

201449004A

厚生労働科学研究委託費
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）

ゲノム網羅的解析によるB型肝炎ウイルス感染の
病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 徳永 勝士

平成27（2015）年3月

厚生労働科学研究委託費
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）

ゲノム網羅的解析によるB型肝炎ウイルス感染の
病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 徳永 勝士

平成 27（2015）年 3 月

本報告書は、厚生労働省の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）による委託業務として、国立大学法人東京大学が実施した平成26年度「ゲノム網羅的解析によるB型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発 -----	1
（東京大学大学院医学系研究科 徳永 勝士）	
（資料）別紙 1 研究体制 -----	8

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. GWAS 等による、持続感染、繊維化進展、癌化に起因する遺伝要因の探索 癌化 ---	9
（東京大学医科学研究所 松田 浩一）	
2. GWAS 等による、持続感染、繊維化進展、癌化に起因する遺伝要因の探索 HLA 多型解析 -----	12
（国立国際医療研究センター 西田 奈央）	
3. 臨床情報・検体収集および関連解析の実施（持続感染等）-----	15
（千葉大学大学院医学研究院 横須賀 収）	
4. 臨床情報・検体収集および関連解析の実施（繊維化進展等） B型慢性肝炎における線維化進展と PNPLA3 遺伝子との関連 -----	17
（武蔵野赤十字病院 黒崎 雅之）	
5. 臨床情報・検体収集および関連解析の実施（癌化等）-----	19
（金沢大学医薬保健研究域 本多 政夫）	
6. 臨床情報・検体収集および関連解析の実施（薬剤応答性等） （PEG-IFN・核酸アナログ）-----	23
（国立病院機構長崎医療センター 八橋 弘）	
7. 臨床情報・検体収集および関連解析の実施（薬剤応答性等） 経口抗ウイルス剤耐性に関与するウイルス因子の探索 -----	25
（信州大学医学部付属病院 松本 晶博）	

8.	HB ワクチン応答性に関する宿主因子の遺伝子解析のための試料収集 -----	27
	(川崎医科大学 日野 啓輔)	
9.	B型肝炎ワクチン応答性についての臨床情報および検体収集 -----	30
	(筑波大学医学医療系 須磨崎 亮)	
10.	B型肝炎ウイルス再活性化に関連する遺伝子解析の検体収集・臨床情報収集 ----	32
	(名古屋市立大学大学院医学研究科 楠本 茂)	
11.	臨床情報・検体収集および関連解析の実施 (劇症化等)	
	わが国におけるB型急性肝不全の実態 -----	34
	(埼玉医科大学 持田 智)	
	(資料) 図1. 急性肝不全, LOHFにおけるHBV感染 (2010~2013年:225例)、	
	表1. B型急性肝不全, LOHF (2010~2013年:225例) -----	38
12.	HB感染集積家系における宿主因子の探索:北海道における家族内感染 -----	39
	(北海道大学病院 夏井坂 光輝)	
13.	臨床情報・検体収集および関連解析の実施 -----	42
	(東京大学大学院医学系研究科 小池 和彦)	
14.	大規模な検体および臨床情報収集とヒト肝由来初代培養細胞ストックの作成----	48
	(北海道大学大学院医学研究科 武富 紹信)	
15.	ウイルス因子の解析 -----	53
	(国立感染症研究所 脇田 隆字)	
16.	HLA等機能解析-----	57
	(国立国際医療研究センター 宮寺浩子)	
17.	HLA等機能解析-----	59
	(北海道大学薬学研究院 前仲 勝実)	
III.	学会等発表実績 -----	61
IV.	研究成果の刊行物・別刷 -----	76

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（総括）

ゲノム網羅的解析によるB型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務主任者：徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科 教授
業務協力者：澤井 裕美 東京大学大学院医学系研究科 特任助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)感染後の臨床経過のうち、持続感染、線維化進展、癌化、再活性化、劇症化、薬剤応答性、ワクチン応答性、家族内感染等に関連する宿主遺伝因子を網羅的に探索する為、班を3つのチーム (1. 臨床分科会、2. ゲノム解析分科会、3. 機能解析分科会) から構成して研究を行った。1. では各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人約4,000名に加えて、韓国人、タイ人、香港人についても検体収集を実施した。2. のゲノム解析では、1. のシステムで収集したHBV関連患者群1,356検体についてAXIOM ASI Arrayを用いたGWASを実施し、持続感染・線維化・癌化などの病態における関連候補SNPを同定し、そのうち癌化については新規遺伝要因を同定した。HLA-DP多型解析では、日本人を含む東アジア集団の患者、健常者約3,200検体について大規模HLAタイピングを実施し、既報のHLAアレル以外に慢性化および病態進展と関連を示すアレルを新たに同定した。また、ホモとヘテロの効果についても検討した。ウイルス因子の同定では、HBs抗原領域のアミノ酸配列のバリエーションと病態間で違いのあるアミノ酸変異を抽出した。3. の機能解析では、慢性B型肝炎感受性及び抵抗性に関連するHLA-DPアレルを対象として、HLA-DP結合抗原ペプチドをHBs, HBc抗原ペプチドライブラリーから探索し、慢性B型肝炎抵抗性HLA-DPアレル特異的に結合するウイルス抗原領域を見出した。B型慢性肝炎から肝癌発症に関わる階層クラスター解析および遺伝子ネットワーク解析とNASH肝癌を加えた73の肝癌組織及び非癌部の遺伝子発現解析の比較では、腫瘍内浸潤リンパ球の動態が肝癌の予後と密接に関連していることが示唆された。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

