

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08986

研究課題名(和文) B型肝炎ワクチンの応答性に関連する遺伝要因の探索

研究課題名(英文) Identification of host genetic factors associated with response to a HB vaccination

研究代表者

澤井 裕美 (SAWAI, Hiromi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：60377124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HBワクチンを接種した約1200検体について、ワクチン低反応群、中反応群、高反応群の3群に分けたGWASを実施した。低反応群vs高反応群ではBTNL2遺伝子が関連を示し、3群比較では、DRB1-DQB1とDPB1が関連を示した。次にHLA imputationデータを用い、HLAアリル・ハプロタイプとHBワクチン効果の関連を解析した。HBワクチン低反応群とB型慢性肝炎患者群で比較すると、HBワクチン応答性に関わるDRB1-DQB1ハプロタイプの存在が示され、HBワクチン高反応群と健康対照群で比較すると、HLA class II遺伝子はワクチン高反応群に有意な関連を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界180カ国以上でHBワクチン接種は行われており、日本ではGenotype Cに対応するHBワクチン(ビームゲン)が使用されてきた。しかし、ビームゲン接種者のうち約10%はHBs抗体を獲得できず、その原因は不明であった。本研究により、特定のHLA-DR-DQ分子によるHBs抗原の認識(ワクチン低反応)、およびBTNL2分子によるT細胞やB細胞の活性制御(ワクチン高反応)がHBワクチンの効果に重要な役割を果たすことが明らかとなり、今後国際共同等を進めることで、ユニバーサルワクチネーションが行われている日本やその他の国において、HBワクチンの適正かつ効率的な使用方法の確立が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The GWAS and HLA association tests were carried out using a total of 1,193 Japanese individuals including low responders, intermediate responders, and high responders. Classical HLA class II alleles were statistically imputed using the genome-wide SNP typing data. The GWAS identified independent associations of HLA-DRB1-DQB1, HLA-DPB1 and BTNL2 genes. Five HLA DRB1-DQB1 haplotypes and two DPB1 alleles showed significant associations with response to the HB vaccine in a comparison of three groups of 1,193 HB vaccinated individuals. When frequencies of DRB1-DQB1 haplotypes and DPB1 alleles were compared between low immune responders and HBV patients, significant associations were identified for three DRB1-DQB1 haplotypes, and no association was identified for any of the DPB1 alleles. In contrast, no association was identified for DRB1-DQB1 haplotypes and DPB1 alleles in a comparison between high immune responders and healthy individuals.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：B型肝炎 疾患関連遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

- (1) B型肝炎ウイルス(HBV)感染後の経過は多岐に渡り、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。
- (2) 宿主遺伝要因についても候補遺伝子アプローチだけでなく位置的アプローチによる解析が進み、日本人を含むアジア人検体を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)により、HBV 持続感染やウイルス排除に *HLA-DPA1*、*-DPB1* の関連が示され、*HLA-DQ* の関与も示唆された。アジア集団における感受性および抵抗性アリルも同定され、集団ごとに異なるアリルが関連することが示された。
- (3) HB ワクチンに対する応答性の GWAS はインドネシアや中国で行われ、*HLA-DR*(インドネシア、中国)や *HLA-DP*(インドネシア)がワクチン応答性に関与する遺伝要因として同定されたが、日本では実施されていない。
- (4) 台湾のコホート解析より、HB ワクチン不応-HBV 持続感染感受性と、HB ワクチン応答-HBV 持続感染抵抗性のアリルがそれぞれ共通していることから、両者には何かしらの共通の分子機構が存在する事が予想される。

#### 2. 研究の目的

- (1) HB ワクチンへの応答性に関連する新規遺伝要因の探索を行う。
- (2) *HLA class II* 遺伝子(*HLA-DR*, *DQ*, *DP*)について、アリルおよびハプロタイプと HB ワクチンの効果の関連を解析する。

