

課題番号 : 28指1302
 研究課題名 : HLA遺伝子によるHBV関連疾患の発症機序解明を目指す研究
 主任研究者名 : 西田 奈央
 分担研究者名 : 大橋 順

キーワード : B型肝炎、肝細胞癌、HLA 遺伝子、GWAS、高速シーケンス

研究成果 1 :

成人日本人 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が明らかとなった。続いて全 1,193 例を対象としてゲノムワイド関連解析および HLA 関連解析を実施し、HB ワクチン応答性に特定の HLA-DRB1-DQB1 ハプロタイプ



図 1 日本人 1,193 人のビームゲン接種者の HBs 抗体価

(*DRB1*04:05-DQB1*04:01*, *DRB1*08:03-DQB1*06:01*, *DRB1*14:06-DQB1*03:01*, *DRB1*15:01-DQB1*06:02*) と *BTNL2* 遺伝子が関連することを明らかとした (Nishida, Ohashi et al. *Hepatology* 2018)。

研究成果 2 :

日本人 B 型肝炎患者の中で、肝発がんのある症例 472 例と肝発がんのない症例 513 例を対照としたゲノムワイド関連解析を実施し、さらに GWAS で用いた集団とは独立の日本人やタイ人、香港人の B 型肝炎患者群を用いた Replication 解析を実施した。関連解析の結果、HLA class II 遺伝子の一つである HLA-DPB1 遺伝子の他に、HLA class I 遺伝子領域に存在する HLA-A 遺伝子も肝発がんに関連を示すことが明らかとなった。ゲノムワイド SNP タイピング結果から 6 座位の HLA アリルを推定し HLA 関連解析を実施したところ、特定の HLA-A アリルが肝発がんのリスクを上げることが明らかとなった (Sawai, Nishida et al. Under revision)。

研究成果 3 :

B 型肝炎由来肝発がんの発生を妨げる有意な宿主因子である HLA-DPB1 アリルをホモで有するにも関わらず肝発がんを発症した症例の血清試料から HBV-DNA の抽出を行い、高速シーケンサーを用いて HBV-DNA 全領域の Amplicon sequencing を実施した。同じ HLA-DPB1 アリルをホモで有する肝がんのない症例における HBV-DNA 変異と比較をしたところ、肝発がん患者において既報にはない肝発がんの特徴的なアミノ酸変異が存在することを明らかにした (論文準備中)。さらに Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) による HBV ペプチドと HLA 分子との結合予測を実施したところ、見出されたアミノ酸変異により HLA 分子との結合が弱くなる 4 種類の HBV ペプチドと、結合が強くなる 3 つの HBV ペプチドが予測された。

Subject No. : 28-Shi-1302
 Title : Understanding of roles of HLA in HBV-related diseases
 Researchers : Nao Nishida, Jun Ohashi
 Key word : Hepatitis B infection, hepatocellular carcinoma, HLA, GWAS, NGS

Abstract 1 :

Serum anti-HBV surface antibody (HBsAb) was tested before the vaccination with a recombinant absorbed hepatitis B vaccine (Bimmugen®, Kaketsuken, Kumamoto, Japan) and at 1 month after final inoculation for 1,193 Japanese adult individuals. In this study, we categorized 1,193 individuals into three groups: group_0, low responders, HBsAb ≤ 10 mIU/mL; group_1, intermediate responders, $10 < \text{HBsAb} < 100$ mIU/mL;

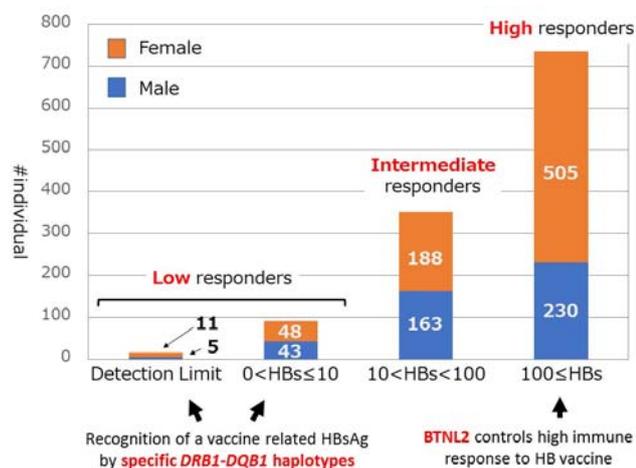


Figure 1 Distribution of HBsAb levels among 1,193 Japanese individuals.

