

## 2. ゲノミクスの手法に基づく HCV 感染者の IFN 治療効果の研究

杉山 真也, 溝上 雅史

独立行政法人国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター

ヒトゲノムの解読が進められたことで、感染症領域でもホスト因子の大規模な解析が可能となった。その中で、C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の効果を規定する因子の探索が行われ、IL-28B 遺伝子周囲の SNPs が同定された。この結果は、人種を超えてその関連が認められ、治療感受性の遺伝子型であった場合、最大でオッズ比が約 12 倍を示し、ウイルス排除へと至ることが示された。さらに、この SNPs は HCV の自然治癒にも関連を示し、HCV 感染と IL-28B 遺伝子の間に相互作用が存在していることを示唆するものであった。また、この治療の副作用の一つである貧血の発症に関連する SNPs が ITPA 遺伝子周囲に同定された。貧血に対して抵抗性を示す遺伝子型を保有した場合、ヘモグロビンの減少が抑制された。ITPA 周囲の SNPs では、人種により強い関連を示す SNPs に違いが認められ、人種ごとに検討することの重要性が示された。これらの SNPs を診断に利用することで治療効果を予測することができ、効果的な薬剤選択が可能になると考えられる。

ヒトゲノムの解読と高密度マイクロアレイの開発を始めとする科学的知見と技術の進歩により、遺伝要因がそれほど大きくなかった 2 型糖尿病やリウマチといった慢性疾患についても、大規模な集団を用いた関連解析により複数の原因遺伝子の同定がなされ、注目を集めている<sup>5, 21)</sup>。感染症領域においてもヒトゲノムを対象とした解析が進められており、ウイルス肝炎でも治療に関わるホスト因子の解析が進められている。その中で 2009 年に複数の研究グループから C 型慢性肝炎の治療効果に関連するホスト因子として IL-28B 周囲の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) が報告された。それに続いて、C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) 感染時のウイルスの自然排除やインターフェロン (interferon, IFN) 治療中の副作用の出現に関連する SNPs の発見もなされ、C 型肝炎領域に限っても多くの研究成果が上げられている。

本稿では、ヒトゲノムを対象とした大規模解析の手法や

その応用について解説し、例として C 型肝炎での研究成果について紹介する。

### ホスト因子の解析基盤

感染症での病態や治療効果を決定する因子の探索としては、感染源であるウイルスや細菌のゲノムを解析することが一般的である。外来因子であることやゲノムサイズがヒトと比べて極端に小さいため、解析が比較的容易に行えるためである。しかしながら、治療薬の改善やウイルス因子の探索だけでは、十分な解析でないことは明らかであり、病態の理解や治療効果の予測をより正確に行うためには、ホスト因子の解析が期待されていた。そのような中で、1990 年から 2003 年にかけて取り組まれたヒトゲノムプロジェクトの成果として、ヒトゲノムのドラフト配列が公開されたことで、ホストの遺伝要因に対する大規模な解析を行う基盤が得られた。

ゲノムの多様性に関わる変異の種類としては、一塩基多型 (SNPs; single nucleotide polymorphisms)、コピー数多型 (CNV; copy number variation)、挿入欠失 (Indel; insert and deletion) といったものが挙げられる。これらの中でも、SNPs が全体の変異の 90% を占めており、個体差を規定する大きな要因となっている。SNPs の定義は、集団のアリル頻度に対して 1% 以上の頻度で塩基の置換が認められるものとされ、1% 以下の頻度で観察される塩基置換はレアバリエント (rare variant) と呼ばれている。

#### 連絡先

〒272-8516 千葉県市川市国府台 1-7-1

独立行政法人国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター

TEL: 047-372-3501

FAX: 047-375-4766

E-mail: m.sugiyama@hospk.ncgm.go.jp

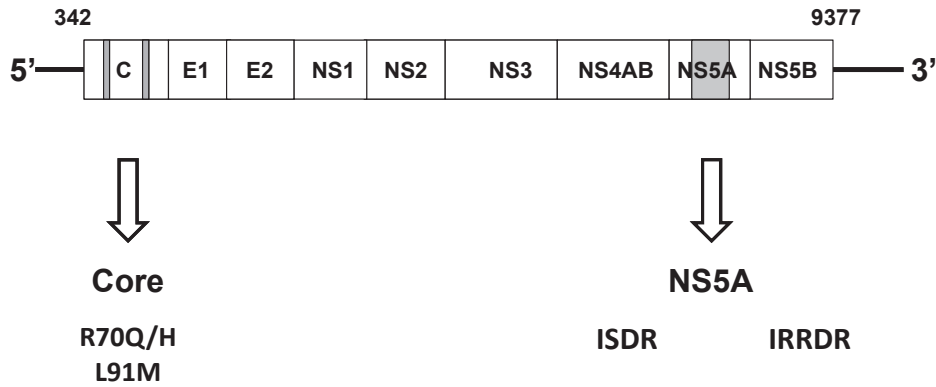


図1 HCV ゲノムの模式図

ゲノム構造とポリプロテインの構成. IFN&RBV 治療に関連を示すウイルスゲノムの内の変異箇所

この出現頻度が1%以上のSNPsは全ゲノム中には約100-300塩基あたりに1つ存在していると考えられており、総数としては約1000万-3000万個程度であると推定されている。この1%のデータを得るには現在のデータ量では不十分であり、近年では国際チームによる1000ゲノムプロジェクトが進められている。この解析は、複数のフェーズに分かれており、最終的には2500人程度のヒトゲノムが解読される予定となっており、人種による遺伝要因の違いについてもこれまで以上に細かく解析されている<sup>6)</sup>。

