

博士論文

慢性 C 型肝炎患者のインターフェロン感受性関連遺伝子  
MAPKAPK3 の同定および機能解析

2010 年 3 月

奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科

塚田 裕庸

## 目次

	頁
略語	4
1. 研究の背景	6
1.1 慢性 C 型肝炎患者に対するインターフェロン (IFN) 療法とその課題	6
1.2 IFN 療法の抗ウイルス作用と I 型 IFN シグナル伝達経路	8
1.3 ケース・コントロール関連解析による IFN 感受性関連遺伝子の探索	10
1.4 本論文の構成	14
2. 慢性 C 型肝炎患者の IFN 感受性関連遺伝子 MAPKAPK3 の同定	15
2.1 本研究の目的	15
2.2 材料および方法	16
2.2.1 対象患者および試料収集	16
2.2.2 tag single nucleotide polymorphism (SNP) の選定	16
2.2.3 SNP 遺伝子型の判定	18
2.2.4 Hardy-Weinberg 平衡への適合度検定	21
2.2.5 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子頻度モデル)	22
2.2.6 ケース・コントロール関連解析 (SNP 遺伝子型頻度モデル)	24
2.2.7 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子の相加モデル)	25
2.2.8 ケース・コントロール関連解析 (ハプロタイプ頻度モデル)	26
2.2.9 集団階層化の補正	28
2.2.10 多変量 Logistic 回帰分析	30
2.3 結果	31
2.3.1 tag SNP の選定	31
2.3.2 tag SNP 遺伝子型の判定	31
2.3.3 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子頻度モデル)	31
2.3.4 ケース・コントロール関連解析 (SNP 遺伝子型頻度モデル)	32
2.3.5 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子の相加モデル)	32
2.3.6 ケース・コントロール関連解析 (ハプロタイプ頻度モデル)	33
2.3.7 集団階層化の補正	33
2.3.8 多変量 Logistic 回帰分析	34
2.3.9 MAPKAPK3 遺伝子領域のその他 SNP での関連解析	34
2.4 考察	46
3. IFN 感受性関連遺伝子 MAPKAPK3 の機能解析	49
3.1 本研究の目的	49
3.2 材料および方法	50

3.2.1	MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域における新規 SNP の探索	50
3.2.2	培養細胞	50
3.2.3	HCV replicon 細胞	50
3.2.4	ヒト末梢血単核球の調製	51
3.2.5	リアルタイム定量 PCR 法	51
3.2.6	allele specific transcript quantification 法 (ASTQ 法)	52
3.2.7	MAPKAPK3 発現ベクター構築	54
3.2.8	ウェスタンブロットティング	55
3.2.9	luciferase reporter assay	55
3.2.10	HCV replicon 細胞への遺伝子導入、cell sorting、リアルタイム定量 PCR	56
3.3	結果	57
3.3.1	MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域における新規 SNP の探索	57
3.3.2	MAPKAPK3 組織分布	57
3.3.3	I 型 IFN 刺激による MAPKAPK3 発現変動	57
3.3.4	ASTQ 法	57
3.3.5	MAPKAPK3 一過性過剰発現の確認	58
3.3.6	I 型 IFN シグナル伝達に対する MAPKAPK3 の抑制作用	58
3.3.7	I 型 IFN の抗 HCV 作用に対する MAPKAPK3 の抑制作用	59
3.4	考察	67
4.	結論	70
	謝辞	71
	参考文献	72

## 略語

本研究では下記の略語を使用した。

ASTQ	: allele specific transcript quantification
ADP	: adenosine diphosphate
ATP	: adenosine triphosphate
bp	: base pair
CREB	: cyclic AMP responsive element binding protein
GDP	: guanosine diphosphate
GTP	: guanosine triphosphate
EDTA	: ethylene diamine tetraacetic acid
eIF-2	: eukaryotic initiation factor-2
EMCV	: encephalomyocarditis virus
FACS	: fluorescence activated cell sorter
FCS	: fetal calf serum
FRET	: fluorescence resonance energy transfer
GAF	: interferon-gamma activated factor
GAS	: IFN- $\gamma$ activated site
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	: green fluorescent protein
GTP	: guanosine triphosphate
HCV	: hepatitis C virus
IFN	: interferon
IFNAR1	: type I IFN receptor-1
IMPDH	: inosine-monophosphate dehydrogenase
IRES	: internal ribosome entry site
ISRE	: IFN-stimulated response element
ISGF3	: interferon-stimulated gene factor 3
JAK	: Janus-activated kinase
LAP	: liver-enriched transcriptional activator protein
MAP	: mitogen-activated protein
MAPKAPK	: MAP kinase-activated protein kinase
MAPKK	: MAP kinase kinases
MEQ	: million genome equivalents
mRNA	: messenger RNA

MxA	: myxovirus resistance A
OAS1	: 2',5'-oligoadenylate synthetase 1
PKR	: double strand RNA-dependent protein kinase
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RAC	: ras-related C3 botulinum toxin substrate
rpm	: rounds per minute
RT-PCR	: reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	: single nucleotide polymorphism
SOCS1	: suppressor of cytokine signaling 1
STAT	: signal transducer and activator of transcription
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 1. 研究の背景

### 1.1 慢性 C 型肝炎患者に対するインターフェロン (IFN) 療法とその課題

慢性 C 型肝炎は、C 型肝炎ウイルス (hepatitis virus C, HCV) の持続感染により発症する (1)。HCV に感染すると急性肝炎となり、20-40%の患者では HCV が排除されて自然治癒する (図 1.1)。一方、残り 60-80%の患者では HCV が排除されず慢性肝炎に移行する。HCV は主に肝細胞に感染して、宿主ゲノムに取り込まれることなく 30 年以上にわたって持続感染する。慢性肝炎が長期間持続すると、炎症による細胞死と再生の繰り返しにより肝組織の繊維化が進行して、30-40%の患者が肝硬変となる。さらに肝硬変に移行した患者では、60-80%の高率で肝細胞癌に進展する(1)。日本国内では年間約 2.5 万人が肝細胞癌で死亡しており、その約 8 割は HCV 感染によると考えられている。HCV の主な感染経路は血液であり、HCV 感染者は日本国内で約 200 万人以上、世界で約 1.7 億人以上と推定されている。肝硬変から高率で肝細胞癌に進展することに加え、肝細胞癌は切除後の再発率も高く治療困難であるため、慢性 C 型肝炎の段階での治療および肝硬変への移行防止が重要な治療戦略となっている。

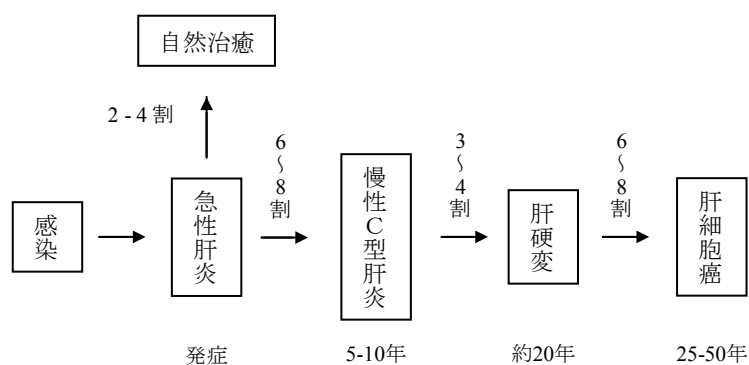


図 1.1 HCV 感染からの自然経過

慢性 C 型肝炎の治療には HCV の排除が重要であり、HCV に対して単独で抗ウイルス作用を示す治療薬は I 型インターフェロン (type I interferon, IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$ ) のみが臨床応用されている。日本国内では 1992 年に慢性 C 型肝炎に対する IFN 療法が保険適応となり、さらに血中安定性向上のためにポリエチレングリコール化した IFN- $\alpha$  と抗ウイルス剤リバビリンとの併用療法が 2004 年 12 月に承認されている。1 本鎖プラス鎖 RNA ウイルスである HCV には数種類の遺伝子型が存在し、日本では HCV 遺伝子型 1b の感染患者が約 70%、HCV 遺伝子型 2a が約 20%、HCV 遺伝子型 2b が約 10%と報告されている (2)。日本人に多い HCV 遺伝子型 1b 感染かつ高ウイルス量患者では IFN 治療効果が低く、最も有効と報

告されているリバビリンとの併用療法においても約 50%の患者は HCV が排除されない (1,3,4)。また、IFN 療法は投与期間が半年以上と長く、発熱、全身倦怠感、抑うつなど副作用も認められ (5)、治療効果の個人差が臨床上の重要な課題となっている。

IFN 治療効果の個人差の原因となる因子が明らかとなれば、それぞれの患者に適した IFN 投与方法 (投与量、投与期間、ポリエチレングリコール化 IFN、併用剤など) を選択するための判断に有用と考えられる。また、副作用との兼ね合いによる IFN 投与中止や対症療法 (肝庇護療法、瀉血療法など) への早期変更の判断にも有用と考えられる。また、IFN 治療効果の個人差の原因が明らかとなれば、新たな治療方法や治療薬の開発につながることも期待される。

慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果と関連する因子として、ウイルス側因子、患者側因子および薬剤因子が報告されている (表 1.1)。ウイルス側因子としては、HCV 遺伝子型 1b 感染患者および治療前の血中 HCV RNA 量が高値の患者において、IFN 治療効果が低いことが報告され (6)、ウイルス側因子を指標とした治療効果の予測が臨床で用いられている。しかし、ウイルス側因子が類似の患者においても、IFN 治療効果に個人差が認められるため、患者側因子の影響も重要と考えられている。これまでに患者側因子として、年齢、性別、人種、肝線維化、および肥満度など報告されている (7,8)。また、サイトカイン、ケモカインおよび IFN 誘導遺伝子などの遺伝的多型が IFN 治療効果と関連することも報告されている (8-12)。しかしながら、これら患者側因子の IFN 治療効果への関連は弱く、より強く IFN 治療効果と関連する患者側因子の同定が、臨床上の重要な課題とされている。

表 1.1 慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果と関連する代表的因子

ウイルス側因子	HCV RNA 量 : 多い (治療効果低い)、少ない (治療効果高い) HCV 遺伝子型 : HCV-1b (治療効果低い)、HCV-non 1b (治療効果高い) ウイルスゲノム変異
患者側因子	年齢 : 高齢 (治療効果低い)、若齢 (治療効果高い) 性別 : 女性 (治療効果低い)、男性 (治療効果高い) 肥満度 : 高い (治療効果低い)、低い (治療効果高い) 肝線維化 : 線維化 F2- F4 (治療効果低い)、線維化 F0-F1 (治療効果高い) 遺伝的多型 (IFN- $\gamma$ , IL-2, MxA, etc.)
薬剤因子	IFN : 投与量、投与期間、種類 (ポリエチレングリコール化) 抗ウイルス剤リバビリンとの併用

IL-2; interleukin-2, MxA; myxovirus resistance A.

## 1.2 IFN 療法の抗ウイルス作用と I 型 IFN シグナル伝達経路

I 型 IFN は多面的な機能をもつサイトカインであり、抗ウイルス作用、免疫調節作用、細胞増殖抑制作用および細胞分化誘導作用などを示し、IFN 受容体下流のシグナル伝達経路は複数存在することが報告されている (13,14)。慢性 C 型肝炎患者の IFN 療法では、I 型 IFN の抗ウイルス作用による HCV の排除が重要であり、IFN 受容体下流の主に 2 経路が重要であることが報告されている(14)。

第一に、Janus-activated kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路が I 型 IFN の抗ウイルス作用に必須の経路であることが報告されている(図 1.2)。I 型 IFN が細胞表面の I 型 IFN 受容体 (type I IFN receptor, IFNAR1 と IFNAR2 のヘテロダイマー) に結合すると、受容体細胞内領域に結合する JAK1 と tyrosine kinase 2 が活性化され、その後 STAT1 および STAT2 がリン酸化される。さらに、STAT1 および STAT2 は IFN regulatory factor 9 と複合体を形成して、転写因子 IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3)として機能する。また、リン酸化された STAT1 はホモダイマーを形成して、転写因子 IFN-gamma activated factor (GAF)として機能する。核に移行した転写因子 ISGF3 および GAF は、IFN 誘導遺伝子の転写制御領域に存在する IFN-stimulated response element (ISRE) 配列および IFN- $\gamma$  activated site (GAS) 配列に結合して、多数の遺伝子の転写を誘導して抗ウイルス作用を惹起する。ウイルス感染細胞内では、誘導された 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1)、myxovirus resistance A (MxA)、double strand RNA-dependent protein kinase (PKR)などにより、ウイルス RNA の分解および転写抑制作用、ウイルスタンパクの合成阻害作用などが活性化される (図 1.3)。また、免疫系によるウイルス感染細胞の排除も活性化され、I 型 IFN の多面的な作用により抗ウイルス作用が誘導される (1,15)。

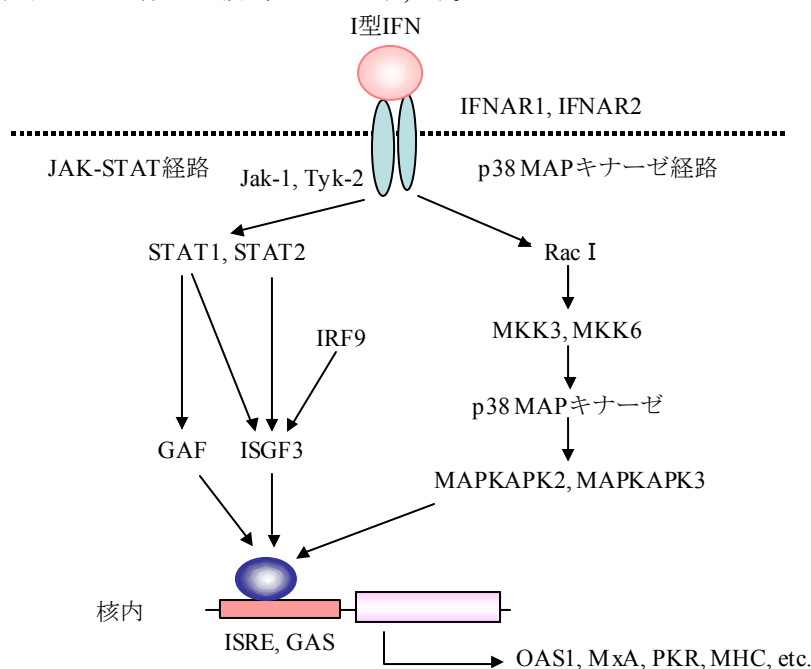


図 1.2 I 型 IFN シグナル伝達経路と抗ウイルス作用の誘導



第二に、p38 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路が I 型 IFN の抗ウイルス作用に重要であることが報告されている (図 1.2)。I 型 IFN が IFN 受容体に結合すると、低分子量 GTP 結合タンパク質の ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) が活性化され、その後 MAP kinase kinases (MAPKK) ファミリーの MAPKK3 および MAPKK6 がリン酸化される (16,17)。リン酸化された MAPKK3 および MAPKK6 は p38 MAP キナーゼを活性化して、活性化された p38 MAP キナーゼは MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2) および MAPKAPK3 を活性化し、抗ウイルス作用を誘導する(18-21)。p38 MAP キナーゼ経路の遺伝子欠損マウス (MAPKK3, MAPKK6, p38 MAP キナーゼ, MAPKAPK2)では、I 型 IFN 刺激後の ISRE および GAS 配列からの転写誘導が抑制され、I 型 IFN の抗ウイルス作用が低下するため、p38 MAP キナーゼ経路は I 型 IFN による抗ウイルス作用の誘導に必要であることが証明されている(17,19,20)。

近年、IFN 受容体 (IFNAR1, type I IFN receptor-1)プロモーター領域の GT 塩基繰り返し数の遺伝的多型について、特定の GT 繰り返し数の患者では IFN 治療効果が高いことが報告された(22)。この遺伝的多型が IFN 治療効果に影響を与える機序は不明であるが、IFNAR1 発現量の変化を介して治療効果に影響する可能性が考えられている。同様に、IFN 受容体下流のシグナル伝達分子に質的または量的変異の原因となる遺伝的多型が存在する場合、IFN 治療効果が影響を受ける可能性が考えられる。しかし、これまでに IFN シグナル伝達分子の遺伝的多型について、IFN 治療効果との関連は報告されていない。そこで本研究では、IFN 治療効果と関連する患者側遺伝因子の同定を目的として、IFN シグナル伝達分子の遺伝的多型と IFN 治療効果との関連を検討した。

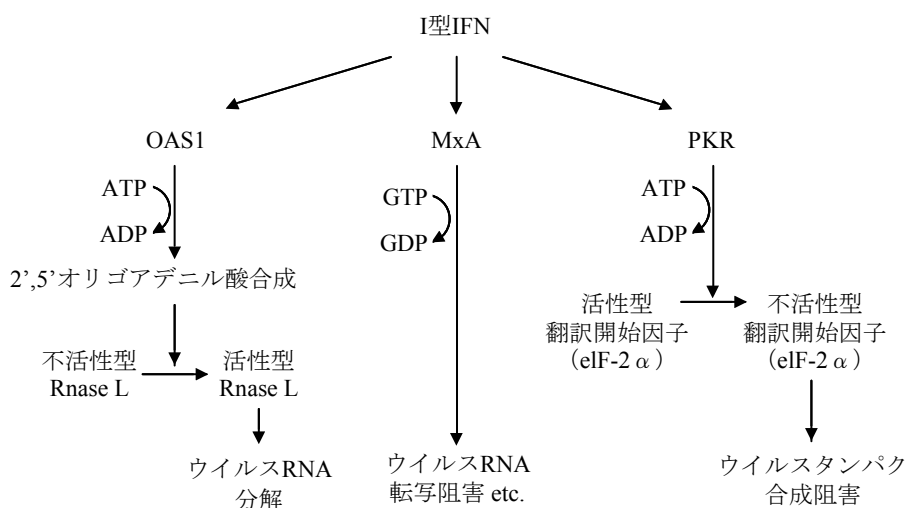


図 1.3 IFN 誘導遺伝子によるウイルス感染細胞内でのウイルス阻害作用

### 1.3 ケース・コントロール関連解析による IFN 感受性関連遺伝子の探索

本研究では、single nucleotide polymorphism (SNP) を遺伝的多型マーカーに用いたケース・コントロール関連解析を行い、IFN シグナル伝達分子の遺伝的多型が慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果と関連する可能性を検討した。SNP は一般集団において頻度が 1%以上の一塩基置換と定義され、ある SNP (A/a) では A 対立遺伝子の染色体と a 対立遺伝子の染色体が存在する。ヒトは両親由来の 1 対の相同染色体をもつため、対立遺伝子の組み合わせは遺伝子型と定義され、SNP (A/a) では AA、Aa および aa の遺伝子型のヒトが集団内に存在する。SNP はゲノム DNA 上には約 1000 万ヶ所、平均で約 300 塩基対ごとに 1 ヶ所存在するため、ゲノム上に最も高密度に存在する遺伝的多型マーカーとなる。この 1000 万ヶ所の SNP が人類の遺伝的多型の 90%を占めると推定されている (23,24)。

