

令和元年5月10日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09387

研究課題名(和文) B型慢性肝炎とHLA class II遺伝子との関連の包括的理解を目指す研究

研究課題名(英文) Comprehensive understanding for the relationship between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection

研究代表者

西田 奈央(Nishida, Nao)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：50456109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GWASによりB型肝炎ワクチン(HBワクチン)の応答性およびHBV由来肝臓に関わるホスト因子を同定した。ビームゲンに対する応答性には、特定のHLA class II遺伝子型が関連しており、さらにBTNL2遺伝子がワクチン高反応に寄与することを明らかとした。ワクチン応答性について詳細な臨床情報に基づくゲノム解析(パスウェイ解析、上流因子解析)を実施した結果、HBワクチン応答性にはHLA分子によるHBV由来ペプチド抗原の認識やT細胞上のBTNL2分子などの副刺激分子を介した抗原提示細胞からの共刺激シグナルの伝達が重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビームゲン接種者のうち約10%はその中和抗体であるHBs抗体を十分に獲得できないという問題がある。B型肝炎は血液汚染により引き起こされる疾患であるため、特に肝移植患者や医療従事者におけるHBs抗体陰性は早急な解決が求められる非常に重大な問題である。本研究で明らかとなったHBワクチン応答性に特異的に関連するHLA class II分子やワクチン高反応に関わるBTNL2分子を介したHBs抗体産生の機序を明らかにすることで、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)：By conducting GWAS, the following were identified: host factors concerning responsiveness of hepatitis B vaccine (HB vaccine) and HBV related liver cancer. Specific HLA class II genotypes were associated with the responsiveness to Bimmugen, which is one of the widely used hepatitis B vaccine (HB vaccine) in Japan. Moreover, we revealed that BTNL2 gene contributed to the high response to the vaccine. Genome analysis (i.e. pathway analysis, upstream regulator analysis) based on detailed clinical information on vaccine responsiveness showed that recognition of HBV-derived peptide antigens by HLA molecules and transmission of costimulatory signals from antigen-presenting cells via costimulatory molecules such as BTNL2 molecules on T cells play important roles in HB vaccine responsiveness.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：B型肝炎 HLA GWAS HBワクチン

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

1. 研究開始当初の背景

わが国のウイルス性慢性肝炎患者の総数は 100 万人から 200 万人、無症候性キャリアを含めると 300 万人を超えると推計される。このうち B 型肝炎ウイルス (HBV) を原因とするものは約 20% を占めると推計されている。B 型肝炎の予後・治療を規定する因子は、ホスト因子、ウイルス因子、環境因子など大きく 3 つに分けられ、ウイルス因子としては、ウイルス量・precore / core promoter の変異・HBV genotype などが挙げられる。成人で HBV に感染すると、その約 1 割が無症候性キャリアとなり、残りの 9 割が急性肝炎を発症した後に治癒するものと考えられていた。しかしながら、近年になって増加してきた欧米型の HBV genotype A による急性肝炎は、わが国の大部分を占める genotype B ならびに genotype C に比べて、慢性化しやすいと報告されている。一方で、母子感染による HBV 感染では、幼児期には肝炎を起こさずに無症候性キャリアとして経過し、思春期以降になって肝炎を発症するものの、慢性肝炎に移行するのはそのうちの 10-20% 程度であることが知られている。慢性肝炎は、肝硬変や肝発癌のリスク因子となることから、HBV キャリアの中で慢性肝炎に移行する患者を予測し予防することは、患者の治療にかかる経済的・肉体的なリスクを軽減することにつながる。

