

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた C 型肝炎治療に伴う肝病態進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析
2. 研究開発代表者： 坂本 直哉（国立大学法人北海道大学）

3. 研究開発の成果

本研究で我々は、ゲノムワイド関連解析(GWAS)の手法を用いて HCV 感染の組織学的進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析を行うことにより、新規診断マーカーを探索することを目的として研究をおこない以下の結果を得た。

- ・エキソーム解析のために、in house で全エキソンと 5 と 3 UTR 領域に対するプローブの設計を行った。これによって、従来の既成品では達成できなかったエキソン部位と UTR を含めての 98% のカバー率を可能とした。作成したエキソームキットを用いて、SVR 後の発がん症例と非発がん症例の約 300 例について高速シーケンサーでエキソーム解析を行った。日本人検体においては、トップクラスの規模であり、C 型肝炎患者においても世界で一番多くのデータを得たといえる。得られたエキソームデータを解析することで、SVR 後発癌に関わる遺伝要因の候補を得た。

- ・HCV 感染後に SVR となったが肝発癌してしまった患者 58 例と肝発癌しなかった患者 120 例の全エキソン領域と主な調節領域を大規模にシーケンスした配列データを解析した。サンプルごと、平均 1 億 2 千万本の配列をヒトゲノムにマッピングし、平均 22 万のゲノム多型 (SNV, indel, CNV) を同定した。ゲノムワイド関連解析を行った結果、4 つの多型が P 値 $< 1E-7$ であったが、Bonferroni 法を用いた多重検定補正後には P 値 < 0.05 にはならず、更なるサンプル数が必要であると考えた。一方で、コピー数多型 (CNV) について、新規に発見した 3 例の 1 つが既知の HCV ターゲット遺伝子を含んでいたことを確認した。

- ・C 型慢性肝炎からの肝発癌に関わる酸化的 DNA 傷害修復遺伝子の個体差を検討するため次世代シーケンサーで解析したところ、MUTYH 遺伝子 SNP の一つが発癌危険因子の候補となった。Luc assay により同 SNP の minor allele 配列の挿入が MUTYH の転写を抑制することが示された。

- ・初年度は、分子動力学計算による HCV 複製阻害薬の作用機序解明に取り組み、ウイルスの NS5A タンパク質への動的薬剤結合推定を行った。ER 膜結合タンパク質のため、膜結合部分を含む全体構造は未決定だったが、相互転換する 2 種類の構造を予測し、それぞれにおいて薬剤結合部位を推定した。

- ・C 型慢性肝炎において、免疫調節因子 Galectin-9 (Gal-9) の血清レベルが増加しており、NK 細胞の細胞傷害能を増強し、肝細胞傷害や HCV 持続感染の一因となる可能性が示された。

- ・HCV 症例における肝発癌・肝病態進展と MICA、PNPLA3、DEPDC5 の SNP の関連を検討し、MICA は既存の因子とは独立に、DEPDC5 は高齢者における亜集団において、PNPLA3 は肝線維化に関連して、それぞれに肝発癌と関連する因子であることを明らかとした。また、抗 HCV 治療によるウイルス排除症例 (sustained viral responder, SVR) 症例における肝病態の進展・肝発癌に関して、アセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) の多型 が関与する可能性を示した。

- ・肝細胞癌の背景疾患と関連するゲノム異常を解明するために、それぞれ病因・病態の異なる肝癌例の癌部と非癌部における deep sequence を行った。その結果、C 型肝炎は TERT promoter 変異が多かったが、B 型肝炎は有意に少なく、TERT promoter 変異例は有意に予後不良であった。

- ・C 型肝炎では肝の線維化ステージの進展に伴って鉄沈着が進み、肝細胞の酸化ストレスに関与することから、次世代シーケンサーを用いてヒト肝癌細胞株 Hep3B における鉄代謝関連遺伝子変異を検索した。その結果 48 箇所 SNVs を認め、うち 24 箇所の SNVs はアミノ酸置換を伴い、3 箇所の Indels を認めた。