SNP を遺伝的多型マーカーに用いたケース・コントロール関連解析では、IFN 療法の著効患者 (ケース) と非著効患者 (コントロール) の SNP 遺伝子型を解析して、著効群と非著効群間での SNP 対立遺伝子や SNP 遺伝子型の出現頻度の違いを統計学的手法により検定する (図 1.4)。ある SNP (A/a)について、著効群で A 対立遺伝子の頻度が高く、非著効群で a 対立遺伝子の頻度が高い場合、SNP (A/a) は IFN 治療効果と関連する遺伝的多型マーカーであることが統計学的に示される。また SNP (A/a) が位置する遺伝子は、慢性 C 型肝炎患者の IFN 感受性と関連する IFN 感受性関連遺伝子であることが示される。2 群間での SNP 出現頻度の違いは、分割表における独立性の検定により評価する。統計学的な検定方法については、2.2 項で詳細に説明する。

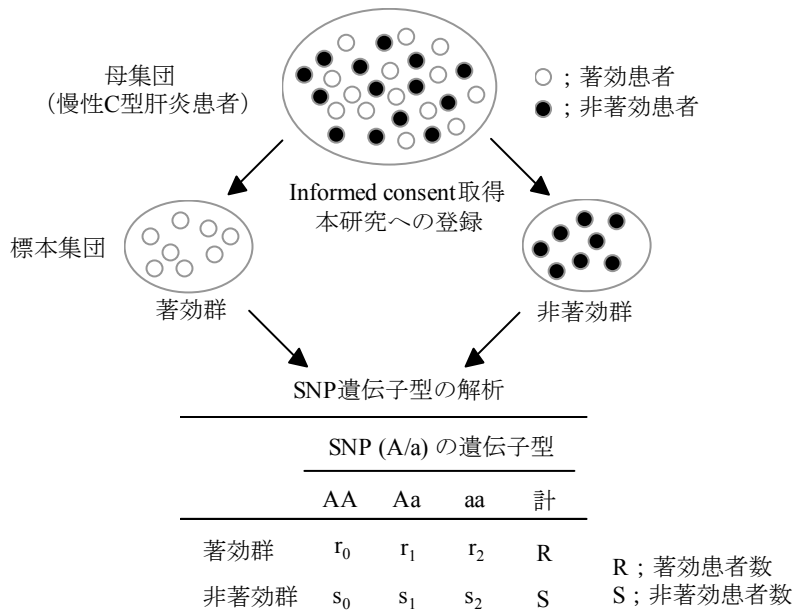


図 1.4 ケース・コントロール関連解析の例

SNP を遺伝的多型マーカーに用いたケース・コントロール関連解析では、一般集団の共通祖先の染色体上に IFN 抵抗性となる原因変異 a およびその近傍に連鎖する SNP の b 対立遺伝子が存在する場合を想定する (図 1.5)。染色体上で連鎖する対立遺伝子の組み合わせはハプロタイプと定義され、共通祖先ゲノムにはハプロタイプ A-B とハプロタイプ a-b の 2 種類が存在する。ヒトは両親由来の 1 対の相同染色体をもち、新たな突然変異または減数分裂時の相同染色体間での組換えが起こらない限り、ハプロタイプの対立遺伝子の組み合わせは保たれて次世代に伝達 (共遺伝) される。その結果、隣接する対立遺伝子間に連鎖性が生じ、これを連鎖不平衡と定義される。図 1.5 の例では、原因変異 a と SNP b 対立遺伝子の組み合わせであるハプロタイプ a-b は保たれて現在の集団に共遺伝される確率が高いため、非著効患者にはハプロタイプ a-b が有意に高頻度に認められることが期待される。

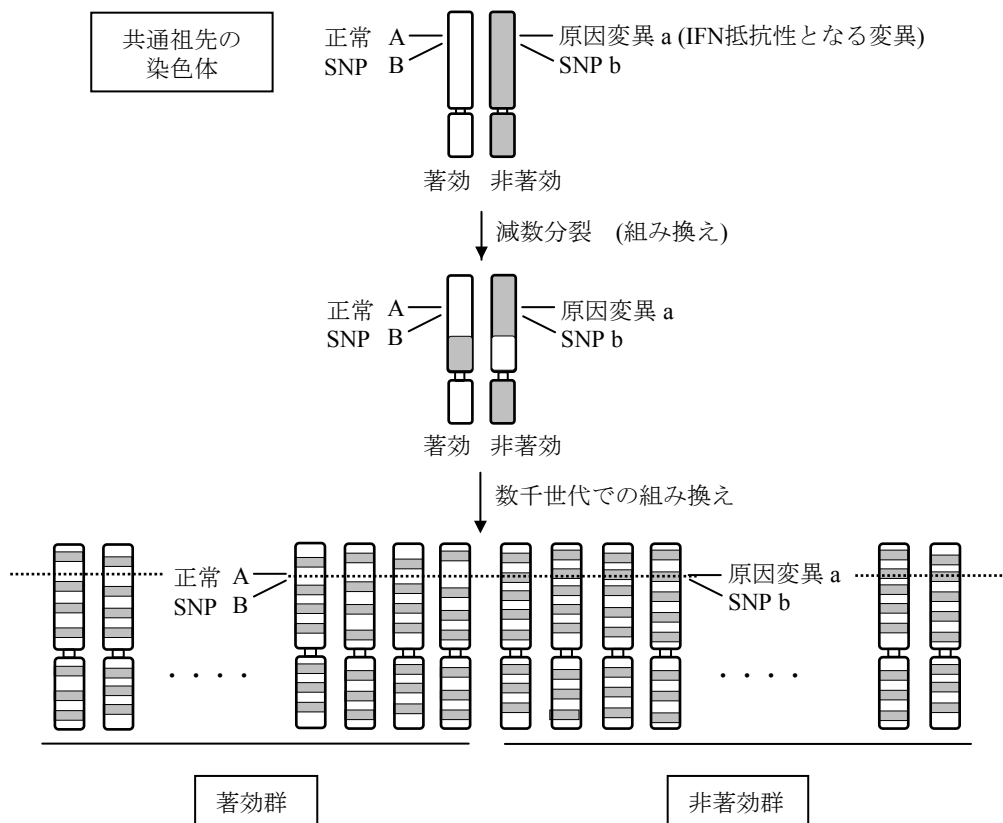


図 1.5 著効群および非著効群における IFN 抵抗性変異と近傍 SNP の共遺伝の例

IFNシグナル伝達分子をコードする遺伝子領域にはイントロンも含むと多数の SNP が存在するため、それら全ての SNP を解析することは効率的ではなく、遺伝子の多型性を代表する必要最少数の SNP を解析することが望ましい。近年、tag SNP の概念が実証され(25-27)、染色体上で密接に連鎖する複数の SNP からその領域の遺伝的多型性を代表する tag SNP を選定することが可能となった(28,29)。tag SNP の概要を図 1.6 に示す。図 1.6-A は集団内で認められる染色体の例を示す。染色体上で連鎖する SNP1 から SNP4 について 4 種類のハプロタイプが集団内に存在する(図 1.6-B)。図 1.6-B では、SNP1 と SNP2 が連鎖不平衡を示し、SNP1 が A 対立遺伝子の場合 SNP2 は G 対立遺伝子、SNP1 が C 対立遺伝子の場合 SNP2 は A 対立遺伝子と特定される関連性が生じる。同様に SNP3 と SNP4 も強い連鎖不平衡を示す結果、集団内には 4 種類のハプロタイプのみが認められる。4 SNP で構成されるハプロタイプは、理論上の組み合わせでは  $2^4$  の 16 通りが考えられるが、強い連鎖不平衡が認められる領域ではハプロタイプの種類が限定される。その結果、その領域の遺伝的多様性は限られた SNP で代表可能であり、代表となる SNP が tag SNP と定義される。図 1.6-B の場合、SNP1 と SNP2 間、SNP3 と SNP4 間の 2 つの連鎖不平衡が強い領域があり、SNP1 および SNP3 の 2 つの tag SNP で代表可能となる。

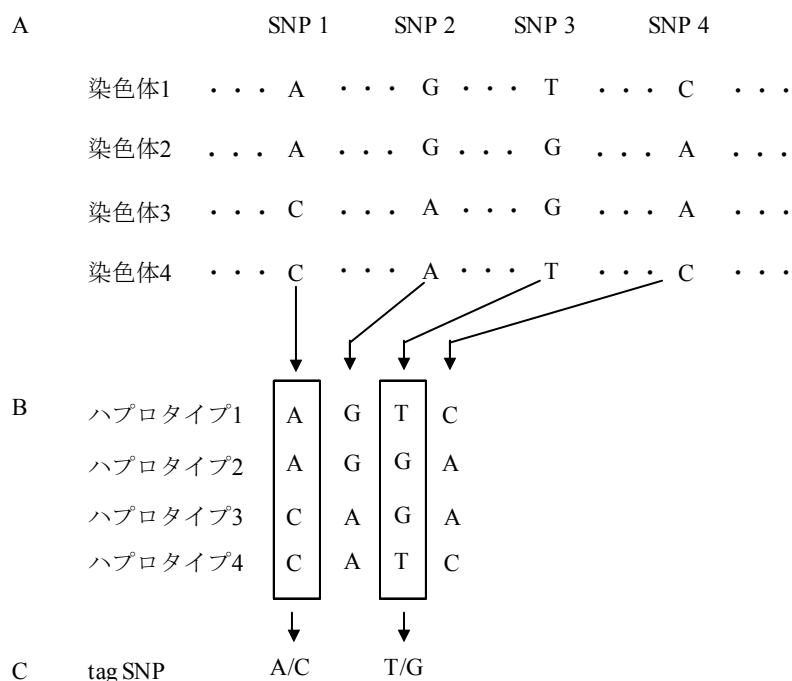


図 1.6 ハプロタイプおよび tag SNP の概要

ヒトゲノムの全領域において tag SNP の選定を可能にする国際 HapMap プロジェクトの完了が 2005 年に報告され(30,31)、ゲノム全体から選択した 100 万ヶ所以上の SNP について、アフリカ、アジアおよびヨーロッパをそれぞれ起源とする合計 269 人分の SNP 遺伝子型データが公開された。これにより、tag SNP を用いたケース・コントロール関連解析が近年急速に発展した。その結果、これまで困難であった多数の遺伝因子や環境因子が関与する複雑な形質（体質、多遺伝子性疾患、薬剤応答性など）と関連する遺伝因子が多数同定され注目を集めている(32, 33)。

ケース・コントロール関連解析は、血縁関係にない一般集団でのケース群とコントロール群において遺伝的多型マーカーの出現頻度の違いを比較する手法であり、血縁関係にある集団内において表現型と遺伝的多型マーカーの共分離を解析する連鎖解析とは異なる手法である。連鎖解析では、目的とする形質（疾患の有無など）を有する大きな家系サンプルを収集することが困難な場合が多いこと、4 世代前後の家系では組換えも少なく染色体領域の絞込み範囲が狭いこと、単独の遺伝子が関与する形質の遺伝因子の同定には有効であるが、多数の遺伝因子や環境因子が関与する複雑な形質と関連する遺伝因子の同定は困難であるなどの課題が知られている。一方、ケース・コントロール関連解析は、血縁関係にない一般集団を用いるため多数のサンプル収集が容易であり、祖先ゲノムからの数千世代での組換えを想定するため絞込み範囲も狭く、連鎖解析では困難であった多数の遺伝因子や環境因子が関与する複雑な形質と関連する遺伝因子の同定に有効であることが報告されている (34,35)。

慢性 C 型肝炎患者に対する IFN 療法の治療効果には複数の患者遺伝因子の関与が示唆され(8)、また HCV 遺伝子型や血中 HCV RNA 量などウイルス側因子の影響も大きく(6)、慢性 C 型肝炎患者が多数存在する家系サンプルの収集も困難であるため、IFN 治療効果と関連する患者遺伝因子の同定にはケース・コントロール関連解析が有効と考えられる。

#### 1.4 本論文の構成

本研究では、慢性 C 型肝炎患者に対する IFN 療法の治療効果と関連する患者遺伝因子の同定を目的とする。

第 2 章では、tag SNP を用いたケース・コントロール関連解析を行い、IFN シグナル伝達分子の遺伝的多型と IFN 治療効果との関連を検討した。その結果、MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP が HCV 遺伝子型 1b 感染患者の IFN 治療効果と関連することを見出し、MAPKAPK3 は新規の IFN 感受性関連遺伝子であることを同定した。IFN 治療効果の個人差の原因として、MAPKAPK3 遺伝的多型がその遺伝子産物への質的または量的変化を介して IFN 治療効果に影響を与える可能性が考えられた。また、同定した MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP について、IFN 抵抗性対立遺伝子をもつ場合に非著効となる可能性が 3.4 倍高いことが示され、MAPKAPK3 tag SNP 遺伝子型の判定は IFN 治療効果の予測に有用と示唆された。

第 3 章では、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果に対する MAPKAPK3 遺伝的多型の機能的意義を検討した。その結果、MAPKAPK3 遺伝的多型によりその転写活性が変化すること、MAPKAPK3 高発現により I 型 IFN シグナル伝達が抑制され、I 型 IFN の抗ウイルス作用が減弱されることを明らかにした。以下に得られた知見を報告する。

## 2. 慢性 C 型肝炎患者の IFN 感受性関連遺伝子 MAPKAPK3 の同定

### 2.1 本研究の目的

本章では、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果と関連する患者遺伝因子の同定を目的として、tag SNP を用いたケース・コントロール関連解析を行い、IFN シグナル伝達分子の遺伝的多型と IFN 治療効果との関連を検討した。

IFN 治療効果との関連が見出された MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP について、得られた知見を報告する。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 対象患者および試料収集

広島大学病院、広島大学医学部関連病院、および虎ノ門病院において慢性 C 型肝炎に対する IFN 療法を受けた患者のうち、書面での informed consent を得た患者を登録した。患者登録条件は、民族的に日本人であり、治療前の血清中 Alanine transaminase が 6 ヶ月以上異常値、抗 HCV 抗体および血中 HCV RNA 陽性、B 型肝炎ウイルス抗原陰性、他の肝臓疾患なし、免疫抑制剤および抗ウイルス剤による治療を受けていない患者とした。各患者は 1 日 1 回 600 万単位 IFN を 8 週間連続で筋肉内投与後、1 週間に 2 回 600 万単位 IFN を 16 週間投与する IFN 治療を完了した。治療効果の判定は、治療完了 6 ヶ月後の血中 HCV RNA 陰性の 468 名を著効群、血中 HCV RNA 陽性の 587 名を非著効群とした。治療途中で中断した患者および治療完了 6 ヶ月後の効果判定以降に再燃した患者は解析から除外した。

全患者の臨床背景を表 2.13 に示した。患者血中 HCV RNA の測定は Amplicor-monitor assay または branched-chain DNA assay を用いた。治療前の血中 HCV RNA 量について、Amplicor-monitor assay で 1.0 MEQ/mL 以上または branched-chain DNA assay で 100 KIU/mL 以上の患者では、IFN 治療効果が低い傾向が報告されているため(36,37)、これら閾値により患者ウイルス量を 2 群(高ウイルス量/低ウイルス量)に分類した。組織学的な肝繊維化段階の判定は、肝生検試料を用いて分類した(38)。著効群と非著効群間では、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果と関連する HCV 遺伝子型、治療前血中 HCV RNA 量および性別に偏りが認められた(表 2.13)。全患者のゲノム DNA は、末梢血から標準的なフェノールクロロホルム法により調製した(39)。

### 2.2.2 tag SNP の選定

I 型 IFN シグナル伝達に関与する遺伝子として、IFNAR1、IFNAR2、JAK1、tyrosine kinase 2、STAT1、STAT2、IFN regulatory factor 9、RAC1、MAPKK3、MAPKK6、p38 MAP kinase、MAPKAPK2 および MAPKAPK3 の 13 遺伝子から tag SNP を選定した。HapMap data base (<http://www.hapmap.org/index.html.ja>) に登録されている日本人 45 名の SNP 遺伝子型データにおいて、各 SNP の低頻度対立遺伝子が 5%以上の頻度を示す SNP を、各遺伝子領域(転写開始点 2000bp 上流から終止コドン 1500bp 下流まで)から抽出した。抽出した SNP の日本人 45 名の遺伝子型データを Haploview software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) に入力して、SNP 間の連鎖不平衡の尺度となる連鎖不平衡係数  $r^2$  および  $D'$  を全 SNP 間で算出した(40,41)。tag SNP 選定のため、 $r^2 > 0.8$  の強い連鎖不平衡となる SNP 群をグループ化して(各グループは連鎖不平衡 bin と定義される)、各連鎖不平衡 bin を代表する SNP を tag SNP とした。

Haploview software により算出される連鎖不平衡係数  $r^2$  および  $D'$  について、以下にその概要を示す。染色体上に連鎖する第一の SNP (A/a) および第二の SNP (B/b) を想定して、



集団内での A 対立遺伝子の頻度を  $P_A$ 、a 対立遺伝子の頻度を  $(1-P_A)$ 、B 対立遺伝子の頻度を  $P_B$ 、b 対立遺伝子の頻度を  $(1-P_B)$  とする。4 通りのハプロタイプ (A-B, A-b, a-B, a-b) の頻度は  $P_{AB}$ ,  $P_{Ab}$ ,  $P_{aB}$ ,  $P_{ab}$  とする。ハプロタイプ頻度は SNP 遺伝子型データから Haploview software の EM アルゴリズムにより推定され、2.2.8 項にて詳細に説明する。2 SNP が連鎖不平衡の関係にない場合には、2 SNP の対立遺伝子の組み合わせは独立であるため、ハプロタイプ A-B の頻度  $P_{AB}$  は各対立遺伝子の頻度  $P_A$  と  $P_B$  の積となる。同様に各ハプロタイプ頻度は式 2.1 となる。一方、2 SNP が連鎖不平衡の関係にある場合には、2 SNP の対立遺伝子の組み合わせは非独立となり、式 2.1 の等号は成立しない。

$$\begin{aligned}
 P_{AB} &= P_A P_B \\
 P_{Ab} &= P_A (1-P_B) \\
 P_{aB} &= (1-P_A) P_B \\
 P_{ab} &= (1-P_A) (1-P_B)
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

連鎖不平衡係数  $D$  を式 2.2 のように定義すると、2 SNP が連鎖不平衡の関係にない場合には式 2.1 より  $D=0$  となるが、2 SNP が連鎖不平衡の関係にある場合は式 2.1 が成立しないため  $D \neq 0$  となる。連鎖不平衡係数  $D$  は連鎖不平衡の強さの尺度であり、ハプロタイプ頻度と対立遺伝子頻度との”ずれ”を表す。連鎖不平衡が強く、ハプロタイプの頻度と対立遺伝子頻度との”ずれ”が大きい程、 $D$  は 0 から離れた値となる。

$$D = P_{AB} P_{ab} - P_{Ab} P_{aB} \tag{2.2}$$

連鎖不平衡係数  $r^2$  は、連鎖不平衡係数  $D$  を用いて式 2.3 から算出される。 $r^2$  は 0 から 1 の値をとり、2 SNP が連鎖不平衡の関係にない場合に  $r^2=0$  となる。

$$r^2 = D^2 / (P_{AB} + P_{aB})(P_{Ab} + P_{ab})(P_{AB} + P_{Ab})(P_{aB} + P_{ab}) \tag{2.3}$$