2009 年に鎌谷らのグループは、B 型肝炎に有意な関連を示す宿主因子として、HLA-DP 遺伝子を報告した (Kamatani et al. 2009)。さらに同じグループは、検体数を増やした GWAS を実施し、HLA-DQ 遺伝子領域を新たな B 型肝炎慢性化の関連遺伝子として報告した (Mberek et al. 2011)。我々は、先行研究とは独立の日本人 B 型肝炎患者群 437 検体、健常対照群 420 検体、無症候性キャリア群 335 検体を用いた GWAS を実施し、HLA-DP 遺伝子が B 型肝炎だけでなく、HBV 排除にも寄与することを明らかにした。また、我々は B 型肝炎および HBV 排除に対する HLA-DP 遺伝子の寄与が、広くアジアの集団 (日本、韓国、タイ、中国) で再現されることを報告した。一方、ドイツ人集団では HLA-DP 遺伝子と B 型肝炎の関連が再現されないと報告されたことから (Vermehren et al. 2012)、アジア人集団 (日本、韓国、タイ、香港) の B 型肝炎患者 3,167 検体を対象として HLA-DPB1 タイピングを実施した。その結果、B 型肝炎に対して感受性の関連を示す HLA-DPB1*09:01 と*05:01、および抵抗性の関連を示す HLA-DPB1*02:01、*04:01、*04:02 を同定した。これらのうち、DPB1*09:01 と*02:01 は我々が新たに同定し、報告したアリルとなる。加えて、DPB1*02:01 が肝発癌に対しても抵抗性の関連を示すことを世界に先駆けて明らかにした。また、DPB1 遺伝子型と慢性肝炎との関連解析の結果、(1) 感受性 DPB1 アリルまたは抵抗性 DPB1 アリルを 1 つ有する症例よりも 2 つ有する症例で関連が相加的に強くなること、(2) 感受性もしくは抵抗性 DPB1 アリルをヘテロ接合体で有する症例はホモ接合体で有する症例よりも強い関連を示すこと、(3) DPB1*05:01 (感受性) と抵抗性 DPB1 アリル (DPB1*02:01、DPB1*04:01、DPB1*04:02) のいずれかをヘテロ接合体で有する症例では、B 型肝炎に対して抵抗性の関連 (抵抗性 DPB1 アリルの優性効果) を示すこと、を明らかにした。さらに、HLA-DR、DQ 遺伝子を含めた HLA class II 遺伝子の HLA アリルを HLA imputation 法により決定し、B 型肝炎との関連を詳細に解析した結果、5 つの DPB1 アリルのうち、2 つはハプロタイプを組む HLA-DR-DQ が第一義的な関連を示すことを明らかとした。

2. 研究の目的

本研究は、B 型肝炎と HLA class II 遺伝子の関連を包括的に理解することを目指す研究である。HLA 遺伝子は多型性に富む遺伝子であることから、B 型肝炎患者や B 型肝炎ワクチン接種者の詳細な臨床情報を収集するとともに、臨床的に特徴のある HBV 患者の HLA 遺伝子を含むゲノム DNA や HBV-DNA を詳細に解析し、B 型肝炎の発症につながるホスト因子およびウイルス因子の同定を目指す。

3. 研究の方法

日本全国の 21 か所の検体収集協力施設から約 3,800 例の日本人 B 型肝炎患者および健常対照者からゲノム DNA および血清を収集済みであり、現在も検体の収集を継続している (平成 26 年度厚生労働科学研究委託費 (肝炎等克服実用化研究事業) (研究代表者: 徳永勝士) との共同研究)。また、申請者が所属する施設において、B 型肝炎患者の詳細な臨床情報を収集・管理するためのシステムの構築が完了しており、全 290 項目の調査項目を入れた統一の様式を準備して臨床情報の収集を行っている。

【ホスト因子の探索】

(1) HLA アリルの推定

日本人 B 型肝炎患者の約 1,000 例および日本人健常対照者 (B 型肝炎ワクチン接種者を含む) の約 1,000 例について、ゲノムワイド SNP タイピングが完了している。また、ゲノムワイド SNP タイピングデータを用いた HLA imputation 法により 6 座位の HLA 遺伝子型 (HLA-A、C、B、DRB1、DQB1、DPB1) を高い精度で推定することが可能となっており、全 2,000 例について HLA アリルを推定する。

