

論文の内容の要旨

論文題目 C型慢性肝炎患者における発癌と IL28B 遺伝子の関連

佐藤 雅哉

近年、C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン（IFN）治療への反応性が、19番染色体長腕上に存在し IFN- λ をコードする IL28B 遺伝子及びその遺伝子周辺に存在する複数の遺伝子多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）と関連していることが、ゲノムワイド関連解析により明らかになった。これらの SNP はC型肝炎ウイルス感染後の自然消失にも関与することが明らかになっている。ウイルスの感染が成立すると、免疫担当細胞より、IFNや他のサイトカインの分泌が起こる。C型肝炎ウイルス（Hepatitis C Virus, HCV）のような RNA ウィルスの感染に際しては、レチノイン酸誘導型遺伝子 I や Toll 様受容体といったセンサー分子がウイルス RNA 鎖を認識し、ウイルス駆除のための免疫反応の誘導が開始される。IL28B 遺伝子をはじめとする免疫応答に関わる遺伝子は、生体防衛系の強度や性質にも関与し、ウイルス感染の経過に影響を与えられている。更に、IL28B 遺伝子のコードする IFN- λ は動物実験や細胞株を用いた研究により、アポトーシスの誘導や抗腫瘍効果が報告されている。

これらの報告から、IL28B 遺伝子および周囲 SNP は発癌を含めた C型慢性肝炎の自然経過に影響を与えると推定されるが、C型慢性肝炎患者における IL28B 遺伝子と近傍の SNP が発癌に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。本研究では、IFN 治療歴のない C型慢性肝炎患者を対象に、日本人において IFN 治療反応性との関連が示唆されている IL28B 遺伝子近傍の SNP である rs8099917 が発癌を含めた C型慢性肝炎患者の自然経過に与える影響を検討した。

本研究は 1997 年 8 月より 2009 年 8 月までの間に東京大学医学部附属病院消化器内科外来を受診した患者の中で、遺伝子解析に対する同意を書面にて取得可能であった HCV-RNA 陽性患者より抽出し、2010 年 1 月 31 日までに肝細胞癌（Hepatocellular Carcinoma, HCC）に対する初回治療を当院にて施行された患者を対象とした。B型肝炎ウイルス表面抗原（HBs-Ag）陽性患者、胆道系疾患を合併する患者、IFN による治療を受けた既往のある患者、飲酒量や Body Mass Index（BMI）が不明な患者を除いた 351 人を対象とした。本研究の主要評価項目は HCC の発症年齢であり、IL28B（rs8099917）遺伝子多型、性別、BMI、アルコール消費量といった宿主因子や、ウイルスのセロタイプが HCC 発症年齢に及ぼす影響を検討した。副次評価項目として、臨床血液における生物学的マーカーや、肝

線維化の進行を設定し、IL28B 遺伝子を含めた宿主因子がこれらに与える影響を検討した。ベースラインでの肝生検施行例が少なく、結果を参照出来た患者が 48 症例と限られたため、肝線維化の指標として、AST 対血小板比 (aspartate aminotransferase platelet ratio index, APRI) を適応した。APRI スコア 1.5 以上を肝硬変と定義した。