連鎖不平衡係数  $D'$  は、連鎖不平衡係数  $D$  を用いて式 2.4 から算出される。 $D'$  は 0 から 1 の値をとり、2 SNP が連鎖不平衡の関係にない場合に  $D'=0$  となる。

$$\begin{aligned}
 D' &= D / D_{\max} \quad (D > 0 \text{ の場合}) \\
 D' &= D / D_{\min} \quad (D < 0 \text{ の場合})
 \end{aligned}
 \tag{2.4}$$

ここで  $D_{\max}$  および  $D_{\min}$  は式 2.5 のように定義される。

$$D_{\max} = \min (P_A P_b, P_a P_B)$$

$$D_{\min} = \max (-P_A P_B, P_a P_b) = (-1) \times \min (P_A P_B, P_a P_b) \quad (2.5)$$

連鎖不平衡係数  $r^2$  および  $D'$  と集団内に存在するハプロタイプとの関係の一例を図 2.1 に示す。図 2.1-A では、染色体上に連鎖する SNP (A/a) および SNP (B/b) について、ハプロタイプ A-B のみの集団 1 とハプロタイプ a-b のみの集団 2 が混合する場合を仮定する。混合集団で組換えが起きるまではハプロタイプ A-B および a-b のみであり ( $r^2 = 1, D' = 1$ )、組換えによりハプロタイプ A-b および a-B が発生した状態で  $r^2 < 1$  および  $D' < 1$  となる。さらに組換えにより混合集団内で 4 通りのハプロタイプ頻度が等しい場合に  $r^2 = 0$  および  $D' = 0$  となる。

図 2.1-B では、ある一つの集団においてハプロタイプ A-B のみが最初に存在する場合を仮定する。変異により SNP (A/a) が生じると、ハプロタイプ a-B が生じ、集団内には 2 種類のハプロタイプ存在する ( $r^2 = 1, D' = 1$ )。さらに変異によりハプロタイプ a-b が発生すると、集団内には 3 種類のハプロタイプ A-B、a-B および a-b が存在して、この状態で  $r^2 < 1$  および  $D' = 1$  となる。集団内に 4 種類のハプロタイプが存在する状態で  $D' < 1$  となる。

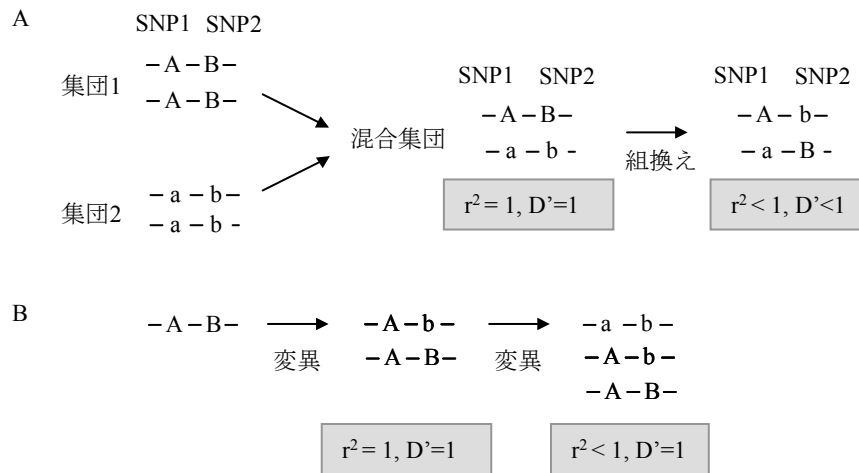


図2.1 集団内ハプロタイプと連鎖不平衡係数の関係の一例

### 2.2.3 SNP 遺伝子型の判定

SNP 遺伝子型の判定は Invader 法(42)または Taqman 法(43)を用い、方法は各引用文献に従った。Invader 法および Taqman 法の概要を以下に示す。

Invader 法では、SNP の各対立遺伝子の検出に 2 種類の signal probe と 1 種類の invader probe を用いる。signal probe は鋳型 DNA 配列と相補的であり、5'末端が各 SNP 対立遺伝子と相補的となる (図 2.2)。signal probe の 5'側末端には、それぞれ異なる flap 配列が付加されて

いる。invader probe の3'末端は SNP 部位となるように設計され、SNP 対立遺伝子とミスマッチとなる配列に設計されている。鋳型 DNA と signal probe の SNP 部分が相補的である場合に、SNP 部位で invader probe の3'末端の塩基が入り込む構造 (invader structure) が形成される (図 2.2)。

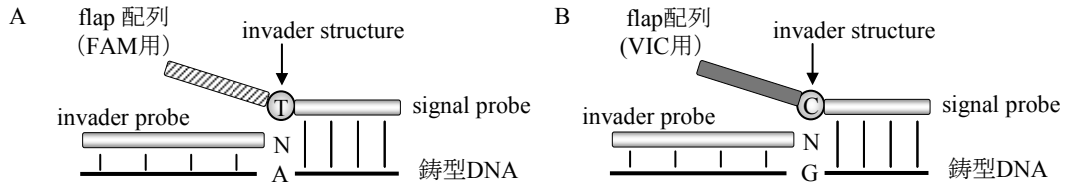


図2.2 あるSNP (A/G)に対するsignal probeおよびInvader probeの例  
A対立遺伝子を検出するsignal probe (A)およびG対立遺伝子を検出するsignal probe (B)を示す

Invader 反応では、invader structure を酵素 Cleavase が認識して flap 配列を切断する (図 2.3)。その結果、鋳型 DNA の SNP 対立遺伝子に相補的な signal probe の flap 配列のみが切断され (図 2.3-A)、相補的でない signal probe の flap 配列は切断されない (図 2.3-B)。2 種類の flap 配列は、それぞれ FAM または VIC で標識された fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe の 1 本鎖部分に相補的に設計され、切断された flap 配列はそれぞれ相補的な FRET probe と結合して invader 構造を形成する (図 2.3-A)。この invader structure を酵素 Cleavase が認識して、FRET probe の蛍光色素が切断されると、消光剤によるクエンチングが解除されて、蛍光シグナルが検出される。各サンプルでの 2 種類の蛍光強度を解析して、SNP 対立遺伝子型を判定する (図 2.4)。

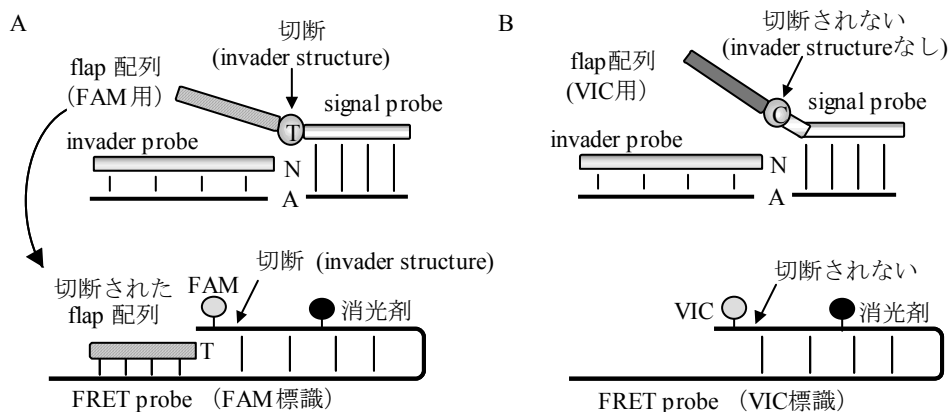


図 2.3 ある SNP (A/G)に対する Invader 法による SNP 検出方法の概要  
鋳型DNAのA対立遺伝子と相補的 (A) および相補的でないsignal probe (B) の例を示す

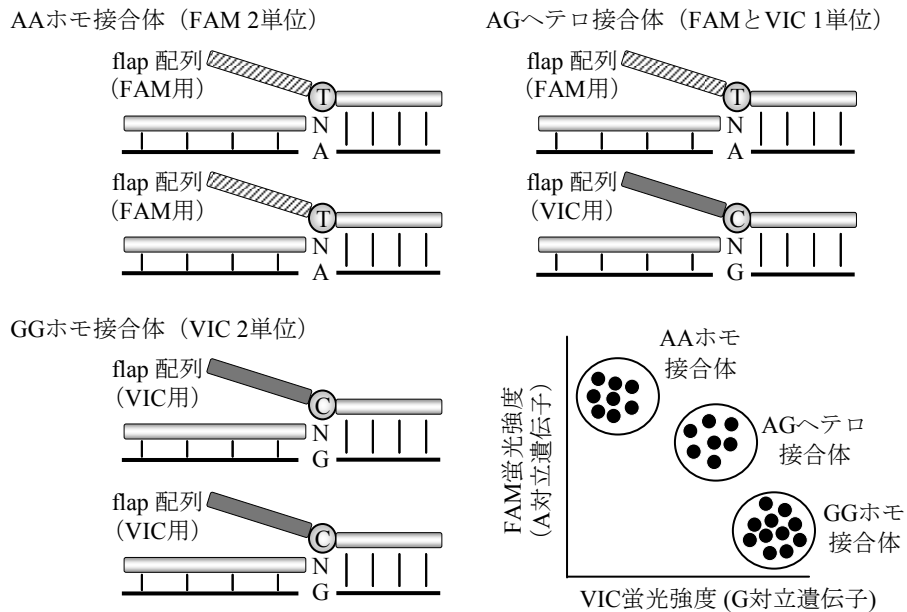


図2.4 SNP遺伝子型の判定

あるSNP (A/G)について、各接合体でのSNP遺伝子型判定の概要を示す。各接合体のサンプルの蛍光量をグラフにプロットして、SNP遺伝子型を判定する。

Taqman 法では、SNP の各対立遺伝子と相補的であり、それぞれ異なる蛍光色素 (FAM または VIC) で標識された 2 種類の Taqman probe を用いる (図 2.5)。鋳型ゲノム DNA の SNP を含む領域を特異的 PCR プライマーにより伸長・増幅する際、Taqman probe が鋳型 DNA の相補配列に結合する。Forward プライマーが Taqman probe の 5'側まで伸展したときに Taqman probe と鋳型 DNA が相補的な場合に限り、Taq ポリメラーゼの 5'-3' nuclease 活性により Taqman probe が分解される (図 2.6-A)。一方、Taqman probe と鋳型 DNA が相補的でない場合には、Taqman プローブが分解されず、蛍光は発生しない (図 2.6-B)。Invader 法と同様に、2 種類の蛍光強度を解析することで、SNP 対立遺伝子型を判定する。

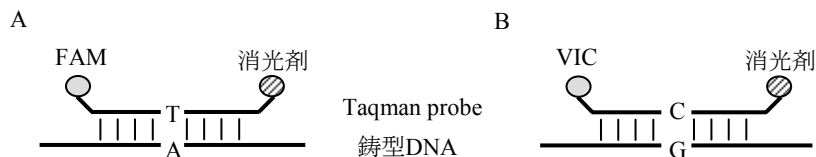


図 2.5 ある SNP (A/G)に対する Taqman probe の例

A対立遺伝子を検出するTaqman probe (A)およびG対立遺伝子を検出するTaqman probe (B)を示す

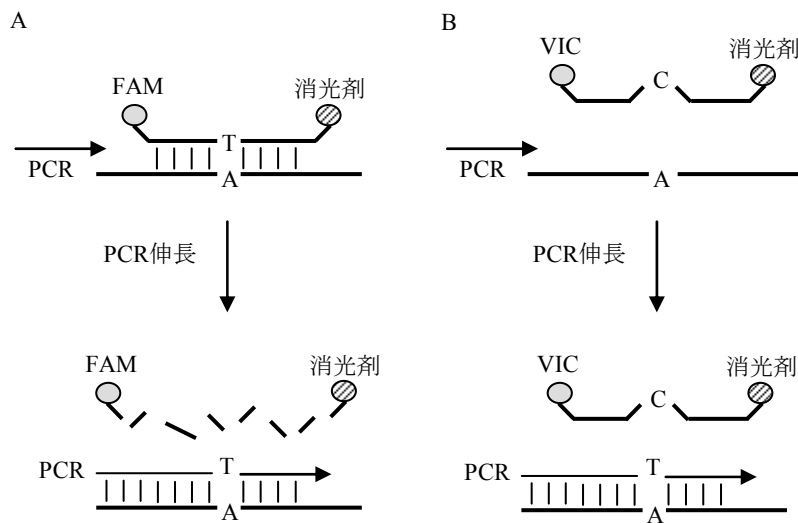


図 2.6 ある SNP (A/G) に対する Taqman 法による SNP 検出方法の概要  
 鋳型DNAのA対立遺伝子と相補的 (A) および相補的でないTaqman probe (B) の例を示す

#### 2.2.4 Hardy-Weinberg 平衡への適合度検定

Hardy-Weinberg 平衡の概略を図 2.7 に示した。集団内で、着目する SNP (A/a) が生物学的に中立であり、この集団内で自由婚 (ランダムな交配) が行われている場合を仮定した。その場合、集団における SNP 対立遺伝子の頻度は世代を経ても一定であり (A : a = p : q)、対立遺伝子の頻度依存的に SNP 遺伝子型の頻度も一定となる。この状態にあるとき、SNP (A/a) は Hardy-Weinberg 平衡を満たすと定義される(44)。

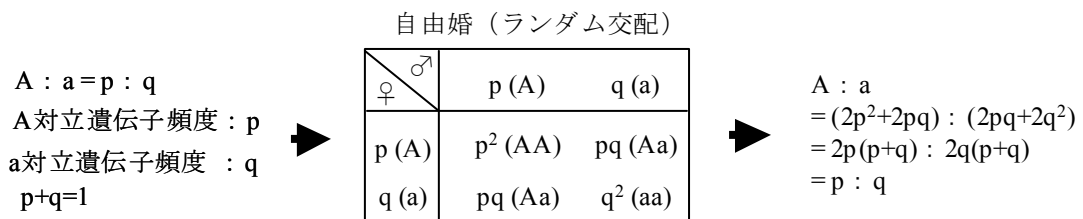


図 2.7 Hardy-Weinberg 平衡

本研究に登録した患者集団において SNP (A/a) が Hardy-Weinberg 平衡を満たすか否かについて、 $\chi^2$  検定により評価した (44)。帰無仮説「Hardy-Weinberg 平衡が成立する」として、観測された各 SNP 遺伝子型の患者数 (観測度数) と、帰無仮説から期待される各 SNP 遺伝子型の患者数 (期待度数) には差がないと仮定した。まず、患者 SNP 遺伝子型の観測度数 (表 2.1) より、SNP 対立遺伝子頻度を算出した (式 2.6)。

表 2.1 各 SNP 遺伝子型の患者数 (観測度数)

	AA	Aa	aa	合計
観測度数	$n_0$	$n_1$	$n_2$	$N$

$$A \text{ 対立遺伝子頻度} = (2n_0+n_1) / 2N = p$$

$$a \text{ 対立遺伝子頻度} = (n_1+2n_2) / 2N = 1-p \quad (2.6)$$

つぎに、帰無仮説から期待される各 SNP 遺伝子型の患者数 (期待度数) を算出した。帰無仮説から期待される各 SNP 遺伝子型頻度は、SNP 対立遺伝子の頻度依存性であるため、A 対立遺伝子の頻度が  $p$  の場合、遺伝子型 AA の頻度は  $p^2$  となり、患者合計  $N$  の場合遺伝子型 AA の患者数は  $Np^2$  と算出される。各遺伝子型患者の期待度数は表 2.2 と算出される。

表 2.2 各 SNP 遺伝子型の患者数 (期待度数)

	AA	Aa	aa	合計
期待度数	$Np^2$	$2Np(1-p)$	$N(1-p)^2$	$N$

式 2.7 により、各 SNP 遺伝子型での期待度数と観測度数の偏りを算出して、全 SNP 遺伝子型について合計すると Pearson の  $\chi^2$  統計量が算出される。 $O_i$  および  $E_i$  は各 SNP 遺伝子型患者数の観測度数 (表 2.1) および期待度数 (表 2.2) であり、 $i$  は 3 種類の遺伝子型 (AA, Aa, aa) それぞれについて計算して合計すると ( $k=3$ )、 $\chi^2$  統計量は式 2.8 となる。自由度 1 の  $\chi^2$  分布より P 値を求め、多重検定を考慮して 0.1% 有意水準で帰無仮説を棄却した。以上の検定を、全 tag SNP について全患者の SNP 遺伝子型データを用いて行った。

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad * O; \text{観測度数}, E; \text{期待度数} \quad (2.7)$$

$$\chi^2 = \frac{(n_0 - Np^2)^2}{Np^2} + \frac{\{n_1 - 2Np(1-p)\}^2}{2Np(1-p)} + \frac{\{n_2 - 2N(1-p)^2\}^2}{N(1-p)^2} \quad (2.8)$$

### 2.2.5 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子頻度モデル)

ある SNP (A/a) について、対立遺伝子 a が IFN 抵抗性となる対立遺伝子の場合、a 対立遺伝子は非著効群に高頻度に出現すると予想される。そのため、著効群と非著効群間での SNP 対立遺伝子頻度の違いを  $\chi^2$  検定により評価した。帰無仮説「著効群と非著効群での SNP 対立遺伝子頻度には差がない」として、患者において観測された SNP 対立遺伝子数 (観測度数) と、帰無仮説から期待される SNP 対立遺伝子数 (期待度数) との偏りを  $\chi^2$  統計

量として算出して、有意に偏る場合に帰無仮説を棄却した。

患者の SNP 遺伝子型 (AA, Aa, aa) と治療効果の 3×2 分割表より (表 2.3)、SNP 対立遺伝子 (A,a) と治療効果での 2×2 分割表を作成した (表 2.4)。ヒトは両親由来の 1 対の相同染色体をもつため、対立遺伝子数は患者数の 2 倍となる。

表 2.3 患者 SNP 遺伝子型と治療効果の 3×2 分割表

	AA	Aa	aa	合計
著効	$r_0$	$r_1$	$r_2$	R
非著効	$s_0$	$s_1$	$s_2$	S

表 2.4 SNP 対立遺伝子数と治療効果の 2×2 分割表

	A	a	合計
著効	$R_A$	$R_a$	2R
非著効	$S_A$	$S_a$	2S

$R_A = 2r_0 + r_1$ ,  $R_a = r_1 + 2r_2$   
 $S_A = 2s_0 + s_1$ ,  $S_a = s_1 + 2s_2$

つぎに、帰無仮説から期待される著効群および非著効群における SNP 対立遺伝子数の期待度数を算出した。表 2.4 の 2×2 分割表より、A 対立遺伝子の頻度は  $(R_A + S_A)/(2R + 2S)$ 、著効群の頻度は  $2R/(2R + 2S)$  であり、SNP 対立遺伝子頻度と治療効果が独立の場合 (関連がない場合)、著効群での A 対立遺伝子頻度はそれぞれの頻度の積となる。SNP 対立遺伝子の合計が  $(2R + 2S)$  の場合、著効群での A 対立遺伝子の期待度数は  $(R_A + S_A)/(2R + 2S) \cdot 2R/(2R + 2S)$  および  $(2R + 2S)$  の積となる。各群の SNP 対立遺伝子の期待度数は表 2.5 となる。