(2) HLA 関連解析

6 座位の HLA アリルについて関連解析を実施し、B 型肝炎の発症や B 型肝炎ワクチン応答性に関連する HLA アリルを同定する。

(3) 絞り込み GWAS

詳細な臨床情報に基づいて GWAS を実施し、新規の候補遺伝子を同定する。

(4) Replication 解析

絞り込み GWAS で見いだされた候補 SNP を対象として TaqMan 法もしくは DigiTag2 法で Replication 解析を実施する。

(5) NGS 解析

B 型肝炎由来肝がんに関連する HLA アリルを有する症例を選択し、NCC オンコパネルを用いた NGS 解析を実施する。

【ウイルス因子の探索】

(1) HBV 遺伝子型の決定

B 型肝炎患者の血清から HBV-DNA を抽出し、HBV genotype を判定する。

(2) NGS 解析

B 型肝炎由来肝がんに関連する HLA アリルを有する症例を選択し、HBV-DNA の塩基配列決定を行う。データベースに登録されている HBV-DNA 配列を参照配列としてアライメントを行い、新たな HBV-DNA 変異を同定する。

4 . 研究成果

(1) B 型肝炎ワクチン応答性に関わるホスト因子 (論文リスト 2 参照)

日本人成人 1,193 例を対象として同一のキットを用いた HBs 抗体測定を実施した。得られた抗体産生量をもとに、ワクチン低反応群 (107 例、HBsAb 10mIU/mL 以下)、ワクチン中反応群 (351 例、HBsAb 10mIU/mL 超、100 mIU/mL 以下)、ワクチン高反応群 (735 例、HBsAb 100mIU/mL 超) の 3 群に分けたところ、年齢が低いほど、また女性の方が抗体産生量が多くなること明らかとなった (図 1)。続いて全 1,193 例を対象としてゲノムワイド SNP タイピングを実施し、ワクチン低反応群、ワクチン中反応群、ワクチン

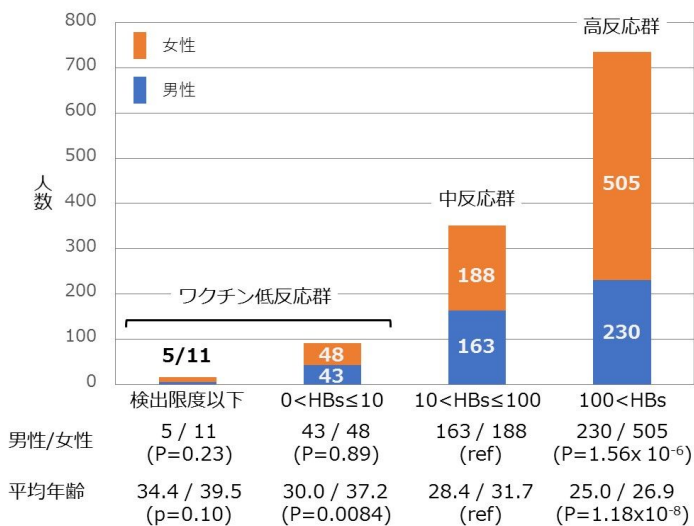


図 1 日本人成人 1,193 人のピームゲン接種者の HBs 抗体価

高反応群の 3 群に分けてゲノムワイド関連解析を実施した。さらに、ゲノムワイド SNP タイピングデータを用いた HLA imputation (注 1) を実施し、HLA アリル (注 2) およびハプロタイプ (注 3) と HB ワクチン効果について関連解析を実施した。