ヒトの遺伝的多様性の大半を占めるSNPsであるが、1つのSNPsは近傍に存在するSNPsと遺伝的にその挙動を共にすることがある(連鎖不平衡, Linkage disequilibrium, LD)。この現象を利用することで複数のSNPsを一つの集団として扱うことができるため、解析の負担を軽減できる。このSNPs間の連鎖関係のパターンをまとめたのがハプロタイプであり、この研究成果は国際ハップマッププロジェクトとして知られている<sup>11)</sup>。このハプロタイプにも人種による違いがあるため、各地域でのゲノム解析が必要である。従来から人種により薬剤感受性に違いがあることが知られているが、それはSNPsの出現頻度やハプロタイプの違いが要因であると考えられ、薬剤反応性のみならず、各種疾患の病態の違いとしても影響していると考えられている。

### SNPsを利用した全ゲノム関連解析

複数の国際プロジェクトにより、ヒトゲノムとその多様性について明らかとなってきたが、全ゲノムを実際に解析することは費用と労力の面からも困難である。そこで、現在の主流となっているのは、多検体処理に対応し、100万個前後のSNPsが搭載された高密度マイクロアレイによるSNPsタイピング解析である。この解析をケースコントロールスタディとして実施するものが全ゲノム関連解析(Genome-Wide Association Study, GWAS)である。高速シーケンサーによる塩基配列レベルでのGWASも有用で

はあるが、現段階では、SNPsを利用したGWASの研究成果が最も多く報告され、クローン病や2型糖尿病といったこれまで原因が不明であった疾患の原因遺伝子が多数報告されている<sup>3, 16, 17)</sup>。

上記のように、ヒトゲノム解読により急速に進展したホスト因子の解析手法を利用して、我々を含めた複数のグループがC型慢性肝炎の治療効果に関わる因子の探索を実施した。以下では、その成果と概要を解説する。

### HCVとC型慢性肝炎

HCVはフラビウイルス科のヘパシウイルス属に分類されており、ウイルスゲノムは約9.6kbのプラス鎖RNAで約3000アミノ酸からなる1つのポリプロテインをコードしている(図1)。このポリプロテインは宿主のプロテアーゼを利用した切断を受け、構造タンパク質と非構造タンパク質に分類される10個の機能タンパク質となる。ウイルス粒子の大きさはおよそ55-65nmであり、感染に関わる受容体としては、Heparansulphate proteoglycan, DC-SIGN, L-SIGN, LDL受容体, CD-81, ヒトスカベンジャー受容体クラスB1, Claudin-1, Occludinといった分子が候補としてあげられており、これらが複合的に関与して感染が成立すると考えられている<sup>4)</sup>。

HCV感染により引き起こされるC型慢性肝炎の患者数は、全世界で約1億7千万人程度であると推定されており、この数は世界人口の3%を占めるほどである。そのうち、本邦では200万人のキャリアがいると推定されている。国内での原発性の肝癌によって死亡した人数は、国立がんセンターのがん統計情報によると、2004年度には34507人と報告されており、肝硬変患者の70%、肝細胞癌患者の75%をC型肝炎ウイルス感染者が占めており、肝疾患領域の大きな問題となっている。

### C型慢性肝炎の臨床像

HCVが感染すると急性肝炎を発症するが、ウイルス排

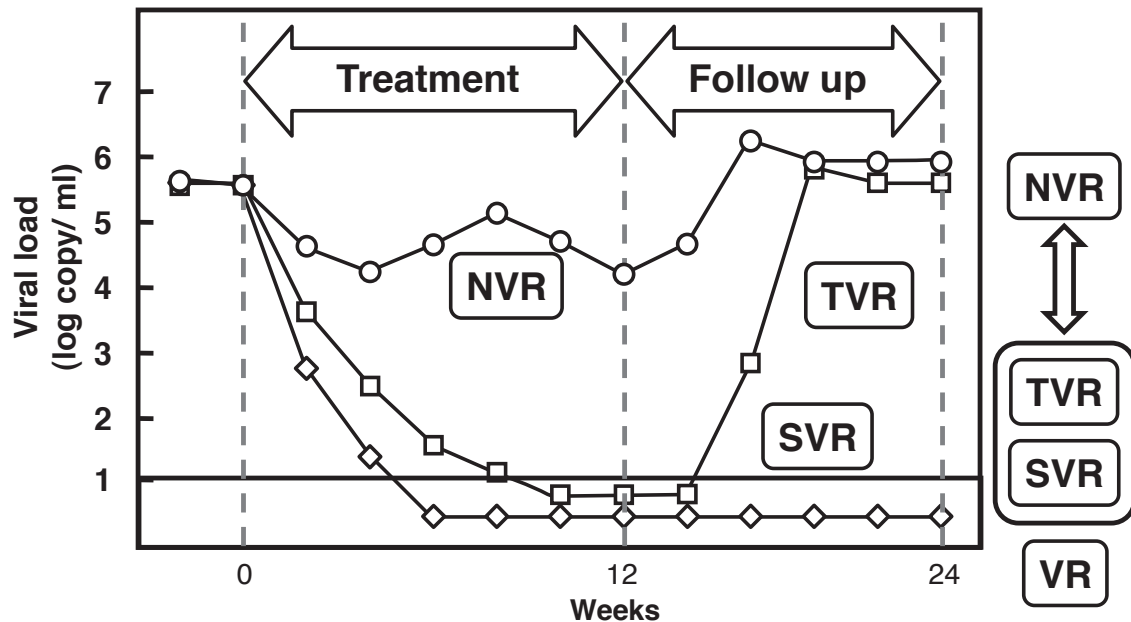


図2 治療時のウイルス動態の模式図

SVRは治療開始後ウイルスが減少を続け、ウイルスの排除が成立する。TVRは治療開始後ウイルスが減少を続けるものの、ウイルスの排除に至らず、治療終了後に再上昇する。NVRは治療開始後もウイルスが一度も陰性化しない。NVRに対して、ウイルス反応性が認められたSVRとTVRをまとめてVRとする。