表 2.5 SNP 対立遺伝子数の期待度数

	A	a	合計
著効	$\frac{(R_A + S_A)R}{(R+S)}$	$\frac{(R_a + S_a)R}{(R+S)}$	2R
非著効	$\frac{(R_A + S_A)S}{(R+S)}$	$\frac{(R_a + S_a)S}{(R+S)}$	2S

式 2.7 により、2×2 分割表の各セルでの SNP 対立遺伝子数の期待度数と観測度数の偏りを算出して、全セルについて合計すると Pearson の  $\chi^2$  統計量が算出される。 $O_i$  および  $E_i$  は各セルの SNP 対立遺伝子数の観測度数 (表 2.4) および期待度数 (表 2.5) であり、 $i$  は 4 つのセルのそれぞれについて計算して合計すると ( $k=4$ )、 $\chi^2$  統計量は式 2.9 となる。多重検定の補正として Bonferroni 法を適用した補正後 P 値  $< 0.05$  の場合に帰無仮説を棄却した (補

正後 P 値 = 各 SNP の P 値 × 解析 tag SNP 数 116)。なお、2×2 分割表のいずれかのセルが 5 未満の場合は、Fisher の直接確率検定を行った。

$$\chi^2 = \frac{(2R + 2S)(S_A R_a - S_a R_A)^2}{(S_A + R_A)(S_a + R_a)(S_A + S_a)(R_A + R_a)} \quad (2.9)$$

SNP と治療効果との関連の強さの指標としてオッズ比を式 2.10 より算出した。a 対立遺伝子が著効群に高頻度 (a 対立遺伝子は著効と関連する) の場合にオッズ比は 1 より大きく、a 対立遺伝子が非著効に高頻度 (a 対立遺伝子は非著効と関連する) の場合に 1 より小さくなり、SNP と治療効果との関連が弱い場合は 1 に近い値となる。オッズ比の 95%信頼区間は、woolf 法の式 2.11 より算出した。

$$\text{オッズ比} = \frac{R_a / R_A}{S_a / S_A} \quad (2.10)$$

$$\frac{\text{オッズ比}}{1.96 \times \sqrt{\frac{1}{R_A} + \frac{1}{R_a} + \frac{1}{S_A} + \frac{1}{S_a}}} \leq \text{オッズ比の 95\%信頼区間} \leq \text{オッズ比} \times 1.96 \times \sqrt{\frac{1}{R_A} + \frac{1}{R_a} + \frac{1}{S_A} + \frac{1}{S_a}} \quad (2.11)$$

## 2.2.6 ケース・コントロール関連解析 (SNP 遺伝子型頻度モデル)

ある SNP (A/a) の a 対立遺伝子が IFN 抵抗性となる対立遺伝子であり、A 対立遺伝子に対して優性の場合、a 対立遺伝子のホモまたはヘテロ接合体は非著効群で高頻度になると予想される。また、a 対立遺伝子が劣性の場合 a 対立遺伝子のホモ接合体が非著効群で高頻度と予想される。そのため、著効群と非著効群間での SNP 遺伝子型頻度の違いを  $\chi^2$  検定により評価して、SNP 遺伝子型と IFN 治療効果との関連の有無を検定した。

IFN 抵抗性対立遺伝子 a の優性モデルでは、患者 SNP 遺伝子型 (AA, Aa, aa) と治療効果の 3×2 分割表より(表 2.3)、Aa ヘテロ接合体を aa ホモ接合体と併合した 2×2 分割表を作成した(表 2.6)。帰無仮説「著効群と非著効群において、IFN 抵抗性対立遺伝子 a を少なくとも 1 つもつ患者の頻度には差がない」を検定するため、2.2.5 項と同様の方法で  $\chi^2$  検定およびオッズ比を算出した。

表 2.6 a 対立遺伝子優性モデルでの 2×2 分割表

	AA	Aa+aa	合計	
著効	R <sub>A</sub>	R <sub>a</sub>	R	R <sub>A</sub> = r <sub>0</sub> , R <sub>a</sub> = r <sub>1</sub> +r <sub>2</sub> S <sub>A</sub> = s <sub>0</sub> , S <sub>a</sub> = s <sub>1</sub> +s <sub>2</sub>
非著効	S <sub>A</sub>	S <sub>a</sub>	S	



IFN 抵抗性対立遺伝子 a の劣性モデルでは、患者 SNP 遺伝子型 (AA, Aa, aa) と治療効果の 3×2 分割表より(表 2.3)、Aa ヘテロ接合体を AA ホモ接合体と併合した 2×2 分割表を作成した(表 2.7)。帰無仮説「著効群と非著効群において、IFN 抵抗性対立遺伝子 a を 2 つもつ患者の頻度には差がない」を検定するため、2.2.5 項と同様の方法で  $\chi^2$  検定およびオッズ比を算出した。

表 2.7 a 対立遺伝子劣性モデルでの 2×2 分割表

	AA+Aa	aa	合計	
著効	$R_A$	$R_a$	R	$R_A = r_0 + r_1, R_a = r_2$ $S_A = s_0 + s_1, S_a = s_2$
非著効	$S_A$	$S_a$	S	

### 2.2.7 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子の相加モデル)

ある SNP (A/a) の a 対立遺伝子が IFN 抵抗性となる対立遺伝子の場合、SNP 遺伝子型 (AA, Aa, aa) において、IFN 抵抗性対立遺伝子 a の増加にともなって非著効となる頻度が増加する傾向について、Cochran-Armitage trend 検定により評価した (45)。Cochran-Armitage trend 検定では、帰無仮説を「著効群と非著効群において、IFN 抵抗性対立遺伝子 a の個数が 0、1、2 個である患者の頻度には差がない」として、その対立仮説「非著効群において、IFN 抵抗性対立遺伝子 a の個数が 0、1、2 個である患者の頻度は直線的に増加する」の確からしさを検定した。

患者の SNP 遺伝子型 (AA, Aa, aa) と治療効果の 3×2 分割表より(表 2.8)、trend  $\chi^2$  統計量を式 2.12 より算出した。自由度 1 の  $\chi^2$  分布表より P 値を求め、多重検定の補正として Bonferroni 法を適用した補正後 P 値<0.05 の場合に帰無仮説を棄却した (補正後 P 値 = 各 SNP の P 値×解析 tag SNP 数 116)。

表 2.8 患者 SNP 遺伝子型と治療効果の 3×2 分割表

	AA	Aa	aa	合計
著効	$r_0$	$r_1$	$r_2$	R
非著効	$s_0$	$s_1$	$s_2$	S
合計	$n_0$	$n_1$	$n_2$	N

$$\text{trend } \chi^2 = \frac{N\{N(r_1+2r_2)-R(n_1+2n_2)\}^2}{R(N-R)\{N(n_1+4n_2)-(n_1+2n_2)^2\}} \quad (2.12)$$

IFN 抵抗性対立遺伝子  $a$  が 1 つ増加した場合のオッズ比 (AA vs. Aa) は、AA ホモ接合体と Aa ヘテロ接合体の  $2 \times 2$  分割表より(表 2.9)、2.2.5 項と同様に求めた。

表 2.9 患者 SNP 遺伝子型 (AA, Aa) と治療効果の  $2 \times 2$  分割表

	AA	Aa	
著効	$R_A$	$R_a$	$R_A = r_0, R_a = r_1$ $S_A = s_0, S_a = s_1$
非著効	$S_A$	$S_a$	

IFN 抵抗性対立遺伝子  $a$  が 2 つ増加した場合のオッズ比 (AA vs. aa) は、AA ホモ接合体と aa ホモ接合体の  $2 \times 2$  分割表より(表 2.10)、2.2.5 項と同様に求めた。

表 2.10 患者 SNP 遺伝子型 (AA, aa) と治療効果の  $2 \times 2$  分割表

	AA	aa	
著効	$R_A$	$R_a$	$R_A = r_0, R_a = r_2$ $S_A = s_0, S_a = s_2$
非著効	$S_A$	$S_a$	

### 2.2.8 ケース・コントロール関連解析 (ハプロタイプ頻度モデル)

遺伝子領域中の tag SNP で構成されるハプロタイプについて、あるハプロタイプが IFN 抵抗性ハプロタイプの場合、そのハプロタイプは非著効群に高頻度に出現すると予想される。そのため、著効群と非著効群間でのハプロタイプ頻度の違いを  $\chi^2$  検定により評価した。

連鎖する 2 SNP について、片方がホモ接合体である場合には SNP 遺伝子型からハプロタイプが特定される (図 2.8-A)。一方、2 SNP の遺伝子型が互いにヘテロ接合体の場合には SNP 遺伝子型からハプロタイプは特定されない (図 2.8-B)。そのため、集団内の SNP 遺伝子型データから集団内のハプロタイプ頻度を推定する EM アルゴリズムが開発され、Haploview software にて利用可能である(41)。

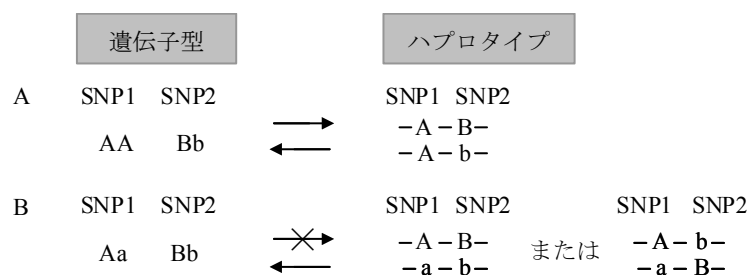


図2.8 SNP遺伝子型とハプロタイプ

連鎖するSNP (A/a)とSNP (B/b)のSNP遺伝子型について、片方のみヘテロ接合体の場合 (A)および互いにヘテロ接合体の場合(B)を示す。

ある遺伝子領域中の  $n$  個の tag SNP について、各患者の SNP 遺伝子型と治療効果を Haploview software へ入力すると、 $m$  種類のハプロタイプが推定され、治療効果との  $m \times 2$  分割表が作成される(表 2.11)。ハプロタイプ 1 について  $\chi^2$  統計量を算出する場合、ハプロタイプ 1 とその他ハプロタイプに集計した  $2 \times 2$  分割表が作成される(表 2.12)。

表 2.11  $m$  種類のハプロタイプと治療効果との  $m \times 2$  分割表

	ハプロタイプ1	ハプロタイプ2	...	ハプロタイプm	合計
著効	$r_1$	$r_2$	...	$r_m$	2R
非著効	$s_1$	$s_2$	...	$s_m$	2S

R = 著効患者数  
S = 非著効患者数

表 2.12 ハプロタイプ 1 についての  $2 \times 2$  分割表

	ハプロタイプ1	その他ハプロタイプ	合計
著効	$R_A$	$R_a$	2R
非著効	$S_A$	$S_a$	2S

$R_A = r_1, R_a = 2R - r_1$   
 $S_A = s_1, S_a = 2S - s_1$

帰無仮説「著効群と非著効群でのハプロタイプ頻度には差がない」を検定するため、表 2.12 より 2.2.5 項と同様の方法で  $\chi^2$  統計量が算出される。同様に、 $m$  種類のハプロタイプそれぞれについて、 $2 \times 2$  分割表が作成されて  $\chi^2$  統計量が算出される。

各ハプロタイプの  $\chi^2$  統計量より、Haploview software を用いて並べ替え検定 (permutation test) の P 値を算出した。並べ替え検定では、帰無仮説「著効群と非著効群でのハプロタイプ頻度は差がない」に従って、治療効果の区別なしに患者を著効群と非著効群に再割付を  $n$  回繰り返す (図 2.9)。各回の再割付において、 $m$  種類のハプロタイプそれぞれについて  $2 \times 2$  分割表が作成され、算出される  $m$  種類の  $\chi^2$  統計量のうち最も値の大きい値を各回の再割付の代表  $\chi^2_n$  値とする (図 2.9)。 $n$  回の再割付において得られた  $n$  個の  $\chi^2_n$  値において (図 2.10)、実際の著効・非著効群の患者割付から算出された  $\chi^2$  観測値より大きな  $\chi^2_n$  値の割合を算出する式 2.13 より P 値を決定する。本研究では 10,000 回の再割付を行い、5% 有意水準で帰無仮説を棄却した。

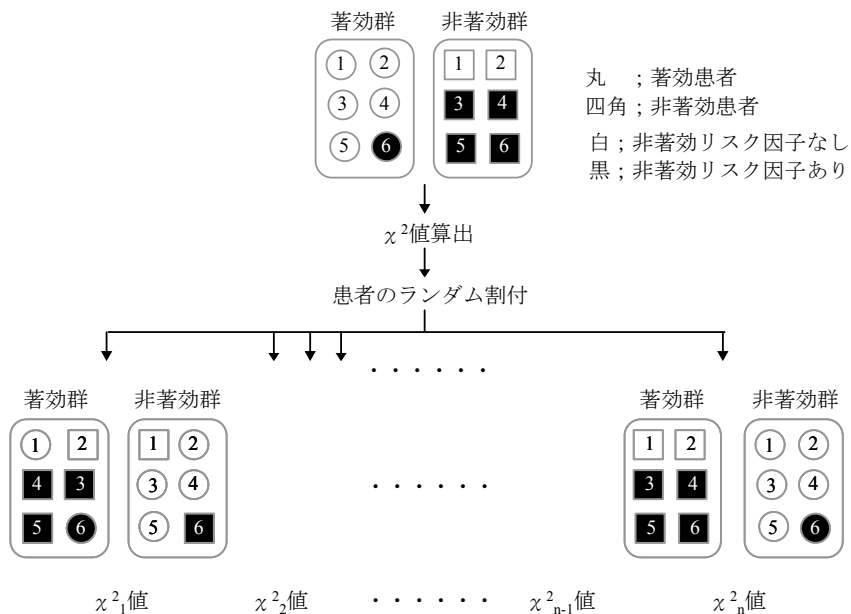


図 2.9 並べ替え検定の再割付の概要

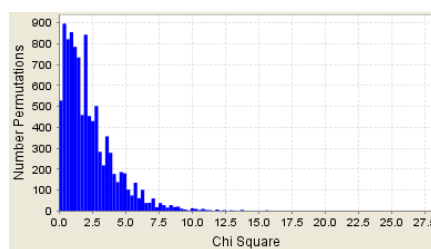


図 2.10 n 回の再割付により得られる n 個の  $\chi^2_n$  値の度数分布の例  
 横軸に  $\chi^2_n$  値、縦軸に各  $\chi^2_n$  値となる再割付の回数 (度数) を示す。

$$\text{並べ替え検定 P 値} = \frac{\chi^2_n \text{ 値} > \chi^2 \text{ 観測値となる再割付の回数}}{\text{再割付の回数}} \quad (2.13)$$

### 2.2.9 集団階層化の補正

ケース・コントロール関連解析では、IFN 著効群と非著効群において治療効果と関連のない SNP 頻度は等しいと仮定する。しかし、母集団中に遺伝的に異なる分集団構造がある場合 (集団階層化)、著効群および非著効群において治療効果と関連のない SNP 頻度を等しくすることは困難な場合が多い。図 2.11 の例では、著効群における分集団 1 からの割合 (f) が、非著効群における分集団 1 からの割合 (g) よりも大きく、治療効果と関連のない遺伝

的背景に偏りが生じる。このような 2 群間でケース・コントロール関連解析を行うと、2 群間の遺伝的背景の偏りに関連する SNP を、治療効果に関連する SNP として検出する偽陽性の可能性が高くなることが知られている。

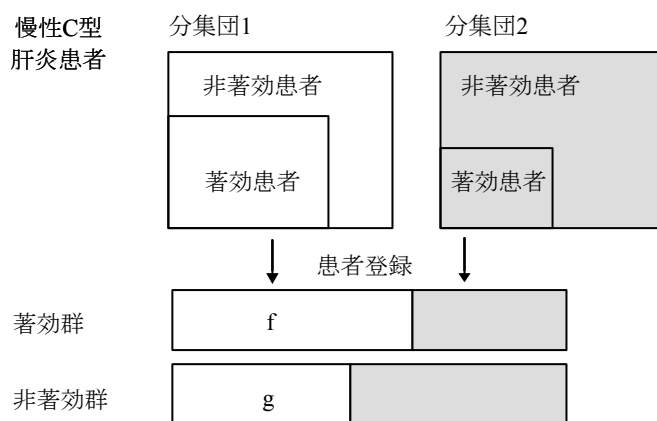


図 2.11 集団階層化による 2 群間の遺伝的背景の偏り

母集団中に遺伝的に異なる分集団1、分集団2が存在する例を示す。著効群における分集団1からの患者の割合が、非著効群における割合gよりも大きい。この場合、2群間で遺伝的背景に偏りが生じる。

集団階層化の補正は、Freedman らの報告の Genomic Control 法により行った (46)。治療効果に関連のない SNP のケース・コントロール関連解析から得られる  $\chi^2$  統計量の分布は、集団階層化がないと仮定した場合には自由度 1 の  $\chi^2$  分布に従うが、集団階層化の影響が存在する場合は  $\chi^2$  統計量の分散が大きくなること (variance inflation) が知られている。Genomic Control 法では、集団階層化による variance inflation の影響を補正する variance inflation factor  $\lambda$  を尤度に基づく推定手法を用いて算出する (46)。variance inflation factor  $\lambda$  は式 2.14 より算出した。N 個の SNP のうち j 番目の SNP から得られた観測統計量 ( $\chi^2$  値) を  $c_j$ 、 $\chi^2$  分布の確率密度関数を  $f$  とすると、 $\lambda$  に対して尤度 L が表され、最大の尤度 L を与える  $\lambda$  を求める。

$$L = \prod_{j=1}^N \frac{f(c_j/\lambda)}{\lambda}. \quad (2.14)$$

variance inflation factor  $\lambda$  による  $\chi^2$  統計量の補正は式 2.15 で算出した。補正後  $\chi^2$  値から自由度 1 の  $\chi^2$  分布表を用いて、ケース・コントロール関連解析の補正後 P 値を求めた。

$$\text{補正後 } \chi^2 \text{ 値} = \chi^2 \text{ 値} / \text{variance inflation factor } \lambda \quad (2.15)$$

#### 2.2.10 多変量 Logistic 回帰分析

SNP と IFN 治療効果との関連を評価する際、治療効果と関連する SNP 以外の因子（交絡因子）の影響で、SNP と治療効果との真の関連が歪められる可能性が考えられる。そこで、交絡因子の影響を除外して SNP と治療効果との関連を評価するため、多変量 Logistic 回帰分析を変数強制投入法により行った。変数強制投入法では、治療前血中 HCV RNA 量 (低 vs.高)、患者年齢 (加齢 1 歳あたり)、性別 (男性 vs.女性) および肝線維化段階 (F0-1 vs. F2-4) を説明変数に用い、全ての説明変数を強制的に Logistic 回帰式に取り込み、それら因子の影響を調整した。SNP は、1 SNP ずつ説明変数に加え、SNP ごとに評価した。