group_2, high responders, HBsAb ≥ 100 mIU/mL. GWAS and *HLA* association tests were carried out using a total of 1,193 Japanese individuals including 107 low responders, 351 intermediate responders, and 735 high responders. Classical *HLA* class II alleles were statistically imputed using the genome-wide SNP typing data. GWAS and *HLA* association tests identified independent associations of *HLA-DRB1-DQB1* and *BTNL2* genes with immune response to HB vaccine designed based on HBV genotype C (Figure 1) (Nishida, Ohashi et al. *Hepatology* 2018).

Abstract 2 :

GWAS using 472 HBV patients with hepatitis B related hepatocellular carcinoma (B-HCC) and 513 chronic hepatitis B (CHB) patients identified the association of *HLA* class I gene with disease progression. The following *HLA* association tests revealed that two specific *HLA-A* alleles increase the risk of B-HCC (Sawai, Nishida et al. Under revision).

Abstract 3 :

HBV-DNA sequencing was carried out by NGS amplicon sequencing using serum samples from B-HCC patients harboring homozygote of HCC-protective *HLA-DPB1* allele. By comparing of HBV-DNA variations between B-HCC and CHB patients, four HBV related peptides showed significant associations with increased risk of HCC (paper in preparation).

Researchers には、分担研究者を記載する。

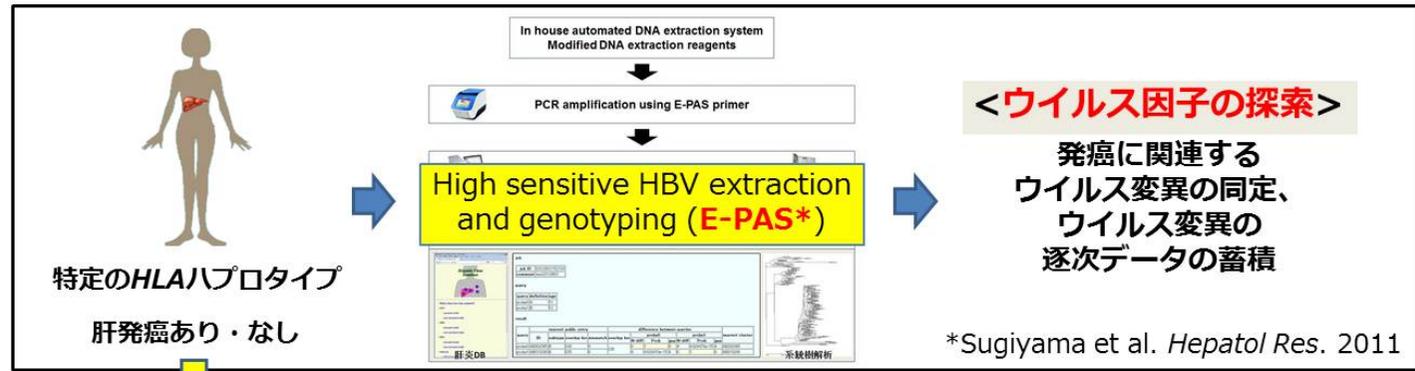
研究のマイルストーン(28指1302:HLA遺伝子によるHBV関連疾患の発症機序解明を目指す研究)

【平成28年度】

HLA imputationおよび
HLA関連解析の実施

HBV genotype判定、HBV-DNA
塩基配列決定

HLA層別解析の実施



【平成29年度】

HLAリスク症例のゲノム解析
(B型肝炎ワクチン、B-HCC)