(Sugiyama M. et al. J Pharmacol Sci. 2011 より引用改変)

除へと至る割合は30%程度で、その大半は慢性肝炎へと移行する。慢性感染が成立した場合、自然治癒（ウイルスの自然排除）へと至ることは稀であり（年率0.2%）、炎症の持続による肝傷害が緩やかに進んで行く。抗ウイルス治療によるウイルスの排除が行われない限り、その病態は約10年単位で進行していき、慢性肝炎から肝硬変、そして肝細胞癌へと至る。現在の標準的な治療法は、ペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン（RBV）の併用療法で、その治療効果は比較的強いものの副作用も強く現れることがあり、高齢化が進んでいる肝炎患者には負担となっている。

PEG-IFN&RBV療法によりウイルス排除へと至る割合は、HCV遺伝子型2、3型では80%程度であり、難治性の1型高ウイルス量タイプでは50%程度である。治療経過としては、一般に3つのパターンに分類され、ウイルス排除へと至る sustained virological response (SVR)、薬物治療中はウイルスが陰性化するが治療終了後に再びウイルスが陽性化する transient virological response (TVR)、そして治療中においてもウイルス陰性が得られない non-virological response (NVR)に分けられる<sup>18)</sup> (図2)。

#### 治療予測因子（ウイルス因子）

C型慢性肝炎の治療効果が上記のように左右される要因としては、薬剤選択等の治療法の因子・ウイルス因子・ホ

スト因子と言ったものが挙げられる。治療法としては、IFN単剤から始まり、PEG-IFN&RBV併用療法となった現在まで改良が進められ、それに伴って、SVRへと至る割合も約2%から50%まで上昇した。一方で、現行の治療薬は、身体的に強い負担を生じ、治療期間は長期に及ぶ。また、副作用も発現するため、治療費や身体的な負担を考えると治療効果や副作用の出現を予測できれば、事前に対処することで効率的な治療を進められるため、これまでも治療効果を予測するウイルス因子の探索が精力的に行われてきた。

#### 1. HCV 遺伝子型

HCVはそのゲノム配列に基づいた分子系統解析により、複数の遺伝子型に分類されており、HCV遺伝子型の違いにより、治療効果に違いがあることが明らかとなっている。HCV/1型では、IFN治療に対する反応性は悪いが、HCV/2型では治療反応性が高いことが知られている（表1）。本邦では、HCV/1型が患者全体の70%を占めているため、問題となっている。

#### 2. コア蛋白の変異

治療抵抗性の患者群においてHCVコア蛋白の70と91番目のアミノ酸変異が関連していることが明らかとなっている（図1）<sup>2)</sup>。治療反応例と不応例を比較すると、コア蛋白の70と91番目の変異が治療不応例において観察され、多変量解析でもこれらの変異が治療不応に強い関連を示し

表1 治療効果に寄与するウイルス因子

因子	特徴・変異	治療効果
HCV 遺伝子型	1	抵抗性
	2	反応性
Core70	R → Q, H	抵抗性
Core91	L → M	抵抗性
ISDR	0	抵抗性
	1-3	中間
	4 ≤	反応性
	6 >	抵抗性
IRRDR	6 >	抵抗性
	6 ≤	反応性

表2 C型慢性肝炎の治療効果に関連する SNPs

Study	Ge et al.	Suppiah et al.	Tanaka et al.	Rauch et al.
地域	北アメリカ	ヨーロッパ, オーストラリア	日本	スイス
人種	ヨーロッパ系, アフリ カ系, ヒスパニック	ヨーロッパ系	アジア日本	ヨーロッパ系
対象	SVR vs. non-SVR	SVR vs. non-SVR	SVR vs. non-SVR	SVR vs. non-SVR
HCV 遺伝子型	1	1	1	1, 2, 3, 4
有意な SNPs	rs12979860	rs8099917	rs8099917	rs8099917
近傍の遺伝子	<i>IL-28B</i>	<i>IL-28B</i>	<i>IL-28B</i>	<i>IL-28B</i>
P 値 *	$1.37 \times 10^{-28}$	$9.25 \times 10^{-9}$	$1.18 \times 10^{-18}$	$3.11 \times 10^{-8}$
OR*	3.1	1.98	12.1	5.19
(95%CI)	(2.1-4.7)	(1.57-2.52)	(6.5-22.4)	(2.9-9.3)

\*解析形式を SVR vs. non-SVR に統一した結果

た。変異のパターンとしては、70 番がアルギニンからグルタミンもしくはヒスチジンに置換され、91 番目のロイシンがメチオニンに置換される傾向があった (表 1)。

### 3. HCV-NS5A 領域の変異

治療反応性を高める変異として、HCV 遺伝子の非構造領域である NS5A 後半部にある約 40 アミノ酸の多様性が知られている (図 1)。この領域は、インターフェロン感受性決定領域 (Interferon Sensitivity Determining Region, ISDR) と呼ばれている<sup>9)</sup>。その領域を観察すると、変異がない野生型、1-3 個の変異を持つ中間型、4 個以上の変異を持つ変異型に分類できる (表 1)。ISDR 野生型では、IFN 単独 24 週投与でのウイルス陰性率は 10% 未満となり、変異が増えるに従って治療反応性が高まるため、治療効果と ISDR の相関が認められている。