横須賀 収・千葉大学大学院医学研究院・教授
黒崎 雅之・武蔵野赤十字病院消化器科・部長
本多 政夫・金沢大学大学院医薬保健研究域・教授
八橋 弘・国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター長
松本 晶博・信州大学医学部附属病院・准教授
日野 啓輔・川崎医科大学肝胆膵内科学・教授
須磨崎 亮・筑波大学医学医療系・教授
楠本 茂・名古屋市立大学大学院医学研究科・講師
持田 智・埼玉医科大学消化器内科・教授
夏井坂光輝・北海道大学大学院医学研究科・助教
小池 和彦・東京大学医学部附属病院・教授
武富 紹信・北海道大学大学院医学研究科・教授
松田 浩一・東京大学医科学研究所・准教授
西田 奈央・国立国際医療研究センター・上級研究員

脇田 隆宇・国立感染症研究所・部長
宮寺 浩子・国立国際医療研究センター・上級研究員
前仲 勝実・北海道大学薬学研究院・教授
研究協力者
溝上 雅史・国立国際医療研究センター・センター長
考藤 達哉・国立国際医療研究センター・室長
杉山 真也・国立国際医療研究センター・上級研究員
坂元 亨宇・慶應義塾大学医学部・教授
調 憲・九州大学大学院・教授
江口有一郎・佐賀大学医学部・教授

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)感染後の臨床経過は非常に個人差が大きい。臨床経過に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。宿主の遺伝因子についても、B 型肝炎の慢性化については候補遺伝子アプローチにより幾つかの遺伝子の関与が示されており、さらにゲノムワイド関連解析(GWAS)により HLA-DP 遺伝子の関連が示された。また、B 型慢性肝炎の癌化についても複数の GWAS が実施されているが、日本人集団での再現性は得られていない。本研究では、B 型肝炎における、持続感染、線維化進展、癌化、PEG-IFN や経口抗ウイルス剤などに対する薬剤応答性、ワクチン応答性、再活性化、劇症化、家族内感染等に関連する宿主遺伝因子を網羅的に探索する事を目的とする。

B. 研究方法

本研究では、班を3つの組織(1. 臨床分科会、2. ゲノム解析分科会、3. 機能解析分科会)から構成し、研究を実施した(別紙 1 参照)。

1. 臨床分科会(横須賀、黒崎、本多、八橋、松本、日野、須磨崎、楠本、持田、夏井坂、小池、武富)

平成 23-25 年度に構築した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て、検体および臨

床情報の収集を実施した。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る。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る。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る。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 が付加される。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る。

2. ゲノム解析分科会(徳永、松田、西田、脇田)

(1) ゲノムワイド関連解析

新規の宿主遺伝要因を探索する事を目的として、収集した HBV 関連患者群の合計約 5,000 検体のうち、1,356 検体を対象としてゲノムワイド SNP タイピングを実施した。タイピングには Affymetrix 社の AXIOM ASI 1 Array (約 60 万種の SNP を搭載)を用いた。Overall call rate の平均は 99.41%、DishQC の平均は 0.969 となった。タイピング結果に基づいて、持続感染・線維化進展・癌化についてゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施した。

(2) HLA タイピング

日本人 HBV 患者群(CH, LC, HCC を含む)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-DPBI 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ため、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。上記タイピングデータを用いて関連解析を実施した。

(3) ウイルス因子解析

B 型肝炎の慢性化および癌化に抵抗性を示す HLA-DPB1*02:01 アリルをホモで持つ患者検体を抽出し、それらを慢性肝炎群 (CH) と肝癌群 (HCC) に分類した。各群について 11 例で、年齢を中央値で有意差がない二群を取り出した。HBV のシーケンスのために、PreS1, S2, S をカバーするプライマーセットで PCR 増幅を行った。その後、得られた産物を GS Jr. でディープシーケンスを実施した。シーケンスデータについては、アライメントまでを BWA-mem で実施し、その後のアミノ酸変換は、in house の解析システムの構築を行った。得られた多数のアミノ酸配列について、ケース (HCC) とコントロール (CH) でそれぞれにデータを一つに集約した上で、比較解析を行い、各病態に特有のアミノ酸を抽出した。

3. 機能解析分科会 (前仲、宮寺、本多)

(1) HLA-DP タンパク質の発現系構築

B 型肝炎慢性化に対する感受性・抵抗性と有意に関連を示す HLA-DPA1 および DPB1 アリル、関連を示さない中立性アリル (HLA-DPA1*01:03, *02:01, *02:02, HLA-DPB1*02:01, *03:01, *04:01, *04:02, *05:01, *09:01) cDNA を HLA 標準細胞株よりクローニングし、哺乳類繊維芽細胞株で発現した。HLA タンパク質 β サブユニット C 末端に His タグを付加し、安定発現株の界面活性剤可溶性分画を NTA-Ni コートプレート上でインキュベートし、HLA タンパク質をプレート上に固定した。HBs 抗原、HBc 抗原全長についてビオチン標識ペプチドライ

ブラリーを作製し、HLA-DP に結合するウイルス抗原ペプチドを探索した。

(2) 化合物スクリーニング手法の確立

遺伝的解析から関連が検出された HLA を含む新規創薬候補遺伝子産物に対して、化合物スクリーニングを行う上で有効と想定される複数のスクリーニング手法の確立を試みた。具体的には、当研究室において多用している表面プラズモン共鳴法に加え、示差走査熱量分析法、示差走査蛍光測定法を用いた評価系について検討した。

(3) 慢性肝炎から肝癌発症に関わる遺伝子群のネットワーク解析と非アルコール性脂肪性肝炎のネットワーク解析の比較

これまでの B 型慢性肝炎 (CH-B)、B 型肝炎 (HCC-B)、C 型慢性肝炎 (CH-C)、C 型肝炎 (HCC-C) の肝組織に加え、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の非癌部及び癌部 (NASH-HCC) の遺伝子発現を解析した。解析サンプル数は CH-B : 21, HCC-B : 21, CH-C : 33, HCC-C : 33, NASH : 19, NASH-HCC : 19 であり、Affymetrix gene chip U133Plus 2.0 を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、代表者である徳永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、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。アジア各国との共同研究体制を整え、東京大学および国立国際医療研究センターとの MOU 契約を取り交わした。

