

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790728

研究課題名(和文) C型肝炎に対するインターフェロン療法の治療無効・副作用にかかわる遺伝要因の探索

研究課題名(英文) Host genetic factors associated with drug response and side effects against HCV treatment

研究代表者

西田 奈央(NISHIDA, NAO)

独立行政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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎に対するPEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法の治療効果を規定する遺伝要因としてIL28B遺伝子を同定し、さらに同療法における副作用である貧血、好中球減少に関連する遺伝要因を同定した。治療有効および副作用のリスクが低い症例を選択して治療を実施することで、患者負担の軽減につながるだけでなく、医療費の削減も実現できる。また、C型肝炎ウイルスの自然排除にIL28B遺伝子と共にHLA-DQB1の特定のアリルが関連することを明らかにした。今後、HLA-DQB1分子によるウイルス排除の機序を明らかにしていくことで、C型肝炎慢性化、肝癌への進展のメカニズムの解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：We identified the host genetic factors associated with side effects (anemia, neutropenia) against HCV treatment. These findings would enable to make selection of patients who will get successful treatment or who have few side-effects, by testing newly identified host genetic markers in combination with IL28B SNP. Moreover, we identified the association of HLA-DQB1 allele with HCV spontaneous clearance in Japanese HCV patients. DQB1 alleles would be key host factors to clear HCV, which will lead the following functional studies of HLA-DQ molecules in the future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学 疾患関連遺伝子 GWAS

### 1. 研究開始当初の背景

わが国のC型肝炎ウイルス(HCV)感染者は約200万人存在するとされ、HCVはわが国における最大の感染症である。HCVは一旦感染すると70%程度が慢性肝炎に移行し、自然に治癒することはほとんどなく、多くは肝硬変・肝癌へと進展し、本邦では年間約2万5千人が肝癌で死亡している。そのHCVの根治治療として、現時点で標準的な治療となっているペグインターフェロン+リバビリン(PEG-IFN- $\alpha$ /RBV)併用療法で根治させることができるようになったが、日本人に最も多いGenotype 1型高ウイルス量の症例では50%程度の根治しか得られず、約20%はPEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法が全く効かないのが現状である。申請者はゲノムワイド関連解析(GWAS)により、C型肝炎に対するPEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法において、IL28B(IFN $\lambda$ 3)遺伝子領域内に存在する遺伝子多型(rs8099917)が治療効果と強い関連を示すことを明らかにした(Tanaka Y. Nat Genet 2009; 41)。rs8099917の遺伝子多型を測定することで、根治の見込める患者群(VR)を高い確率(的中率85%)で選別でき、効かない患者群(NVR)は副作用による苦痛や高額な医療費から免れることができる(的中率90%)。しかしながら、rs8099917の遺伝子型からだけでは治療効果の予測できない症例がVR群で約15%、NVR群で約10%存在しており、IL28B遺伝子以外の遺伝要因が治療効果に寄与していることが予測される。申請者は、GWASにおいてゲノムワイド有意水準には達さないものの弱い関連( $P < 10^{-4}$ )が見られた18か所の候補遺伝子領域について、PEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法を受けた729検体の肝炎患者(NVR群234検体、VR群495検体)を用いたReplication studyを実施したが、IL28B以外の疾患感受性遺伝子を同定することができなかった(論文未報告)。そこで本研究では、GWASの結果で関連が検出された上位500か所のSNPを用いたSNP間相互作用解析を実施し、複数のSNPが協調することで薬剤無効に強い関連を示すようなSNPがないかを探索するという着想に至った。IL28B遺伝子がインターフェロン療法の薬剤無効に強い関連を示すことは、申請者ら以外に国外の3つの研究グループから報告されているが、IL28B遺伝子以外の感受性遺伝子の報告は国内外においていまだに一報もない。このことから、本研究は極めて緊急性、重要性の高いものと考えられる。インターフェロン療法では必ず何らかの副作用を経験することが知られている。インターフェロン療法の副作用の中で最も多いものは、投与初期にみられるインフルエンザ様症状で、発熱や全身のだるさ、悪寒、頭痛、関節痛などがみられる。副作用で、特に注意が必要なのは抑うつ状態であり、抑うつ状態の徴候として不眠やイライラ感などが挙げ

