

論文内容の要旨

論文題目 Identification of a chronic hepatitis B susceptible locus through genome-wide association study

(ゲノムワイド関連解析による慢性 B 型肝炎疾患感受性遺伝子の同定)

氏名 鎌谷 洋一郎

背景

慢性 B 型肝炎は、B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus, HBV) によって引き起こされるもっとも頻度の高いウイルス性肝疾患である。日本などアジア地域では、HBV 感染は新生児期や幼児期に母子感染によって成立すると報告されているが、アフリカでは幼児期の水平感染が主であると考えられている。HBV への罹患率は地域によって大きく異なり、HBs 抗原の陽性率はタイや中国では全人口の 5-12% に及ぶと推定されている一方、北米やヨーロッパではわずかに 0.2-0.5% と報告されている。日本では以前は罹患率が高かったが、母子感染予防策により 1% 以下の頻度にまで減少している。現在世界中で 4 億人が HBV に持続的に感染していると推定されており、また世界中の肝疾患の 60% は HBV の慢性感染と、それに引き続く肝硬変を原因としている。ときに HBV 持続感染があっても自然寛解することもあるが、年間 2-10% の慢性 B 型肝炎患者は肝硬変に移行し、さらにその中から肝不全や肝細胞癌に進行する。

このように HBV 感染後の臨床経過は様々であるが、そのような経過に影響する因子としてこれまで感染時の年齢、性別、アルコール摂取量、他の肝炎ウイルスとの共感染などが明らかとなっている。また台湾における双生児研究によって遺伝因子も感染成立に重要な役割を果たすことが示されている。これまで候補遺伝子の解析によって、*IFNG*、*TNF*、*VDR*、*ESRI* 遺伝子上の多型、さらに様々な *HLA* 遺伝子アレルが HBV 感染後の慢性化に関与する遺伝因子として報告されている。しかしいずれも解析の規模が小さく、B 型肝炎の慢性化に関わる遺伝因子としてこれまでに確立された報告はない。

ヒトゲノム計画の終了、ならびに国際 HapMap 研究の進展に伴い、21 世紀に入ってからゲノムワ

イド遺伝的関連研究を行うことが可能となった。連鎖解析とは異なり、密なマーカーを用いて頻度が高く浸透度の低い遺伝的変異の検出が可能となり、糖尿病や癌といった一般的で頻度の高い疾患の感受性遺伝子が同定され始めている。当研究室では慢性 B 型肝炎の発症に關与する遺伝因子を確実に明らかにすることを目的とし、慢性 B 型肝炎についての、世界で初めての一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) を用いたゲノムワイド遺伝的関連研究を行った。

方法

この研究では、まず最初に 2 段階アプローチによるゲノムワイド関連研究を行った。

第 1 ステージでは、179 例の日本人慢性 B 型肝炎患者 DNA サンプルと、934 例の日本人健常者 DNA サンプルを用いて、Illumina HumanHap550 BeadChip を用いてヒトゲノム上約 550,000 SNPs の遺伝子型を決定した。これらの実験結果については、クラスタープロット結果、call rate、アレル頻度ならびに Hardy-Weinberg 平衡検定にもとづく厳しいクオリティコントロール (Quality control, QC) を行い、疑わしい結果を除外することにより、十分な信頼度が保証された 499,544 個の SNPs が選択された。このデータにもとづいてケース・コントロールスタディを行い、三つの遺伝的モデル (アレル頻度モデル、優性モデル、劣性モデル) のもとでの独立性の検定 P 値の最小値 (minimum P value) をもとに上位 12,000 SNPs を抽出した。第 2 ステージでは、これら抽出された SNP について、第 1 ステージとは独立した 607 例の日本人慢性 B 型肝炎患者 DNA サンプルについて Affymetrix GeneChip Custom 10K array によりタイピングし、1,267 例の日本人コントロール遺伝子型データとともに同様の QC によって選択された 9,875 SNPs について Cochran-Armitage 傾向検定を行い、B 型肝炎と有意に関連する SNP を同定した。多重検定を考慮して補正した有意水準は 5.06×10^{-6} と設定した。