この他にもアミノ酸変異数を指標とする予測に NS5A 内の V3 領域にかかるアミノ酸 363-407 番の領域 (Interferon/ribavirin resistance-determining region, IRRDR) が知られている (図 1) (表 1)<sup>7,8)</sup>。IRRDR 変異数が 6 以上ある HCV に感染していた場合、18 例全例 (100%) でウイルス RNA が排除されたが、6 未満であった場合は、27 例中 10 例 (37%) でのみウイルスが排除された。

### C 型慢性肝炎の治療効果と SNPs

様々なウイルス因子が同定されたが、それらを組み合わせても治療効果を予測できるのは、患者全体の約 50% 程度であった。そのため、これ以外の因子としては、宿主因子が残されるのみであり、この影響が大きいことを示唆していた。そこで我々は、多施設共同研究により、標準治療法の効果を規定する SNPs の同定を試みた。SNPs を利用したゲノムワイドな解析を実施することでさらなる治療予測向上に寄与する因子の探索を実施した。プラットフォームとしては、アフィメトリクス社の SNP6.0 チップを使用して、約 90 万 SNPs を対象とした関連解析を実施した。対象は C 型慢性肝炎で PEG-IFN&RBV 治療を受けた患者であり、その効果が認められなかった NVR 群とそれ以外の SVR&TVR 群を比較することで、治療抵抗性に関わる因子を解析した (図 2)。その結果、19 番染色体の *IL-28B* 周辺に治療無効群に関連を示す有意な SNPs を見出した<sup>20)</sup>。このとき最も強い関連を示した SNPs は rs8099917 であり、治療抵抗性を関連する有力な因子であった (図 3A)。レプリケーションスタディの結果を合わせたオッズ比と p 値とオッズ比 (OR) は、 $p < 2.68 \times$

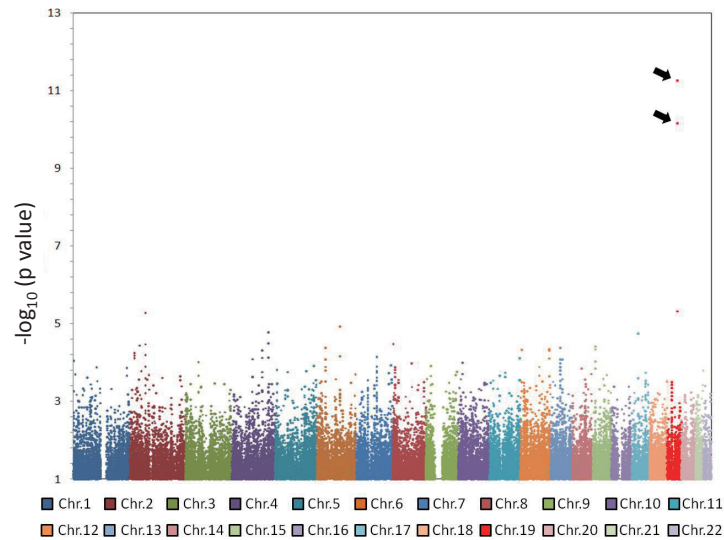


図3A

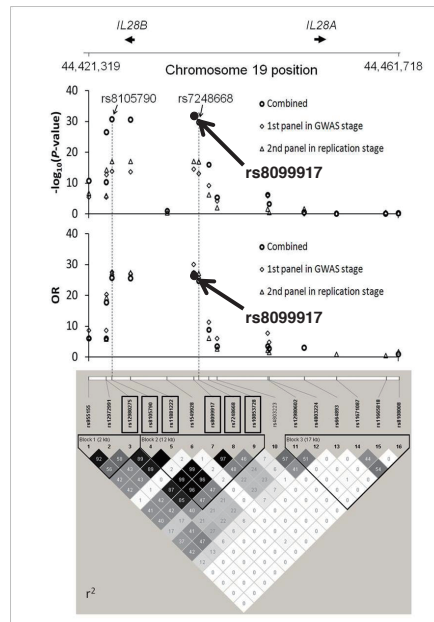


図3B

### 図3 IFN 治療に関連するホスト因子の解析

A. SNPs を利用した GWAS による関連解析の結果. VR と NVR を比較した結果を表したマンハッタンプロット.

B. 上段: GWAS とレプリケーションスタディの p 値と OR とそれらの合算値を示したグラフ. 下段: 関連を示した領域の LD ブロック.

(Tanaka Y., Sugiyama M. et al. Nat Genet. 2009 より引用改変)

$10^{-32}$ , OR = 27.1 で強い関連を示した (図 3B). 同様の結果が, アメリカ, オーストラリア, ヨーロッパのグループから報告され, この遺伝子周囲の SNPs について, 人種を超えた関連が示された<sup>12, 14, 19)</sup> (表 2). 他のグループは, SVR に寄与する因子の解析を実施したため, 表 2 では他

の研究グループの解析手法に合わせて, 我々の結果も SVR に寄与する因子として GWAS のデータを再解析した結果を示している. その結果においても, 日本人のデータは OR = 12.1 を示し, 強い関連を示している.