IFN 治療効果に独立して関連する因子を検討するため、ステップワイズ変数増加法により多変量 Logistic 回帰分析を行った。ステップワイズ変数増加法では、治療効果と関連する有意な説明変数を Logistic 回帰式に取り込み、取り込みの可否は 5% 有意水準で判定した。類似の作用を示す説明変数の一方は除外されるため、回帰係数の推定精度が低下する多重共線性を回避することが可能となる。用いた説明変数は変数強制投入法と同様であり、治療効果と関連することが同定された SNP を同時に説明変数に加えて解析した。解析ソフトには StatFlex 5.0 software package (Artec 社) を用いた。

## 2.3 結果

### 2.3.1 tag SNP の選定

I型 IFN シグナル伝達に関与する 13 遺伝子から tag SNP として 116 SNP を選定した (表 2.14)。HapMap data base から抽出した各遺伝子領域中の SNP について、連鎖不平衡係数  $r^2 > 0.8$  以上の強い連鎖不平衡の関係にある SNP 群を、連鎖不平衡 bin としてグループ化した。その結果、各遺伝子の連鎖不平衡 bin の数は、IFNAR1 は 3、IFNAR2 は 6、JAK1 は 8、Tyrosine kinase 2 は 3、STAT1 は 23、STAT2 は 1、IFN regulatory factor 9 は 5、Rac1 は 7、MAPKK3 は 5、MAPKK6 は 35、p38 MAP kinase は 10、MAPKAPK2 は 6 および MAPKAPK3 は 4 となり、各連鎖不平衡 bin を代表する SNP を tag SNP とした (表 2.14)。

### 2.3.2 tag SNP 遺伝子型の判定

全 116 tag SNP の遺伝子型の判定を、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療著効 468 名および非著効 587 名のゲノム DNA を用いて行った (全患者の遺伝子型データは Gastroenterology 2009;136(5):1796-1805 の supplemental data として公開)。遺伝子型判定の成功確率は、全 116 tag SNP で平均 99.4% であり、残り 0.6% の遺伝子型が不明な結果は集計から除外した。

つぎに、集計した全 116 tag SNP の遺伝子型データについて、Hardy-Weinberg 平衡への適合度を  $\chi^2$  検定により評価した。Hardy-Weinberg 平衡に適合しない場合には、(1) SNP 遺伝子型判定の正確性が低いため SNP 遺伝子型頻度の偏り、(2) サンプリングバイアスや集団階層化による SNP 遺伝子型頻度の偏り、などによりケース・コントロール関連解析において偽陽性の可能性が高くなることが知られている。しかし検定の結果、全 116 tag SNP について Hardy-Weinberg 平衡からの有意な逸脱は認められなかった (図 2.12)。

以上より、全 116 tag SNP の遺伝子型判定の正確性は高く、ケース・コントロール関連解析に用いるのに十分な遺伝子型データの質であることが示された。

### 2.3.3 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子頻度モデル)

全 116 tag SNP の SNP 対立遺伝子頻度と IFN 治療効果との関連について、全 HCV 感染患者において解析した (図 2.13-A)。また、IFN 治療効果が低い HCV 遺伝子型 1b 感染患者のみに層別化して同様に解析した (図 2.13-B)。その結果、HCV 遺伝子型 1b 感染患者において、治療効果と関連する 2 つの tag SNP を見出した (図 2.13-B, 表 2.15)。これら 2 SNP は MAPKAPK3 の第 2 イントロンに位置する SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A) であり、Bonferroni 法による多重検定の補正後 P 値  $< 0.05$  の有意水準を満たすことを確認した (補正後 P 値 = SNP の P 値  $\times$  解析 tag SNP 数 116)。これら 2 つの tag SNP 間の連鎖不平衡係数  $r^2$  は、HapMap data base の日本人 45 名のデータでは 0.79 であったため、異なる連鎖不平衡 bin に分類された。一方、本研究の日本人 1055 名では 2 つの tag SNP 間の連鎖不平衡係数  $r^2$  は 0.82 であった。この結果より、IFN 治療効果と関連する 2 つの tag SNP は  $r^2 > 0.8$

以上の強い連鎖不平衡の関係にあることが示された。

tag SNP rs3792323 (A>T) の対立遺伝子頻度と治療効果との関連について、HCV 遺伝子型 1b 感染患者において解析した結果を示す (表 2.15-A)。 $\chi^2$  検定の結果、著効群および非著効群の 2 群間において、SNP 対立遺伝子頻度に有意な差が認められた (P 値 0.000052、オッズ比 0.57)。オッズ比 0.57 より、T 対立遺伝子をもつ場合は A 対立遺伝子をもつ場合と比較して著効となる可能性は 0.57 倍 (非著効となる可能性が 1.75 倍) と示された。従って、tag SNP rs3792323 (A>T) の低頻度対立遺伝子 T は、IFN 抵抗性対立遺伝子と示された。同様に、tag SNP rs616589 (G>A) においても、低頻度対立遺伝子 A は、IFN 抵抗性対立遺伝子と示された (表 2.15-A, P 値 0.000056、オッズ比 0.57)。低頻度対立遺伝子 A をもつ場合は対立遺伝子 G をもつ場合と比較して著効となる可能性が 0.59 倍と示された。

以上の結果より、MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A) は HCV 遺伝子型 1b 感染患者の IFN 治療効果と関連し、2 つの tag SNP の低頻度対立遺伝子は IFN 抵抗性対立遺伝子であることが示された。また本研究の患者集団では、2 SNP は  $r^2 > 0.8$  以上の強い連鎖不平衡の関係にあることが示された。残り 114 tag SNP では、補正後 P 値  $< 0.05$  の有意水準を満たす SNP は認められなかった。

#### 2.3.4 ケース・コントロール関連解析 (SNP 遺伝子型頻度モデル)

tag SNP rs3792323 (A>T) の SNP 遺伝子型頻度と治療効果との関連について、HCV 遺伝子型 1b 感染患者において解析した。その結果、2.3.3 項より IFN 抵抗性対立遺伝子と示された低頻度対立遺伝子 T の優性モデルにおいて治療効果との強い関連が認められた (表 2.15-B, P 値 0.00019、オッズ比 0.53)。オッズ比 0.53 より、対立遺伝子 T をもつ場合は対立遺伝子 A をもつ場合と比較して IFN 治療効果が低く、著効となる可能性が 0.53 倍 (非著効となる可能性が 1.89 倍) と示された。同様に、tag SNP rs616589 (G>A) においても、IFN 抵抗性対立遺伝子と示された低頻度対立遺伝子 A の優性モデルにおいて治療効果との強い関連が認められた (表 2.15-B, P 値 0.00023、オッズ比 0.53)。2 つの tag SNP ともに、Bonferroni 法による多重検定の補正後 P 値 (SNP の P 値  $\times$  解析 tag SNP 数 116) において有意と判定された。一方、2 SNP ともに低頻度対立遺伝子の劣性モデルでは、有意な差は認められなかった (補正後 P 値  $> 0.05$ , data not shown)。

以上より、tag SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A) において、低頻度対立遺伝子は高頻度対立遺伝子に対して優性の IFN 抵抗性対立遺伝子であることが示された。残り 114 tag SNP での SNP 遺伝子型頻度モデルでは、有意な関連は認められなかった。

#### 2.3.5 ケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子の相加モデル)

tag SNP rs3792323 (A>T) の遺伝子型 (AA, AT, TT) において、2.3.4 項で優性の IFN 抵抗性対立遺伝子と示された対立遺伝子 T の増加に従って、相加的に非著効となる患者の頻度が増加する傾向の有無について、Cochran-Armitage trend 検定により解析した。その結果、



IFN 抵抗性対立遺伝子 T が加わるごとに IFN 治療効果が低くなる傾向が HCV 遺伝子型 1b 感染患者において示された (表 2.15-B, P 値 0.000046)。表 2.15-B の AA vs. AT では、AA ホモ接合体と比較して IFN 抵抗性対立遺伝子 T が 1 つ増加する AT ヘテロ接合体では、著効となる可能性が 0.58 倍 (非著効となる可能性が 1.72 倍) と示された。さらに AA vs. TT では、AA ホモ接合体と比較して IFN 抵抗性対立遺伝子 T が 2 つ増加する TT ホモ接合体では、著効となる可能性が 0.3 倍 (非著効となる可能性が 3.3 倍) と示された。同様に、tag SNP rs616589 (G>A) においても、IFN 抵抗性対立遺伝子 A の増加にともない、相加的に非著効となる患者の頻度が増加する傾向が示された (表 2.15-B, P 値 0.000048)。2 つの tag SNP とともに、Bonferroni 法による多重検定の補正後 P 値 (SNP の P 値 × 解析 tag SNP 数 116) において有意と判定された。

以上より、tag SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A) において、IFN 抵抗性対立遺伝子の増加にともない、相加的に非著効となる患者の頻度が増加する傾向が示された。残り 114 tag SNP では、SNP 対立遺伝子の相加モデルでは有意な差は認められなかった。

### 2.3.6 ケース・コントロール関連解析 (ハプロタイプ頻度モデル)

MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP で構成されるハプロタイプについて、ある特定のハプロタイプが IFN 抵抗性ハプロタイプである場合、そのハプロタイプは非著効群に高頻度に出現すると予想される。そのため、2.3.1 項で選定した MAPKAPK3 遺伝子領域の 4 つの tag SNP (rs3792323 A>T, rs3804628 G>A, rs616589 G>A, rs2040397 C>T) で構成されるハプロタイプと IFN 治療効果との関連について、HCV 遺伝子型 1b 感染患者において解析した。

その結果、頻度 5%以上の 3 種類のハプロタイプ A-G-G-C、T-G-A-C および A-G-G-T が、全ハプロタイプの 94.3%以上を占めると推定された。ハプロタイプ A-G-G-C が有意に著効群に高頻度に認められ (P 値=0.03)、ハプロタイプ T-G-A-C が有意に非著効群に高頻度に認められた (P 値=0.0001)。また、IFN 抵抗性対立遺伝子である tag SNP rs3792323 および rs616589 の低頻度対立遺伝子 (T および A) は、非著効群に高頻度のハプロタイプ TGAC に認められ、それぞれ独立ではなく同じハプロタイプを構成して治療効果と関連することが示された。この結果は、tag SNP rs3792323 および rs616589 間の連鎖不平衡係数  $r^2=0.82$  であり (2.3.3 項)、2 SNP が強い連鎖不平衡の関係にあることと矛盾しない結果であった。

### 2.3.7 集団階層化の補正

tag SNP rs3792323 および rs616589 は、IFN 抵抗性対立遺伝子の相加モデルにおいて最も強い関連を示した (2.3.5 項)。本研究に用いた著効群および非著効群において集団階層化が存在する場合、治療効果に関連のない SNP が偽陽性として検出される可能性が高くなる。そこで Genomic Control 法を用いて、2.3.5 項の相加モデルにおける P 値から集団階層化の影響を補正した。全 116 tag SNP について算出した trend  $\chi^2$  統計量を用いて、HCV 遺伝子型 1b 感染患者における集団階層化を補正する variance inflation factor  $\lambda$  を推定した結果、 $\lambda$

値は 1.1775 であった。tag SNP rs3792323 および rs616589 の集団階層化補正後 P 値は 0.00017 となり、さらに Bonferroni 法による多重検定の補正後 P 値(P 値×解析 tag SNP 数 116) においても、有意と判定された ( $p < 0.05$ )。

以上より、集団階層化の影響を補正した場合においても、HCV 遺伝子型 1b 感染患者における tag SNP rs3792323 および rs616589 と治療効果との関連は有意であり、集団階層化による偽陽性である可能性は低いことが示された。

### 2.3.8 多変量 Logistic 回帰分析

SNP と IFN 治療効果との関連を評価する際、IFN 治療効果と関連する SNP 以外の因子は交絡因子となりえる。そのため、変数強制投入法での多変量 Logistic 回帰分析により交絡因子の影響を調整して、tag SNP rs3792323 および rs616589 と治療効果との関連を評価した。その結果、tag SNP rs3792323 は交絡因子の影響を調整した後も、HCV 遺伝子型 1b 感染患者の治療効果と関連することが示された (表 2.17-A, P 値 0.0014, オッズ比 0.30, 95%信頼区間 0.14-0.63)。tag SNP rs3792323 の IFN 抵抗性対立遺伝子 T をもつ場合は、A 対立遺伝子をもつ場合と比較して治療非著効となる可能性が 0.3 倍 (治療著効となる可能性が 3.3 倍) であることが示された。IFN 治療効果と他因子との関連は、HCV RNA 量 (オッズ比 8.14)、肝繊維化 (オッズ比 1.64)、年齢 (オッズ比 0.97) および性別 (オッズ比 1.49) であった。同様に、tag SNP rs616589 も交絡因子の影響を調整した後も、HCV 遺伝子型 1b 感染患者の治療効果と関連することが示された (表 2.17-A, P 値 0.0012, オッズ比 0.31, 95%信頼区間 0.15-0.63)。

つぎに、IFN 治療効果に独立して関連する因子を検討するため、ステップワイズ変数増加法での多変量 Logistic 回帰分析を行った。説明変数には、tag SNP rs3792323 および rs616589 を同時に加えて解析した。その結果、SNP rs3792323 は他の説明変数と独立して IFN 治療効果に関連することが示された (表 2.17-B, P 値 0.0011, オッズ比 0.29, 95%信頼区間 0.14 - 0.61)。一方、tag SNP rs616589 は他の説明変数と独立して治療効果と関連する因子として選択されなかった。この結果は、治療効果との関連は tag SNP rs3792323 により代表されることを示し、2 SNP が  $r^2 > 0.8$  の強い連鎖不平衡の関係にあること (2.3.3 項) に矛盾しない結果であった。

以上より、tag SNP rs3792323 および rs616589 と治療効果との関連は交絡因子の影響を調整した後も HCV 遺伝子型 1b 感染患者の IFN 治療効果と有意に関連することが示された。2 つの tag SNP と治療効果との関連は tag SNP rs3792323 により代表され、tag SNP rs3792323 の T 対立遺伝子は IFN 抵抗性となる危険因子であることが示された。

### 2.3.9 MAPKAPK3 遺伝子領域のその他 SNP での関連解析

MAPKAPK3 遺伝的多型と IFN 治療効果との関連は、2.3.8 項より tag SNP rs3792323 に代表されることが示された。tag SNP rs3792323 は、 $r^2 > 0.8$  以上の強い連鎖不平衡を示す SNP

群（連鎖不平衡 bin）を代表する tag SNP であるため、同一の連鎖不平衡 bin に含まれるその他 SNP も同様に IFN 治療効果と関連すると考えられる。そこで、tag SNP rs3792323 と同一の連鎖不平衡 bin に含まれる SNP について、HCV 遺伝子型 1b 感染患者における治療効果との関連を SNP 対立遺伝子の相加モデルにより解析した。

2.3.1 項の結果より、HapMap data base の日本人 45 名の遺伝子型データでは、MAPKAPK3 遺伝子領域から抽出した 24 SNP は 4 つの連鎖不平衡 bin にグループ分けされた。この際に、Haploview software により全 SNP 間で算出した連鎖不平衡係数  $r^2$  および  $D'$  を図 2.14 に示し、rs3792323 と各 SNP 間の  $r^2$  を表 2.19 にまとめた。tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  以上の強い連鎖不平衡の関係にある 10 SNP は連鎖不平衡 bin 1 にグループ分けされた。それらは MAPKAPK3 遺伝子の第 2 イントロンから 3'UTR に存在するため、広範囲に渡って強い連鎖不平衡が保たれていることが示された。また  $D'$  を指標とした場合も同様に、大部分の SNP 間で  $D' = 1$  となり、広範囲に渡って強い連鎖不平衡の関係にあることが示された。tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  以上の強い連鎖不平衡の関係にある 7 SNP (rs616689, rs808148, rs745356, rs876105, rs876104, rs9879397, rs2170840) について、治療効果との関連を解析した。その結果、いずれも rs3792323 と同程度の P 値を示した(図 2.14)。

以上より、tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  の強い連鎖不平衡を示す他の SNP も同様に、IFN 治療効果と有意に関連することが示された。この結果より、tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  の強い連鎖不平衡を示す遺伝的多型が、MAPKAPK3 遺伝子産物への質的または量的変化を介して IFN 治療効果に影響を与える可能性が考えられた。

表 2.13 患者臨床背景

	著効群	非著効群	P値
患者数	468	587	-
年齢 (平均 ± 標準偏差)	54.6±11.8	55.9±10.3	0.1*
性別			0.002
男性	325	354	
女性	143	233	
HCV遺伝子型			<0.0001†
1a	3	3	
1b	208	434	
2a	209	101	
2b	48	49	
HCV RNA量			<0.0001‡
高	177	420	
低	216	69	
データなし	75	98	
肝線維化			0.19§
F0	5	5	
F1	213	254	
F2	130	173	
F3	24	43	
F4	17	28	
肝生検なし	79	84	

\* 著効群と非著効群の年齢は Mann-Whitney U-test により比較した (StatFlex 5.0 software package, Artec 社)

†‡§ 著効群と非著効群のカテゴリーデータの比較は  $\chi^2$  検定により行った (Excel 2003, Microsoft 社)

† HCV 遺伝子型 1b vs. non-1b, ‡ HCV RNA 量 高 vs. 低, § 肝線維化 F0-1 vs. F2-4.