ここまでの探索的研究によって明らかとなった SNP については、その関連に再現性があるかどうかを確認するため、3 セットの再現性研究を行った。再現性研究では、TaqMan genotyping system または Invader assay により SNP の遺伝子型を決定した。再現性研究の第 1 セットは 274 例の日本人慢性 B 型肝炎患者と 274 例の日本人コントロールをもちいたマッチド・ケースコントロールスタディ (年齢、性別、アルコール摂取量についてマッチ) であり、第 2 セットは 718 例の日本人慢性 B 型肝炎患者と 1,280 例の日本人コントロールにより構成されている。さらにこの SNP が日本人だけでなく広くアジア全体で関連を示すかどうかを確認するため、308 例のタイ人慢性 B 型肝炎患者と 546 例のタイ人健常者からなる第 3 セットの再現性研究を行った。再現性研究の結果の均質性を確認するため、Mantel-Haenszel の方法を用いたメタ解析を行った。

これらのゲノムワイド関連研究と再現性研究により同定された慢性 B 型肝炎関連 SNP は *HLA-DP* 遺伝子領域にあったため、*HLA-DP* の抗原結合部位アミノ酸配列に対応する *HLA-DP* アレルをケース・コントロールで決定し、それと今回の関連 SNP を含む統合的なハプロタイプ解析を行うことによって、疾患の発症に直接かかわる原因遺伝的変異を予測した。

結果

2 段階ステージのゲノムワイド関連研究の結果、550,000 SNPs の内、11 個の SNPs が統計学的に有意に慢性 B 型肝炎との関連を示した ($P=3.62 \times 10^{-8} \sim 1.16 \times 10^{-13}$, Figure 1、赤い横線が有意水準を示す)。これら 11 SNP は、すべて 6 番染色体上 *HLA-DPA1*, *HLA-DPBI* 両遺伝子の周囲約 50Kbp の領域に存在していた (Figure 2)。

Figure 1

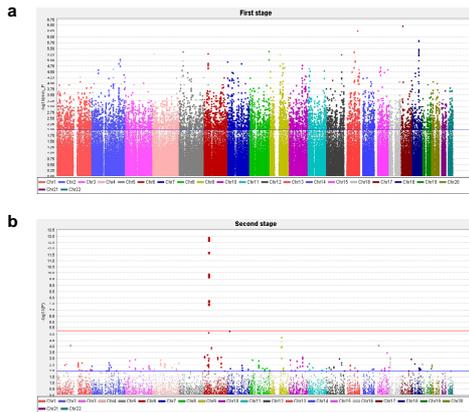
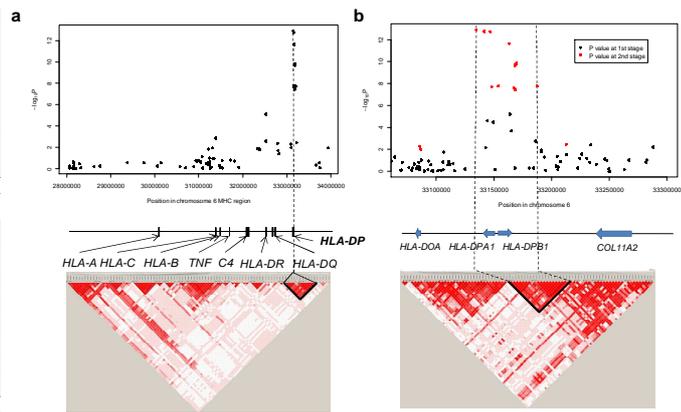


Figure 2



再現性研究においては、*HLA-DPB1* 周囲にある SNP rs9277535 と、*HLA-DPA1* 周囲にある rs3077 のそれぞれについて再現性を確認した。日本人を用いた第 1 セット、第 2 セットのいずれの再現性研究においてもすべての SNP について関連の再現性が確認された ($P=1.96 \times 10^{-6} \sim 1.06 \times 10^{-16}$, Table 1)。さらにタイ人による第 3 セットの再現性研究でも強力な関連が確認された ($P=6.53 \times 10^{-6} \sim 6.52 \times 10^{-8}$, Table 1)。