#### 3. 研究の方法

- (1) 日本全国の研究協力施設から、サンプルを効率的に収集し、詳細な臨床情報と共に管理するシステムを用いた検体収集・臨床情報の蓄積を行った。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た。既に DNA および血清を分離済み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、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た。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 が付加された。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た。
- (2) 新規の宿主遺伝要因を探索する事を目的として、ヘプタバックス HB ワクチン(Heptavax-II)を接種した 1,193 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 99.23%となった。タイピング結果に基づいて、HB ワクチン応答性について GWAS を実施した。解析により関連候補 SNP がある場合は、DigiTag2 法または TaqMan 法を用いたタイピングの検証、および独立の検体による再現性の検証を行った。
- (3) HB ワクチン応答性に関連する *HLA* アリルの同定を目的として、(2)で取得したゲノムワイド SNP タイピングデータを用いた *HLA imputation* を実施した。ゲノムワイド SNP タイピングデータから MHC 領域を抽出し、HIBAG R パッケージを用いて日本人の健常者データを参照配列とした。

#### 4. 研究成果

- (1) ワクチン低反応群、ワクチン中反応群、ワクチン高反応群の 3 群に分けて GWAS を実施した。ワクチン低反応群と高反応群を比較した結果、*HLA class III* 領域に存在する *BTNL2* 遺伝子が有意な関連を示した。また 3 群を従属変数とした Multiple regression 解析を実施した結果、*HLA class II* 領域に存在する *DRB1-DQB1* ハプロタイプと *DPB1* アリルが HB ワクチン応答性に独立に関連することが示された。

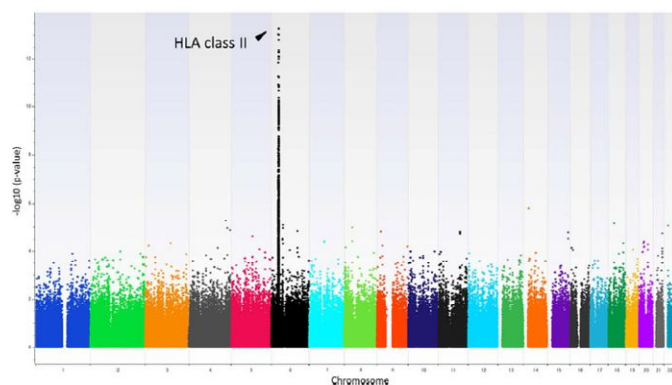


図1 HBワクチン低反応群、中反応群、高反応群のGWAS

- (2) ゲノムワイド SNP タイピングデータを用いた *HLA imputation* を実施し、*HLA* アリルおよびハプロタイプと HB ワクチン効果について関連解析を実施した。HB ワクチン低反応群における *HLA* アリルやハプロタイプの頻度を B 型慢性肝炎患者群 (815 例) と比較した結果、3 つの *DRB1-DQB1* ハプロタイプが有意な関連を示した。このことは、B 型慢性肝炎と HB ワクチンの応答性に寄与する *HLA* は互いに異なっていることを示している。つまり、HB ワクチン低反応に特異的に関わる *DRB1-DQB1* ハプロタイプが存在することを示唆する。一方で *DPB1* アリルについては HB ワクチン低反応群と B 型慢性肝炎患者群の比較では有意な関連を示さず、*DPB1\*05:01* を有すると抗体産生量が少なく B 型慢性肝炎になりやすい、*DPB1\*04:02* を有すると抗体産生量が多

く B 型慢性肝炎になりにくいという関係になっていることが明らかとなった。さらに HB ワクチン高反応群と健常対照群( 2,281 例 )について同様の比較をした結果、有意な関連を示す *HLA class II* 遺伝子 (*DRB1-DQB1* ハプロタイプ、*DPB1* アリル) は 1 つも存在しなかった。このことから *HLA class II* 遺伝子はワクチン高反応には寄与しないことが明らかとなった。ワクチン高反応群と低反応群の GWAS で *BTNL2* 遺伝子が検出されたことから、*BTNL2* 遺伝子はワクチン高反応に強く寄与していることが示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

全て査読あり

Hiroimi Sawai, Nao Nishida, Seik-Soon Khor, Masao Honda, Masaya Sugiyama, Natsumi Baba, Kayoko Yamada, Norie Sawada, Shoichiro Tsugane, Kazuhiko Koike, et al. Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports* (2018) 8(1): 7958.

Nao Nishida\*, Masaya Sugiyama\*, Hiroimi Sawai\*( \* equal contribution), Sohji Nishina, Aiko Sakai, Jun Ohashi, Seik-Soon Khor, Keisuke Kakisaka, Takayo Tsuchiura, Keisuke Hino, et al. Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the *BTNL2* gene for response to a hepatitis B vaccine. *Hepatology* (2018) 68(3): 848-858.

Kentaro Matsuura, Hiroimi Sawai, Kazuho Ikeo, Shintaro Ogawa, Etsuko Iio, Masanori Isogawa, Noritomo Shimada, Atsumasa Komori, Hidenori Toyoda, Takashi Kumada, et al. Genome-Wide Association Study Identifies *TLL1* Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* (2017) 152: 1383-1394.

Nao Nishida, Jun Ohashi, Seik-Soon Khor, Masaya Sugiyama, Takayo Tsuchiura, Hiroimi Sawai, Keisuke Hino, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Hiroshi Yatsushashi, et al. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Scientific Reports* (2016) 6:24767.

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. *The Pharmacogenomics Journal* (2015) 15(6):530-537.

〔学会発表〕(計 13 件)

澤井裕美、西田奈央、杉山真也、Seik-Soon Khor、溝上雅史、徳永勝士、B 型肝炎の癌化に関連する HLA クラス I 領域における新規遺伝要因の同定、第 27 回日本組織適合性学会大会、2018/9/22、国内、

西田奈央、杉山真也、澤井裕美、大橋順、Seik-Soon Khor、土浦貴代、徳永勝士、溝上雅史、B 型肝炎ワクチンの応答性に関わる *HLA-DRB1-DQB1* ハプロタイプと *BTNL2* 遺伝子、第 27 回日本組織適合性学会大会、2018/9/22、国内、

澤井裕美、西田奈央、杉山真也、Seik-Soon Khor、溝上雅史、徳永勝士、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎の癌化に関連する新規遺伝要因の同定、日本人類遺伝学会第 63 回大会、2018/10/12、国内、

西田奈央、杉山真也、澤井裕美、大橋順、Seik-Soon Khor、土浦貴代、徳永勝士、溝上雅史、B 型肝炎ワクチンの効果に対する *HLA class II* 遺伝子型の影響、日本人類遺伝学会第 63 回大会、2018/10/13、国内、

西田奈央、杉山真也、澤井裕美、Seik-Soon Khor、土浦貴代、徳永勝士、溝上雅史、B 型肝炎ワクチンの効果に関連する宿主因子の同定、日本人類遺伝学会 第 62 回大会、2017/11/16、国内

菊地 正隆、小林 香織、澤井 裕美、西田 奈央、杉山 真也、溝上 雅史、徳永 勝士、中谷 明弘、日本人集団における B 型肝炎の全ゲノムコピー数多型解析、日本人類遺伝学会 第 62 回大会、2017/11/16、国内、

Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Hiroimi Sawai, Jun Ohashi, Seik-Soon Khor, Takayo Tsuchiura, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami. GWAS identified associations of HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and *BTNL2* gene with response to a hepatitis B vaccine. *American Society of Human Genetics* 2017, 2017/10/18, 国外

Tokunaga K, Matsuura K, Sawai H, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, and Tanaka Y, Association of *TLL1* variant with hepatocellular carcinoma developed after eradication of hepatitis C virus. *American Society of Human Genetics* 2017.10, 国外 10/17-21

Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Hiroimi Sawai, Sohji Nishina, Aiko Sakai, Keisuke Kakisaka, Keisuke Hino, Ryo Sumazaki, Yasuhiro Takikawa, Kazumoto Murata, Tatsuo Kanda, Osamu Yokosuka, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami. HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and *BTNL2* gene associate with response to a hepatitis B

vaccine. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2017, 2017/10/22, 国外、

Hiromi Sawai, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Seik-Soon Khor, Masashi Mizokami and Katsushi Tokunaga. Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016/4/5.

Hiromi Sawai, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Seik-Soon Khor, Masashi Mizokami and Katsushi Tokunaga. Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. ASHG2016. 2016/10/19.

馬場奈津美、澤井裕美、西田奈央、杉山真也、Seik-Soon Khor、溝上雅史、徳永勝士、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎の癌化に関連する新規遺伝要因の同定、第 25 回日本組織適合性学会、2016/10/23.

西田奈央、澤井裕美、大橋順、Seik-Soon Khor、杉山真也、土浦貴代、石井真由美、徳永勝士、溝上雅史、日本人における B 型肝炎関連疾患と HLA 遺伝子の関連、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/12/2.

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 型肝炎の癌化に関連する新規遺伝要因の同定、第 51 回日本肝臓学会総会、2015/5/21.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。