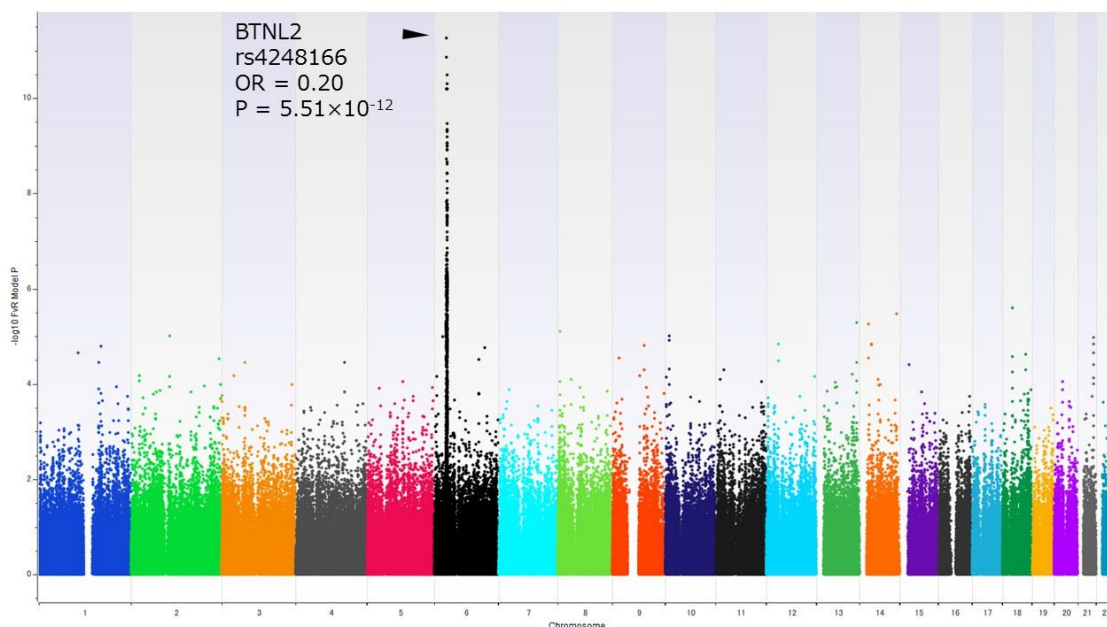


図 2 ワクチン低反応群と高反応群の比較結果

ワクチンの効果に年齢と性別が関係することから、年齢と性別で補正をして 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(図 2)。続いて 3 群を従属変数とした重回帰分析を実施した結果、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を明らかにした(図 3)。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強く示唆している。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。加えて、ワクチン高反応群と低反応群の比較で 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。

(注 1) HLA: HLA はヒト白血球抗原のことで、ヒトのほぼすべての細胞と体液に分布しており、ヒトの免疫に関わる重要な分子として働く。ヒト第 6 染色体の短腕部に存在しており、遺伝子の機能や構造からセントロメア側から class II、class III、および class I の 3 つの領域で構成されている。

(注 2) HLA imputation: HLA imputation 法は、ゲノムワイド SNP タイピングデータなどから HLA の遺伝子型を高い精度で推定する遺伝統計解析の手法である