C. 研究結果

1. 検体収集・臨床情報蓄積システムを利用した検体収集の実施

各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人、台湾人 (健常者群および HBV 患者群) について検体収集を実施した。また、検体・臨床情報を補完するソフトウェア開発とサーバ整備も実施した。日本人検体については、

全国より約 4,000 検体が収集され、そのほとんどに臨床情報（簡易）の付加が完了した。また海外検体については、約 3,000 検体（韓国、香港、タイ、台湾）を収集した。

2-1. HBV 感染に伴う各病態の宿主遺伝要因同定を目的としたゲノムワイド関連解析

B 型肝炎の慢性化に関連する宿主遺伝要因の探索を目的とし、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 523 検体をケース群、健常者群 640 検体をコントロール群として GWAS を実施した。既報の HLA-DP を含む HLA 領域で 471SNP、それ以外の領域で 58SNP が関連候補 SNP として選ばれた。また、繊維化進展に関連する遺伝要因の探索を目的とし、肝硬変患者群 211 検体をケース群、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 523 検体をコントロール群として GWAS を実施した。その結果、59SNP が関連候補 SNP として選ばれた。更に、癌化に関連する遺伝要因の探索を目的とし、HBV 陽性肝癌患者群 473 検体をケース群、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 516 検体をコントロール群として GWAS を実施した。その結果、110SNP が関連候補 SNP として選ばれた。各病態に対して独立の日本人検体及びアジア集団の検体を用いて replication study を実施し、癌化に関連する新規の遺伝要因を同定した。

2-2. 日本人検体およびアジア検体を用いた大規模 HLA タイピング結果を用いた関連解析

日本人の健常者群と HBV 患者群の HLA-DPBI アリルで関連解析を行い、日本人において B 型肝炎慢性化に対する抵抗性を示すアリルとして HLA-DPBI*02:01、*04:01、*04:02、感受性を示すアリルとして HLA-DPBI*05:01、*09:01 を同定した。日本人において癌化に対して抵抗性を示す HLA-DPBI*02:01 を同定した。

韓国集団、香港集団、タイ集団において HLA-DPBI アリルの関連解析を実施し、韓国集団では日本集団と共通のアリルが感受性・抵抗性に関連する事が示され、香港集

団およびタイ集団では、日本集団とは異なるアリルが関連する事が示された。

HLA-DPBI の個別 Genotype での関連解析の結果、上記の抵抗性 DPBI アリルをヘテロで有する症例（0201/0401）は抵抗性 DPBI アリルをホモで有する症例（0201/0201）よりも有意な抵抗性の関連を示すことを明らかにした。また、HLA-DPBI の個別 Genotype での関連解析の結果、上記の感受性 DPBI アリルをヘテロで有する症例（0501/0901）は感受性 DPBI アリルをホモで有する症例（0501/0501）よりも有意な抵抗性の関連を示すことを明らかにした。

2-3. ウイルス因子解析手法の確立

次世代シーケンサーにより得られた配列を、HBV のリファレンス配列に従ってアライメントし、その状態を保持したまま、HBV の持つ遺伝子のコドン単位に従って、アミノ酸に変換するシステムの構築を行った。

解析基準については、シーケンス結果を元に、各サンプルで各サイトの depth が 100 以上の場合とした。アミノ酸のバリエーションについては、出現頻度が 5%以上のものを採用した。解析に際しては、ケースとコントロールの各群に属する 11 検体を一つにまとめたリードファイルを作成して、アミノ酸のバリエーションを算出した。

アミノ酸で観察した際に、そのコドンサイトの最頻出アミノ酸がケースコントロール間で異なる場合は、メジャー変異と定義した。また、最頻出アミノ酸がケースとコントロールで同じであるが、マイナーな存在のアミノ酸に違いがある場合は、そのコドンサイトにマイナー変異があるものと定義した。その結果、ケースとコントロールを比較した場合に、HBs 抗原のアミノ酸領域の 1-400 番まででは、観察されたほとんどのアミノ酸位置はマイナー変異を有していた（92箇所）。一方で、5箇所では、メジャー型の変異があった。

3-1. HLA-DP アリルの組換えタンパク発現系の構築

これまでに主要 HLA-DP アリルの組換えタ

ンパク質発現系を構築し、HLA-ペプチド結合測定系を確立した。今年度は、この測定系を用いて HBV 表面抗原(HBs)、コア抗原(HBc)のペプチドライブラリー(ペプチド 63 種類)について HLA-ペプチド結合解析を行い、慢性化抑制アリル DP0402 に特異的に結合する高親和性ペプチド 3 種、慢性化進行アリル DP0901、中立アリル DP0301 に弱く結合する低親和性ペプチド 1 種類を見出した(いずれも未発表)。

3-2. 化合物スクリーニング手法の確立

複雑な分子形態をとる HLA タンパク質をまずは対象として、化合物スクリーニング系の検討を進めた。スクリーニング手法として簡便で、大規模ハイスループットスクリーニングに適している示差走査蛍光測定法、およびより詳細なミディウムスループットの解析に向く示差走査熱量分析法を検討した。

研究室で既に調製法の確立している HLA クラス I タンパク質を用いて、上記 2 種の手法でタンパク質の分析を行った。その結果、HLA クラス I 分子 (HLA-G) はいずれの手法でも分子の変性点が 2 点あるものの、測定条件の最適化を行えば、スクリーニングの系として用いることが可能であると予想された。また、初期データとして遺伝的関連が検出されている HLA 以外の受容体タンパク質についても、大腸菌等を用いた組換えタンパク質の調製法を検討中である。

