

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19345

研究課題名(和文) 肝発癌例での次世代シーケンサーを用いたHBV遺伝子変異と宿主遺伝子多型の解析

研究課題名(英文) Analysis of association between genetic heterogeneity of HBV, and SNPs determined by Next-Generation-Sequencing and HCC development after the initiation of nucleos(t)ide analogue treatment

研究代表者

小塚 立蔵 (kozuka, ritsuzo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10726657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸アナログ開始後の肝発癌例の特徴を、1)臨床的要因、2)ウイルス側要因、3)宿主側要因の観点から検討した。1)臨床的要因は、肝硬変例や肝線維化マーカー(APRI)高値例で肝発癌が多いことが示された。2)ウイルス側要因は、次世代シーケンサーでHBV遺伝子変異を網羅的に解析した。全ゲノムのうち、polymerase領域のアミノ酸変異が、肝発癌に関与していることが示唆された。3)宿主側要因は、リアルタイムPCR法で宿主遺伝子多型(SNP)を網羅的に解析した。18種類のSNPのうち、HLAにおけるSNPが肝発癌に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) development after the initiation of nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B patients from a viewpoint of clinical, viral, and host factor. First, liver cirrhosis status and high serum fibrosis marker levels at baseline were the significant risk factors of developing HCC. Second, we analyzed genetic heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) by Next-Generation-Sequencing. Of the HBV full-length sequences, amino acid substitution in the polymerase region was significantly associated with HCC development. Third, we examined single nucleotide polymorphisms (SNP) by the Real-Time PCR Assay. Our results suggested that SNP in HLA gene was significantly associated with HCC development among 18 SNPs.

研究分野：肝臓学

キーワード：B型肝炎 核酸アナログ 肝発癌 次世代シーケンス ウイルス遺伝子変異 宿主遺伝子多型 肝硬変 肝線維化マーカー

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus; HBV) 遺伝子は約 3,200 塩基の不完全環状二重鎖 DNA であり、肝細胞に感染後に閉環し、宿主 DNA polymerase によって完全二本鎖 DNA となり、トポロジーによって covalently closed circular DNA (cccDNA)となる。この cccDNA が核内に存在し、ここから pregenome RNA や mRNA が作られ、ウイルスが複製される。核酸アナログ(nucleos(t)ide analogue; NA)は HBV に対して強い複製抑制効果を有し、血中の HBV DNA 量を低下させるだけでなく、肝発癌抑制効果も報告されている(Liaw YF, et al. *N Eng J Med* 2004)。一方、NA の長期投与に伴い、肝細胞癌の発生も報告されている(Hosaka T, et al. *Hepatology* 2013)。

NA 投与例では非投与例と比較して肝発癌は有意に抑制されることが報告されている。一方、NA の長期投与により肝炎は沈静化されるにも関わらず、依然として発癌を認めるため、肝発癌危険因子の網羅的な検討が必要である。我々は、すでに NA 開始後の肝発癌例の臨床背景因子については検討しており、肝硬変例は慢性肝炎例と比べて、発癌率が有意に高いことを明らかにしている(OR 6.30、95%CI 1.17-34.1、 $p=0.033$)。

(1) 肝発癌に対するウイルス側要因

HBV 遺伝子変異と肝発癌との関係性について、preS/S領域の遺伝子変異(Zhang KY, et al. *Cancer Sci* 2007)、precore(preC)領域の変異(G1,896A)および core promoter (CP)領域の変異(A1,762T/G1,764A)(Yuen MF, et al. *Gut* 2008)、HBx 遺伝子領域の変異が肝発癌と関連するとされるが、HBV 全塩基配列を対象に解析がなされている訳ではなく、特に NA 投与では薬剤応答の関連性から DNA polymerase 領域の一部のみしか解析が行われていないのが現状である。