(注 3) アリル: 相同の遺伝子座で異なる遺伝情報を有する対立遺伝子のこと

(注 4) ハプロタイプ: アリルの組み合わせ

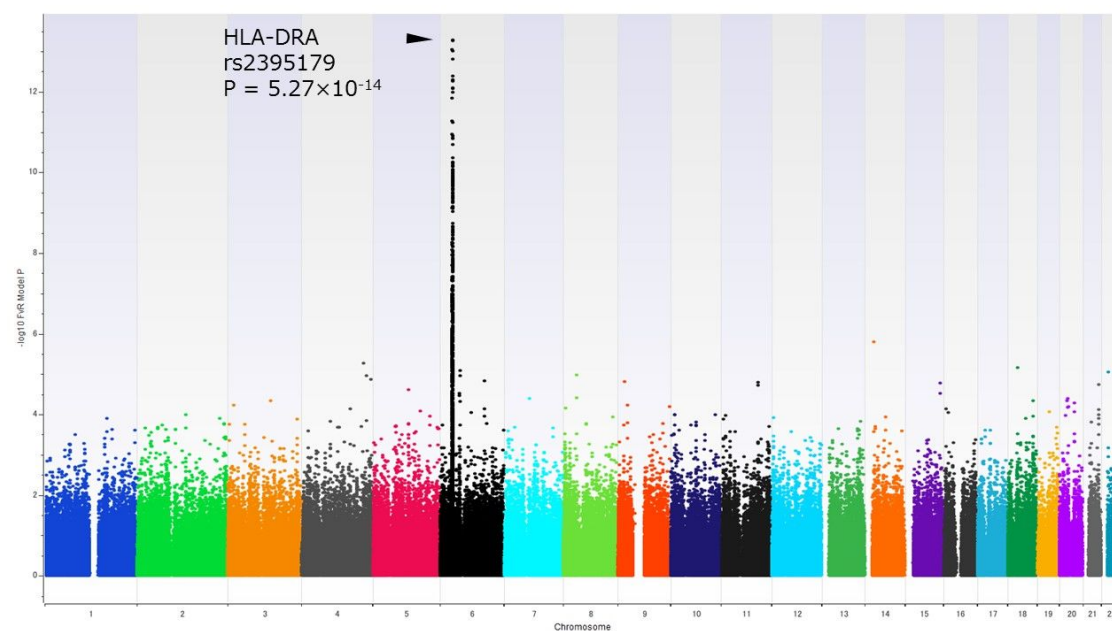


図 3 3 群を従属変数とした重回帰分析の結果

ワクチンの効果に年齢と性別が関係することから、年齢と性別で補正をして GWAS を実施した

(2) B 型肝炎由来肝臓がんに関わる宿主因子(論文リスト 1 参照)

国内 28 施設の研究協力施設において収集された HBV 感染患者 985 症例を対象としてゲノムワイド SNP タイピングを実施した。詳細な臨床情報を元に、肝臓を有する HBV 感染患者群(472 症例)と肝臓を有さない HBV 感染患者群(513 症例)に分けてゲノムワイド関連解析を実施した。さらに、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 B 型肝炎由来肝臓がんについて関連解析を実施した。

肝臓を有する HBV 感染患者群と肝臓を有さない HBV 感染患者群を比較した結果、HLA class I 遺伝子領域に $P < 10^{-4}$ となる SNP が集積することが明らかとなった(図 4)。連鎖不平衡を考慮して 3 箇所の SNP を選択し、GWAS とは独立のアジア系集団(日本人、香港人、タイ人)の検体を用いて関連が再現されるか検証を行った。メタ解析の結果、rs1110446 がゲノムワイド有意水準に達する関連を示した(表 1)。HLA imputation 法により推定された HLA アリルについて、肝臓を有する HBV 感染患者群と肝臓を有さない HBV 感染患者群でアリル頻度の比較を実施した結果、HLA-A*33:03、HLA-A*31:01 が有意な関連を示した(表 2)。