3-3. 遺伝子ネットワーク解析の実施

非癌部及び癌部の遺伝子発現はそれぞれの成因別に特徴的な発現パターンを示した。肝癌の予後と関連する遺伝子発現としてクロマチン修飾、細胞周期、DNA 修復関連遺伝子の発現上昇は有意に PFS (progression free survival)低下と関連した。また、NK 細胞、IFN シグナル、抗原提示、TCR シグナリングの発現低下が有意に PFS 低下と関連した。このように肝癌細胞内の腫瘍浸潤リンパ球の動態と肝癌の再発、予後と密接に関連していることが明らかとなった。

D. 考察

本プロジェクトで構築した検体収集・臨床情報の蓄積システムを利用して検体収集を開始した。収集されたサンプルは現時点で、日本、韓国、香港、タイを合わせると約 5,700 検体にのぼり、さらに共同研究グループが約 1,300 検体を保有する。今後これらの検体は、より大規模な GWAS やその結果の検証に用いることが期待される。また、B 型肝炎慢性化・ウイルス排除について HLA-DP の HLA タイプを詳細に検討する事で、病態の解明およびリスク予測遺伝子検査法の開発に役立つことが期待される。HLA-DP については組換えタンパク発現系の構築も進んでおり、抗原ペプチドとの複合体など、より詳細な解析が期待できる。

既に B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除や肝癌については一部新規遺伝要因を報告しているが、今後はこのシステムを用いてより大規模な解析を実施することで、新規の遺伝要因を同定する事が可能になると考えられる。また、線維化進展や癌化においても新規遺伝要因の同定が期待される。同時に、遺伝子ネットワーク解析により同定された遺伝子群、ウイルスゲノム配列中の多型を組み合わせた解析も期待される。

E. 結論

本研究では、班を 4 つの組織から構成し、研究を実施した。1) 各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人、台湾人(健常者群、HBV 患者群およびウイルス排除群)約 5,700 検体を収集した。2) ゲノム解析では、慢性化・線維化進展・癌化に関連する宿主遺伝要因を網羅的に探索し、各病態について関連候補 SNP を検出した。また癌化については新規遺伝要因を同定した。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関与する HLA-DPB1 アリルを同定し、ホモとヘテロの効果についても検討した。ウイルス因子の同定では、HBs 抗原領域のアミノ酸配列のバリエーションと病態間で違いのあるアミノ酸変異を抽出した。

機能解析では、慢性 B 型肝炎感受性及び抵抗性に関連する HLA-DP アリルを対象として、HLA-DP 結合抗原ペプチドを HBs, HBc 抗原ペプチドライブラリーから探索し、慢性 B 型肝炎抵抗性 HLA-DP アリル特異的に結合するウイルス抗原領域を見出した。B 型慢性肝炎から肝癌発症に関わる階層クラスター解析および遺伝子ネットワーク解析と NASH 肝癌を加えた 73 の肝癌組織及び非癌部の遺伝子発現解析の比較では、腫瘍内浸潤リンパ球の動態が肝癌の予後と密接に関連していることが示唆された。

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 WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JK, 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: 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) **Tokunaga K**. Lessons from Genome-Wide Search for Disease-Related Genes with Special Reference to HLA-Disease Associations. *Genes* 5(1):84-96, 2014
- (3) Miyadera H, Ohashi J, Lernmark Å, Kitamura T, and **Tokunaga K**: Cell surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J. Clin. Invest.* 125(1): 275-291, 2015
- (4) Khor SS, Yang W, Kawashima M, Kamitsuji S, Zheng X, Nishida N, Sawai H, Toyoda H, Miyagawa T, Honda M, Kamatani N, and **Tokunaga K**.

High-accuracy imputation for HLA class I and II genes based on high-resolution SNP data of population-specific references. *Pharmacogenomics J.* (in press)

2. 学会発表

- (1) Nao Nishida, Hiromi Sawai, Koichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Ken Yamamoto, Takehiko Sasazuki, 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, Minae Kawashima, **Katsushi Tokunaga**, Masashi Mizokami, Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2014, Boston, 2014
- (2) Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouich Kashiwase, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, **Katsushi Tokunaga**, Masashi Mizokami, Association of HLA-DPB1 alleles with CHB infection and HBV related HCC in Asia. 62th Annual ASHG Meeting, California, 2014
- (3) 西田奈央、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、**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 アリルの横断的解析、第 50 回 日本肝臓学会総会、東京、2014
- (4) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、溝上雅史、**徳永勝士**、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎の慢性化および癌化に関わる新規遺伝要因の探索、第 50 回 日本肝臓学会総会、東京、2014
- (5) 岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、宮寺浩子、**徳永勝士**、溝上雅史、HLA-DP