対象患者 351 人における IL28B (rs8099917) 遺伝子型は TT261 人、TC87 人、CC3 人であった。メジャーアリルである T 遺伝子頻度は 0.87 であり、集団内に Hardy-Weinberg 平衡からの乖離は見られなかった ($p > 0.05$)。男性 200 人 (57.0%)、女性 151 人 (43.0%) であり、BMI > 25 は 70 人 (20%)、アルコール多飲歴のある患者は 75 人 (21.4%)、HCV セロタイプは 1 が 240 人 (68.7%)、2 が 91 人 (25.9%)、判定不能又は未検患者が 20 人 (5.7%) であった。患者の平均発症年齢は 69.3 歳であった。IL28B (rs8099917) はメジャーアリルホモ接合群 (TT) とマイナーアリル陽性群 (TG/GG) にて解析を行った。IL28B (rs8099917) TT 群、TG/GG 群の平均発症年齢は各々 69.88 ± 0.97 歳、 67.48 ± 1.71 歳であった。単変量解析 (Wilcoxon の順位和検定) では TT 群の平均 HCC 発症年齢は TG/GG 群に比し、有意に高かった ($p = 0.02$)。その他、HCC 発症年齢を高くする有意な因子として、女性性別 ($p < 0.001$)、BMI25 以下 ($p = 0.02$) が挙げられた。これらの因子について、AIC を用いたステップワイズ変数選択によりモデルを作成して行った多変量解析でも、TT 群は女性別 ($p < 0.001$)、BMI25 以下 ($p = 0.009$) と共に、HCC 発症年齢を高くする有意な因子として抽出された ($p = 0.02$)。TG、GG 遺伝子型の平均 HCC 発症年齢はそれぞれ 67.51、66.80 歳であり、Jonckheere-Terpstra トレンド検定において、遺伝子型 TT、TG、GG の間での有意な HCC 発症年齢の低下傾向が認められた ($p = 0.02$)。

副次評価項目に関しては、コホート登録時の各臨床所見を用いて行った。単変量解析において、TT 群は、低血小板数 (11.15 vs. 12.80, $p = 0.01$)、高ビリルビン (0.90 vs. 0.83, $p = 0.02$)、低 γ GTP (76.83 vs. 87.23, $p = 0.005$)、低プロトロンビン時間 (PT) (75.40 vs. 79.27, $p = 0.04$) と有意な相関を示した。また、TT 群では、APRI スコアが 1.5 を超える患者の割合が多く (58.62% vs. 46.67%, $p = 0.07$)、AST 値 (77.69 vs. 69.12, $p = 0.12$) と ALT 値 (80.92 vs. 67.79, $p = 0.17$) が高い傾向を示した。これらの因子に対し、IL28B (rs8099917) 遺伝子型とともに、コホート登録時の年齢、性別、BMI、飲酒量を用いて、ステップワイズ変数選択により行った多変量解析 (APRI スコア > 1.5 の患者割合の比較に関してはロジスティック回帰分析) を行うと、TT 群では APRI スコア 1.5 を超える患者が有意に多く ($p = 0.01$)、この他 TT 群は低血小板数 ($p = 0.002$)、高 AST 値 ($p = 0.02$)、高 ALT 値 ($p = 0.002$)、低 PT ($p = 0.002$) と有意な相関を示した。単変量解析で有意な相関を示した γ GTP と総ビリルビン値は多変量解析では有意な因子として抽出されなかった (いずれもステップワイズ変数選択において、最終モデルを構成する変数に採択されなかった)。TT、TC、CC 遺伝

子型の APRI スコアが 1.5 以上を示した患者の割合はそれぞれ 58.6%、47.1%、33.3%であり、Cochran-Armitage の傾向検定において、T アリル保有数の減少に伴い、APRI スコア 1.5 以上の患者は有意な減少傾向を示した ($p=0.04$)。また、T アリルの保有量の減少に伴い、AST 値、ALT 値は減少する傾向を示した (AST 値, TT 77.7 vs. TC 69.6, vs. CC 56.0 IU/l ; ALT 値, TT 80.9 vs. TC 68.7 vs. CC 40.0 IU/l) が、Jonckheere-Terpstra のトレンド検定ではいずれの相関も有意水準には達しなかった (AST 値, $p = 0.11$; ALT 値, $p = 0.15$)。