アメリカの Ge らはヒスパニック, アフリカ系アメリカ

表3 自然治癒に関わる SNPs

	SNPs	集団	P 値	OR	95%CI
Thomas et al.	rs12989760	ヨーロッパ系	$1.0 \times 10^{-7}$	2.6	1.85-3.84
		アフリカ系	$1.0 \times 10^{-4}$	3.1	1.75-5.88
Rauch et al.	rs8099917	HCV 単一感染	$1.96 \times 10^{-5}$	2.49	1.64-3.79
		HCV/HIV 共感染	$8.25 \times 10^{-5}$	2.16	1.47-3.18
		Combined	$6.07 \times 10^{-9}$	2.31	1.74-3.04

表4 貧血に関連する SNPs

ITPA SNPs	集団	MAF%*	p 値	Independent p 値
rs1127354	ヨーロッパ系	7.6	$4.6 \times 10^{-52}$	$2.3 \times 10^{-68}$
	アフリカ系	4.6	$2.7 \times 10^{-7}$	$5.1 \times 10^{-7}$
	ヒスパニック	4.0	$1.2 \times 10^{-3}$	$5.6 \times 10^{-5}$
	Combined	6.9	$1.7 \times 10^{-58}$	$5.9 \times 10^{-26}$
rs7270101	ヨーロッパ系	12.3	$6.8 \times 10^{-22}$	$3.6 \times 10^{-38}$
	アフリカ系	7.9	$3.0 \times 10^{-5}$	$6.6 \times 10^{-5}$
	ヒスパニック	8.0	$3.8 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^{-5}$
	Combined	11.2	$8.5 \times 10^{-76}$	$2.6 \times 10^{-43}$

\* MAF : minor allele frequency

Fellay et al. Nature 2010 より引用改変

人, ヨーロッパ系アメリカ人を対象として解析を実施し, 最も有意な SNPs は rs12979860 であった(表2)。アジア系, ヒスパニック, ヨーロッパ系アメリカ人では治療効果との強い相関が認められたが, アフリカ系アメリカ人では, それらに比べて相関が低かった。このことは, rs12979860 のアリル頻度が人種により異なっていることから説明される。治療反応性を示す C アリルがアフリカ系アメリカ人では他の人種に比べて低くなっており, 以前より指摘されているアフリカ系で HCV 治療反応性が悪いことを遺伝的に説明するものであった。

オーストラリアとヨーロッパの集団を対象とした解析を Suppiah らと Rauch らが実施しており, 我々と同様に rs8099917 を最も有意な SNPs として報告している<sup>14,19)</sup>(表2)。アメリカのグループから報告された rs12979860 と rs8099917 は一見異なる結果であるようにみえるが, これらの SNPs はゲノム上の近接した位置にあり, HapMap データによるとこの周囲には連鎖不平衡が成立している。そのため, 解析プラットフォームの違い等に由来するもので, 実際は同一の結果であると推定できる。

#### 自然治癒に関わる SNPs

HCV に感染した患者の多くは慢性感染へと至るが, 約 30% ではウイルスが排除され, HCV 抗体のみ陽性を示す自然治癒群が存在することが知られている。この自然治癒へと至る遺伝的要因に関しても Thomas らと Rauch らが解析を実施した<sup>14,22)</sup>。

Thomas らは Ge らが報告した rs12979860 に絞った解析

を実施し, この SNPs と自然治癒の関連について解析した。また, Rauch らは GWAS により HCV の自然排除に関わる SNPs の探索を実施した。両者の解析結果で共に, 自然治癒には, C 型慢性肝炎の治療効果に関わる SNPs として報告された rs12979860 と rs8099917 の関連が示され, HCV 感染と IL-28B の関連が再び示されることになった(表3)。HIV と HCV の共感染についても解析がなされたが, Rauch らの解析では, C 型肝炎治療に対する HIV の影響は認められなかった。

#### IFN & RBV 治療での副作用に関連する SNPs

C 型慢性肝炎の治療に使われる RBV が引き起こす貧血は, 主要な副作用の一つで, 減薬や治療の中止の原因である。不十分な治療期間や減薬は, SVR を妨げる要因とされており, 一旦は検出感度以下まで減少したウイルスが, 治療終了後に再び増殖する TVR になりやすい。この貧血の出現を予測できれば, 対象者にのみ予防措置を講ずることによって効率的にウイルス排除へと導くことができる。

Fellay らは, C 型慢性肝炎の治療を受けたアメリカの 1286 人を GWAS により解析し貧血の発症に関連する SNPs として rs6051702 を同定した<sup>10)</sup>。この SNPs は染色体 20 番に存在し, この周囲に存在する複数の遺伝子と連鎖していた。そのなかで, ITPA 上に存在する rs1127354 と rs7270101 に最も強い関連が示され, これらがマイナーアリルを持った場合, 貧血が起こりにくいことを示した。この結果は, ヨーロッパ系, アフリカ系, ヒスパニックでも強い関連が示された(表4)。

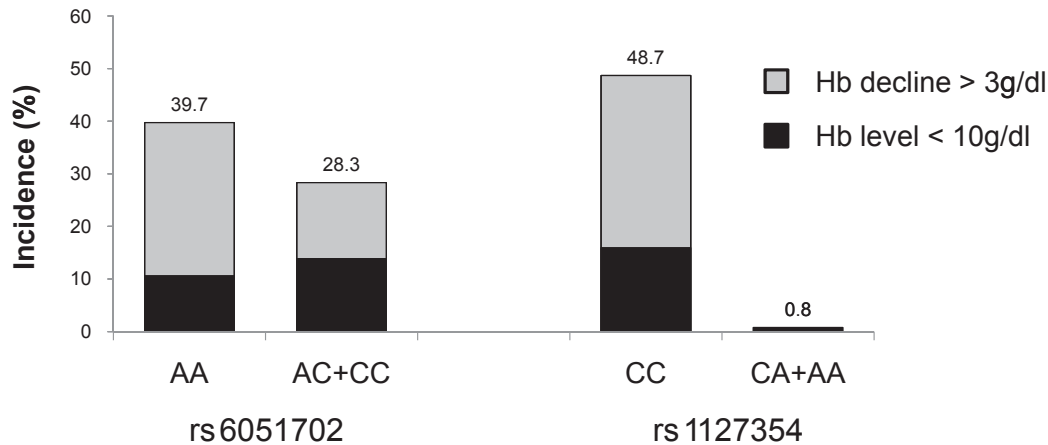


図4 日本人で貧血に関連する SNPs

海外のスタディで関連が認められた rs6051702 と日本人で関連が認められた rs1127354 の比較. rs1127354 にマイナーアリルを持つ場合は、軽度重度を含めたヘモグロビンの減少が抑制された。