られる。また、治療期間中に貧血や血小板数減少といった検査値異常を生じる事例も多く報告されている。PEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法を受けているHCV感染者の約20%は治療無効となる上に、様々な副作用のリスクを負っているというのがHCV感染患者に対する治療の現状である。今年になって、インターフェロン療法による貧血にITPA遺伝子が強い関連を示すことが国内外から報告された。申請者らが実施したGWAS(貧血有93検体、貧血無194検体)においても、ITPA遺伝子がゲノムワイド有意水準に達する強い関連を示すことが明らかとなっている。しかしながら、貧血を引き起こさない群の約半数で、ITPA遺伝子のリスクアリルを持っていることから、ITPA遺伝子以外の原因遺伝子が存在することが予想される。また、インターフェロン療法の副作用である血小板減少などの検査値異常の原因遺伝子についてはこれまでに国内外からの報告例がなく、今後の重要な研究課題となることが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究は、(1)治療効果に寄与する新規の遺伝要因を発見し、PEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法の治療効果をより高い中率で予測することを目指し、また、(2)PEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法による副作用発症の原因遺伝子を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

日本全国の研究協力30病院施設で収集した肝炎患者検体を東京大学医学部人類遺伝学教室に送付し、同教室においてSNP解析および統計解析を実施する。同教室にはすでに2,000検体を超える肝炎患者サンプルが集められており、名古屋市立大学が中心となってまとめた臨床情報と併せて本研究を実施する準備は整っている。PEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法の治療無効および副作用を対象としたゲノムワイド関連解析で検出された疾患候補遺伝子領域について、申請者が開発したReplication studyに適したSNP解析法であるDigiTag2法を用いたSNP解析を実施する。GWASで検出された上位500か所のSNPを用いたSNP間相互作用解析で検出されたSNPを対象として、DigiTag2法を用いてReplication studyを実施し、新規感受性遺伝子の同定を目指す。

(1) PEG-IFN- $\alpha$ /RBV併用療法の治療無効に係わる新規感受性遺伝子の同定

インターフェロン治療が無効となる症例群(NVR群)78検体と有効となる症例群(VR群)64検体を用いて実施したゲノムワイド関連解析で関連が検出された上位500か所のSNPを対象として、SNP間相互作用解析を実施する。SNP間相互作用解析により、複数のSNPが協調することで治療無効に強い関連を示す遺伝要因を探索し、それらを解析対象としてDigiTag2法を用いたReplication

study を実施する。

(2) PEG-IFN- $\alpha$ /RBV 併用療法による副作用にかかわる新規感受性遺伝子の同定

インターフェロン療法により貧血を呈する症例群 93 検体と貧血とならない症例群 194 検体を用いて実施したゲノムワイド関連解析で弱い関連が検出された SNP ( $P < 10^{-4}$ ) を対象とした Replication Study を実施するとともに、上位 500 か所の SNP を対象とした SNP 間相互作用解析で見つめられた候補遺伝子領域について、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施する。また、貧血を引き起こさない患者群の中に、貧血との関連がすでに報告されている ITPA 遺伝子のリスクアリルを持つ患者が約半数存在していることが分かっている。そこで、ITPA 遺伝子のリスクアリルを持つ患者群の中で貧血有群と貧血無群の層別化 GWAS を実施し、ITPA 遺伝子以外の新規感受性遺伝子を探索する。

#### 4. 研究成果

(1) PEG-IFN- $\alpha$ /RBV 併用療法の治療無効に係わる新規感受性遺伝子の同定

HCV 患者への標準治療に対する治療無効群 (NVR) 118 例と治療有効群 (VR) 140 例を用いた GWAS を実施し、(1) 単点解析で  $P < 0.0001$  となった 18 か所の SNP、および(2) KEGG データベースを用いて IL28B 遺伝子、RIG-I 遺伝子のそれぞれに対する遺伝子パスウェイ解析から検出した 38 か所の SNP、を Replication 解析の候補 SNP に選択した。Replication 解析では、GWAS とは独立に収集した NVR 群 203 例と VR 群 434 例を用いた。解析の結果、ポジティブコントロールとして解析した既知の関連 SNP である IL28B 遺伝子中の rs8099917 からは  $P = 2.52 \times 10^{-42}$  という有意な関連が検出された。しかしながら、新規候補遺伝子領域を同定することはできなかった。