ここまでの結果についてメタ解析を行ったところ、関連の強さはいずれの SNP についてもタイ人を含むすべてのコホートで均質であり (Breslow-Day 検定の P 値 0.84, 0.85)、統合した独立性の検定 P 値は rs3077 について $P=2.31 \times 10^{-38}$ 、rs9277535 について $P=6.34 \times 10^{-39}$ であった (Table 1)。

Table 1. Results of replication studies and Meta-analysis

SNP	Nearest gene	Allele	Stage (1/2)	case			control			OR (95%CI) ^a	P value ^b	P_het ^c
				11	12	22	11	12	22			
rs3077	<i>HLA-DPA1</i>	A/G	GWAS Second stage	42	240	324	197	598	472	0.57 (0.49-0.66)	1.26×10^{-13}	
			First Replication	25	95	152	50	122	102	0.53 (0.41-0.69)	1.73×10^{-6}	
			Second Replication	64	237	410	197	596	485	0.55 (0.47-0.63)	1.06×10^{-16}	
			Third Replication	28	109	163	85	250	210	0.61 (0.49-0.75)	6.53×10^{-6}	
			Meta-analysis ^d							0.56 (0.51-0.61)	2.31×10^{-38}	0.84
rs9277535	<i>HLA-DPB1</i>	A/G	GWAS Second stage	58	254	294	230	619	418	0.59 (0.51-0.69)	1.78×10^{-12}	
			First Replication	26	102	144	49	132	91	0.54 (0.42-0.69)	1.96×10^{-6}	
			Second Replication	68	264	376	227	604	445	0.56 (0.48-0.64)	1.81×10^{-16}	
			Third Replication	29	136	139	107	273	155	0.56 (0.46-0.69)	6.52×10^{-8}	
			Meta-analysis ^d							0.57 (0.52-0.62)	6.34×10^{-39}	0.85

^aOdds ratio of minor allele from 2x2 allele frequency table. ^bP values of Pearson's chi-squared test for allele model. ^cResult of Breslow-Day test.

^dMeta-analysis of all four studies. Odds ratio and P values for independence test were calculated by Mantel-Haenszel method.

強力な関連が認められた SNP はすべて *HLA-DPA1* または *DPB1* 遺伝子周囲にあった。*HLA-DPA1*、*DPB1* はいずれも MHC class II 分子である HLA-DP のサブユニットをコードする遺伝子である。HLA-DP は抗原提示細胞において発現し、外来抗原を CD4 陽性 T 細胞に提示しその後の免疫反応カスケードを開始する際に重要な役割を担う。*HLA-DPA1*、*DPB1* はいずれも抗原結合部位のコード領域である exon 2 において非常に多型性に富んでおり、この領域の配列によってアレル型が決定される。HLA-DP 分子の抗原結合部位の多型性は、外来抗原との結合の強さに影響し、結果的に外来抗原に対する免疫応答反応に影響すると考えられる。したがって我々は、HLA-DP 分子の抗原結合部位を変化させる遺伝的変異が真に慢性 B 型肝炎を引き起こしやすくなる原因であり、今回のゲノムワイド研究により同定された SNPs はこれと強い連鎖不平衡にある事により関連を示したのではないかと考えた。そこで B 型肝炎関連 SNPs と *HLA-DPA1*、*DPB1* アレルとの連鎖不平衡を検討するために、第 2 ステージの慢性 B 型肝炎患者 607 名の DNA サンプルと第 1 ステージの健常者 934 名の DNA サンプルを用いて *HLA-DP* アレルを決定しハプロタイプ解析を行った。その結果、*HLA-DPA1* アレル、*HLA-DPB1* アレル及び今回同定された 11SNP は互いに強い連鎖不

