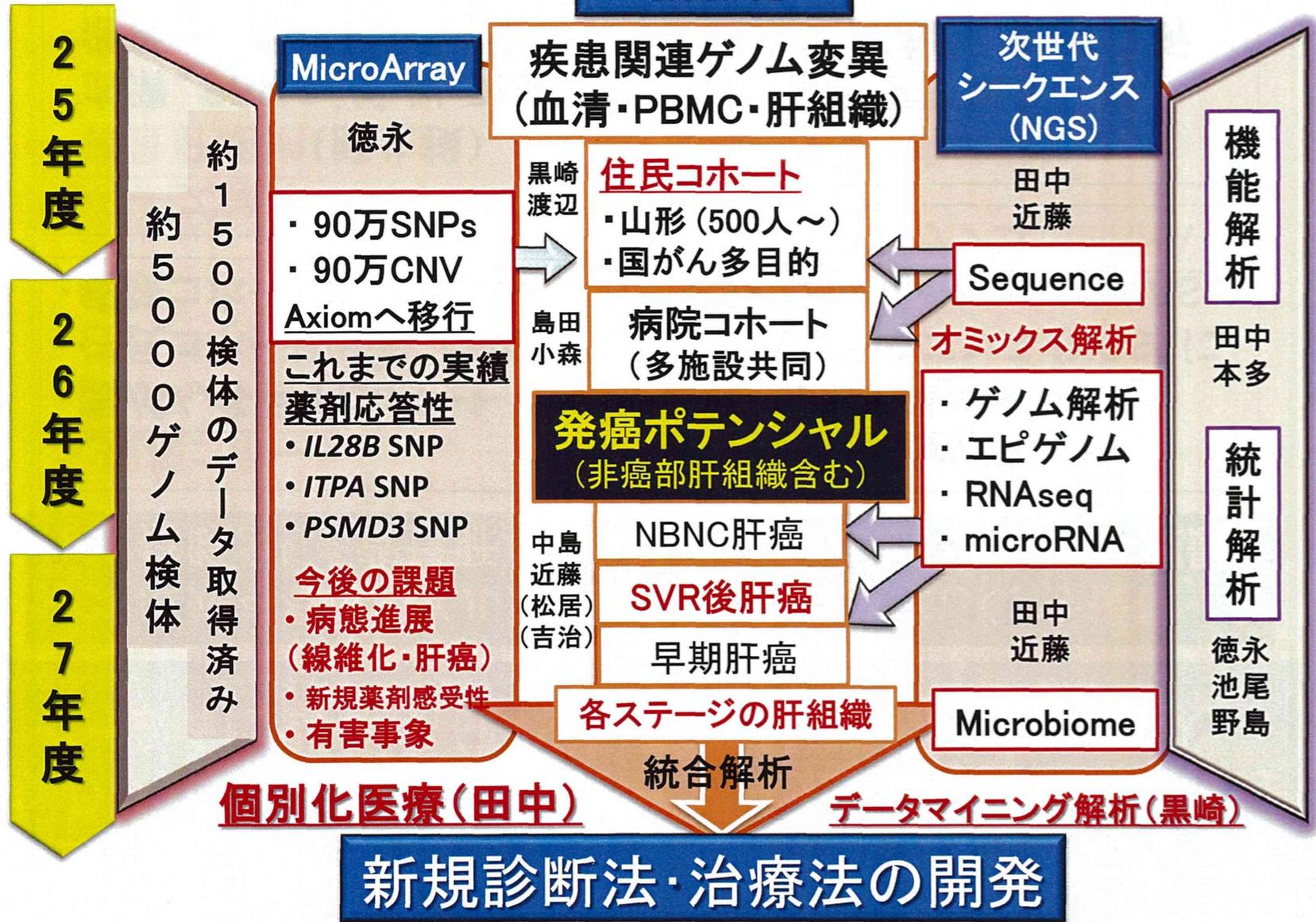
シリーズ検体

- ・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（遺伝研）
- ・統計解析（東京大学）
- ・パスウェイ（相互作用）解析
- ・データベース化