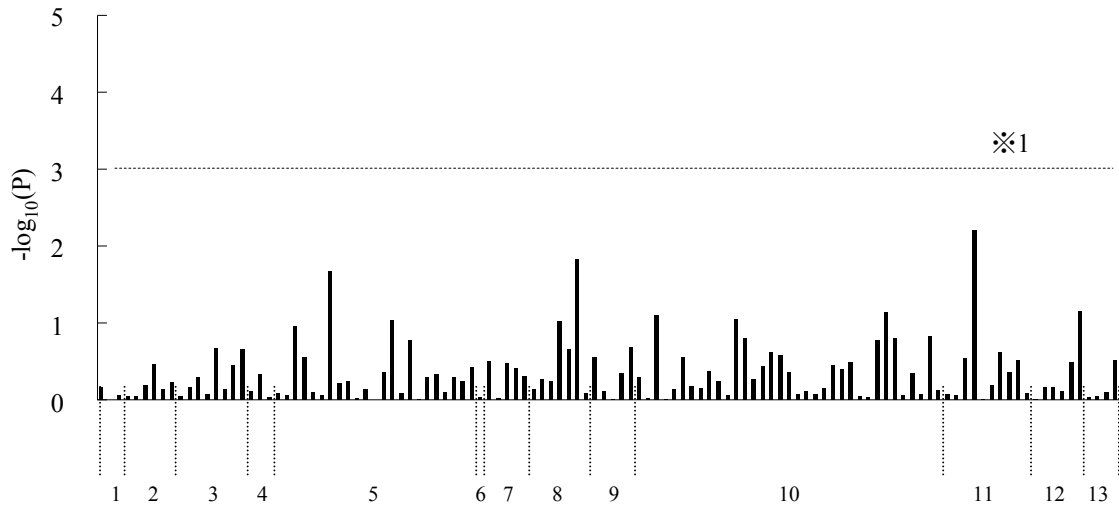
低 HCV RNA 量: 100 KIU/mL 未満(Amplicor-monitor assay)、または 1.0 MEQ/mL 未満(branched-chain DNA assay)

表 2.14 I 型 IFN シグナル伝達に関与する 13 遺伝子から選択した 116 tag SNP

Gene Symbol	抽出SNP数	tag SNP数	tag SNP ID
IFNAR1	24	3	rs2243594, rs2243600, rs2252930
IFNAR2	38	6	rs2252650, rs6517154, rs2073362, rs2248202, rs10211925, rs2248412
JAK1	54	8	rs310209, rs3790541, rs310247, rs3790532, rs2254002, rs3818753, rs17127024, rs2274948
Tyrosine kinase2	4	3	rs280523, rs280519, rs280496
STAT1	42	23	rs11885069, rs9789428, rs2280233, rs13395505, rs12693589, rs2066805, rs1400657, rs3771300, rs11677408, rs11887698, rs2030171, rs1467199, rs10199181, rs2066802, rs16833155, rs2066799, rs11693463, rs10208033, rs3755312, rs2280232, rs13029532, rs7562024, rs1914408
STAT2	6	1	rs2066807
IFN regulatory factor 9	6	5	rs12432194, rs4981494, rs12432304, rs2277484, rs2236350
RAC 1	29	7	rs2303364, rs836483, rs6954996, rs7456834, rs702484, rs2347339, rs768409
MAPKK3	20	5	rs2305871, rs9901404, rs12602109, rs3760201, rs8074866
MAPKK6	118	35	rs2074028, rs2034100, rs817565, rs2251862, rs2072073, rs2716213, rs12451722, rs6501326, rs2716225, rs8080760, rs12948059, rs2074027, rs2716222, rs4968857, rs756944, rs2715806, rs8078890, rs2716191, rs2715812, rs11869073, rs12945375, rs12939509, rs8082399, rs2716195, rs2716223, rs2715810, rs7213686, rs8067307, rs4968859, rs9893349, rs17690015, rs2715834, rs1548444, rs2715817, rs2715832
p38 MAP kinase	50	10	rs7761118, rs2145362, rs3752525, rs3730326, rs7770710, rs16884694, rs13196204, rs3804453, rs3804454, rs10807156
MAPKAPK2	29	6	rs4844550, rs10863784, rs12028997, rs4073250, rs4072677, rs12060808
MAPKAPK3	24	4	rs616589, rs3792323, rs3804628, rs2040397

IFNAR, type I IFN receptor; JAK, Janus-activated kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; RAC, ras-related C3 botulinum toxin substrate; MAP, mitogen-activated protein; MAPKK, MAP kinase kinases; MAPKAPK, MAP kinase-activated protein kinase.

A HCV 全遺伝子型



B HCV 遺伝子型 1b

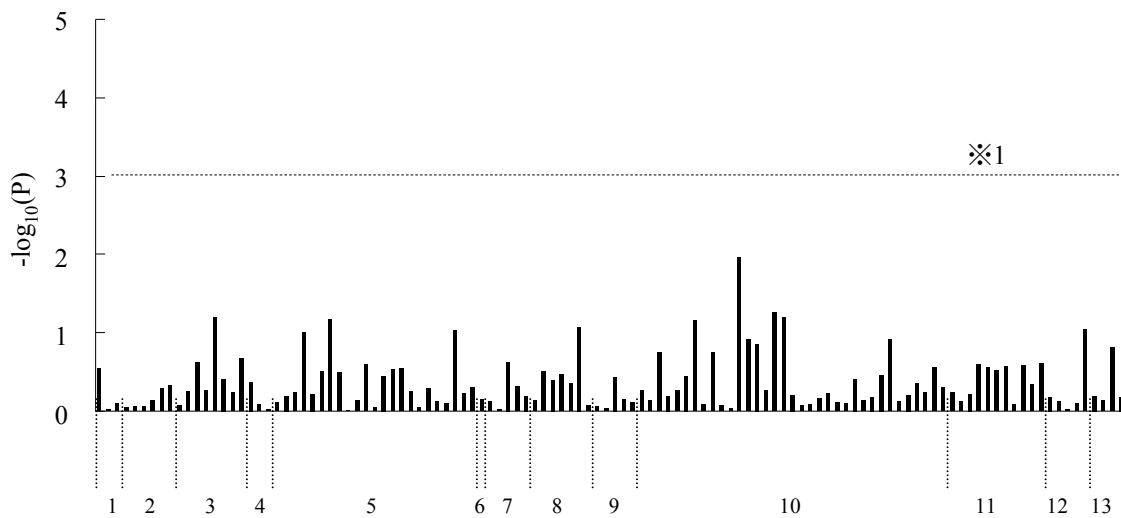


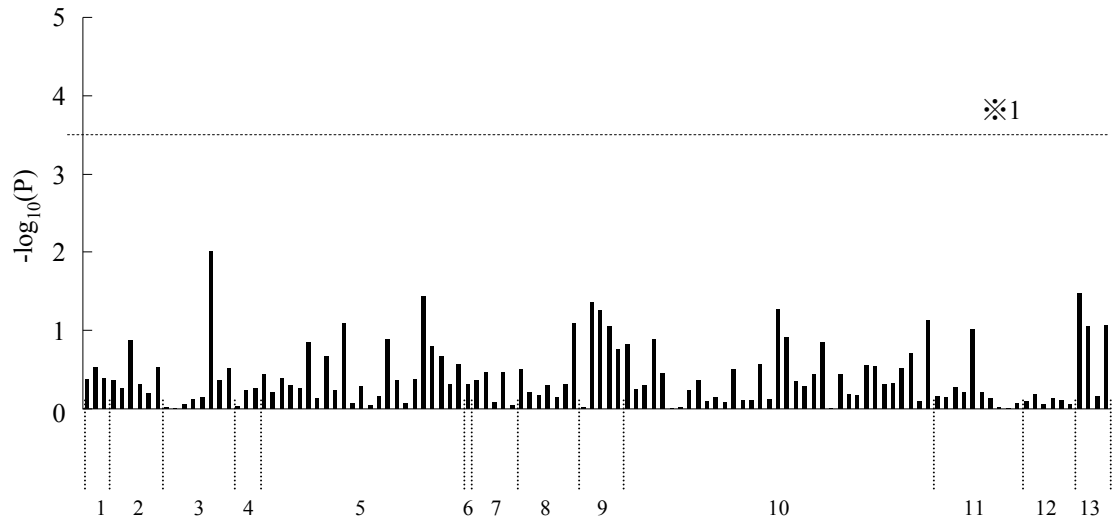
図 2.12 全 116 tag SNP の Hardy-Weinberg 平衡への適合度検定

縦軸は  $\chi^2$  検定の P 値の常用対数の負値のため、縦軸の値が大きいくれば P 値が小さいことを示す。横軸の各番号は以下の遺伝子を示す。各遺伝子中の tag SNP は表 2.14 の順に示す。1 (IFNAR1), 2 (IFNAR2), 3 (JAK1), 4 (Tyrosine kinase 2), 5 (STAT1), 6 (STAT2), 7 (IFN regulatory factor 9), 8 (Rac I), 9 (MAPKK3), 10 (MAPKK6), 11 (p38 MAP kinase), 12 (MAPKAPK2), 13 (MAPKAPK3)

(A) HCV 全遺伝子型、(B) HCV 遺伝子型 1b

※1 は Hardy-Weinberg 平衡への適合度の有意水準を示す

A HCV 全遺伝子型



B HCV 遺伝子型 1b

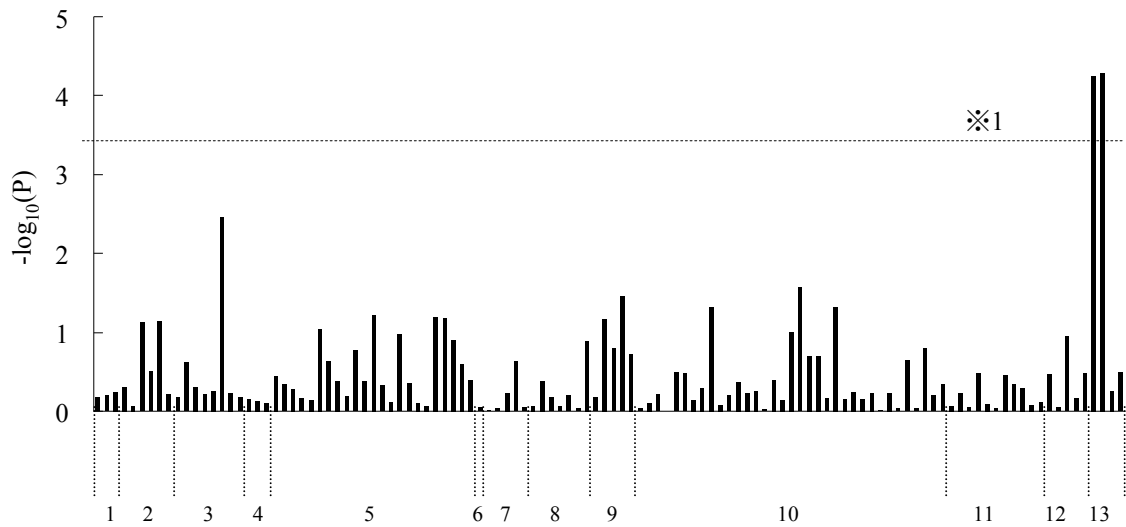


図 2.13 全 116 tag SNP でのケース・コントロール関連解析 (SNP 対立遺伝子頻度モデル)

縦軸は  $\chi^2$  検定の P 値の常用対数の負値のため、縦軸の値が大きい程 P 値が小さいことを示す。横軸の各番号は以下の遺伝子を示す。各遺伝子中の tag SNP は表 2.14 の順に示す。1 (IFNAR1), 2 (IFNAR2), 3 (JAK1), 4 (Tyrosine kinase 2), 5 (STAT1), 6 (STAT2), 7 (IFN regulatory factor 9), 8 (Rac 1), 9 (MAPKK3), 10 (MAPKK6), 11 (p38 MAP kinase), 12 (MAPKAPK2), 13 (MAPKAPK3)

(A) HCV 全遺伝子型 (著効患者 468 名, 非著効患者 587 名)

(B) HCV 遺伝子型 1b (著効患者 208 名, 非著効患者 434 名)

※1 は 116 SNP での Bonferroni 補正後の有意水準を示す

表 2.15 ケース・コントロール関連解析 (HCV 遺伝子型 1b 感染患者)

A SNP 対立遺伝子頻度モデル

SNP	対立遺伝子 1/2	治療効果	対立遺伝子頻度, %		P値	オッズ比 (95%信頼区間)
			1	2		
rs3792323	A/T	著効 (n=208)	77.6	22.4	0.000052	0.57 (0.44-0.75)
		非著効 (n=434)	66.6	33.4		
rs616589	G/A	著効 (n=208)	73.6	26.4	0.000056	0.59 (0.45-0.76)
		非著効 (n=434)	62.2	37.8		

B SNP 対立遺伝子の優性モデルおよび相加モデル

SNP	対立遺伝子 1/2	治療効果	遺伝子型 頻度, %			対立遺伝子2の優性モデル		Cochran-Armitage 検定		
						P値	オッズ比 (95%信頼区間)	P値	オッズ比 (95%信頼区間)	
			11	12	22				11 vs. 12, 22	11 VS. 12
rs3792323	A/T	著効	59.6	36.1	4.3	0.00019	0.53 (0.38-0.74)	0.000046	0.58 (0.41-0.83)	0.30 (0.14-0.63)
		非著効	43.9	45.5	10.7					
rs616589	G/A	著効	53.4	40.4	6.3	0.00023	0.53 (0.38-0.75)	0.000048	0.59 (0.42-0.84)	0.33 (0.17-0.62)
		非著効	38.0	48.4	13.7					

HCV 遺伝子型 1b 感染患者：著効患者 208 名, 非著効患者 434 名



表 2.16 ケース・コントロール関連解析 (ハプロタイプ頻度モデル)

ハプロタイプ	全体 頻度, %	著効群 頻度, %	非著効群 頻度, %	$\chi^2$ 値	並べ替え検定 P値
A-G-G-C	43.6	49.0	41.0	7.227	0.0325
T-G-A-C	30.0	22.4	33.6	17.052	0.0001
A-G-G-T	20.6	22.2	19.8	0.972	0.7919

ハプロタイプの SNP 対立遺伝子は rs3792323 (A>T), rs3804628 (G>A), rs616589 (G>A), rs2040397 (C>T) の順に示す。

表 2.17 多変量 Logistic 回帰分析 (変数強制投入法)

A) tag SNP rs3792323

説明変数	HCV遺伝子型1b		
	P値	オッズ比	95% 信頼区間
rs3792323 (T対立遺伝子/ A対立遺伝子)	0.0014	0.30	0.14-0.63
性別 (男性/女性)	0.12	1.49	0.90-2.46
年齢 (1歳ずつ加齢)	0.018	0.97	0.95-1.00
肝繊維化 (F0-1/F2-4)	0.040	1.64	1.02-2.63
HCV RNA量 (低/高) *	<0.00001	8.14	4.97-13.33

B) tag SNP rs616589

説明変数	HCV遺伝子型1b		
	P値	オッズ比	95% 信頼区間
rs616589 (A対立遺伝子/ G対立遺伝子)	0.0012	0.31	0.15-0.63
性別 (男性/女性)	0.096	1.53	0.93-2.53
年齢 (1歳ずつ加齢)	0.015	0.97	0.95-0.99
肝繊維化 (F0-1/F2-4)	0.030	1.68	1.05-2.69
HCV RNA量 (低/高) *	<0.00001	8.27	5.05-13.54

低 HCV RNA 量： 100 KIU/mL 未満(Amplicor-monitor assay)、または 1.0 MEQ/mL 未満 (branched-chain DNA assay)

表 2.18 多変量 Logistic 回帰分析 (ステップワイズ変数増加法)

説明変数	HCV遺伝子型1b		
	P値	オッズ比	95% 信頼区間
rs3792323 (T対立遺伝子/ A対立遺伝子)	0.0011	0.29	0.14-0.61
年齢 (1歳ずつ加齢)	0.0096	0.97	0.95-0.99
肝繊維化 (F0-1/F2-4)	0.035	1.66	1.04-2.66
HCV RNA量 (低/高)*	<0.00001	8.25	5.05-13.50

低 HCV RNA 量： 100 KIU/mL 未満(Amplicor-monitor assay)、または 1.0 MEQ/mL 未満 (branched-chain DNA assay)

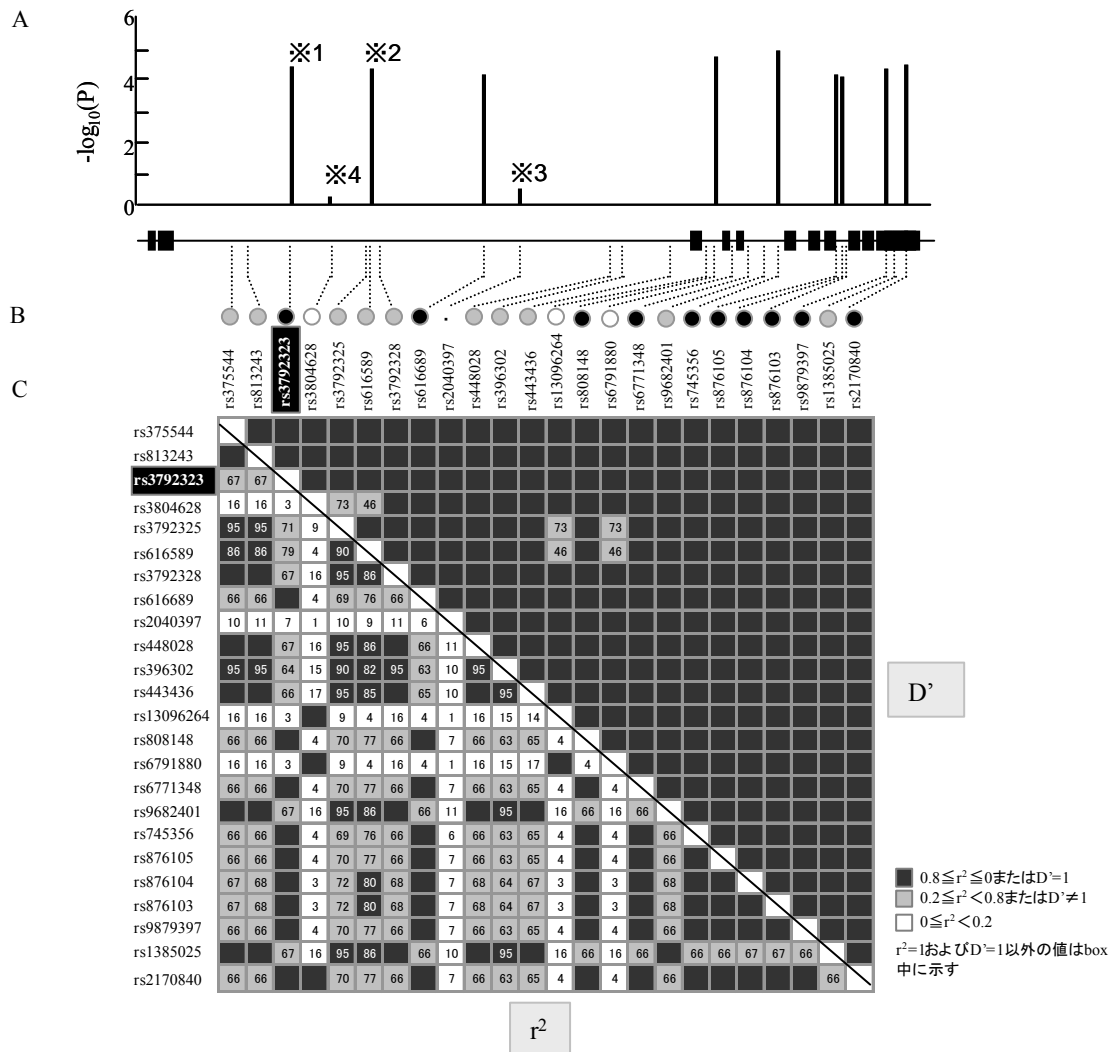


図 2.14 MAPKAPK3 遺伝子領域のその他 SNP での関連解析

(A) MAPKAPK3 遺伝的多型を代表する 4 つの tag SNP および tag SNP rs3792323 と同一の連鎖不平衡 bin に含まれる 7 SNP について HCV 遺伝子型 1b 感染患者における IFN 治療効果との関連を解析した。縦軸は  $\chi^2$  検定の P 値の常用対数の負値のため、縦軸の値が大きい程 P 値が小さいことを示す。(B) MAPKAPK3 エクソン・イントロン構造を示し、HapMap data base の日本人 45 名において MAPKAPK3 遺伝子領域で 5%以上の頻度を示す 24 SNP の位置を示す。(C) HapMap data base の日本人 45 名の遺伝子型データを用いて、MAPKAPK3 遺伝子領域の 24 SNP について、全 2 SNP 間の連鎖不平衡係数  $r^2$  および  $D'$  を算出した結果を示す。各 SNP 番号を示し、tag SNP rs3792323 を黒背景で示す。tag SNP rs3792323 を含む連鎖不平衡 bin の SNP は●で示す。同様に、tag SNP rs616589 を含む連鎖不平衡 bin の SNP は○で、tag SNP rs3804628 を含む連鎖不平衡 bin の SNP は○で示す。tag SNP rs2040397 は・で示し、1 SNP のみを含む連鎖不平衡 bin となる。■の box は  $0.8 \leq r^2 \leq 1$  または  $D'=1$  を示し、■の box は  $0.2 \leq r^2 < 0.8$  または  $D' \neq 1$ 、□の box は  $0 \leq r^2 < 0.2$  を示した。 $r^2=1$  および  $D'=1$  以外の値は box 中に示した。※1; tag SNP rs3792323, ※2; tag SNP rs616589, ※3; tag SNP rs3804628, ※4; tag SNP rs2040397.