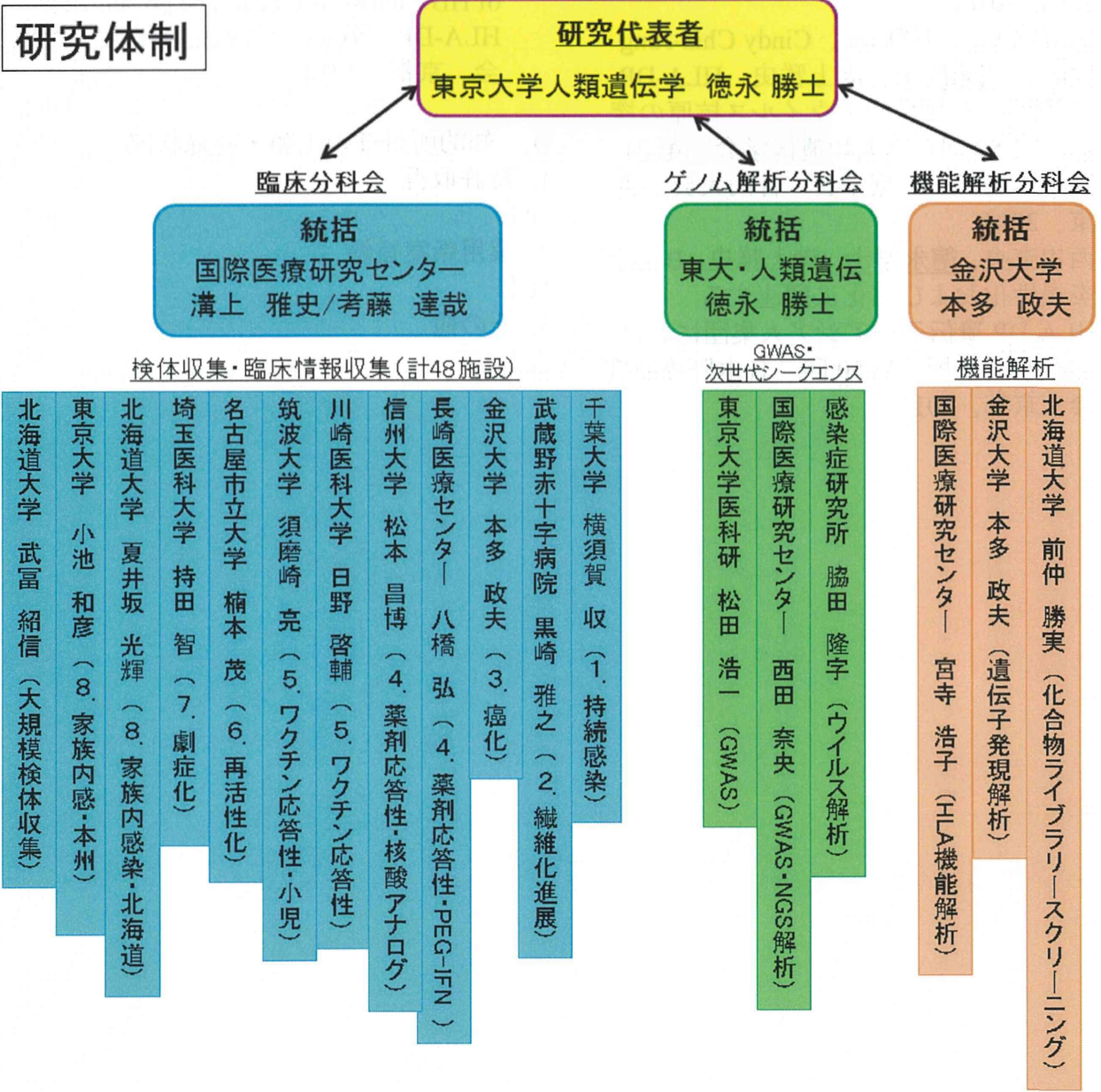
提示 B 型肝炎ウイルス抗原の網羅的探索、日本組織適合性学会第 23 回大会、長崎、2014

- (6) 宮寺浩子、岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、徳永勝士、溝上雅史、HLA-DP に結合する B 型肝炎ウイルス抗原の探索、第 59 回日本人類遺伝学会 第 21 回日本遺伝子診療学会 合同大会、東京、2014
- (7) 西田奈央、徳永勝士、溝上雅史、B 型肝炎慢性化および癌化に関連する HLA-DP 遺伝子のアジア人集団における横断的解析、第 50 回 日本肝癌研究会、京都、2014

- (8) 岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子、徳永勝士、Screening and identification of HBV antigens that can be presented to HLA-DP、第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014

H. 知的所得権の出願・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



Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：GWAS 等による、持続感染、繊維化進展、癌化に起因する遺伝要因の探索
癌化

担当責任者：松田 浩一 東京大学医科学研究所 准教授

研究要旨：HBV陽性肝癌発症に関わる遺伝因子を同定する目的で、HBV陽性肝癌患者237名、非癌コントロール15060名を用いて、全ゲノム関連解析を行なった。その結果、HLA-DP,HLA-DQ領域に有意な関連を認めた ($P=3.5 \times 10^{-12}$)。またHLA領域以外にも、10-6位の強い関連を示す6領域が明らかとなった。またこれまでB型肝炎、HBV肝癌以外の悪性腫瘍との関連が報告されている288SNPについて、HBV肝癌との関連を検討した。その結果、CDKN2AやPHLDB1が $P<0.01$ と有意な関連を示すことが明らかとなった。今後これらの領域を中心に、独立したサンプルでの検討を進める予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス感染や発癌に関わる宿主因子の解析を通して、疾患の発症リスク予測や発癌メカニズムの解明を行う。

B. 研究方法

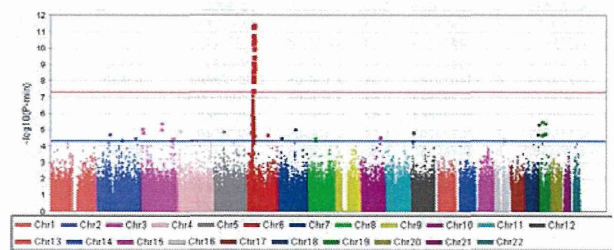
HBV 陽性肝癌患者 237 名、非癌コントロール 15060 名を用いてイルミナ Human Hap610 BeadsChip により、約 60 万箇所の SNP のタイピングを行なった。解析にあたり、年齢性別を交絡因子とした。また、既報の文献の review を行い、癌の発症と関連が報告されている 483SNP を抽出した。これらの SNP について、GWAS の結果を用いて、発がんリスクとの関連を確認した。