(Sakamoto N. et al. Hepatol Res. 2010 より引用改変)

茶山らと我々のグループはそれぞれで日本人を対象として貧血に関連する同様の解析を実施し、日本人特有の結果を導いている<sup>13, 15)</sup>。Fellay らにより報告された rs6051702 や rs7270101 は、いずれも日本人では十分な有意水準に達せず、rs1127354 が日本人の貧血発症に強く関連する SNPs であった。さらに、この SNPs がマイナーアリルをもつタイプ（ヘテロもしくはマイナーホモ型）であると、ヘモグロビンの減少率が抑えられ、ほぼ全ての患者で治療 4 週以内の初期での重度の貧血が認められなかった（約 0.8%）（図 4）。この明確な違いは日本人において特に強く認められ、人種によってアリル頻度や連鎖ブロックのパターンが異なることに由来するものと考えられた。このことから、SNPs 解析においては、人種ごとの解析が重要であるといえる。

#### ホスト因子とウイルス因子の統合解析

治療抵抗性に関わるウイルス因子の中でも、最も強い関連が認められたコア 70 番変異は、IL-28B 周囲の SNPs と相関を示した。特に、治療抵抗性に関連する rs8099917 の遺伝子型である TG/GG を保有する患者でコア 70 番変異が蓄積しており、TG/GG 型かつコア 70 番が野生型であった場合、SVR へと至る割合は、50.0% (6/12) であった<sup>1)</sup>。一方で、TG/GG 型かつコア 70 番が変異型であった場合は、SVR 率が 11.8% (2/17) であった。治療抵抗性に関わるこの 2 因子がそろった場合の治療成績が悪いことから、このような症例では新薬の登場を待つといった選択肢が考えられる。このように、様々な因子の組み合わせを行うことで、さらなる治療予測精度の向上が期待できるため、今後も臨床検査値やゲノム情報を収集し、解析を行う必要がある。

#### おわりに

従来のウイルス因子の解析に加えて、ホストゲノムを対象とした一連の関連解析により治療効果や副作用に関連する因子が複数同定された。現在、本邦では rs8099917 は高度先進医療として、既に臨床の現場で利用されるに至っている。また、複数の因子を総合的に解析することで、今後、さらに高い確率で治療効果の予測が可能になると考えられる。このような研究成果は、ヒトゲノムに対する網羅的な解析によりもたらされたもので、GWAS は既存の科学的知識や研究者の仮説を超えた予想外の結果と大きなブレイクスルーをもたらさう。その成果は新規治療法の開発のみならず、新たな学問領域の創出へと繋がるため、ヒトゲノム情報を基盤とした研究は、今後も重要度が増していくと考えられる。近く、1000 ゲノムプロジェクトにより人種ごとの詳細なゲノム情報が提供され、また、個人のゲノムを研究室レベルで比較的簡単に取得できるシーケンサーも登場している。ゲノムとその多様性を基盤とした診断や治療の研究が加速度的に進んでいるため、様々な疾患領域で個別化医療が現実のものとなる日は近いといえる。

#### 謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究費、肝炎等克服緊急対策研究事業「テーラーメイド医療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究」（平成 19-21 年度、班長：溝上雅史、田中靖人）、「ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究」（平成 22 年度より、班長：田中靖人）による成果である。

