

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860536

研究課題名(和文) ウイルスセンシング経路の遺伝的多様性がウイルス性肝疾患の進展に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) The investigation of genetic polymorphisms in viral-sensing pathway affecting development of diseases caused by hepatitis viruses.

研究代表者

三木 大樹 (MIKI, Daiki)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：10584592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAウイルスであるB型肝炎ウイルス(HBV)とRNAウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)では、感染初期のウイルス認識機構が異なっている。本研究では、感染初期に重要な分子群の遺伝子多型について検討を行った。近年、HBVの感染レセプターとして見出されたNTCPの機能的アミノ酸変異S267Fを解析したところ、日本人では稀であり、感染成立や病態進展における重要性を示唆する結果は得られなかった。また、HCVセンサーとして知られるRIG-Iの発現量調節性SNPについて解析した結果、HBVセンサーとしても機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are distinct mechanisms for viral sensing in the early phase of infection with hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV). The former is DNA virus and the latter is RNA virus. In this study, we investigated genetic polymorphisms in viral sensing pathway affecting development of diseases caused by hepatitis viruses. NTCP was recently identified as a hepatocyte receptor for HBV. It has been reported that the amino acid substitution S267F, which corresponds to a single nucleotide polymorphism (SNP) rs2296651, of NTCP is defective in HBV receptor function. However, we found that the SNP is rare and could not find any genetic association between the SNP and HBV persistence nor development of HBV-induced HCC in Japanese population. We also investigated polymorphism of viral RNA sensor RIG-I, and found a supportive data for the theory that RIG-I functions not only as a RNA sensor but as a DNA sensor.

研究分野：肝臓病学、ゲノム医科学、ウイルス学

キーワード：SNP

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々をはじめ、国内外の研究グループからのゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、肝炎ウイルス (HBV・HCV) の慢性感染や自然排除、HCV のインターフェロン (IFN) 治療応答性、HCV 関連肝硬変、HBV・HCV 関連肝癌の各病態において、MHC 領域に存在する HLA や MICA、IFNL4 あるいは IL28B などの免疫応答に関わる遺伝子の重要性が、一塩基多型 (SNP) という個人個人の持つ遺伝的多様性の検討から示されてきた。つまり、感染初期のウイルスセンシング～免疫応答の経路に存在する遺伝的多様性が疾患の種々の表現型形成において非常に重要な役割を果たしており、それが病気の進行や薬の効き具合など、さまざまな個人差を生み出す要因となっていることが示唆されている。

(2) その一方で、機能的な解析から、肝炎ウイルス感染初期における免疫応答経路の全容が徐々に明らかとなってきた。特に、肝細胞内に侵入したウイルスを認識すること (ウイルスセンシング) から始まり、IFN をはじめとしたサイトカイン産生、さらに引き続いて IFN 誘導遺伝子 (ISGs) 産生とつながる自然免疫系の全容は、今まさに明らかとなりつつあるところで、非常に注目の集まる分野である。

2. 研究の目的

(1) ウイルス性慢性肝炎の病態進展に関わる遺伝子多型が最近のゲノムワイド関連解析により明らかとなってきたが、それらは自然免疫系の重要性を示唆していた。また、機能的な解析からも、DNA および RNA 両ウイルスのセンシング機構の全容と重要性が明らかとなりつつあるが、その遺伝的多様性とウイルス性肝炎の病態進展との関連は明らかになっていない。本研究では、機能的にも重要性が示唆されるウイルスセンシング機構の遺伝的多様性 (SNP) あるいはウイルス側の因子や他の環境要因との間の相互作用を遺伝学的側面から解析して、臨床に有用な情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究においては、これまでの GWAS 研究で収集してきた大規模なサンプルおよび付随する詳細な臨床情報を主に活用して、効率的に多数例の解析を行った。

(2) 感染初期に重要と想定されるウイルスセンシング～免疫応答の経路にのる分子群に照準を絞り、それらの遺伝子多型 (SNP) について、Invader アッセイを中心とした高速タイピングを行った。具体的には、HBV レセプターの最有力候補として注目される NTCP、HBV/HCV 両ウイルスの DNA/RNA センサーの可能性が指摘されている RIG-I、さらに TLR ファミリー、それに引き続いて動くイン

ターフェロン誘導遺伝子群 (ISGs)、IRF や STAT ファミリー、インターロイキン、サイトカイン群について、発現量調節に関わる SNP やその遺伝子を含むゲノム領域をカバーするタグ SNP を適宜選択し、SNP タイピングを行った。

(3) 得られた結果について、表現型との関連を統計学的に解析した。また、独立したサンプルセットによる再現性の確認を適宜行った。遺伝的背景が比較的均一な日本人では、集団内に潜在する人種差などの影響は少ないと考えられるため、SNP-表現型関連解析を行うには有利であるという推定のもとに行った。また、解析候補 SNP を絞った上で、大規模なサンプルサイズを用いることで、既報から予測されるオッズ比 1.2~1.5 程度の SNP についても十分な統計学的検出力を保てるように意図した。