（倫理面への配慮）

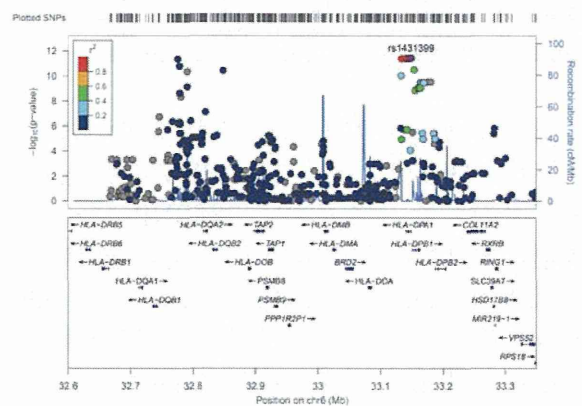
本解析に用いた症例は全て、インフォームドコンセントを取得済みで、また各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

全ゲノム関連解析の結果、480702 SNP についてのデータ取得された。



もっと強い関連を示したのは、HLA-DP 領域であった ($P=3.5 \times 10^{-12}$)。この領域は、慢性 B 型肝炎との関連が既に報告済みであることから、この SNP は癌化ではなく、HBV 感染の慢性化に関与すると考えられた。



また HLA 領域以外では、ITPR1, LOC389141, KIAA0319, ZNF804B, FCHO1, POP4 の 6 領域が 10-6 位の強い関連を示した。

表. HLA 以外の領域の解析結果

SNP	Chicpos.	OR	P	gene	location	
rs147799	1	36357047	1.62	7.06E-05	ABGA4	0
rs3759450	1	36356890	1.63	6.83E-05	ABGA4	0
rs546024	2	63775279	1.60	6.18E-05	LOC647112	3926
rs7589567	2	70271843	0.62	1.70E-05	G2m42	-189
rs2706766	2	70310090	0.65	8.26E-05	TAT	0
rs1382457	2	70396890	0.64	8.39E-05	PAM136A	-14185
rs9090969	2	123382184	1.66	9.60E-05	LOC728241	713246
rs6747870	2	130186239	2.30	3.76E-05	TME163	0
rs10932354	2	212118093	1.66	2.99E-05	ER654	0
rs16963738	2	223045043	1.69	7.38E-05	SOPP2	0
rs17041369	3	4769890	2.13	5.02E-05	ITPR1	0
rs2500174	3	8264088	1.66	1.46E-05	SNAP3	0
rs4974120	3	86196533	1.69	8.67E-05	ERG2	0
rs4974176	3	86196547	1.69	8.67E-05	ERG2	0
rs1462307	3	111964638	1.62	3.61E-06	LOC397141	-9766
rs10934067	3	111990953	1.66	9.02E-06	LOC191780	102614
rs8538303	3	163137089	1.97	4.04E-05	LOC100132454	-382366
rs6443429	3	176552192	0.62	6.66E-05	TBL1XR1	0
rs7611092	3	176552228	0.61	3.57E-05	TBL1XR1	0
rs1157931	4	13491883	1.66	1.17E-05	LOC397836	-26905
rs1399249	4	71029223	1.63	4.62E-05	G5V1326	4667
rs12649564	4	102110699	0.66	6.34E-05	PPP3GA	47911
rs4624412	4	122180349	1.66	9.06E-05	G6a37	16683
rs8538062	4	181345604	1.62	6.86E-05	LOC728081	876732
rs7665396	4	181350668	1.64	9.40E-05	LOC728081	871900
rs16662451	5	63542993	1.60	1.30E-05	AKL13	0
rs3955067	5	110100566	2.58	6.69E-05	SLG2346	-2086
rs1209916	6	22473741	0.58	1.45E-05	PRL	-68032
rs7766676	6	34436623	2.76	1.18E-06	GGG2	0
rs2790181	6	34696540	2.54	4.24E-06	KIAA0319	0
rs8226412	6	43624206	2.33	6.19E-05	JPO5	0
rs7764616	6	45653953	1.61	2.19E-05	RUNX2	27156
rs7773293	6	114070787	1.54	2.10E-05	LOC728590	60880
rs2301677	7	17292583	0.63	3.30E-05	LOC100131512	0
rs1557917	7	88388864	1.67	9.98E-06	ZNF804B	0
rs2158499	7	88396705	1.68	6.02E-05	ZNF804B	0
rs10091962	8	40482035	2.30	3.22E-05	ZMAT4	25235
rs7018220	8	40502000	2.30	4.21E-05	ZMAT4	5270
rs1249744	9	116083173	0.64	8.57E-05	COL27A1	0
rs4917418	10	106285577	1.55	7.00E-05	CCDC147	80739
rs1028918	10	106291065	1.55	6.80E-05	CCDC147	86227
rs12252509	10	106291589	1.55	6.90E-05	CCDC147	86751
rs11192121	10	106313791	1.58	2.64E-05	SORCS3	-77058
rs6487879	12	9282599	1.74	4.51E-05	PZP	-10366
rs12229800	12	13697499	2.10	6.80E-05	GRIN2B	0
rs7301344	12	15188200	1.60	1.47E-05	PERG	0
rs12889177	14	22561189	2.24	9.90E-05	PSMB5	3731
rs3112814	16	51190534	1.51	6.91E-05	LOC643714	0
rs12597685	16	51195281	0.65	4.35E-05	LOC643714	0
rs3104811	16	51221448	1.53	3.62E-05	LOC643714	-23050
rs4940181	18	48284629	2.30	7.48E-05	DCC	0
rs8095066	18	72016459	1.67	1.74E-05	ZNF516	184148
rs2927261	18	74731402	1.83	3.96E-06	LOC645321	107937
rs265555	19	17756874	3.28	2.83E-06	FCHO1	0
rs265552	19	17761158	2.77	1.92E-05	FCHO1	792
rs8112048	19	19678749	1.49	7.31E-05	ZNF14	3532
rs7246866	19	19683049	1.50	6.12E-05	ZNF14	0
rs8110890	19	19709485	1.50	5.98E-05	ZNF14	-4564
rs7256497	19	19716654	1.54	1.86E-05	LOC100130292	-5772
rs12978630	19	34784968	1.91	1.62E-05	POP4	-4073
rs7247377	19	34788403	1.91	1.66E-05	POP4	-638
rs12983160	19	34804197	1.98	3.64E-06	POP4	5650
rs4239875	22	33668995	2.14	7.31E-05	ISX	-123135