## 参考文献

- 1) Akuta, N., F. Suzuki, M. Hirakawa, Y. Kawamura, H. Yatsuji, H. Sezaki, Y. Suzuki, T. Hosaka, M. Kobayashi, M. Kobayashi, S. Saitoh, Y. Arase, K. Ikeda, K. Chayama, Y. Nakamura, and H. Kumada. 2010. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 52:421-9.
- 2) Akuta, N., F. Suzuki, H. Sezaki, Y. Suzuki, T. Hosaka, T. Someya, M. Kobayashi, S. Saitoh, S. Watahiki, J. Sato, M. Matsuda, M. Kobayashi, Y. Arase, K. Ikeda, and H. Kumada. 2005. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48:372-80.
- 3) Barrett, J. C., S. Hansoul, D. L. Nicolae, J. H. Cho, R. H. Duerr, J. D. Rioux, S. R. Brant, M. S. Silverberg, K. D. Taylor, M. M. Barmada, A. Bitton, T. Dassopoulos, L. W. Datta, T. Green, A. M. Griffiths, E. O. Kistner, M. T. Murtha, M. D. Regueiro, J. I. Rotter, L. P. Schumm, A. H. Steinhart, S. R. Targan, R. J. Xavier, C. Libioulle, C. Sandor, M. Lathrop, J. Belaiche, O. Dewit, I. Gut, S. Heath, D. Laukens, M. Mni, P. Rutgeerts, A. Van Gossum, D. Zelenika, D. Franchimont, J. P. Hugot, M. de Vos, S. Vermeire, E. Louis, L. R. Cardon, C. A. Anderson, H. Drummond, E. Nimmo, T. Ahmad, N. J. Prescott, C. M. Onnie, S. A. Fisher, J. Marchini, J. Gori, S. Bumpstead, R. Gwilliam, M. Tremelling, P. Deloukas, J. Mansfield, D. Jewell, J. Satsangi, C. G. Mathew, M. Parkes, M. Georges, and M. J. Daly. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40:955-62.
- 4) Burlone, M. E., and A. Budkowska. 2009. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90:1055-70.
- 5) Craddock, N., M. E. Hurles, N. Cardin, R. D. Pearson, V. Plagnol, S. Robson, D. Vukcevic, C. Barnes, D. F. Conrad, E. Giannoulatou, C. Holmes, J. L. Marchini, K. Stirrups, M. D. Tobin, L. V. Wain, C. Yau, J. Aerts, T. Ahmad, T. D. Andrews, H. Arbury, A. Attwood, A. Auton, S. G. Ball, A. J. Balmforth, J. C. Barrett, I. Barroso, A. Barton, A. J. Bennett, S. Bhaskar, K. Blaszczyk, J. Bowes, O. J. Brand, P. S. Braund, F. Bredin, G. Breen, M. J. Brown, I. N. Bruce, J. Bull, O. S. Burren, J. Burton, J. Byrnes, S. Caesar, C. M. Clee, A. J. Coffey, J. M. Connell, J. D. Cooper, A. F. Dominiczak, K. Downes, H. E. Drummond, D. Dudakia, A. Dunham, B. Ebbs, D. Eccles, S. Edkins, C. Edwards, A. Elliot, P. Emery, D. M. Evans, G. Evans, S. Eyre, A. Farmer, I. N. Ferrier, L. Feuk, T. Fitzgerald, E. Flynn, A. Forbes, L. Forty, J. A. Franklyn, R. M. Freathy, P. Gibbs, P. Gilbert, O. Gokumen, K. Gordon-Smith, E. Gray, E. Green, C. J. Groves, D. Grozeva, R. Gwilliam, A. Hall, N. Hammond, M. Hardy, P. Harrison, N. Hassanali, H. Hebaishi, S. Hines, A. Hinks, G. A. Hitman, L. Hocking, E. Howard, P. Howard, J. M. Howson, D. Hughes, S. Hunt, J. D. Isaacs, M. Jain, D. P. Jewell, T. Johnson, J. D. Jolley, I. R. Jones, L. A. Jones, et al. 2010. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 464:713-20.
- 6) Durbin, R. M., G. R. Abecasis, D. L. Altshuler, A. Auton, L. D. Brooks, R. M. Durbin, R. A. Gibbs, M. E. Hurles, and G. A. McVean. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061-73.
- 7) El-Shamy, A., M. Nagano-Fujii, N. Sasase, S. Imoto, S. R. Kim, and H. Hotta. 2008. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47.
- 8) El-Shamy, A., M. Sasayama, M. Nagano-Fujii, N. Sasase, S. Imoto, S. R. Kim, and H. Hotta. 2007. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol* 51:471-82.
- 9) Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, Y. Ogura, N. Izumi, F. Marumo, and C. Sato. 1996. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81.
- 10) Fellay, J., A. J. Thompson, D. Ge, C. E. Gumbs, T. J. Urban, K. V. Shianna, L. D. Little, P. Qiu, A. H. Bertelsen, M. Watson, A. Warner, A. J. Muir, C. Brass, J. Albrecht, M. Sulkowski, J. G. McHutchison, and D. B. Goldstein. 2010. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* 464:405-8.
- 11) Frazer, K. A., D. G. Ballinger, D. R. Cox, D. A. Hinds, L. L. Stuve, R. A. Gibbs, J. W. Belmont, A. Boudreau, P. Hardenbol, S. M. Leal, S. Pasternak, D. A. Wheeler, T. D. Willis, F. Yu, H. Yang, C. Zeng, Y. Gao, H. Hu, W. Hu, C. Li, W. Lin, S. Liu, H. Pan, X. Tang, J. Wang, W. Wang, J. Yu, B. Zhang, Q. Zhang, H. Zhao, H. Zhao, J. Zhou, S. B. Gabriel, R. Barry, B. Blumenstiel, A. Camargo, M. Defelice, M. Faggart, M. Goyette, S. Gupta, J. Moore, H. Nguyen, R. C. Onofrio, M. Parkin, J. Roy, E. Stahl, E. Winchester, L. Ziaugra, D. Altshuler, Y. Shen, Z. Yao, W. Huang, X. Chu, Y. He, L. Jin, Y. Liu, Y. Shen, W. Sun, H. Wang, Y. Wang, Y. Wang, X. Xiong, L. Xu, M. M. Waye, S. K. Tsui, H. Xue, J. T. Wong, L. M. Galver, J. B. Fan, K. Gunderson, S. S. Murray, A. R. Oliphant, M. S. Chee, A. Montpetit, F. Chagnon, V. Ferretti, M. Leboeuf, J. F. Olivier, M. S. Phillips, S. Roumy, C. Sallee, A. Verner, T. J. Hudson, P. Y. Kwok, D. Cai, D. C. Koboldt, R. D. Miller, L. Pawlikowska, P. Taillon-Miller, M. Xiao, L. C. Tsui, W. Mak, Y. Q. Song, P. K. Tam, Y. Nakamura, T. Kawaguchi, T. Kitamoto, T. Morizono, A. Nagashima, Y. Ohnishi, et al. 2007. A second generation human



- haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449:851-61.
- 12) Ge, D., J. Fellay, A. J. Thompson, J. S. Simon, K. V. Shianna, T. J. Urban, E. L. Heinzen, P. Qiu, A. H. Bertelsen, A. J. Muir, M. Sulikowski, J. G. McHutchison, and D. B. Goldstein. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399-401.
  - 13) Ochi, H., T. Maekawa, H. Abe, Y. Hayashida, R. Nakano, M. Kubo, T. Tsunoda, C. N. Hayes, H. Kumada, Y. Nakamura, and K. Chayama. 2010. ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy--a genome-wide study of Japanese HCV virus patients. *Gastroenterology* 139:1190-7.
  - 14) Rauch, A., Z. Kutalik, P. Descombes, T. Cai, J. Di Iulio, T. Mueller, M. Bochud, M. Battegay, E. Bernasconi, J. Borovicka, S. Colombo, A. Cerny, J. F. Dufour, H. Furrer, H. F. Gunthard, M. Heim, B. Hirschel, R. Malinverni, D. Moradpour, B. Mullhaupt, A. Witteck, J. S. Beckmann, T. Berg, S. Bergmann, F. Negro, A. Telenti, and P. Y. Bochud. 2010. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 138:1338-45, 1345 e1-7.
  - 15) Sakamoto, N., Y. Tanaka, M. Nakagawa, H. Yatsushashi, S. Nishiguchi, N. Enomoto, S. Azuma, Y. Nishimura-Sakurai, S. Kakinuma, N. Nishida, K. Tokunaga, M. Honda, K. Ito, M. Mizokami, and M. Watanabe. 2010. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 40:1063-1071.
  - 16) Saxena, R., B. F. Voight, V. Lyssenko, N. P. Burtt, P. I. de Bakker, H. Chen, J. J. Roix, S. Kathiresan, J. N. Hirschhorn, M. J. Daly, T. E. Hughes, L. Groop, D. Altshuler, P. Almgren, J. C. Florez, J. Meyer, K. Ardlie, K. Bengtsson Bostrom, B. Isomaa, G. Lettre, U. Lindblad, H. N. Lyon, O. Melander, C. Newton-Cheh, P. Nilsson, M. Orho-Melander, L. Rastam, E. K. Speliotes, M. R. Taskinen, T. Tuomi, C. Guiducci, A. Berglund, J. Carlson, L. Gianniny, R. Hackett, L. Hall, J. Holmkvist, E. Laurila, M. Sjogren, M. Sterner, A. Surti, M. Svensson, M. Svensson, R. Tewhey, B. Blumenstiel, M. Parkin, M. Defelice, R. Barry, W. Brodeur, J. Camarata, N. Chia, M. Fava, J. Gibbons, B. Handsaker, C. Healy, K. Nguyen, C. Gates, C. Sougnez, D. Gage, M. Nizzari, S. B. Gabriel, G. W. Chirn, Q. Ma, H. Parikh, D. Richardson, D. Rieke, and S. Purcell. 2007. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331-6.
  - 17) Sladek, R., G. Rocheleau, J. Rung, C. Dina, L. Shen, D. Serre, P. Boutin, D. Vincent, A. Belisle, S. Hadjadj, B. Balkau, B. Heude, G. Charpentier, T. J. Hudson, A. Montpetit, A. V. Pshezhetsky, M. Prentki, B. I. Posner, D. J. Balding, D. Meyre, C. Polychronakos, and P. Froguel. 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-5.
  - 18) Sugiyama, M., Y. Tanaka, M. Nakanishi, and M. Mizokami. 2011. Novel Findings for the Development of Drug Therapy for Various Liver Diseases: Genetic Variation in IL-28B Is Associated With Response to the Therapy for Chronic Hepatitis C. *J Pharmacol Sci* 115:263-9.
  - 19) Suppiah, V., M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M. L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G. J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Muller, M. Bahlo, G. J. Stewart, D. R. Booth, and J. George. 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100-4.
  - 20) Tanaka, Y., N. Nishida, M. Sugiyama, M. Kurosaki, K. Matsuura, N. Sakamoto, M. Nakagawa, M. Korenaga, K. Hino, S. Hige, Y. Ito, E. Mita, E. Tanaka, S. Mochida, Y. Murawaki, M. Honda, A. Sakai, Y. Hiasa, S. Nishiguchi, A. Koike, I. Sakaida, M. Imamura, K. Ito, K. Yano, N. Masaki, F. Sugauchi, N. Izumi, K. Tokunaga, and M. Mizokami. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105-9.
  - 21) TheWellcomeTrustCaseControlConsortium. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661-78.
  - 22) Thomas, D. L., C. L. Thio, M. P. Martin, Y. Qi, D. Ge, C. O'Huigin, J. Kidd, K. Kidd, S. I. Khakoo, G. Alexander, J. J. Goedert, G. D. Kirk, S. M. Donfield, H. R. Rosen, L. H. Tobler, M. P. Busch, J. G. McHutchison, D. B. Goldstein, and M. Carrington. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798-801.

# Genome-wide association study and the clinical application to chronic hepatitis C

**Masaya SUGIYAMA, Masashi MIZOKAMI**

The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine

1-7-1, Kohnodai, Ichikawa, Chiba 272-8516

m.sugiyama@hospk.ncgm.go.jp

Based on the data and technology generated in previous international projects, such as the Human Genome Project and the HapMap, for the building of the common patterns of genetic variation in humans, a genome-wide association study (GWAS) to HCV infection was conducted to reveal genetic effects against treatment response or the induction of side effects. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with response to pegylated-interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) therapy were determined around *IL-28B* in chromosome 19, and the strong association was also observed in spontaneous viral clearance regardless of population. These data imply that an important interaction between HCV infection and *IL-28B* is critical for viral persistence or clearance. PEG-IFN and RBV therapy is associated with a range of treatment-limiting adverse effects. One of the frequent side effects induced by the combination therapy is haemolytic anaemia. The severe anaemia requires the reduction of the RBV dose, which could lead to treatment failure. Genetic variants around inosine triphosphatase gene (ITPA) were associated with haemolytic anaemia. Interestingly, the significant SNPs observed in Europe and the United States were not strongly associated with Japanese population although all significant SNPs were located around ITPA gene, suggesting that SNPs typing using individual population are required for the collection of precise data. These significant SNPs would be useful for prediction prior to treatment for individualized medicine.