HBV変異関連解析

ハプロタイプ内多様性解析

1. 簡易シート

| HLA-DP | HLA-DQ | HLA-DG | HLA-DR | HLA-DRA | HLA-DQA1 | HLA-DQB1 | HLA-DQA2 | HLA-DQB2 | HLA-DQA3 | HLA-DQB3 | HLA-DQA4 | HLA-DQB4 |
|-----------|--------|--------|--------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.0-0.25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.25-0.50 | 5 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.50-0.75 | 50 | 10 | 10 | 44 | 16 | 6 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.75-1 | 362 | 407 | 368 | 400 | 411 | 405 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

2. 詳細シート

<臨床的特徴の探索>
290項目の調査表を基に肝疾患に関連する臨床的特徴を同定

GWAS : HBV患者群1,033例と健常者942例の比較

HLA-DP rs2395309
P = 1.24 × 10⁻²¹

MAGI2 rs319875
P = 7.69 × 10⁻⁶
OR = 1.48

Gene A
P = 7.97 × 10⁻⁶
OR = 0.73

Genome-wide SNP imputation (ToMMo-1,070例の日本人Referenceデータを使用)

色あり:GWAS元データ
色なし:Imputationデータ

候補遺伝子の機能予測プラットフォームの構築

<ホスト因子の探索>
慢性肝炎や肝発がんに関連するホスト因子の同定

HLA imputation (Khor SS, Nishida N et al. *Pharmacogenomics J* 2015)

| Posterior probability | A | C | B | DRB1 | DQB1 | DPB1 |
|-----------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |
| 0.0-0.25 | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |
| 0.25-0.50 | 5 (1.2%) | 0 (0.0%) | 5 (1.2%) | 1 (0.2%) | 0 (0.0%) | 0 (0.0%) |
| 0.50-0.75 | 50 (12.0%) | 10(2.4%) | 44 (10.6%) | 16 (3.8%) | 6 (1.4%) | 12 (2.9%) |
| 0.75-1 | 362 (86.8%) | 407(97.6%) | 368 (88.2%) | 400 (95.9%) | 411 (98.6%) | 405 (97.1%) |