平衡の関係にあることがわかり、*HLA-DPA1*0103-DPB1*0402* と *HLA-DPA1*0103-DPB1*0401* は B 型肝炎発症に防御的に働く ($P = 6.00 \times 10^{-8}$ 、 $P = 0.002$) 一方、*HLA-DPA1*0202-DPB1*0501* と *HLA-DPA1*0202-DPB1*0301* は B 型肝炎に罹患しやすくなる ($P = 5.79 \times 10^{-6}$ 、 $P = 0.002$) ということを明らかにした。

Table 2 Haplotype analysis^a

No.	Haplotype ^b	Frequency (Case)	Frequency (Control)	<i>P</i> value ^c	odds ratio ^c (95% CI)
1	GG- <i>DPA1*0202</i> -TCG- <i>DPB1*0501</i> -GAGATT	0.428	0.347	5.79×10^{-6}	1.45 (1.16-1.81)
2	AA- <i>DPA1*0103</i> -CCA- <i>DPB1*0201</i> -AGTGCC	0.165	0.192	0.052	base
3	GG- <i>DPA1*0201</i> -TCG- <i>DPB1*0901</i> -GGGGTC	0.129	0.124	0.642	1.21 (0.91-1.61)
4	AA- <i>DPA1*0103</i> -CTA- <i>DPB1*0402</i> -AGTGCC	0.042	0.096	6.00×10^{-8}	0.52 (0.35-0.75)
5	AA- <i>DPA1*0103</i> -CCA- <i>DPB1*0401</i> -AGTGCC	0.018	0.038	0.002	0.57 (0.33-0.96)
6	GG- <i>DPA1*0202</i> -TCG- <i>DPB1*0301</i> -GGGGTC	0.036	0.018	0.002	2.31 (1.39-3.84)
7	GG- <i>DPA1*0202</i> -TCG- <i>DPB1*0202</i> -AGTGCC	0.020	0.027	0.257	0.88 (0.51-1.52)
8	GG- <i>DPA1*0202</i> -TCG- <i>DPB1*0201</i> -AGTGCC	0.022	0.024	0.662	0.97 (0.57-1.65)
9	GG- <i>DPA1*0201</i> -TCG- <i>DPB1*0501</i> -GAGATT	0.029	0.018	0.057	1.81 (1.06-3.08)
10	GG- <i>DPA1*0201</i> -TCA- <i>DPB1*1301</i> -GGTGCC	0.022	0.016	0.172	1.69 (0.95-3.03)
11	AA- <i>DPA1*0103</i> -CTG- <i>DPB1*0301</i> -GGGGTC	0.011	0.016	0.246	0.74 (0.36-1.53)
12	GG- <i>DPA1*0201</i> -TCG- <i>DPB1*1401</i> -GGGGTC	0.012	0.012	0.877	1.25 (0.61-2.53)

^aControls of the first stage and cases of the second stage were analyzed. ^bHaplotypes consisting of rs2595309, rs3077, HLA DPA1, rs2301220, rs9277341, rs3135021, HLA DPB1, rs9277535, rs10484569, rs3128917, rs2281388, rs3117222, and rs9380343 were indicated. ^c*P* values, odds ratios, and its 95% confidence intervals of each haplotype were calculated as described in Methods.

結語

世界で初めての慢性 B 型肝炎についてのゲノムワイド関連研究により、*HLA-DP* 遺伝子座が B 型肝炎の発症と関連する遺伝子座位として同定され、タイ人を含む複数の独立した再現性研究によってその関連は確認された。これは、この遺伝子座が B 型肝炎発症と関連するという初めての報告でもある。また、*HLA-DP* アレル解析により、B 型肝炎を起こしやすくする、または起こしにくくする直接的な原因となる遺伝的変異を推定した。

今後、B 型肝炎ウイルス抗原と *HLA-DP* との結合ならびにこれらの遺伝的変異がそれに与える影響をより詳細に解析していくことにより、病因についての理解が深まると思われる。またこれらの結果を用いて、肝炎の発症予防プログラムの開発や、より有効なワクチンや新規の治療薬の開発に貢献できると期待される。