(2) 肝発癌と宿主側要因

HBV における肝発癌と関連する一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)の報告として、中国からは1番染色体上のKIF1B 遺伝子内の SNP(rs17401966)(Zhang H, et al. *Nat Genet* 2010)、6番染色体上のHLA-DQA1/DRB1 遺伝子内の SNP(rs9272105)(Li S, et al. *PLoS Genet* 2012)、21番染色体上のGRIK1 遺伝子内の SNP(rs455804)(Li S, et al. *PLoS Genet* 2012)が挙げられる。MICA 遺伝子の SNP(rs2596542)(Kummar V, et al. *PLoS One* 2012)は B 型肝炎関連肝発癌にも関係しているとの報告もある。以上のように、自然経過例において、種々の SNP が HBV 肝発癌と関連しており、NA 投与例での発癌との関係性についても検討すべきである。

(3) 肝発癌と環境因子

B 型肝炎慢性肝疾患からの肝発癌には上記の因子以外に環境因子として、飲酒歴、糖尿病歴、

肥満が挙げられる(Chen CL, et al. *Gastroenterology* 2008)。

2. 研究の目的

HBV の遺伝子変異が、肝発癌に影響を与えるかどうか、さらにはウイルス側要因だけでなく、肝発癌に寄与する宿主側要因を明らかにする目的で、NA 投与例での、肝発癌と HBV 全遺伝子配列および宿主遺伝子多型との関連性を検討するために、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行う。

3. 研究の方法

大阪市立大学附属病院に通院中の B 型肝炎慢性肝疾患患者のうち NA 投与後に発癌した症例としなかった症例を比較し、(1)臨床的要因、(2)ウイルス側要因、(3)宿主側要因から発癌症例の特徴を明らかにする。

(1) 臨床的要因の検討

対象は B 型肝炎慢性肝疾患に対してエンテカビル(ETV)を1年以上投与した138例(47±13歳、男性65%、HBeAg陽性51%、ALT 115(16-2,605) IU/L、HBV-DNA 7.2(2.9- >9.1) log copies/mL、遺伝子型 C 87%、CH/LC 117/21)である。1) ETV 開始後の累積発癌率を検討した。2) 宿主因子(年齢、性別、LC、HCC 家族歴、血小板、総ビリルビン、アルブミン、AST、ALT、GTP、AFP)、ウイルス因子(HBeAg、HBsAg、HBV-DNA、遺伝子型)、環境因子(BMI、飲酒歴、喫煙歴、糖尿病、IFN 治療歴)のうち、肝発癌に寄与する因子を解析した。3) 肝線維化マーカーについては、血清マーカー(ヒアルロン酸、P-III-P、IV 型コラーゲン、M2BPGi、APRI、FIB-4 index)および Fibroscan®による liver stiffness(LS)を因子として肝発癌との関係性を検討した。

(2) ウイルス側要因の検討(HBV 遺伝子変異の関連性)

(1)の症例のうち、ETV 開始時に血清を採取・保存できた115例を対象とした(発癌例10例、非発癌例105例)。NA 開始時の保存血清を用いて、HBV のゲノム DNA を抽出し、イルミナ Miseq による ultra-deep sequencing を行った。HBV 全塩基配列を CLC Genomic Workbench と Genenious によって解析した。NA 開始後の肝発癌例と非発癌例を比較し、肝発癌と HBV 遺伝子変異の関連性を検討した。

(3) 宿主側要因の検討(宿主遺伝子多型の関連性)

(1)の症例のうち、全血を採取・保存できた127例を対象とした(発癌例10例、非発癌例117例)。NA 投与例の全血を用いて、報告されている下記18種類の SNP と肝発癌の関連性を検討した。解析法は、多数の SNP を解析するため、Real-Time PCR Assay(TaqMan SNP Genotyping Assay)に変更した。