本研究において、IL28B (rs8099917) マイナーアリル陽性群 (TC/CC) は既知の発癌危険因子である男性性別、高 BMI とともに、若年での HCC 発症の危険因子として抽出された。多量飲酒や HCV セロタイプ 1 は、HCC 発症への関与の報告があるが、本研究では、飲酒と HCV セロタイプは発癌年齢に関与する有意な因子として抽出されなかった。Kumar ら、Miki らは、3000 人以上の患者を対象とし、GWAS を用いて約 40 万箇所の SNP に関し遺伝子型ごとの有病率を横断的に比較した症例-対照研究を行い、C 型慢性肝炎 (Chronic Hepatitis C, CHC) 患者における HCC 発症に関与する SNP を報告したが、いずれの報告においても IL28B 遺伝子とその近傍の SNP は HCC 発症のリスク因子として抽出されなかった。この原因として、一つには横断的な症例-対象研究は非発癌患者の未来の発癌までの期間と、発癌後患者の発癌と研究への登録までの期間が考慮されておらず、本研究の主要評価項目として設定した発癌年齢に比べ、HCC 発症のリスク差を過小評価した可能性が考えられる。更に、GWAS においては、膨大な候補 (SNP) の中から、レプリケーションスタディの候補を選出するため、本来有意でない SNP も偶然有意になってしまう第 1 種の過誤を多く生じることが報告されている。このため、通常の $p < 0.05$ では十分でなく、更に低い p 値が必要となる。この多重検定における対処方法の 1 つが Bonferroni の補正であるが、この補正方法は全ての因子が独立であることが前提となっている。SNP 同士は互いにハプロタイプブロックを形成しており、それぞれが互いに独立でないため、GWAS における Bonferroni の補正は必要以上に保守的な補正となる。Kumar らの報告においても 43 万箇所の SNP の中からレプリケーションスタディへの候補を選出する際、当初に設定された p 値を満たす SNP はなく、基準を $p < 1 \times 10^{-5}$ へと変更し 8 箇所の SNP を抽出している。このため、GWAS での多重検定においては、真に有意な因子が偶然有意となった因子とともにレプリケーションスタディの候補から棄却される危険性を孕んでおり、実際にこれら 2 つの報告にて HCC 発症に関連するとして報告された SNP は互いに異なっている。この多重性の問題も GWAS 研究において HCC 発症のリスク因子として IL28B 遺伝子と近傍の SNP が抽出されなかった原因として考えられた。また、本研究において IL28B(rs8099917) TT 群で、APRI スコアが 1.5 を超える患者が多く、ALT 値も有意に高値であった。過去にも同様に IL28B (rs8099917, rs12979860) メジャーアリルホモ接合群において病理学的に肝硬変の進んだ症例、肝炎の強い症例が多いとの報告や、メジャーアリルホモ接合群において APRI スコアの高い症例が多く、ALT 値が高かったとの報告がある。Tillmann らは、HCV 感染の急性期において、IL28B(rs12979860) メジャーアリルホモ接合群 (CC) を持つ患者に顕性の黄疸が多く発症し、ヘテロ接合群 (CT) においても、黄疸を発症した患者により多くのウイルス自然消失が

見られることを報告した。この研究において、L28B (rs12979860) メジャーアリルホモ接合群 (CC) で急性期の HCV に対するより強い免疫応答とそれに伴う肝障害を生じたことを考慮すると、ウイルス排除が得られなかった患者においても、メジャーアリルホモ接合群において、より強い免疫応答が蓄積されたと考えられる。IFN- λ を介した強い免疫応答の蓄積が、本研究で IL28B (rs8099917) メジャーアリルホモ接合群において、肝障害はより進行するが、その癌抑制作用により発癌年齢が遅らせられるという一見矛盾した結果が導かれた原因と考えられた。

又、本研究において、rs8099917 の T アリルの保有数の増加は発癌年齢の上昇、APRI スコアが 1.5 を超える肝硬変患者の割合の上昇と有意な線形傾向を示したが、マイナーアリルホモ接合群 (GG) の症例が 3 例のみであったため、今後更に多くの症例の蓄積が必要である。IFN- λ の抗腫瘍効果は動物実験や細胞株を用いた実験にて示されてはいるが、IFN- λ を介した宿主免疫や抗腫瘍効果とその背景にある IL28B 遺伝子の関与は依然分かっていない。IL28B 遺伝子とその周囲に存在する SNP が HCC 発症を含めた慢性 HCV 感染に与える機能的役割の解明のためには IL28B に関与する経路の詳細や肝内遺伝子の誘導メカニズムの解明等、今後の更なる研究が必要と考えられた。