

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870178

研究課題名(和文) B型肝炎の慢性化に関連する遺伝要因の探索

研究課題名(英文) Search for new risk gene for chronic hepatitis B

研究代表者

澤井 裕美 (Sawai, Hiromi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：60377124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、B型肝炎慢性化に関連する既知の遺伝要因(HLA)について詳細な検討を行うため、日本集団およびアジア集団の約3,200検体のHLA-DPタイピングを実施した。またB型肝炎慢性化における新規遺伝要因の探索を目的としたGWASを実施した。HLAタイピング結果を用いた関連解析により、これまでに報告されていない2つの抵抗性アリルおよび1つの感受性アリルで関連が示された。またアジア集団では異なる傾向も示された。一方GWASで見出された疾患関連候補遺伝要因については、いずれも再現性が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We performed trans-ethnic association analyses of HLA-DPA1, HLA-DPB1 alleles and their haplotypes with hepatitis B virus infection and healthy control samples among Asian populations comprising Japanese, Korean, Hong Kong, and Thai subjects. Association analyses identified a new risk allele HLA-DPB1*09:01, and new protective alleles DPB1*02:01 and DPB1*04:01 to chronic HBV infection in addition to the previously reported alleles. Moreover, to identify new host genetic factors contributing to HBV infection, we conducted genome-wide association study (GWAS) and replication analyses using Japanese, Korean, Hong Kong, and Thai individuals. We unfortunately did not replicate the GWAS result although we could identify 529 SNPs with $P < 10^{-4}$ in the GWAS stage.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：肝臓学 B型肝炎 疾患関連遺伝子

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。しかし GWAS ではそれ以外の強い遺伝要因は見つっていない。
- (3) B型肝炎慢性化と *HLA-DP* との関連についての詳細な検討は不十分であり、アジア集団においては詳細な検討がされていない。

2. 研究の目的

- (1) B型肝炎の慢性化に関連する既知の遺伝要因 (*HLA-DP*) について、日本人集団およびアジア集団での詳細な検討を行う。
- (2) B型肝炎慢性化に関連する新規遺伝要因の探索を行う。

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、収集した HBV 関連患者群 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、B型肝炎慢性化の 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。

4. 研究成果

- (1) *HLA-DP* 遺伝子の詳細な検討を目的とし、

日本人 HBV 患者群 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-DPB1* 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為、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。

(2) HBV 持続感染に関連する *HLA-DP* アリルを同定する為、日本人集団の HBV 患者群と健常者群の *HLA-DPB1* アリルの関連解析を行ったところ、*HLA-DBP1*05:01* (感受性アリル)、*HLA-DPB1*04:02* (感受性アリル) で有意な関連が見られ先行研究と同様の結果が得られた。また、それ以外にこれまでに報告されていない 2 つの抵抗性アリル (*HLA-DPB1*02:01*, OR = 0.71, P = 2.1x10⁻³; *HLA-DPB1*04:01*, OR = 0.34, P = 2.4x10⁻⁵) と 1 つの感受性アリル (*HLA-DPB1*09:01*, OR = 1.94, P = 3.7x10⁻⁶) で新たに関連が示された (表 1)。

表1 B型肝炎慢性化に関連するHLA-DPアリル

Japanese	Allele frequency		P-value	OR (95% CI)
	HBV patients (n = 976)	Healthy controls (n = 928)		
DPB1*02:01	0.186	0.245	0.0021	0.71 (0.56-0.89)
DPB1*02:02	0.031	0.040	>0.1	0.76 (0.45-1.28)
DPB1*03:01	0.049	0.043	>0.1	1.15 (0.73-1.81)
DPB1*04:01	0.020	0.058	2.38x10⁻⁵	0.34 (0.19-0.58)
DPB1*04:02	0.039	0.099	1.59x10⁻⁷	0.37 (0.24-0.55)
DPB1*05:01	0.467	0.386	0.0004	1.40 (1.16-1.68)
DPB1*09:01	0.157	0.087	3.70x10⁻⁶	1.94 (1.45-2.62)
DPB1*13:01	0.019	0.013	>0.1	1.52 (0.69-3.44)
DPB1*14:01	0.015	0.013	>0.1	1.19 (0.52-2.80)
others	0.015	0.016	>0.1	0.95 (0.46-1.95)

青: 抵抗性アリル

赤: 感受性アリル

(3) *HLA-DPA1* アリルと *HLA-DPB1* アリルの組み合わせ (ハプロタイプ) についても関連解析を実施したが、特定のハプロタイプで関連が相加的に強まる傾向は見られず、*HLA-DPB1* の特定のアリルが HBV 持続感染に対する感受性および抵抗性に重要であることが示唆された。また、抵抗性アリルをホモで有する場合とヘテロで有する場合を比較し、ヘテロで有する方がより有意な関連を示すことを明らかにした。感受性アリルについても同様の検討を行い、ヘテロでより有意な関連を示した。

(4) 韓国集団、香港集団、タイ集団においても *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 (*HLA-DPB1*05:01*, *-DPB1*04:02*) が感受性・抵抗性に関連する事が示され、香港集団では共通のアリル (*HLA-DPB1*02:01*) が抵抗性に関連する事が示された。タイ集団では、日本集団とは異なるアリルの関連が示された。

(5) 約 60 万 SNP を搭載する免疫関連遺伝子群を含む Affymetrix 社のカスタムアレイのデザインを行った。このアレイは選択した免疫関連遺伝子上流領域および下流領域をそれぞれ 50kb ずつカバーしている。

(6) B 型肝炎の慢性化に関連する新規の遺伝的要因探索を目的として、B 型慢性肝炎患者群および無症候性 HBV キャリア群 (計 523 検体) をケース群、健常者群 (計 640 検体) をコントロール群として新規 GWAS を実施した。P<10⁻⁴を示す SNP は 529 か所見られ、そのうち既報の *HLA-DP* 領域が位置する HLA 領域に位置する SNP は 471 か所にのぼった。HLA 領域以外の SNP のうち、P<10⁻⁵を示す 5SNP について、独立の検体を用いた再現性の検証を、日本集団 1,562 検体、韓国集団 328 検体、香港集団 377 検体、タイ集団 324 検体を用いて実施したが、いずれの SNP でも再現性は得られなかった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

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.* 24 February 2015 [Epub]; doi: 10.1038/tpj.2015.4

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 (* equal contribution). 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

(学会発表)(計 8 件)

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的要因の探索、第 50 回 日本肝臓学会総会、東京、2014

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

Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouichi 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

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

西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、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 遺伝子のアジア人集団における横断的解析、日本人類遺伝学会 第 58 回大会、仙台、2013

西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、徳永勝士、溝上雅史、アジア人集団における B 型肝炎患者を対象とした HLA-DP 遺伝子の横断的解析、第 36 回日本分子生物学会年、神戸、2013

Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, 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, Yoriko Mawatari, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2013, Washington DC, 2013

澤井裕美、西田奈央、松田浩一、馬渡頼子、田中靖人、溝上雅史、徳永勝士、中国集団におけるHBV陽性肝癌感受性候補SNPの東アジア集団での検証、第49回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.7.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

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
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/072649
出願年月日：平成26年8月28日
国内外の別：海外

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
権利者：同上
種類：特許
番号：特願2013-179634
出願年月日：平成25年8月30日
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.humgenet.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤井 裕美 (SAWAI, Hiromi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：60377124