GWAS



研究計画

1. ゲノム研究(徳永、多施設共同研究)

- ✓ **3剤治療効果: *IL28B* SNP、ISG (IFNシグナル抑制系)**
- ✓ **肝線維化に関連したSNPs (黒崎) → 投稿中**
- ✓ **好中球減少 → Human Genetics, 2015**
- ✓ **うつ病 → 関連SNP同定(機能解析)、投稿準備中**
- ✓ **コホートでの発癌(国がん/岩崎、渡辺)
→ imputation (東北メディカル・メガバンク機構との共同研究)**
- ✓ **SVR後発癌(サンプル収集) → GWAS済み、統計解析中**

2. SVR後発癌 vs. NBNC-HCC(小森)

- ✓ **網羅的メチル化解析(島田/宇都宮、野島)**
- ✓ **miRNA解析(近藤、松居)**
- ✓ **RNAseq/CAGE解析(創薬基盤プラットフォーム)**
- ✓ **Bioinformatics: パイプラインの活用(池尾)**

現時点で、すでにいくつかの候補遺伝子あるいはmiRNAを同定

- ① 機能解析(本多)および多数のFFPE検体を用いて検証(協力施設)
- ② HCV除去後の発癌増悪因子の解明(中島)



1. ゲノムDNA (5,000検体以上)
2. 付帯情報
3. GWASデータ (1,000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・岡山大など

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 (SVR後, NBNC)

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

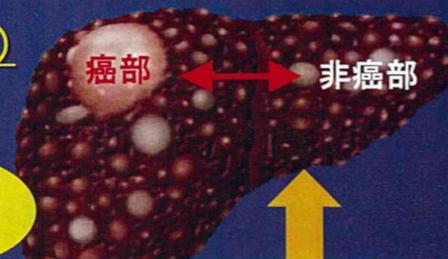
HCV感染期間あるいは年齢をマッチさせて解析(コホート研究)



住民
コホート



早期
肝癌



発癌ポテンシャル(非癌部)

SVR後発癌

肝組織(癌部、非癌部) 200ペア、血清・PBMC

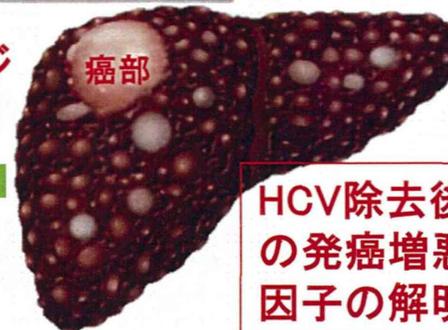
非B非C型肝炎

徳島大・九大・長崎医セ・大阪市大・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)
 RNAseq解析

各ステージ
の肝組織



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
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 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

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合計975例のHCV患者群からゲノムDNAを収集した。これらのうち、745例を対象としたゲノムワイドSNP解析が完了し、HCV由来肝発癌およびSVR後肝発癌を対象としたGWASを実施した。加えて、C型肝炎自然治癒症例およびペグインターフェロン+リバビリン併用療法における好中球減少症例を対象としたGWASにより、新たな疾患感受性遺伝子を同定し、論文報告を行った。

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、同センター内の一括保管される。
- 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。

