

論文審査の結果の要旨

氏名 鎌谷 洋一郎

本論文は、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) を用いたゲノムワイド遺伝的関連研究により同定された慢性 B 型肝炎疾患感受性に関与する遺伝因子について述べられている。

本研究は、慢性 B 型肝炎の発症に関与する遺伝因子を明らかにすることを目的とし、SNPs を用いた慢性 B 型肝炎のゲノムワイド遺伝的関連研究を世界で初めて行った。2 段階ゲノムワイド相関解析を日本人 B 型慢性肝炎群と健常者コントロール群に実施し、*HLA-DPA1*、*HLA-DPBI* 領域に B 型慢性肝炎の発症と有意に相関する SNPs を 11 個同定した。このうち 2 個の SNPs につき 3 種類の独立したコホート (日本人、タイ人の B 型慢性肝炎群および対応する健常者群) を用いて再現性を検証した。本解析により *HLA-DP* 遺伝子領域が B 型肝炎ウイルスの慢性感染に強く関与することを示した。

本研究においては、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、ヒトゲノム上約 550,000 SNPs の遺伝子型を決定した。この中から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クオリティコントロール (Quality control, QC) を行い、信頼性の高い 499,544 個の SNPs を選択した。このデータを用いてケース・コントロールスタディを行い、アレル頻度モデル、優性モデル、劣性モデルでの独立性の検定 P 値の最小値 (minimum P value) を示す上位 12,000 SNPs を抽出した。第 2 ステージでは、抽出した SNPs 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 サンプルでタイピングし、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 によって選択した 9,875 SNPs について Cochran-Armitage 傾向検定を行い、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すことを確認した ($P=3.62 \times 10^{-8} \sim 1.16 \times 10^{-13}$)。これらの SNPs は、すべて 6 番染色体上の *HLA-DPA1*、*HLA-DPBI* 両遺伝子の周囲約 50Kbp の領域に存在していた。

探索的研究によって明らかとなった SNPs のうち、*HLA-DPBI* 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 3 セットの再現性研究を行った。第 1 セットは 274 例の日本人慢性 B 型肝炎患者と 274 例の日本人健常者コントロールを用いたマッチド・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 例の日本人健常者コントロールにより構成されていたが、いずれのセットの再現性研究においても該当 SNPs で関連の再現性が確認された ($P=1.96 \times 10^{-6} \sim 1.06 \times 10^{-16}$)。さらに 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においても、有意な関連が確認された ($P=6.53 \times 10^{-6} \sim 6.52 \times 10^{-8}$)。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ところ、関連の強さはいずれの SNPs 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。

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 SNPs 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 SNPs 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。その結果、*HLA-DPA1* アレル、*HLA-DPBI* 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-DPBI*0402* と *HLA-DPA1*0103-DPBI*0401* は B 型肝炎発症に防御的に働くこと ($P = 6.00 \times 10^{-8}$ 、 $P = 0.002$) 一方で *HLA-DPA1*0202-DPBI*0501* と *HLA-DPA1*0202-DPBI*0301* は B 型肝炎の易罹患性に関わること ($P = 5.79 \times 10^{-6}$ 、 $P = 0.002$) を明らかにした。

慢性 B 型肝炎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が確認された。本研究成果は、*HLA-DP* 遺伝子座と B 型肝炎発症の関連を示した初めての報告である。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が推定された。これらの研究成果は、将来的には 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を介した B 型肝炎の病因の理解につながると期待される。

なお、本論文は、Sukanya Wattanapokayakit、越智秀典、川口喬久、高橋篤、細野直哉、久保充明、角田達彦、鎌谷直之、熊田博光、Aekkachai Puseenam、Thanyachai Sura、醍醐弥太郎、茶山一彰、Wasun Chantratita、中村祐輔、松田浩一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証をおこなったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。