表 2.19 tag SNP rs3792323 と MAPKAPK3 遺伝子領域の SNP との連鎖不平衡係数  $r^2$

連鎖不平衡bin	tag SNP	同一bin内の SNP	rs3792323との連鎖不平衡係数 $r^2$	tag SNPとの連鎖不平衡係数 $r^2$	位置
bin 1	rs3792323	rs3792323	-	-	intron2
		rs616689	1	1	intron2
		rs808148	1	1	intron3
		rs6771348	1	1	intron5
		rs745356	1	1	intron5
		rs876105	1	1	intron8
		rs876104	1	1	intron8
		rs876103	1	1	intron8
		rs9879397	1	1	exon11
		rs2170840	1	1	exon11
bin 2	rs616589	rs616589	0.79	-	intron2
		rs3792325	0.71	0.908	intron2
		rs813243	0.68	0.865	intron2
		rs3792328	0.68	0.865	intron2
		rs448028	0.68	0.865	intron2
		rs9682401	0.68	0.865	intron5
		rs375544	0.68	0.862	intron2
		rs1385025	0.68	0.862	exon11
		rs443436	0.67	0.859	intron2
		rs396302	0.64	0.822	intron2
bin 3	rs2040397	rs2040397	0.073	-	intron2
bin 4	rs3804628	rs3804628	0.036	-	intron2
		rs13096264	0.036	1	intron3
		rs6791880	0.036	1	intron4

HapMap data base から抽出した MAPKAPK3 遺伝子領域の 24 SNP について、IFN 治療効果と関連する tag SNP rs3792323 との連鎖不平衡係数  $r^2$  を示す。

## 2.4 考察

本章では、MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A) が HCV 遺伝子型 1b 感染患者における慢性 C 型肝炎の IFN 治療効果と関連することを見出した(表 2.15, 表 2.16)。多変量 Logistic 回帰分析の結果、tag SNP rs3792323 の T 対立遺伝子をもつ場合に非著効となる可能性が 3.4 倍高いことが示され (表 2.18)、tag SNP rs3792323 の遺伝子型判定は IFN 治療効果の予測に有用と示唆された。

MAPKAPK3 はマイトジェンおよびストレス刺激に応答する mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK)として 1996 年に同定され (47,48)、ストレス耐性や細胞分化などに関与することが示唆されている (49-51)。MAPKAPK3 はホモログである MAPKAPK2 とアミノ酸配列で 75%の相同性を示し、両者は I 型 IFN 刺激時に p38 MAP キナーゼにより活性化される (20)。MAPKAPK2 欠損マウスでは、I 型 IFN の抗ウイルス作用が低下するため、MAPKAPK2 は I 型 IFN による抗ウイルス作用の誘導に重要と報告されている(20)。一方、I 型 IFN の抗ウイルス作用における MAPKAPK3 の機能はこれまで明らかにされていない。本章にて MAPKAPK3 の遺伝的多型と IFN 治療効果との関連が示されたことは、MAPKAPK3 の新たな生理的機能の解明につながる糸口としても興味深い。

MAPKAPK3 遺伝子の第 2 イントロンから 3' UTR までの広範囲において、tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  の強い連鎖不平衡を示す SNP が多数存在し、これら SNP も同程度に IFN 治療効果と関連することが示された (表 2.19, 図 2.14)。この結果、tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  の強い連鎖不平衡の関係となる遺伝的多型が、MAPKAPK3 遺伝子産物への質的または量的変化を介して IFN 治療効果に影響を与える可能性が考えられた。関連解析の結果のみでは機能的多型の特定は困難であるため、機能解析により MAPKAPK3 遺伝子の質的または量的変化の原因となる遺伝的多型を明らかにすることが必要である。また、原因変異となる遺伝的多型は、これまで未知の遺伝的多型である可能性も考えられ、MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域や転写調節領域における新規の遺伝的多型の探索も重要と考えられる。HapMap data base の日本人データでは、MAPKAPK3 遺伝子の転写開始点から 1.5 kb までのプロモーター領域に頻度 5%以上の SNP が登録されていなかったが、登録されている 1.5 kb より上流の SNP についても tag SNP rs3792323 と  $r^2 > 0.8$  および  $D' = 1$  の強い連鎖不平衡を示した (data not shown)。そのため、MAPKAPK3 遺伝子のプロモーターから 3' UTR まで広範囲に渡って、IFN 治療効果に影響を与える機能的多型が存在する可能性が考えられる。

MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP rs3792323 および rs616589 は、一般に難治性とされる HCV 遺伝子型 1b 感染患者において IFN 治療効果と関連を示したが、治療効果の高い HCV 遺伝子型 1b 以外も含めた HCV 全遺伝子型感染患者では関連が認められなかった(図 2.13-A)。この原因は明らかでないが、osteopontin 遺伝子の SNP についても同様の報告があり、SNP と IFN 治療効果との関連は、難治性の HCV 遺伝子型 1b 感染患者において強く認められ、HCV 遺伝子型 1b 以外の感染患者では関連が認められない (52)。現在までに、

HCV 遺伝子型 1a、1b および 2a 由来の HCV RNA が自律複製する HCV replicon 細胞が樹立されているため、これら細胞を用いて HCV 遺伝子型ごとに MAPKAPK3 遺伝的多型の影響を比較することが可能である。MAPKAPK3 の遺伝的多型は質的または量的変化を介して IFN 治療効果に影響する可能性が考えられるため、質的变化の場合は変異型 MAPKAPK3 を、量的変化の場合は野生型 MAPKAPK3 を HCV replicon 細胞に一過性に過剰発現させ、I 型 IFN の抗ウイルス作用への影響を比較することは興味深いと考えられる。IFN 治療効果に対する MAPKAPK3 遺伝的多型の機能的意義も含め、今後のさらなる解析が必要である。

HCV 遺伝子型 1b 感染患者での IFN 治療効果は低く個人差も大きいと、治療効果予測法の確立が臨床上の重要課題である。本研究の結果、MAPKAPK3 tag SNP rs3792323 の IFN 抵抗性対立遺伝子をもつ場合に、非著効となる可能性が 3.4 倍高いと予測されることが示され、MAPKAPK3 tag SNP の遺伝子型判定が IFN 治療効果の予測に有用であることが示唆された。今後、MAPKAPK3 tag SNP の遺伝子型判定による治療効果予測を臨床で用いるためには、独立した患者集団での再現性や予測方法の有用性の検証が必要と考えられる。また近年、ポリエチレングリコール化 IFN- $\alpha$  と抗ウイルス剤リバビリンとの併用療法に高い治療効果が報告されているが (1,4)、本研究にはリバビリン併用療法の患者は含まれていない。そのため、今後これら患者での解析も重要と考えられる。HCV に対するリバビリンの作用機序については、HCV RNA polymerase の阻害作用、HCV RNA への変異誘発作用、T helper-1/ T helper-2 バランスの調節による細胞性免疫活性化作用および inosine-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) 阻害活性を介した HCV RNA 複製阻害作用 (細胞内 GTP 減少による HCV RNA 複製阻害) など様々示唆されている (53)。しかし、リバビリンのみを患者に投与した場合、血中 HCV RNA 量は減少せず HCV は排除されない (54,55)。そのため、リバビリン併用療法においても I 型 IFN シグナル伝達経路を介した抗 HCV 作用の惹起は重要と考えられ、リバビリン併用療法においても、MAPKAPK3 遺伝的多型は IFN 治療効果と関連する可能性は高いと予想される。

本研究では、IFN シグナル伝達経路の 13 遺伝子から選択した 116 tag SNP を用いたケース・コントロール関連解析を行った。しかし近年、全ゲノム上の約 50 万ヶ所の tag SNP を用いて、全ゲノムレベルで網羅的にケース・コントロール関連解析を行う genome wide association study の手法が開発された。これにより、IFN との関連が明らかでない遺伝子を含め、網羅的に IFN 治療効果との関連を解析することが可能となった。IFN シグナル伝達経路は多様であり、その下流で誘導される遺伝子も多様であるため、今後は genome wide association study により、IFN 治療効果に関連する遺伝子上の tag SNP が多数同定されると期待される。MAPKAPK3 遺伝的多型について、IFN 抵抗性対立遺伝子をもつ場合に非著効となる可能性は 3.4 倍と予測されるが (表 2.18)、さらに異なる遺伝子上の tag SNP を加えた予測により、临床上より有用な精度の高い予測が可能になると考えられる。また、IFN 治療効果との関連が示された遺伝子は、IFN 治療において重要な生理的機能を担う可能性

が高く、IFN治療効果を向上させる新しい糸口になると期待される。2009年9月には genome wide association study の手法により IFN 治療効果と関連する IFN-lambda 3 (IL-28B) の遺伝的多型が報告された (56)。IFN 治療効果に影響を与える因子の同定は、ウイルス側因子や薬剤因子に加えて患者側因子も進みつつある。今後 IFN 治療効果の個人差の解明が進めば、患者個人に最適な治療を選択する個別化医療が可能になるものと期待される。

これまでに、慢性 C 型肝炎患者 157 名を用いたケース・コントロール関連解析により、IFNAR1 プロモーター領域の GT 繰返し数多型と IFN 治療効果との関連 ( $P=0.008$ ) が報告された (22)。一方、本研究では慢性 C 型肝炎患者 1055 名を用いたが、IFNAR1 tag SNP と IFN 治療効果に関連は認められなかった。HapMap data base には GT 塩基繰返し数多型は登録されていないため、本研究で用いた tag SNP との連鎖不平衡係数は明らかでない。2 つの研究での異なる結果の原因を明らかにするためには、本研究に用いた患者の IFN 受容体のプロモーター領域の GT 塩基繰返し数をダイレクトシーケンス法により解析して、治療効果との関連を解析することが必要と考えられる。

以上より、本章では HCV 遺伝子型 1b 感染患者の IFN 治療効果と関連する MAPKAPK3 遺伝的多型を見出した。MAPKAPK3 遺伝的多型はその遺伝子産物への質的または量的変化を介して IFN 治療効果に影響を与える可能性が考えられた。そのため次章では、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果に対する MAPKAPK3 遺伝的多型の機能的意義について解析した。



### 3. IFN 感受性関連遺伝子 MAPKAPK3 の機能解析

#### 3.1 本研究の目的

第 2 章の結果より、MAPKAPK3 遺伝的多型はその遺伝子産物への質的または量的変化を介して IFN 治療効果に影響を与える可能性が考えられた。

本章では、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果に対する MAPKAPK3 遺伝的多型の機能的意義を検討した。その結果、MAPKAPK3 遺伝的多型によりその転写活性が変化すること、MAPKAPK3 高発現により I 型 IFN シグナル伝達が抑制され、抗ウイルス作用が減弱されることを明らかにした。以下に得られた知見を報告する。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域における新規 SNP の探索

患者 48 名分のゲノム DNA を用いて MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域における SNP を探索した。各患者のゲノム DNA を鋳型として MAPKAPK3 遺伝子の全てのコーディング領域を PCR 法により増幅後、飯田ら (57) および尾崎ら (39) の PCR 産物からのダイレクトシーケンス法を用いて SNP の有無を確認した。PCR 産物からのダイレクトシーケンス法による SNP 判定の例を図 3.1 に示す。

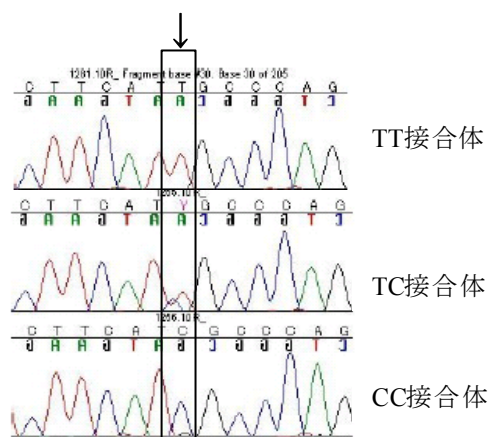


図 3.1 PCR 産物からのダイレクトシーケンス法による SNP 検出の例

### 3.2.2 培養細胞

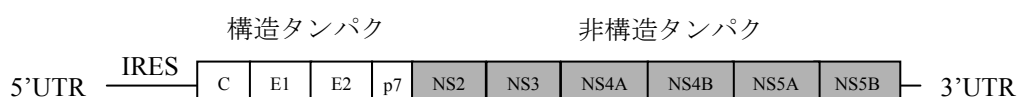
ヒト肝癌由来株 Huh7 細胞は RIKEN Cell Bank から購入して、10% (v/v) ウシ胎児血清、100 U/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified minimal essential medium を用いて 37°C5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。ヒト急性 T 細胞白血病由来株 Jurkat 細胞は ATCC (American Type Culture Collection) から購入して、10% (v/v) ウシ胎児血清、100 U/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin を含む RPMI Medium 1640 を用いて 37°C5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

### 3.2.3 HCV replicon 細胞

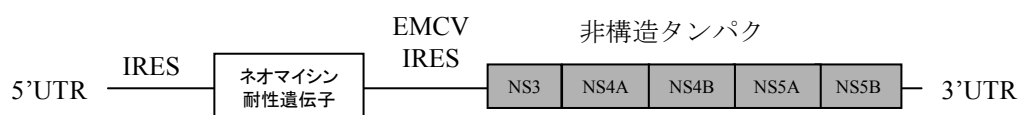
I 型 IFN の抗 HCV 作用を解析する *in vitro* モデルとして、HCV RNA が自律複製する HCV replicon 細胞を用いた (図 3.2)。HCV replicon 細胞では、HCV RNA ゲノム (図 3.2-A) の構造蛋白遺伝子を neomycin 耐性遺伝子と encephalomyocarditis virus (EMCV) の internal ribosome entry site (IRES) に置換したサブゲノム HCV RNA (図 3.2-B) が自律複製して、I 型 IFN の抗 HCV 作用によりサブゲノム HCV RNA の増幅が抑制される。本研究では、HCV 遺伝子型 1b 感染患者において、MAPKAPK3 遺伝的多型と IFN 治療効果に関連が認められたため、HCV 遺伝子型 1b 由来の HCV RNA が自律複製する HCV-N replicon 細胞株を用いた。HCV-N replicon 細胞株は Dr. Christoph Seeger (58) より供与され、10% (v/v) ウシ胎児血

清、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin および 400 µg/mL G418 を含む Dulbecco's modified minimal essential medium を用いて 37°C5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### A HCV RNA ゲノム



#### B サブゲノム HCV RNA



#### C HCV replicon 細胞

サブゲノム HCV RNA を培養細胞に導入して、G418 により選択

図 3.2 HCV replicon 細胞の概要

C, core protein; E, envelope; NS, non structural protein; IRES, internal ribosome entoly site.

#### 3.2.4 ヒト末梢血単核球の調製

理化学研究所遺伝子多型研究センター所属の健常人ボランティアより提供された血液より、Ficoll 密度勾配遠心法を用いて末梢血単核球を調製した。抗凝固剤ヘパリンを含むシリンジで採血した血液を等量の生理食塩水で希釈した。50 mL 遠沈管に Ficoll 400 を含む血球分離溶液 (和光純薬工業社) を 15 mL 加え、30 mL の希釈血液を静かに重層した。400 × g、20°C で 40 分遠心した後、中間層を新しい 15 mL 遠沈管に回収して、末梢血単核球を分離した。10 mL 生理食塩水で 2 回洗浄後、ゲノム DNA の精製は、QIAamp DNA Mini kit (Qiagen 社) を用い、RNA の精製は 3.2.5 項の方法に従った。

#### 3.2.5 リアルタイム定量 PCR 法

MAPKAPK3 mRNA の組織分布の解析には、クロンテック MTC Multiple Tissue cDNA Pannel Human I (cat. 636742)、Human II (cat. 636743) および Human Immune (cat. 636748) を用いた。培養細胞、ヒト末梢血単核球および肝生検試料からの RNA 精製は RNeasy Mini kit または RNeasy Micro kit (Qiagen 社) を用いた。RNase-Free DNase I (Qiagen 社) を用いて DNA を分解した後に、SuperScript III Platimun Two-Step qRT-PCR kit (Invitrogen 社) を用いて first strand cDNA を合成した。

リアルタイム定量 PCR 法は、SYBR Green 法または Taqman probe 法を用いた。SYBR Green

法では、PCR 反応液として 1×Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen 社)、200 nM each primer、50 nM ROX reference dye (Invitrogen 社)、および 5 μL first strand cDNA を含む 20 μL の反応液を調製した。PCR 反応条件は 50°C2 分、95°C2 分、(95°C15 秒、60°C30 秒)×50 サイクルで行った。MAPKAPK3 (GenBank Accession No., NM\_004635)、MxA (GenBank Accession No., NM\_002462)、HCV RNA (GenBank Accession No., S62220)および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, GenBank Accession No., NM\_002046) の検出に用いたプライマーを以下に示す。

MAPKAPK3	Forward, 5'-CCCTGGATCAACCAATCGAT-3' Reverse, 5'-TGACTTCGTCCCAGTGGTCTT-3'
HCV RNA	Forward, 5'-CCGCTCAATGCCTGGAGAT-3' Reverse, 5'-CTTTCGCGACCCAACACTACTC-3'
MxA	Forward, 5'-CCAGGTATACAGGGGTGCATT-3' Reverse, 5'-CGTCTGGAGCATGAAGAACTG-3'
GAPDH	Forward, 5'-CCACATGGCCTCCAAGGA-3' Reverse, 5'-CCCAGCAGTGAGGGTCTCTCT-3'

Taqman probe 法では、PCR 反応液として 1×Ex Taq buffer (Takara 社)、0.5 U Takara Ex Taq HS (Takara 社)、200 μM dNTPs、0.25 μL Taqman probe (Applied Biosystems 社)、50 nM ROX reference dye (Invitrogen 社)、および 4 μL first strand cDNA を含む 20 μL の反応液を調製した。PCR 反応条件は 95°C1 分、(95°C15 秒、60°C1 分)×50 サイクルで行った。OAS1 (GenBank Accession No., NM\_001032409.1)の検出に用いたプローブを以下に示す。

OAS1                      Assay ID Hs00242943\_m1

リアルタイム定量 PCR 法の標準曲線の作成には、各標的配列が挿入されたベクターの段階希釈系列を用いた。各遺伝子の相対発現量は、GAPDH を内部標準として算出した。リアルタイム定量 PCR 法の反応および検出は Mx3000P Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene 社) を用いた。