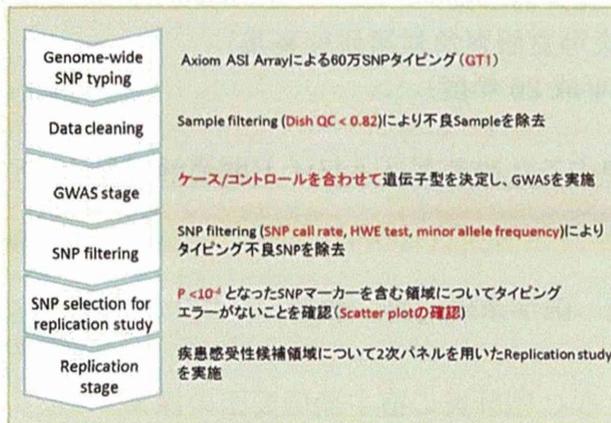


図 1 GWAS の実施手順

C. 研究結果

本年度の研究結果を以下にまとめる。

1. 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用いて、平成 26 年度は、研究協力 29 施設から HCV 患者群を 551 例収集した。昨年度に収集した 424 例を合わせた 975 例の臨床情報の収集を現在、進めている。
2. C型肝炎自然治癒群 252 例と C型肝炎慢性患者群 487 例を用いたゲノムワイド関連解析および HLA 関連解析を実施した。C 型肝炎自然治癒に対して *HLA-DQBI*03:03* と *DQBI*04:01* を新たな疾患感受性アリルとして同定した。加えて、*HLA-DQBI*03:03* が C 型肝炎ウイルス由来肝癌に対して抵抗性の関連を示すことを明らかにした。現在、論文を投稿中である。
3. 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として、*PSMD3* 遺伝子を同定した (Iio E et al. *Hum Genet* 2015)。
4. C型肝炎由来肝癌患者 168 例および慢性肝炎患者 319 例の合計 487 検体を対象として、AXIOM Genome-Wide ASI 1 Array による SNP タイピングを実施し、C 型肝炎由来肝癌を

対象とした GWAS を実施した。現在、Replication 解析を進行中である。

5. SVR 後肝癌患者 127 例および SVR 後非肝癌患者 337 例を対象として、AXIOM Genome-Wide ASI 1 Array による SNP タイピングを実施した。タイピングデータが良好 (Dish QC>0.82) であった 460 検体の平均コール率は 99.78%となった。現在、GWAS を実施中である。

D. 考察

これまでに収集した合計 975 例の C 型肝炎患者のサンプルのうち、745 例においてコール率 95%以上のゲノムワイド SNP タイピングデータを取得することができた。新たに取得したタイピングデータを用いて、1) 肝癌を対象とした GWAS、2) SVR 後の肝癌を対象とした GWAS を実施し、疾患感受性候補 SNP の絞り込み作業に進むことが可能となった。また、これまでにゲノムワイド SNP タイピングが取得済みであったインターフェロン治療後好中球減少症例および HCV 自然排除症例についての GWAS 結果から、それぞれの病態に関連する遺伝子を同定し、論文報告をした。

E. 結論

C 型肝炎ウイルスを背景とする肝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。今年度取得したゲノムワイド SNP データを用いた GWAS において、詳細な臨床情報を加えて網羅的な解析を行うことで、肝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) Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsuhashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, **Tokunaga K**, Tanaka Y., Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. Hum Genet 134(3): 279-89, 2015
- (2) Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Tanaka Y, Nishida N, **Tokunaga K**, Tsubouchi H., Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. J Med Virol 86(11): 1877-85, 2014
- (3) **Tokunaga K**: Lessons from genome-wide search for disease-related genes with special reference to HLA-disease associations. Genes 5: e84-96, 2014.
- (4) **徳永勝士**：肝炎、結核に見る病原微生物と宿主ゲノムの相互作用、第87回日本生化学会大会 シンポジウム「病原微生物との闘いとその戦果：先端生命科学からグローバルヘルスまで」、京都、2014. 10. 16.

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

2. 学会発表

- (1) **Tokunaga K**: Search for drug response genes: towards clinical application, International Seminar and Workshop on Molecular Medicine: From Basic Science to Clinical Care, Jakarta, 2014.4.15.
- (2) **徳永勝士**：ゲノム解析から医療へ貢献する：薬剤応答遺伝子を中心に、医療薬学フォーラム 2014・第22回クリニカルファーマシーシンポジウム、東京、2014. 6. 28.
- (3) **Tokunaga K**: HLA and non-HLA susceptibility genes to human immune-mediated diseases, Siriraj International Conference in Medicine and Public Health 2014, Bangkok, 2014.7.24.