(2) PEG-IFN- $\alpha$ /RBV 併用療法の副作用である好中球減少に関連する遺伝要因の探索

HCV 患者に対する標準治療の副作用の一つである好中球減少に対して、好中球量が 1,000 以上となる群 302 例と、750 以下となる群 114 例とで 1 段階目の GWAS を実施し、さらに顕著な好中球減少例 (好中球量 600 以下) となる群 50 例とで 2 段階目の GWAS を実施した。1 段階目から 2 段階目の GWAS において、オッズ比が強まった 135 か所の SNP を対象として、Replication 解析を実施した。Replication 解析では、GWAS とは独立に収集した好中球量が 600 以下となる群 55 例と、1,000 以上となる群 381 例を用いた。この結果、 $P = 4.49 \times 10^{-7}$ 、 $OR = 2.17$  となる SNP を同定した。加えて、投薬開始時 (0 週時) の好中球量で補正をした結果においても、 $P = 1.39 \times 10^{-4}$ 、 $OR = 3.96$  となることを明らかにした (論文投稿中)。

(3) C 型肝炎ウイルス自然治癒に関連する遺

伝要因の探索

インターフェロン治療の治療有効性を規定する IL28B 遺伝子が HCV 自然治癒にも有意な関連を示すことを、自然治癒群 106 検体と慢性肝炎群 197 検体を用いた GWAS により明らかとした (図 1、rs8099917、 $P = 1.46 \times 10^{-9}$ 、 $OR = 0.11$ )。続いて、rs8099917 で層別化した GWAS を実施し、検出された候補 SNP を対象とした Replication 解析 (自然治癒群 146 検体、慢性肝炎群 290 検体) を実施した。その結果、IL28B 遺伝子以外に有意な関連を示す新規の関連遺伝子を同定することはできなかった。

欧米人における HCV 自然治癒を対象とした GWAS により報告された HLA-DQ 遺伝子は、日本人における HCV 自然治癒にも有意な関連を示すことを明らかにした (rs4273729、 $P = 1.86 \times 10^{-9}$ 、 $OR = 0.48$ )。そこで HCV 自然治癒群および慢性肝炎群を対象として、HLA-DQB1 タイピングを実施し、DQB1\*03:01 ( $P = 2.38 \times 10^{-5}$ 、 $OR = 2.08$ )、DQB1\*03:03 ( $P = 2.16 \times 10^{-3}$ 、 $OR = 1.69$ ) が自然治癒に対して進行性の有意な関連を示し、DQB1\*04:01 ( $P = 9.10 \times 10^{-4}$ 、 $OR = 0.52$ ) が自然治癒に対して抵抗性の有意な関連を示すことを明らかにした (論文投稿中)。

#### 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 11 件)

- (1) Nishino J, Nishida N, et al. (他 4 名、3 番目) The interaction of a single-nucleotide polymorphism with age on response to interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy in female patients with hepatitis C infection. **J Med Virol**. 86(7):1130-3, 2014 (査読あり) doi: 10.1002/jmv.23939.
- (2) Khudayberganova D, Nishida N, et al. (他 12 名、4 番目) IL28B polymorphisms and clinical implications for hepatitis C virus infection in Uzbekistan. **PLoS One** 9(3):e93011, 2014 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0093011
- (3) Nishida N, Tokunaga K, et al. (他 1 名、1 番目) Genome-Wide Association Study Reveals Host Genetic Factors for Liver Diseases. **Journal of Clinical and Translational Hepatology** 1:45-50, 2013 (査読あり)
- (4) Nishida N, Sawai H, et al. (他 41 名、1 番目) 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 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0086449
- (5) Kurosaki M, Nishida N, et al. (他 12 名、

- 3 番目) Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **J Med Virol** 85(3):449-58, 2013 (査読あり) doi: 10.1002/jmv.23497
- (6) Jinam T, Nishida N, et al. (他 18 名、82 番目) The history of human populations in the Japanese Archipelago inferred from genome-wide SNP data with a special reference to the Ainu and the Ryukyuan populations. **J Hum Genet** 57(12):787-95, 2012 (査読あり) doi: 10.1038/jhg.2012.114
- (7) Kawashima M, Nishida N, et al. (他 2 名、3 番目) Evolutionary analysis of classical HLA class I and II genes suggests that recent positive selection acted on DPB1\*04:01 in Japanese population. **PLoS One** 7(10):e46806, 2012 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0046806
- (8) Nakamura M, Nishida N, et al. (他 78 名、2 番目、第 1 著者と第 2 著者は Equal contribution) Genome-wide association study identifies TNFSF15 and POU2AF1 as susceptibility loci for primary biliary cirrhosis in the Japanese population. **Am J Hum Genet.** 91(4):721-8, 2012 (査読あり) doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.010.
- (9) Nishida N, Sawai H, et al. (他 34 名、西田 : 1 番目) Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. **PLoS One** 7(6):e39175, 2012 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0039175
- (10) Sawai H, Nishida N, et al. (他 33 名、2 番目) No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. **BMC Med Genet** 13:47, 2012 (査読あり) doi: 10.1186/1471-2350-13-47.
- (11) Nishida N, Mawatari Y, et al. (他 2 名、1 番目) Highly parallel and short-acting amplification with locus-specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by the DigiTag2 assay. **PLoS One** 7(1):e29967, 2012 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0029967
- 〔学会発表〕(計 16 件)
- (1) 西田奈央, HLA アリルでの層別解析による B 型肝炎慢性化およびウイルス排除に関わる宿主遺伝子の探索 (招待講演), 「Liver Forum in Kyoto」第 16 回学術集会, 2014 年 3 月 29 日, 京都
- (2) 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 遺伝子のアジア集団における横断的解析, 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年 11 月 20 日-23 日, 仙台
- (3) 西田奈央, 徳永勝士, 溝上雅史, IL28B 遺伝子による C 型肝炎の治療効果予測と第二の関連遺伝子の探索 (基調講演), 第 17 回日本肝臓学会大会, 2013 年 10 月 9 日-12 日, 品川
- (4) Nao Nishida, Development of DigiTag2 for determination of human SNPs (招待講演), International Conference in Medicine and Public Health 2013, The Symposium on SNP typing: Application in human and TB, 2013 年 6 月 24 日-28 日, Bangkok
- (5) 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, 2013 年 12 月 3 日-6 日, 神戸
- (6) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Chieko Haga, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Understanding of IL28B gene associated with treatment response for HCV patients, 61th Annual ASHG Meeting, 2013 年 10 月 22 日-26 日, Boston
- (7) 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, 2013年11月1日-5日, Washington DC
- (8) 西田奈央, 田中靖人, 杉山真也, 馬渡頼子, 石井真由美, 徳永勝土, 溝上雅史, C型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索, 第49回日本肝臓学会総会, 2013年6月6日-7日, 新宿
- (9) 西田奈央, ウイルス性肝炎にみる宿主因子とウイルス因子(招待講演), 日本人類遺伝学会 第57回大会 シンポジウム7 感染症の遺伝学:ゲノムと環境の相互作用, 2012年10月24日-27日, 新宿
- (10) 西田奈央, 川嶋実苗, 馬渡頼子, 相葉佳洋, 小森敦正, 徳永勝土, 中村 稔, Genome-wide association study (GWAS)による日本人原発性肝硬変(PBC)の疾患感受性遺伝子の同定, 第35回日本分子生物学会年, 2012年12月11日-14日, 福岡
- (11) 馬渡頼子, 西田奈央, 中伊津美, 徳永勝土, 溝上雅史, DigiTag2法におけるPCRプライマー設計パラメータの検証, 第35回日本分子生物学会年, 2012年12月11日-14日, 福岡
- (12) 西田奈央, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 徳永勝土, 溝上雅史, 東アジア集団におけるB型肝炎慢性化、HBV排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定, 第35回日本分子生物学会年, 2012年12月11日-14日, 福岡
- (13) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Investigating the novel host genetic factors associated with treatment response for HCV patients, The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 2012年11月21日-22日, 新宿
- (14) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Meta-analysis identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in East-Asian populations, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2012, 2012年11月9日-13日, Boston
- (15) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Asako Koike, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga,

- Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, The associations of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance are widely replicated in East-Asian populations, 61th Annual ASHG Meeting, 2012年11月6日-10日, San Fransisco
- (16) 西田奈央, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 徳永勝土, 溝上雅史, 日本人および韓国人におけるB型肝炎慢性化、B型肝炎ウイルス排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定, 第16回日本肝臓学会大会(JDDW), 2012年10月10日-13日, 神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1件)

名称: B型肝炎の慢性化の訴因の検出法  
発明者: 徳永勝土、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: 2013年8月30日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
西田 奈央 (Nishida Nao)  
国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター・上級研究員  
研究者番号: 50456109
- (2)研究分担者  
該当なし
- (3)連携研究者  
該当なし