

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アリル以外に慢性化および病態進展と関連を示すアリ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。

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 隆字・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 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-DPB1 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-DPB1*02:01、*04:01、*04:02、感受性を示すアリルとして HLA-DPB1*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-DPB1*02:01 を同定した。韓国集団、香港集団、タイ集団において HLA-DPB1 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-DPB1 の個別 Genotype での関連解析の結果、上記の抵抗性 DPB1 アリルをヘテロで有する症例（0201/0401）は抵抗性 DPB1 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-DPB1 の個別 Genotype での関連解析の結果、上記の感受性 DPB1 アリルをヘテロで有する症例（0501/0901）は感受性 DPB1 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 1-4 0 0 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ア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(健康者群、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参与する 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