KIF1B : rs17401966
 GRIK1 : rs455804
 MICA : rs2596542
 STAT4 : rs7574865
 PNPLA3 : rs738409
 TCF19 : rs1419881
 LOC101929604 : rs2275959
 DEPDC5 : rs1012068
 C2 : rs9267673
 GLB1 : rs4678680
 SLC10A1 : rs2296651
 HLA-DPA1 : rs3077
 HLA-DPB1 : rs9277535
 HLA-DQB1 : rs2856718
 HLA-DQB2 : rs7453920
 HLA-DQ : rs9275572
 HLA-DQA1/DRB1 : rs9272105
 HLA-DQA2 : rs9276370

4. 研究成果

(1) 1) ETV 開始後 3.5(1.0-8.8)年に、10 例 (56±9 歳、男性 60%、HBeAg 陽性 60%、ALT 71(24-151) IU/L、HBV-DNA 6.8(4.7-8.9) log copies/mL、LC 60%)の発癌を認めた。ETV 開始後の累積発癌率は、3/5/7 年で 6.6/10.0/13.9%であった。2) 累積発癌率は、LC (p=0.001)で有意に高かったが(図 1、表 1)、ウイルス因子(表 2)や環境因子(表 3)の関与は低かった。3) 累積発癌率は、P-III-P 1.5 U/mL(p=0.006)、APRI 3.7(p=0.014)、FIB-4 index 2.6(p=0.021)で有意に高かった(表 4)。4) Cox 比例ハザードモデルを用いた検討では、LC(HR 5.890、95%CI 1.646-21.077、p=0.006)、APRI 3.7(HR 3.859、95%CI 1.081-13.779、p=0.038)が肝発癌に寄与する因子として抽出された(表 5)。

図 1 ETV 開始後の累積発癌率 (肝硬変 vs 慢性肝炎)

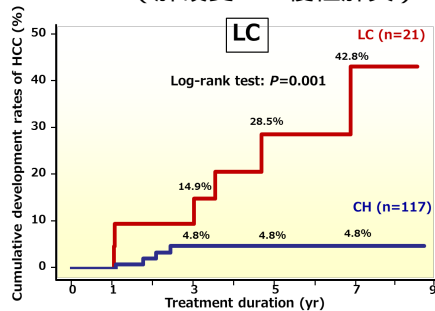


表 1. 肝発癌に寄与する因子 (単変量解析) <宿主因子>

Factor (宿主因子)	Category	HR	95%CI	P
Age (years)	≥50	3.458	0.890-13.429	0.073
Gender	Male	0.760	0.214-2.698	0.67
LC	LC	6.317	1.774-22.496	0.005
HCC family history	(+)	2.330	0.494-11.004	0.29
AST (IU/L)	≥70	0.952	0.275-3.293	0.94
ALT (IU/L)	≥70	0.455	0.131-1.589	0.22
γGTP (IU/L)	≥40	0.910	0.256-3.235	0.88
Total bilirubin (mg/dL)	≥0.9	2.113	0.595-7.496	0.25
Albumin (g/dL)	≥4.0	1.425	0.366-5.550	0.61
Platelet count (×10 ⁴ /mm ³)	≥19	0.456	0.097-2.153	0.32
AFP (ng/mL)	≥8.0	2.704	0.763-9.586	0.12

表 2. 肝発癌に寄与する因子 (単変量解析) <ウイルス因子>

Factor (ウイルス因子)	Category	HR	95%CI	P
Genotype	C	-	-	0.25
HBeAg	positivity	1.599	0.450-5.690	0.47
HBsAg (log IU/mL)	≥3.5	0.879	0.254-3.040	0.84
HBV-DNA (log copies/mL)	≥6.7	1.081	0.304-3.837	0.90

表 3. 肝発癌に寄与する因子 (単変量解析) <環境因子>

Factor (環境因子)	Category	HR	95%CI	P
BMI (kg/m ²)	≥22.0	2.153	0.555-8.348	0.27
Alcohol consumption	(+)	0.539	0.068-4.263	0.56
Cigarette smoking	(+)	1.182	0.333-4.193	0.80
Diabetes mellitus	(+)	3.744	0.792-17.708	0.096
Previous IFN therapy	(+)	0.949	0.201-4.470	0.95