4. 研究成果

(1) 新規 HBV レセプターとして注目されている NTCP については、アジア人特有かつアジア人の間でも頻度差のある機能的アミノ酸変異 S267F (rs2296651) が報告されていた。本研究において、2,000 例超の日本人 B 型慢性肝炎群と 5,000 例超の非肝炎対照群の解析を行ったところ、両群間に有意な SNP 頻度の差は認められなかった (図 1)。

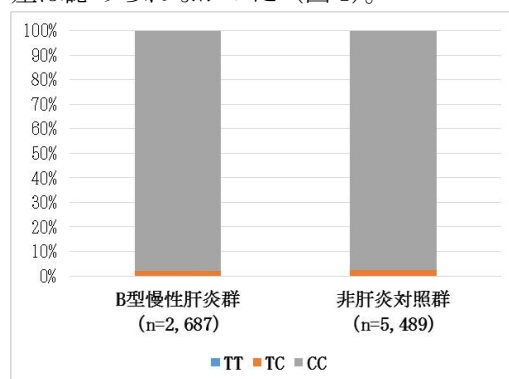


図 1. B 型慢性肝炎と rs2296651 の関連

また、B 型慢性肝炎群内で、肝発癌した症例としなかった症例との比較も行ったが、有意な差は認められなかった (図 2)。

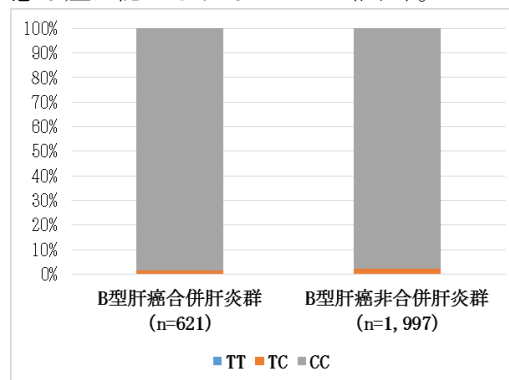


図 2. B 型肝炎と rs2296651 の関連

これらの結果は、年齢や性別などを調整した上でも、同様であった。今回の検討では有意な関連性が認められなかったものの、日本人における同 SNP の頻度が低いことによる検出力不足の可能性が排除しきれないため、この結果が即、NTCP および S267F アミノ酸変異の機能的重要性を否定するものというわけではない。

一方で、NTCP のイントロンにある rs4646287 が B 型肝炎発症リスクと関連するという中国人集団での研究結果が報告されており、同 SNP は 1000 ゲノムデータベース上、中国人 (10%) よりも日本人で頻度が高い (15%) とされていたため、我々も日本人集団で解析を行った。しかし、B 型肝炎発症との有意な関連は認められなかった (図 3)。

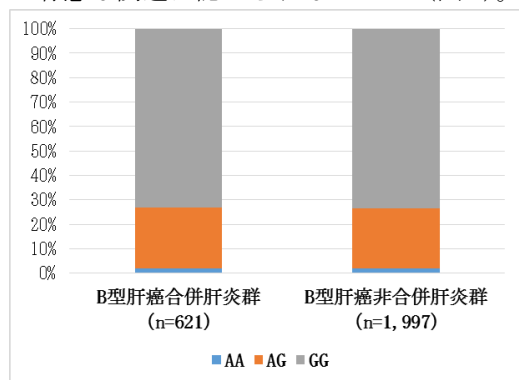


図 3. B 型肝炎と rs4646287 の関連

さらに、NTCP を含む 100kb のゲノム領域から選定した 15 個のタグ SNP も同様に検討を追加したものの、ここでも NTCP の遺伝的多様性と B 型肝炎あるいは肝発症との関連を示すような結果は得られなかった。

(2) RIG-I について発現量調節性 SNP について解析を行った結果、HBV 感染との関連を認め、RIG-I が RNA ウイルスである HCV のみならず、DNA ウイルスである HBV に対してもセンサーとして機能する可能性を支持する結果を得ることができた。

(3) HCV 慢性感染成立に重要な役割を果たす IFNL4 あるいは IL28B の遺伝子多型と、インターフェロン誘導遺伝子の一つである OAS1 近傍の遺伝子多型とが独立して OAS1 遺伝子発現量を調節していることを明らかにした。

(4) すでに、HLA-DQ 遺伝子多型が IFNL4 あるいは IL28B 遺伝子多型とともに HCV 感染初期の免疫応答に重要な役割を果たすことを報告していたが、さらに、この両多型間に相関関係が存在し、かつこの現象は C 型肝炎患者群 (HCV ジェノタイプ 1) のみで見られ、非感染対照群では見られない、ことも報告していた。今回、3,500 例の HCV ジェノタ

イプ 1 慢性肝炎群を用いて、この相関関係の再現性を確認することができた。対して、HCV ジェノタイプ 2 慢性肝炎群 1,600 例を用いた検討では、相関関係を認めず、両遺伝子多型の相互作用は HCV ジェノタイプによって異なるものと考えられた。