また様々な悪性腫瘍の罹患性と関連が知られている 483SNP について、HBV 肝臓との関連を検討した。この内、288SNP について感連が検討可能であった。その結果、CDKN2A や PHLDB1 が 0.01 以下の強い関連を示した。しかしながら多重検定の補正後も有意な関連を示す SNP は同定されなかった。

D. 考察

今回の解析では、既報の領域以外には強い関連を示す領域は同定されなかった。しかしながら、CDKN2A は様々な疾患との関連が知られていることから、HBV 肝臓のマーカーとして有望と考えられる。今後は独立した検体での再現性の確認に加え、サンプル数を増やした解析や、慢性 B 型肝炎をコントロールとした解析などが必要になると考えられる。

E. 結論

HBV 陽性肝臓の疾患関連遺伝子を網羅的に解析した結果、HLA 領域が強い関連を示した。また他にも複数の候補領域が同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) T. Kashiyama, K. Oda, Y. Ikeda, Y. Shiose, Y. Hirota, K. Inaba, C. Makii, R. Kurikawa, A. Miyasaka, T. Koso, T. Fukuda, M. Tanikawa, K. Shoji, K. Sone, T. Arimoto, O. Wada-Hiraike, K. Kawana, S. Nakagawa, **K. Matsuda**, F. McCormick, H. Aburatani, T. Yano, Y. Osuga, T. Fujii, Antitumor Activity and Induction of TP53-Dependent Apoptosis toward Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423, PloS one, 9 (2014) e87220.
- (2) J. Lin, Z. Deng, C. Tanikawa, T. Shuin, T. Miki, **K. Matsuda**, Y. Nakamura, Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation, Int J Oncol, 44 (2014) 1490-1498.
- (3) Y. Yamamoto, M. Miyamoto, D. Tatsuda, M. Kubo, H. Nakagama, Y. Nakamura, H. Satoh, **K. Matsuda**, T. Watanabe, T. Ohta, A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability, Cancer Res, 74 (2014) 3707-3715.
- (4) B. Zhang, W.H. Jia, **K. Matsuda**, S.S. Kweon, K. Matsuo, Y.B. Xiang, A. Shin, S.H. Jee, D.H. Kim, Q. Cai, J. Long, J. Shi, W. Wen, G. Yang, Y. Zhang, C. Li, B. Li, Y.

- Guo, Z. Ren, B.T. Ji, Z.Z. Pan, A. Takahashi, M.H. Shin, F. Matsuda, Y.T. Gao, J.H. Oh, S. Kim, Y.O. Ahn, A.T. Chan, J. Chang-Claude, M.L. Slattery, S.B. Gruber, F.R. Schumacher, S.L. Stenzel, G. Casey, H.R. Kim, J.Y. Jeong, J.W. Park, H.L. Li, S. Hosono, S.H. Cho, M. Kubo, X.O. Shu, Y.X. Zeng, W. Zheng, Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk, *Nat Genet*, 46 (2014) 533-542.
- (5) T. Fujitomo, Y. Daigo, **K. Matsuda**, K. Ueda, Y. Nakamura, Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis, *Int J Oncol*, 45 (2014) 147-156.
- (6) Q. Cai, B. Zhang, H. Sung, S.K. Low, S.S. Kweon, W. Lu, J. Shi, J. Long, W. Wen, J.Y. Choi, D.Y. Noh, C.Y. Shen, K. Matsuo, S.H. Teo, M.K. Kim, U.S. Khoo, M. Iwasaki, M. Hartman, A. Takahashi, K. Ashikawa, **K. Matsuda**, M.H. Shin, M.H. Park, Y. Zheng, Y.B. Xiang, B.T. Ji, S.K. Park, P.E. Wu, C.N. Hsiung, H. Ito, Y. Kasuga, P. Kang, S. Mariapun, S.H. Ahn, H.S. Kang, K.Y. Chan, E.P. Man, H. Iwata, S. Tsugane, H. Miao, J. Liao, Y. Nakamura, M. Kubo, R.J. Delahanty, Y. Zhang, B. Li, C. Li, Y.T. Gao, X.O. Shu, D. Kang, W. Zheng, Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1, *Nat Genet*, 46 (2014) 886-890.
- (7) Z. Deng, **K. Matsuda**, C. Tanikawa, J. Lin, Y. Furukawa, R. Hamamoto, Y. Nakamura, Late Cornified Envelope Group I, a Novel Target of p53, Regulates PRMT5 Activity, *Neoplasia*, 16 (2014) 656-664.
- (8) **K. Matsuda**, A. Takahashi, C.D. Middlebrooks, W. Obara, Y. Nasu, K. Inoue, K. Tamura, I. Yamasaki, Y. Naya, C. Tanikawa, R. Cui, J.D. Figueroa, D.T. Silverman, N. Rothman, M. Namiki, Y. Tomita, H. Nishiyama, K. Kohri, T. Deguchi, M. Nakagawa, M. Yokoyama, T. Miki, H. Kumon, T. Fujioka, L. Prokunina-Olsson, M. Kubo, Y. Nakamura, T. Shuin, Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population, *Hum Mol Genet*, (2014).
- (9) P.H. Lo, C. Tanikawa, T. Katagiri, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Identification of novel epigenetically inactivated gene PAMR1 in breast carcinoma, *Oncol Rep*, 33 (2015) 267-273.
2. 学会発表
- (1) 2014.4.9 AACR annual meeting (San Diego, USA) PSCA as a potential therapeutic and prognostic biomarker for common cancer.
- (2) 2014.4.25. 第103回 日本病理学会 (広島) バイオバンクジャパンについて
- (3) 2014.6.8. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis.
- (4) 2014.8.29. 泌尿器科ゲノム研究会(横浜) 膀胱癌 GWAS の進捗について
- (5) 2014.9.25 日本癌学会(横浜) BioBank Japan Project for personalize medicine
- (6) 2014.12.20 がんゲノム・エピゲノム、数理統計解析についての勉強会(別府) 遺伝子多型解析による疾患感受性遺伝子探索
- G. 知的所得権の出願・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

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発

業務項目：GWAS 等による、持続感染、繊維化進展、癌化に起因する遺伝要因の探索
HLA 多型解析

担当責任者：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：平成26年度は、国内の検体収集協力16施設から、合計2,301例のHBV患者群および健常対照群を収集した。全2,301例のうち2,036例を対象としてHLA-DPBIタイピングを実施した結果、B型慢性肝炎およびHBV関連肝発癌とHLA-DPBI遺伝子の関連はより確かなものとなった。また、B型慢性肝炎に対して進行性および抵抗性の関連を示すDPBIアレルをヘテロで有する症例を検討した結果、抵抗性および進行性のいずれにおいてもヘテロで有する方がより関連が強くなることが明らかとなった。

A. 研究目的

B 型肝炎慢性化および肝発癌に関連することが明らかとなっている HLA-DP 遺伝子について、各種病態への関連を明らかにする。

また、比較対照群として健常群 500 例を目標として収集する。

(4) 二重匿名化した DNA サンプルを用いて、国際医療研究センターにおいて HLA タイピングを実施する。

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した。

- (1) 各研究参加施設で採取した血液サンプルは連結可能匿名化した後、SRL においてゲノム DNA の抽出を行う。DNA・血清サンプルは SRL から国際医療研究センターへ送られ、同センター内に一括保管される。
- (2) 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、国際医療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。
- (3) 上記の患者情報をもとに、(A) HBV 持続感染、(B) HBV 繊維化進展、(C) HBV 関連肝癌、(D) HBV 再活性化、(E) HBV 重症化(劇症化)、(F) 薬剤応答性、(G) ワクチン応答性、(H) HBV 家族内感染の 8 グループに分類し、DNA サンプルと患者情報にゲノム解析用の ID を付与する。

(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払う。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

研究成果を以下にまとめる。

- (1) 国内の研究協力 16 施設で採血した B 型肝炎患者のゲノム DNA、血清サンプルを SRL 経由で国立国際医療研究センター・国府台病院に収集・保管する検体・臨床情報収集システムを構築した。これまでに HBV 患者群および健常対照群の合計 2,301 例を収集し、そのうちの 1,488 例に対する臨床情報（簡易版）、633 例に対する臨床情報（詳細版）の収集が完了した。
- (2) 日本人 HBV 患者群および健常対照群の合計 2,036 検体を対象として、*HLA-DPBI* タイピングを実施し、*HLA-DPBI* アリルを決定した。
- (3) 日本人において B 型肝炎慢性化に対する抵抗性の関連を示す *HLA-DPBI**02:01、*04:01、*04:02、および進行性の関連を示す *HLA-DPBI**05:01、*09:01 の関連はより確かになることを確認した。
- (4) 日本人において肝発癌に対して抵抗性の関連を示す *HLA-DPBI**02:01 の関連がより確かになることを確認した。
- (5) *HLA-DPBI* の個別 Genotype での関連解析の結果、上記 3) の抵抗性 *DPBI* アリルをヘテロで有する症例 (0201/0401) は抵抗性 *DPBI* アリルをホモで有する症例 (0201/0201) よりも有意な抵抗性の関連を示すことを明らかにした。
- (6) *HLA-DPBI* の個別 Genotype での関連解析の結果、上記 3) の進行性 *DPBI* アリルをヘテロで有する症例 (0501/0901) は抵抗性 *DPBI* アリルをホモで有する症例 (0501/0501) よりも有意な抵抗性の関連を示すことを明らかにした。
- (7) *HLA-DP* 遺伝子領域（約 60Kb）を高速シーケンサー（Illumina MiSeq）により塩基配列決定するためのライブラリー調整用プライマーのデザイン、実験条件の検討を行った。

D. 考察

HLA-DPBI 遺伝子の特定のアリルが B 型

肝炎慢性化および肝発癌に関連することがより確かとなった。加えて、B 型肝炎慢性化に対して、抵抗性および進行性の *DPBI* アリルをヘテロで有する症例において、より関連が強くなることが明らかとなった。

E. 結論

B 型肝炎慢性化および肝発癌に関連する *HLA-DPBI* アリルで層別化した GWAS を実施することにより、*HLA-DP* 遺伝子以外の新たな疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tomoharu Yoshizumi, M.D.; Ken Shirabe, M.D.; Hiromi Sawai; Yohei Mano; **Nao Nishida**; Tatsuya Kanto; Masaaki Korenaga; Toru Ikegami; Katsushi Tokunaga; Masashi Mizokami; Yoshihiko Maehara, Variants in the HLA-DP locus are associated with the efficacy of HBV vaccination after living donor liver transplantation, Transplantation (submitted)
- (2) **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(3): e86449, 2014