表 4. 肝発癌に寄与する因子 (単変量解析) <肝線維化因子>

Factor (肝線維化因子)	Category	HR	95%CI	P
Hyaluronic acid (ng/mL)	≥100	0.976	0.275-3.460	0.97
P-III-P (U/mL)	≥1.5	5.556	1.420-21.736	0.014
Type 4 collagen (ng/mL)	≥200	2.307	0.646-8.236	0.20
M2BPGI (COI)	≥1.1	1.562	0.440-5.547	0.49
APRI	≥3.7	4.313	1.208-15.407	0.024
FIB-4 index	≥2.6	4.309	1.113-16.683	0.034
Liver stiffness (KPa)	≥9.0	1.999	0.385-10.395	0.41

表 5. 肝発癌に寄与する因子 (多変量解析)

Factors	Category	HR (95%CI)	P
LC	CH	1	0.006
	LC	5.890 (1.646-21.077)	
APRI	<3.7	1	0.038
	≥3.7	3.859 (1.081-13.779)	

(2) 肝発癌と HBV 遺伝子変異の検討

P 遺伝子、preC 遺伝子、S 遺伝子、X 遺伝子、CP 遺伝子がコードする蛋白のアミノ酸配列を発癌例と非発癌例に分け、有意水準を 0.05 として変異が見られた残基の数で Bonferroni の補正を行った上でフィッシャーの正確確率検定を行った。その結果、P タンパク質のアミノ酸が、発癌例と非発癌例で有意に異なることが判明した (p=0.000133)。この P タンパク質のアミノ酸は、非発癌例では野生型と変異型を持つウイルスがほぼ同数観察されたが、発癌例では、すべての症例が変異型または混合型であった。また、全ゲノムについて同様の解析を行ったが、発癌例と非発癌例で統計的に有意な差が見られたのは、P タンパク質のアミノ酸のみであった。

(3) 当初解析対象とした 18 種類の SNPのうち、C2/GLB1/SLC10A1/HLA-DQA2 の 4 種類は、ほぼ single allele であったため、14 種類の SNP で肝発癌との関係を検討した。各 SNP 別の累積発癌率を、 Kaplan-Meier 法 (log-rank test)、さらにコックス比例ハザードモデルを用いて、肝発癌に寄与する SNP を検討した。各 SNP 別に肝発癌率を検討したところ、HLA における SNP が、有意に肝発癌と関係していることが判明した (p=0.0092)。一方、KIF1B、GRIK1、MICA、STAT4、PNPLA3、TCF19、LOC101929604、DEPDC5 などの HLA 以

外の SNP は、ETV 開始後肝発癌との関連性を認めなかった。

以上より、ETV 開始後の肝発癌例は、肝硬変例や肝線維化マーカー高値例に多いことが示された。肝硬変例では抗ウイルス治療開始後も厳重な経過観察が必要である。また、肝線維化マーカーは、ETV 開始後の肝発癌予測に有用なマーカーであり、特に APRI 高値例では、肝発癌例が多いことが示唆される。次世代シーケンサーを用いて、HBV 全塩基配列を対象としたが、既知の preS/S 領域、preC および CP 領域、HBx 遺伝子領域の変異は、ETV 開始後肝発癌との関係性は認めなかった。一方、polymerase 領域のアミノ酸変異との強い相関を新たに認めた。

既知の GWAS で報告されている SNP を用いた検討では、HLA における SNP が、ETV 開始後肝発癌と関係していることが示唆された。既知の報告は、単に発癌例と非発癌例の比較であったが、本検討は、ETV 開始後という条件下で肝発癌との関係性がある SNP が見出したことは新規性が高いと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

小塚立蔵、榎本大、河田則文. 肝線維化マーカーから見たエンテカビル開始後の肝発癌危険因子の検討. 日本肝臓学会西部会. 2015年12月4日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小塚立蔵 (KOZUKA, Ritsuzo)
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号：10726657

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし