

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的要因の候補を得た。

- ・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SNVsはアミノ酸置換を伴い、3箇所Indelsを認めた。