【平成30年度】

疾患感受性遺伝子の同定

肝癌関連ウイルス変異の同定

予後予測モデルの構築

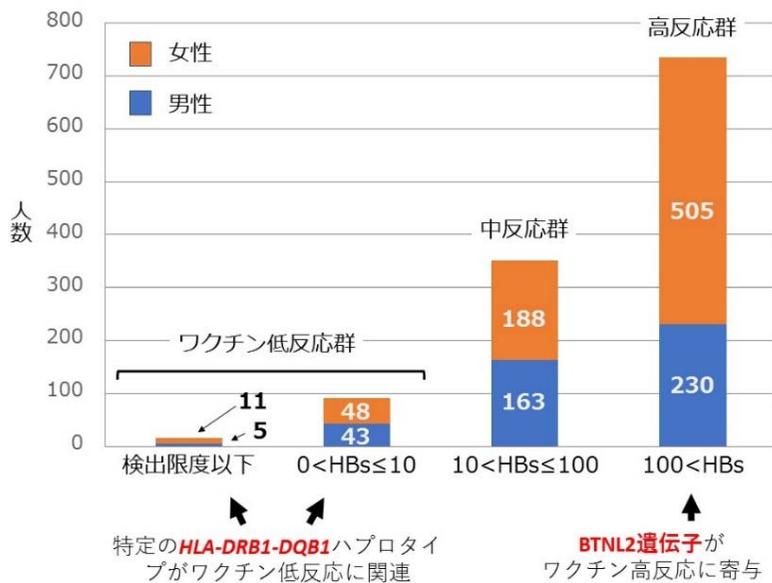
ホスト因子、ウイルス因子と共に詳細な臨床情報を統合的に解析

慢性肝炎や肝発がんのリスク診断や予後予測アルゴリズムを構築

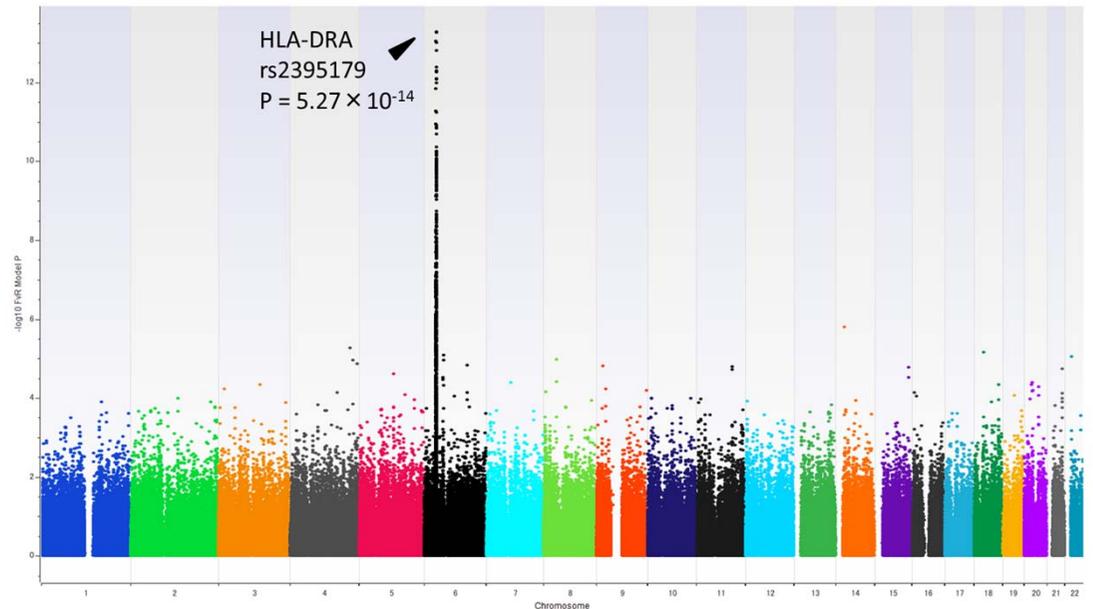
【平成28年度 実施内容】

成人日本人B型肝炎ワクチン接種者1,193例を対象としたゲノムワイド関連解析およびHLA関連解析を実施

⇒ 同一キットを用いたHBs抗体測定を実施し、得られた抗体生産量を元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群に分けて統計解析を実施した。結果、HBワクチン応答性に特定のHLA-DRB1-DQB1ハプロタイプ（DRB1*04:05-DQB1*04:01、DRB1*08:03-DQB1*06:01、DRB1*14:06-DQB1*03:01、DRB1*15:01-DQB1*06:02）とBTNL2遺伝子が関連することを明らかとした（Nishida, Ohashi et al. *Hepatology* 2018）



日本人1,193人のビームゲン接種者のHBs抗体価



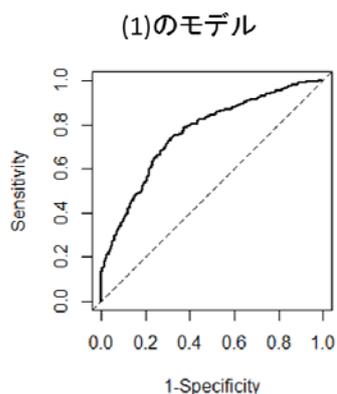
B型肝炎ワクチンに対する応答性が異なる3群を比較したゲノムワイド関連解析によりHLA-DRB1-DQB1とBTNL2遺伝子の関連を同定

課題番号 : 28指1302
研究課題名 : HLA遺伝子によるHBV関連疾患の発症機序解明を目指す研究
(分担研究課題名) 遺伝統計学的解析の実施
主任研究者名 : 西田 奈央
分担研究者名 : 大橋 順

キーワード : B型肝炎、肝細胞癌、HLA 遺伝子、GWAS、高速シーケンス

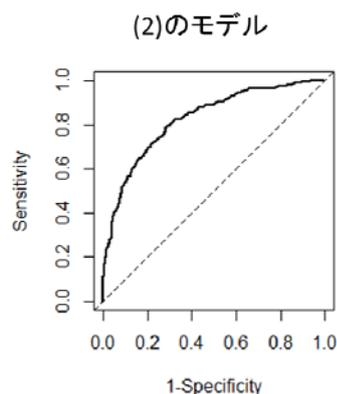
研究成果 :

成人日本人 B型肝炎ワクチン接種において HBs 抗体価 (HBsAb) が 10 以下となるワクチン低反応群を予測する予測式の導出と評価を行った。成人日本人 B型肝炎ワクチン接種者 1,193 名のゲノムワイド SNP タイピングデータを用いて HLA imputation 法により 6 座位の HLA アリルを推定した。GWAS において有意な関連を示した年齢、性別、*HLA-DRB1-DQB1* ハプロタイプ、*BTNL2* SNP のほかに、(1) GWAS で P 値が 10^{-5} 以下となった 8 個の SNPs を追加した場合と、(2) P 値が 10^{-4} 以下となった 45 個の SNPs を追加した場合で予測式の導出を試みた。すべての変数で欠損がない 974 人を選択して予測式を導出したところ、2)の方が AIC が小さく優れた予測式となることが分かった。続いて、導出した予測式の精度を検討するために leave-one-out cross validation を実施したところ、2)の方が正解率、適合率、再現率のいずれにおいてもよい成績となることが明らかとなった。最後に 2つの条件で ROC 曲線を求めたところ、2)の条件で AUC=0.8245 となり導出した予測式は適度な精度を有することが分かった (図 1)。



AUC = 0.7617, 95% CI: 0.7309-0.7925

| | |
|-------------------|-----------|
| 感度 (Sensitivity) | 0.7289973 |
| 特異度 (Specificity) | 0.6970199 |
| 陽性的中率 (ppv) | 0.5951327 |
| 陰性的中率 (npv) | 0.8080614 |



AUC = **0.8245**, 95% CI: 0.7309-0.7925

| | |
|-------------------|-----------|
| 感度 (Sensitivity) | 0.7913279 |
| 特異度 (Specificity) | 0.7140496 |
| 陽性的中率 (ppv) | 0.6279570 |
| 陰性的中率 (npv) | 0.8487230 |

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 28指1302

研究課題名： HLA遺伝子によるHBV関連疾患の発症機序解明を目指す研究

主任研究者名： 西田 奈央

論文発表

| 論文タイトル | 著者 | 掲載誌 | 掲載号 | 年 |
|--|--|------------|--------------------------------------|------|
| Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the BTNL2 gene for response to a hepatitis B vaccine. | 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. | Hepatology | in press | 2018 |
| Role of HLA-DP and HLA-DQ on the clearance of hepatitis B virus and the risk of chronic infection in a multiethnic population. | Trinks J, Nishida N , Hulaniuk ML, Caputo M, Tsuchiura T, Marciano S, Haddad L, Blejer J, Bartoli S, Ameigeiras B, Frías SE, Vistarini C, Heinrich F, Remondegui C, Ceballos S, Echenique G, Charre Samman M, D'Amico C, Rojas A, Martínez A, Ridruejo E, Fernández RJ, Burgos Pratz L, Salamone H, Nuñez F, Galdame O, Gadano A, Corach D, Sugiyama M, Flichman D, Tokunaga K, Mizokami M. | Liver Int. | Liver Int. 2017 Oct;37(10):1476-1487 | 2017 |
| Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. | Nishida N , Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsuhashi 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. | Sci Rep | 6:24767 | 2016 |

学会発表

| タイトル | 発表者 | 学会名 | 場所 | 年月 |
|-------------------------|--|--|----|---------------|
| 遺伝子解析が肝疾患の理解を深める | 西田奈央 | 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 | 東京 | 2018.3.17 |
| B型肝炎ワクチンの効果に関連する宿主因子の同定 | 西田奈央 、杉山真也、澤井裕美、Seik-Soon Khor、土浦貴代、徳永勝士、溝上雅史 | 日本人類遺伝学会 第62回大会 | 神戸 | 2017.11.15-18 |
| 進化的視点からみた疾患関連変異 | 大橋順 | 日本人類遺伝学会 第62回大会 | 神戸 | 2017.11.15-18 |

研究発表及び特許取得報告について

| | | | | |
|--|--|---|---------------|-----------------|
| GWAS identified associations of HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and BTNL2 gene with response to a hepatitis B vaccine | Nao Nishida , Masaya Sugiyama, Hiromi Sawai, Jun Ohashi , Seik-Soon Khor, Takayo Tsuchiura, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami | ASHG 2017 Annual Meeting | ORLANDO | 2017.10-17-21 |
| 肝発がん抵抗性HLA遺伝子型を有する症例におけるHBV-DNA変異解析 | 西田奈央 、杉山真也、土浦貴代、徳永勝士、溝上雅史 | 第26回 日本組織適合性学会大会 | 広島 | 2017.10.27-29 |
| HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and BTNL2 gene associate with response to a hepatitis B vaccine | 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 | American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2017 | Washington DC | 2017.10.20-24 |
| 自己免疫性肝疾患の遺伝的背景 | 西田奈央 | School of AutoImmune Liver Disease | 幕張 | 2017.1.7-8 |
| Associations between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection in the Japanese population | Masashi Mizokami, Nao Nishida , Katsushi Tokunaga | 2016 International HBV Meeting | Seoul | 2016.9.21-24 |
| 肝疾患研究におけるゲノム解析 | 西田奈央 | 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 | 三島 | 2016.6.29 |
| HBV関連疾患とHLAの関連 | 西田奈央 、杉山真也、澤井裕美、考藤達哉、徳永勝士、溝上雅史 | 第52回 日本肝臓学会総会 | 幕張 | 2016.5.19-20 |
| Effects of HLA-DPB1 genotypes on HBV-related diseases in Japanese population | Nao Nishida , Jun Ohashi , Masaya Sugiyama, Takayo Tsuchiura, Mayumi Ishii, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami | 第13回国際人類遺伝学会 | 京都 | 2016.4.3-7 |
| 日本人におけるB型肝炎関連疾患とHLA遺伝子の関連 | 西田奈央 、澤井裕美、 大橋順 、Seik-Soon Khor、杉山真也、土浦貴代、石井真由美、徳永勝士、溝上雅史 | 第39回日本分子生物学会 | 横浜 | 2016.11.30-12.2 |

研究発表及び特許取得報告について

| | | | | |
|---|--|---|-----------|----------------|
| Comprehensive understanding of associations between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection in the Japanese population | Nao Nishida, Jun Ohashi, Masaya Sugiyama, Hiromi Sawai, Keisuke Hino, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Hiroshi Yatsuhashi, Osamu Yokosuka, Kazuhiko Koike, Masayuki Kurosaki, Namiki Izumi, Masaaki Korenaga, Jong-Hon Kang, Eiji Tanaka, Akinobu Taketomi, Yuichiro Eguchi, Naoya Sakamoto, Kazuhide Yamamoto, Akihiro Tamori, Isao Sakaida, Shuheji Hige, Yoshito Itoh, Satoshi Mochida, Eiji Mita, Yasuhiro Takikawa, Tatsuya Ide, Yoichi Hiasa, Minoru Nakamura, Hiroh Saji, Takehiko Sasazuki, Tatsuya Kanto, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami | American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2016 | Boston | 2016.11.11-15 |
| Comprehensive understanding of associations between HLA class II genes and chronic hepatitis B infection in Japanese individuals | Nao Nishida, Jun Ohashi, Seik-Soon Khor, Masaya Sugiyama, Hiromi Sawai, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami | 66th Annual ASHG Meeting | Vancouver | 2016.10.18-22. |

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

| タイトル | 発表者 | 発表先 | 場所 | 年月日 |
|------|-----|-----|----|-----|
| 該当なし | | | | |

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

| 発明名称 | 登録番号 | 特許権者(申請者) (共願は全記載) | 登録日(申請日) | 出願国 |
|------------------|---------------|-----------------------------------|-------------|-----|
| B型肝炎の慢性化の素因の検出方法 | 特願2016-204735 | 徳永勝士、澤井裕美、溝上雅史、 西田奈央 、杉山真也 | 2016年10月17日 | 日本 |

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこ