

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

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

(H25-肝炎-若手-013)

平成 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 西田 奈央

平成 27(2015)年 3 月

***** 目 次 *****

. 総括研究報告書	
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（西田奈央）	……………01
. 分担研究報告書	
. 研究成果の刊行一覧	……………04
. 研究成果の刊行物・別刷	……………05

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 26 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：新たに収集した日本人B型肝炎患者群892名と健常対照群761名を対象としてHLA-DPBIタイピングを実施し、本研究においてこれまでに明らかとなっているHLA-DPBI遺伝子とB型慢性肝炎や肝発がんとの関連がより確かとなることが明らかとなった。加えて、個別のDPBI genotypeでの関連解析を実施したところ、i) 感受性/抵抗性アリルを2つ有する症例で関連が相加的に強くなる、ii) 感受性アリルと抵抗性アリルのヘテロ症例ではどの組み合わせでも抵抗性の関連を示す、iii) 感受性アリルのヘテロ症例、および抵抗性アリルのヘテロ症例はホモ症例よりも有意に関連が強まる、ことが明らかとなった。また、新たに収集したHBV患者群および健常対照群の合計892例について、Affymetrix AXIOM ASIプラットフォームによるゲノムワイドSNPタイピングを実施し、GWASおよびHLA-DPBIアリルでの層別化GWASを実施した。検出した有望な遺伝子領域について、今後、Imputation解析を進める。加えて、ゲノムワイドSNPタイピングデータからHLA Imputationを実施することにより、高い精度で5つのHLA遺伝子（HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPBI）の遺伝子型を推定することが可能となった。2型糖尿病を背景に持つ肝発癌患者を対象として、2型糖尿病発症に関連するSNPについて関連解析を実施したところ、肝発癌に有意な関連を示す新たなSNPを検出した。

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、肝がん関連遺伝子の同定、および2型糖尿病患者における肝発癌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、2型糖尿病患者の中で肝細胞癌を有する群、有さない群に分けた関連解析を実施することで、2型糖尿病患者における肝発癌の関連遺伝子の同定を目指す。必要に応じて、疾患感受性遺伝子領域を対象とし

た Target resequencing や全 RNA 解析、全ゲノム解析などを実施し、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

(1) Affymetrix 社や Illumina 社のゲノムワイド SNP タイピングデータを用いて、StaGen 社と共同で HLA 遺伝子の Tagging SNP の選択を行った結果、5 つの HLA 遺伝子 (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPBI) について 95.2%-99.5% の精度で Imputation が可能となった（論文発表(1)参照）。

(2) 新たに収集した日本人 B 型肝炎患者群 892 名と健常対照群 761 名のゲノム DNA を用いて HLA-DPBI タイピングを実施し、HLA-DPBI アリルと B 型肝炎慢性化の関連解析を実施した。2014 年に論文報告した結果（Nishida et al. *PLoS One* 2014）と合わせた関連解析を実施したところ（B 型肝炎患者群 1,380 名、健常対照群 1,225 名）B 型肝炎慢性化に対して抵抗性の関連を示す 3

つの DPBI アリル（DPBI*02:01、DPBI*04:01、DPBI*04:02）および感受性の関連を示す 2 つの DPBI アリル（DPBI*05:01、DPBI*09:01）の関連がより確かとなることが明らかとなった。この成果について、現在論文投稿中である。

(3) 日本人 B 型肝炎患者群 1,380 例および健常対照群 1,225 例について、個別の HLA-DPBI 遺伝子型で関連解析を実施したところ、i) 感受性/抵抗性アリルを 2 つ有する症例で関連が相加的に強くなる、ii) 感受性アリルと抵抗性アリルのヘテロ症例ではどの組み合わせでも抵抗性の関連を示す、iii) 感受性アリルのヘテロ症例、および抵抗性アリルのヘテロ症例ではホモ症例よりも有意に関連が強まる、ことが明らかとなった。この成果について、現在論文投稿中である。

(4) 2012 年以降に新たに収集した B 型慢性肝炎患者および健常対照群の合計 892 例について、Affymetrix AXIOM ASI プラットフォームによるゲノムワイド SNP タイピングを実施した。これまでに取得済みのタイピングデータと共に、HLA-DPBI アリルでの層別化 GWAS を実施した（HBV 患者群 1,019 例、健常対照群 645 例）。2 つの感受性アリルおよび 3 つの抵抗性アリルの有無で層別化 GWAS を実施したところ、抵抗性アリルを有する症例での層別化 GWAS（B 型慢性肝炎患者群 429 名、健常対照群 403 名）において、有意な関連を示す遺伝子領域を検出した（ $P = 7.04 \times 10^{-8}$ ）。加えて、感受性アリルを有する症例での層別化 GWAS も実施し、 $P < 10^{-5}$ となった SNP を含む遺伝子領域について、東北メディカルメガバンクとの共同研究で Imputation 解析を実施している。Imputation 解析でより有望な SNP が検出された場合には、その SNP を対象として Replication 解析を実施する予定である。

(5) 2 型糖尿病を背景に有する肝発癌患者（ $n = 59$ ）および非肝発癌患者（ $n = 330$ ）について、2 型糖尿病の疾患感受性 SNP として報告された 58SNPs を対象とした関連解析を実施したところ、有意な関連を示す遺伝

子領域を検出した ($P = 0.0009$)。この成果について、現在投稿論文を作成中である。

D. 考察

これまでに取得したゲノムワイド SNP タイピングデータを用いて HLA Imputation (5 つの遺伝子座) を実施することが可能となったことから、*HLA-DPB1* 遺伝子以外の HLA class II 遺伝子 (*DRB1* 遺伝子や *DQB1* 遺伝子) や HLA class I 遺伝子と B 型慢性肝炎や肝発がんとの関連を調べることが可能となった。

E. 結論

HLA Imputation を実施し、*HLA class II* 遺伝子だけでなく *HLA class I* 遺伝子と B 型慢性肝炎や肝発がんとの関連解析を実施する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Seik-Soon Khor, Woosung Yang, Minae Kawashima, Shigeo Kamitsuji, Xiuwen Zheng, **Nao Nishida**, Hiromi Sawai, Hiromi Toyoda, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Naoyuki Kamatani, Katsushi Tokunaga, High-accuracy imputation for HLA class I and II genes based on high-resolution SNP data of population-specific references, *Pharmacogenomics J* [Epub ahead of print] 2015

2. 学会発表

(1) **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,

San Diego, 2014

(2) **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

(3) **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 年 6 月 5 日-6 日

(4) **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、赤坂、2014 年 5 月 29 日-30 日

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 発明の名称：B 型肝炎の慢性化の素因の検出方法

発明者：徳永勝士、澤井裕美、溝上雅史、**西田奈央**

出願日：2013 年 8 月 30 日

出願番号：特願 2013-179634

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。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Seik-Soon Khor, Woosung Yang, Minae Kawashima, Shigeo Kamitsuji, Xiuwen Zheng, <u>Nao Nishida</u> , Hiromi Sawai, Hiromi Toyoda, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Naoyuki Kamatani, Katsushi Tokunaga	High-accuracy imputation for HLA class I and II genes based on high-resolution SNP data of population-specific references	<i>Pharmacogenomics J</i>			2015