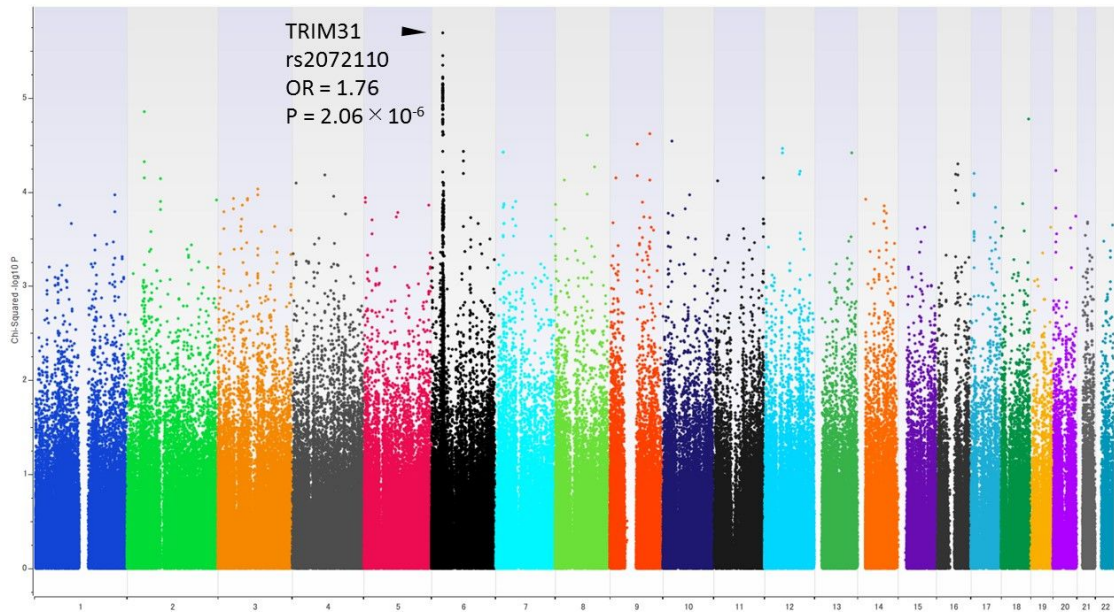


図 4 B型肝炎由来肝発がんを対象とした GWAS の結果

表 1 rs1110446 の Replication 解析の結果

Stage	Population	MAF in B-HCC	MAF in CHB	P value	OR (95% CI)
GWAS	Japanese	0.217	0.132	5.90E-07	1.82 (1.44-2.31)
Combined	Japanese	0.211	0.130	2.78E-10	1.79 (1.49-2.15)
Replication 1	Hong Kong	0.138	0.099	0.163	1.46 (0.86-2.50)
Replication 2	Thai	0.261	0.154	2.71E-04	1.94 (1.35-2.78)
Meta analysis				1.11E-18	

B-HCC : HBV 由来肝がん患者 CHB : B 型慢性肝炎患者 MAF : マイナーアレル頻度

表 2 肝発がん患者を対象とした HLA 関連解析の結果

HLA-A Allele	HCC あり (2n=740)		HCC なし (2n=816)		P value	OR	95% CI	
	count	%	count	%				
31:01	92	12.4	65	8.0	3.48E-03	1.64	1.17	2.29
33:03	71	9.6	43	5.3	1.08E-03	1.91	1.29	2.83
others	577	78.0	708	86.6	4.95E-06	0.54	0.41	0.71

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- (1) Sawai H, Nishida N, Khor SS, Honda M, Sugiyama M, Baba N, Yamada K, Sawada N, Tsugane S, Koike K, Kondo Y, Yatsushashi H, Nagaoka S, Taketomi A, Fukai M, Kurosaki M, Izumi N, Kang JH, Murata K, Hino K, Nishina S, Matsumoto A, Tanaka E, Sakamoto N, Ogawa K, Yamamoto K, Tamori A, Yokosuka O, Kanda T, Sakaida I, Itoh Y, Eguchi Y, Oeda S, Mochida S, Yuen MF, Seto WK, Poovorawan Y, Posuwan N, Mizokami M, Tokunaga K. Genome-wide association study identified new susceptible genetic variants in HLA class I region for hepatitis B virus-related hepatocellular

- carcinoma. Sci Rep. 8(1):7958, doi: 10.1038/s41598-018-26217-7, 2018 (査読あり)
- (2) Nishida N, Sugiyama M, Sawai H, Nishina S, Sakai A, Ohashi J, Khor SS, Kakisaka K, Tsuchiura T, Hino K, Sumazaki R, Takikawa Y, Murata K, Kanda T, Yokosuka O, Tokunaga K, Mizokami M. Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the BTNL2 gene for response to a hepatitis B vaccine. Hepatology. doi: 10.1002/hep.29876, 2018 (査読あり)
 - (3) Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. Sci Rep. 6:24767, doi: 10.1038/srep24767, 2016 (査読あり)

〔学会発表〕(計 17 件、うち招待講演 1 件、うち国際学会 7 件)

- (1) Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Hiromi Sawai, Jun Ohashi, Seik-Soon Khor, Takayo Tsuchiura, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Effects of HLA class II genotypes on a response to HB vaccine in Japanese population, ASHG2018 (国際学会), 2018 年
- (2) 西田奈央, 遺伝子解析が肝疾患の理解を深める, 平成 29 年度肝炎等克服実用化研究事業公開報告会 最新研究からみえてくる肝炎克服 (招待講演), 2017 年
- (3) Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Hiromi 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, ASHG 2017 Annual Meeting (国際学会), 2017 年
- (4) Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Hiromi 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 (国際学会), 2017 年
- (5) 西田奈央, 肝疾患研究におけるゲノム解析, 2016 年度大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 研究会 (招待講演), 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 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、杉山真也

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-204735

出願年: 2016 年 10 月 17 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: 肝炎データストレージ (肝炎 DS)

http://tokyogw.bits.cc/hep-smpl-mng_public/public/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 杉山真也

ローマ字氏名: Masaya Sugiyama

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。