(5) 直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) における IFNL4 遺伝子多型の意義を検討して、薬剤耐性変異ウイルスとの相関関係を見出していたが、その情報を参照することで DAA 治療がより有効に施行可能であることを明らかにした。

(6) HCV 感染成立において miR-122 の重要性が知られているが、HBV 感染において血清中 miRNA 量と関連する SNP も検索した結果、有望なものを同定することはできなかった。

(7) その他、TLR ファミリー、インターフェロン誘導遺伝子群、IRF や STAT ファミリー、インターロイキン、サイトカインなどの発現量調節性 SNP についても網羅的に検討を行ったが、特定の表現型と再現性をもって有意に関連するものは同定されなかった。

(8) 以上のように、ウイルスセンシング経路を中心に遺伝的多様性とウイルス性肝疾患の進展との関連について、ウイルス側因子や他の環境因子、他の宿主因子を含めた遺伝学的解析を行った結果、いくつかの興味深い結果を得ることができた。ここ数年の間で HCV 治療は急速に進歩し、HCV 完全排除の目処がたちつつある。治療困難例や HCV 排除後の発症などの残された課題、さらに今なお完全排除が困難な HBV に対しては、ウイルス因子側のみならず宿主因子側からのアプローチによる新規治療法の開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Nakamura Y, Imamura M, Kawakami Y, Teraoka Y, Daijo K, Honda F, Morio K, Kobayashi T, Nakahara T, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Aikata H, Hayes CN, Miki D, Ochi H, Chayama K. Efficacy and safety of daclatasvir plus asunaprevir therapy for chronic hepatitis C patients with renal dysfunction. *J Med Virol.* 2017;89(4):665-71. (査読有) doi: 10.1002/jmv.24679.
- ② Morio R, Imamura M, Kawakami Y, Morio K, Kobayashi T, Yokoyama S, Kimura Y, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Nelson Hayes C, Aikata H, Takahashi

- S, Miki D, Ochi H, Mori N, Takaki S, Tsuji K, Chayama K. Safety and efficacy of dual therapy with daclatasvir and asunaprevir for older patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2017;52(4):504-11. (査読有) doi: 10.1007/s00535-016-1255-4.
- ③ Morio K, Imamura M, Kawakami Y, Morio R, Kobayashi T, Yokoyama S, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Makokha GN, Hayes CN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Honda Y, Mori N, Takaki S, Tsuji K, Chayama K. Real-world efficacy and safety of daclatasvir and asunaprevir therapy for hepatitis C virus-infected cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(3):645-50. (査読有) doi: 10.1111/jgh.13511.
- ④ Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Hayes CN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Honda Y, Takaki S, Tsuji K, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group. IFNL4 polymorphism effects on outcome of simeprevir, peginterferon and ribavirin therapy for older patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2017;47(3):E5-13. (査読有) doi: 10.1111/hepr.12715.
- ⑤ Yoshimi S, Ochi H, Murakami E, Uchida T, Kan H, Akamatsu S, Hayes CN, Abe H, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Rapid, Sensitive, and Accurate Evaluation of Drug Resistant Mutant (NS5A-Y93H) Strain Frequency in Genotype 1b HCV by Invader Assay. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130022. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0130022.
- ⑥ Akamatsu S, Hayes CN, Ochi H, Uchida T, Kan H, Murakami E, Abe H, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. Association between variants in the interferon lambda 4 locus and substitutions in the hepatitis C virus non-structural protein 5A. *J Hepatol*. 2015;63(3):554-63. (査読有)
- ⑦ Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group. Ribavirin dose reduction during telaprevir/ribavirin/peg-interferon therapy overcomes the effect of the ITPA gene polymorphism. *J Viral Hepat*. 2015;22(2):166-74. (査読有) doi: 10.1111/jvh.12275.
- 他、10件
- [学会発表] (計27件)
- ① Miki D, et al. Japanese genetic study could not suggest the importance of the NTCP locus for HBV persistence. The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL2016). 2016/2/22. Grand Prince Hotel New Takanawa. Minato-ku, Tokyo (Japan)
- ② Miki D, et al. Genetic association study failed to confirm an association between the NTCP S267F mutation and persistence of hepatitis B virus or development of hepatocellular carcinoma in the Japanese population. The Liver Meeting 2015. 2015/11/16. San Francisco (USA)
- ③ Miki D, et al. Genome-wide scan of miRNA polymorphisms revealed a suggestive association of miR-3143 with chronic hepatitis B virus infection. The Liver Meeting 2015. 2015/11/16. San Francisco (USA)
- ④ Miki D, et al. The impact of HLA-DQs and IFNL4 variant on hepatitis C virus-induced liver inflammation. The Liver Meeting 2015. 2015/11/15. San Francisco (USA)
- ⑤ Miki D, et al. The IL28B SNP has a stronger regulatory effect on the expression of OAS1 than a nearby SNP located downstream of OAS1 in chronic HCV patients. The Liver Meeting 2014. 2014/11/11. Boston (USA)
- 他、22件
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
三木 大樹 (MIKI, Daiki)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・副チームリーダー
研究者番号: 10584592
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者
- (4) 研究協力者