### 3.2.6 allele specific transcript quantification 法 (ASTQ 法)

ASTQ 法とは、着目する SNP (A/a) についてヘテロ接合体の mRNA に含まれる A 対立遺伝子および a 対立遺伝子に特異的な転写産物を定量する方法であり、大沢ら (59) および神山ら (60) の方法に従った。同定した tag SNP rs3792323 (A>T) はイントロンに位置するため、スプライシングにより mRNA 上では検出できない。そのため、tag SNP rs3792323 と強い連鎖不平衡の関係にあり、mRNA 上で検出できる SNP を HapMap データおよび

Haploview software を用いて検索した結果、MAPKAPK3 の 3'非翻訳領域の SNP rs1385025 (A>G) がマーカー-SNP として利用可能であった。tag SNP rs3792323 との連鎖不平衡係数は  $D'=1$  であり、2 SNP で構成されるハプロタイプは日本人集団内に 3 種類のみと推定された (図 3.3)。tag SNP rs3792323 の A 対立遺伝子がマーカー-SNP rs1385025 の A 対立遺伝子と同一染色体上にあるハプロタイプ 1 (A-A)、同様にハプロタイプ 2 (T-G)およびハプロタイプ 3 (A-G)と推定される。tag SNP rs3792323 の遺伝子型が AT およびマーカー-SNP rs 1385025 の遺伝子型が AG と 2 SNP ともヘテロ接合型である個人のハプロタイプは、ハプロタイプ 1 およびハプロタイプ 2 の 2 種類に特定される。

	tag SNP rs3792323 (A>T)	マーカー-SNP rs1385025 (A>G)	日本人集団での 推定頻度
ハプロタイプ1	— A —	— A —	62.5%
ハプロタイプ2	— T —	— G —	28.8%
ハプロタイプ3	— A —	— G —	8.8%

図 3.3 tag SNP rs3792323 およびマーカー-SNP rs1385025 から推定されるハプロタイプ Haploview softwareによる日本人集団での推定頻度も示す。

上記 2 SNP ともにヘテロ接合型のヒト試料として、健康人ボランティア 5 名の末梢血単核球および慢性 C 型肝炎患者 5 名の肝生検試料を用いた。ゲノム DNA および cDNA を鋳型として、マーカー-SNP rs 1385025 (A>G)を含む領域を PCR 反応により増幅した。PCR 反応には下に示すプライマーを用い、0.4 U KOD plus DNA polymerase (東洋紡ライフサイエンス社)、1 X KOD buffer、0.2 mM dNTPs、1.0 mM MgSO<sub>4</sub>、0.3 μM primer および template 2.0 μL を含む 20 μL の反応液を調製した。反応条件は 98°C、120 秒-(98°C、10 秒- 60°C、30 秒- 68°C、40 秒)×40 サイクルで行い、得られた PCR 産物を ASTQ 法の鋳型に用いた。

Forward プライマー 5'-CCTGTGAATGCTGAGTGAGCGAGTA-3'

Reverse プライマー 5'-AGTCACCCTTTGGGTCGGGAATAGT-3'

ASTQ 反応では、マーカー-SNP rs 1385025 (A>G) の A 対立遺伝子および G 対立遺伝子に特異的 signal probe を含む probe mixture (Third Wave Technologies 社, Probe No. #136431) を用い、鋳型 PCR 産物中に含まれる各対立遺伝子特異的な MAPKAPK3 遺伝子を Invader 法により定量した。ASTQ 反応液として 1×signal buffer、1×FRET Mix (FRET22/FTRE7)、30 ng cleavase<sup>®</sup> enzyme、0.3 μL probe mixture (全試薬 Third Wave Technologies 社) および 2 ng PCR 産物を含む total 5 μL の反応液を調製した。ASTQ 反応条件は 95°C 5 分-(63°C 1 分)×40 サイクルで行い、マーカー-SNP rs1385025 の A 対立遺伝子特異的 MAPKAPK3 (ハプロタイプ

1) を蛍光色素 VIC で、G 対立遺伝子特異的 MAPKAPK3 (ハプロタイプ 2) を蛍光色素 FAM で検出した (図 3.4)。ASTQ 反応および検出は、M×3000P Multiplex Quantitative PCR system を用いた。

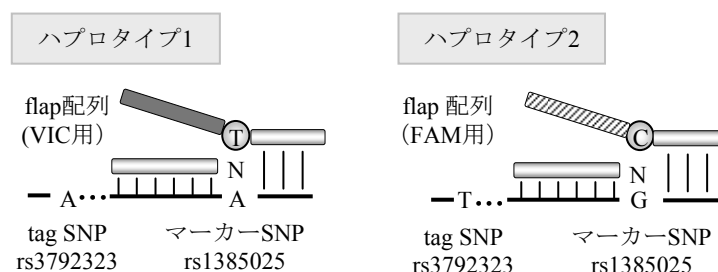


図 3.4 各ハプロタイプを特異的に検出する signal probe

ASTQ 反応の検量線には、ASTQ 反応の鋳型に用いたゲノム DNA 由来 PCR 産物の段階希釈系列 (公比 1.25) を用いた。各個人のゲノム DNA および cDNA 由来 PCR 産物における VIC および FAM 蛍光強度から、ハプロタイプ 1 およびハプロタイプ 2 特異的 MAPKAPK3 の相対濃度を検量線から算出した後に、相対濃度比 (ハプロタイプ 2/ハプロタイプ 1) をグラフにプロットした。5 名分のゲノム DNA および cDNA における相対濃度比 (ハプロタイプ 2/ハプロタイプ 1) の統計学的有意性については、unpaired t test により検定した (StatFlex 5.0 software package)。

### 3.2.7 MAPKAPK3 発現ベクター構築

ヒト MAPKAPK3 の全長 cDNA を単離するため、MAPKAPK3 全長塩基配列 (GenBank Accession No., NM\_004635) に対して、開始コドンを含む forward プライマーおよび終止コドンを含む reverse プライマーを設計した。forward プライマーの 5'側にはサブクローニングのため CACC 配列を付加した。単離に用いたプライマーを以下に示す。

forwardプライマー 5'-CACCATGGATGGTGAAACAGCAGAGG-3'

reverse プライマー 5'-CTACTGGTTGTTGCAGCCCTG-3'

PCR 反応液として、0.3 U KOD plus DNA polymerase (東洋紡ライフサイエンス社)、1 X KOD buffer、0.2 mM dNTPs、1.0 mM MgSO<sub>4</sub>、0.3 μM primer および 3.2.3 項のヒト肝臓 cDNA 1.5 μL を含む 15 μL の反応液を調製し、反応条件は 94°C、120 秒-(95°C、15 秒- 59°C、30 秒- 68°C、90 秒)×33 サイクルで行った。得られた PCR 産物はエントリーベクター pENTER/D-TOPO (Invitrogen 社) の添付文書に従い TOPO 反応によりサブクローニングして、ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems 社) により配列を確認した。Gateway LR Clonase Enzyme mix (Invitrogen 社)の添付文書に従い、エントリーベクターの attL site と哺乳類発

現ベクターpEF-DEST51 (Invitrogen 社) の attR site の組み換え反応により、ヒト MAPKAPK3 全長 cDNA を pEF-DEST51 へ挿入し、ABI 3700 sequencer により正しい読み枠であることを確認した。

### 3.2.8 ウェスタンブロットティング

Huh7 細胞を 12 well plate に  $13 \times 10^4$  cells/well で播種した 24 時間後に、Lipofectamine LTX (Invitrogen 社) を用いて 1000 ng の MAPKAPK3 発現ベクター (pEF-DEST51/MAPKAPK3) を導入した。遺伝子導入の 48 時間後に氷冷した phosphate-buffered saline で洗浄して、200 ul/well の lysis buffer (1% Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mg/mL iodoacetamide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM Tris-HCl, pH7.5) を用いて 10 分間 on ice で可溶化した。15,000 rpm 4°C で 5 分間遠心した上清を Laemmli の方法(61)に従って還元条件下 10-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルで SDD-PAGE を行った。セミドライ法によりゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写した後に、blocking buffer (3% BSA, 0.1% Tween 20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) により室温で 1 時間 blocking 反応を行った。その後、blocking buffer で 1,000 倍希釈した抗 MAPKAPK3 抗体 H50 (Santa Cruz Biotechnology 社, cat. sc-28782) と室温で 2 時間反応させ、washing buffer (0.1% Tween 20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で 10 分間 3 回の洗浄後に、blocking buffer で 20,000 倍希釈したペルオキシターゼ標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。その後、washing buffer で 10 分間 4 回の洗浄後に、ECL 試薬 (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) により膜上のバンドを検出した。 $\beta$ -actin の検出は、1 次抗体に 1,000 倍希釈の抗 beta actin 抗体 (Abcam 社, cat. ab8226)、2 次抗体に 50,000 倍希釈のペルオキシターゼ標識 2 次抗体を用いて同様に行った。

### 3.2.9 luciferase reporter assay

ヒト肝癌由来細胞株 Huh7 細胞を  $7 \times 10^3$  cells/well で 96 well plate に播種した 24 時間後、FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science 社) を用いて 10 ng の ISRE 配列または GAS 配列を含む firefly luciferase vector (pISRE-TA-Luc または pGAS-TA-Luc, BD biosciences 社) と 1 ng renilla luciferase vector (pRL-TK, Promega 社) を導入し、同時に 40 ng の MAPKAPK3 発現ベクター (pEF-DEST51/MAPKAPK3)、mock ベクター (pEF-DEST51/mock) または SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) 発現ベクター (pEF-DEST51/ SOCS1) を導入した。遺伝子導入の 24 時間後に IFN- $\alpha$  を添加して、さらに 24 時間培養後に Dual-Luciferase Assay kit (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。firefly luciferase 活性は、renilla luciferase 活性によって導入効率の補正を行い、luciferase 相対活性として示した。各 IFN- $\alpha$  添加濃度における luciferase 相対活性について、MAPKAPK3 発現ベクター、mock ベクターおよび SOCS1 発現ベクターの 3 群間において分散分析として Kruskal-Wallis test を行った後に、2 群間の差の検定のために Scheffe's test を行った (StatFlex 5.0 software package)。

### 3.2.10 HCV replicon 細胞への遺伝子導入、cell sorting、リアルタイム定量 PCR

HCV replicon 細胞を 12 well plate に  $13 \times 10^4$  cells/well で播種した 24 時間後に、Lipofectamine LTX (Invitrogen 社) を用いて 300 ng の GFP 発現ベクターを導入し、同時に 700 ng の MAPKAPK3 発現ベクター (pEF-DEST51/MAPKAPK3) または mock ベクター (pEF-DEST51/mock) を導入した。遺伝子導入の 24 時間後に回収して、FACS Vantage フローサイトメトリー (Becton Dickinson 社) を用いて GFP 陽性細胞を分離して、96 well plate に  $3 \times 10^4$  cells/well で再播種した。24 時間培養後に IFN- $\alpha$  を添加し、さらに 24 時間培養後に細胞を回収した。first strand cDNA の合成およびリアルタイム定量 PCR 法は、3.2.5 項に記載の方法で行った。IFN- $\alpha$  の抗 HCV 作用は、IFN- $\alpha$  未刺激時の HCV RNA 量を基準とした各 IFN- $\alpha$  濃度での HCV RNA 量の比 (% of control) を指標に評価した。各 IFN- $\alpha$  刺激濃度における 2 群間の有意差検定は student's t-test により行った (Excel, Microsoft 社)。



### 3.3 結果

#### 3.3.1 MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域における SNP の探索

MAPKAPK3 遺伝子の全てのコーディング領域において患者 48 名分のゲノム DNA の塩基配列を解析して、アミノ酸置換・欠失などを伴う遺伝的多型の存在の有無を確認した。その結果、48 名全ての患者においてアミノ酸置換または欠失などを伴う遺伝的多型は認められないことを確認した。この結果は、HapMap data base の日本人 45 名のデータでは、MAPKAPK3 遺伝子のコーディング領域において頻度 1% 以上のアミノ酸置換または欠失などを伴う SNP が認められない結果と一致した。

これまでに、MAPKAPK3 スプライスバリエーションの存在は確認されていないため、MAPKAPK3 遺伝的多型はその遺伝子産物の量的変化を介して IFN 治療効果に影響を与える可能性が高いと考えられた。

#### 3.3.2 MAPKAPK3 組織分布

MAPKAPK3 mRNA の組織分布をリアルタイム定量 PCR 法により検討した。その結果、MAPKAPK3 mRNA は広範囲の組織において発現することを確認した(図 3.5)。心臓および白血球に強い発現が確認され、HCV が慢性感染する肝臓においても発現が認められた。

#### 3.3.3 I 型 IFN 刺激による MAPKAPK3 発現変動

I 型 IFN (IFN- $\alpha$ ) 刺激による MAPKAPK3 発現変動をリアルタイム定量 PCR 法により検討した。3.3.2 項より MAPKAPK3 は広範囲の組織で発現が確認されたため、IFN- $\alpha$  の作用部位を想定して肝細胞および血液系細胞由来株における発現変動を解析した。ヒト肝癌由来株 Huh7 細胞およびヒト急性 T 細胞白血病由来株 Jurkat 細胞の培養上清に IFN- $\alpha$  を終濃度 1000 U/mL の濃度で添加して、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間および 48 時間後の MAPKAPK3 発現量を解析した。その結果、MAPKAPK3 の発現は IFN- $\alpha$  刺激に関わらず恒定的に認められ、IFN- $\alpha$  刺激による発現量の変化は認められなかった (図 3.6)。

#### 3.3.4 ASTQ 法

MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP rs3792323 (A>T) の SNP 対立遺伝子の違いが、MAPKAPK3 転写活性の違いと関連する可能性を ASTQ 法により検討した。ASTQ 法では、tag SNP rs3792323 (A>T) およびマーカー SNP rs1385025 (A/G) で構成されるハプロタイプについて、ハプロタイプ 1 (rs3792323A- rs1385025A) とハプロタイプ 2 (rs3792323T- rs1385025G) のヘテロ接合型のヒト試料を用いた。Invader 法により、ハプロタイプ 1 およびハプロタイプ 2 特異的 MAPKAPK3 を、それぞれ蛍光色素 VIC および FAM で検出した。

ASTQ 法の検量線を図 3.7 に示す。鋳型相対濃度を横軸に、VIC (図 3.7-A) および FAM (図 3.7-B) 蛍光強度を縦軸にプロットした結果、相対濃度 10 から 1.7 の範囲において直線的な検量線が作成された。 $r^2$  値は VIC で 0.98 および FAM で 0.99 であり、鋳型相対濃度

と蛍光強度間に良好な相関が認められた。この結果より、各ハプロタイプ特異的 MAPKAPK3 を良好に定量可能であることが示された。

健康人 5 名の末梢血単核球の結果を図 3.7-C に示す。tag SNP およびマーカー SNP 両方についてヘテロ接合型の場合、2 倍体であるヒトゲノム DNA にはハプロタイプ 1 およびハプロタイプ 2 の 2 種類が 1:1 で存在するため、ハプロタイプ 1 およびハプロタイプ 2 特異的 MAPKAPK3 の相対濃度比 (ハプロタイプ 2/ハプロタイプ 1) は理論上 1.0 となる。5 名分のゲノム DNA における相対濃度比の平均値は  $1.03 \pm 0.14$  と理論値 1.0 に近い値であった。一方 cDNA においても、ハプロタイプ特異的 MAPKAPK3 の相対濃度比 (ハプロタイプ 2/ハプロタイプ 1) は、5 名分の平均値が  $1.09 \pm 0.14$  であり、ゲノム DNA との有意な差は認められなかった。

慢性 C 型肝炎患者 5 名の肝生検試料の結果を図 3.7-D に示す。ハプロタイプ特異的 MAPKAPK3 の相対濃度比 (ハプロタイプ 2/ハプロタイプ 1) は、5 名分ゲノム DNA の平均値は  $1.16 \pm 0.15$  に対して、5 名分 cDNA の平均値が  $1.97 \pm 0.37$  であり、ゲノム DNA と cDNA 間で有意な差が認められた ( $P=0.01$ )。この結果より、肝臓ではハプロタイプ 2 由来の MAPKAPK3 転写活性がより高いことが示された。ハプロタイプ 2 は tag SNP rs3792323 (A>T) の IFN 抵抗性対立遺伝子 T を含むため、T 対立遺伝子をもつ患者の肝臓では MAPKAPK3 高発現が一つの原因となって、IFN 治療効果が低くなる可能性が考えられた。

### 3.3.5 MAPKAPK3 一過性過剰発現の確認

ヒト肝臓 cDNA を鋳型として、MAPKAPK3 遺伝子全長 cDNA を単離した。シーケンスを確認した結果、MAPKAPK3 登録配列 (GenBank Accession No., NM\_004635) と完全に一致する配列であったため、哺乳類発現ベクター pEF-DEST51 に挿入して MAPKAPK3 発現ベクターを構築した。MAPKAPK3 発現ベクターを Huh7 細胞に一過性に導入した 48 時間後に、リアルタイム定量 PCR 法により MAPKAPK3 発現量を解析した結果、コントロールベクター (pEF-DEST51/mock) を導入した場合と比較して、RNA レベルで 5,000 倍以上の高発現が認められた (図 3.8)。また、ウェスタンブロッティングによりタンパクレベルでの MAPKAPK3 発現量を確認した結果、MAPKAPK3 発現ベクター導入により特異的なバンドが検出され、コントロールベクター導入ではバンドは認められなかった (図 3.8)。

以上より、MAPKAPK3 発現ベクターの導入により、RNA およびタンパクレベルにおいて MAPKAPK3 の高発現が認められた。

### 3.3.6 I 型 IFN シグナル伝達に対する MAPKAPK3 の抑制作用

MAPKAPK3 の高発現が I 型 IFN シグナル伝達に与える影響を解析するため、I 型 IFN (IFN- $\alpha$ ) 刺激による ISRE および GAS 配列からの luciferase 遺伝子の転写誘導を指標とした reporter gene assay を行った。MAPKAPK3 を一過性に高発現させた結果、陰性コントロールの mock ベクターと比較して、ISRE 配列および GAS 配列からのルシフェラーゼの転

写誘導が 5 U/mL、50 U/mL および 100 U/mL の IFN- $\alpha$  刺激において有意に抑制された (図 3.9)。陽性コントロールとして IFN- $\alpha$  シグナル伝達を抑制する SOCS1 を一過性に高発現させた場合も同様に、mock ベクターと比較して有意に抑制された。

以上の結果より、MAPKAPK3 の高発現により I 型 IFN シグナル伝達が抑制されることが示された。

### 3.3.7 I 型 IFN の抗 HCV 作用に対する MAPKAPK3 の抑制作用

I 型 IFN (IFN- $\alpha$ ) の抗 HCV 作用に対する MAPKAPK3 高発現の影響を検討するため、HCV RNA が自律複製する HCV replicon 細胞へ MAPKAPK3 発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを一過性に導入した。24 時間後に FACS Vantage フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞を分離した結果、GFP 陽性 HCV replicon 細胞は分離前の 33% から 99.5% まで濃縮された (図 3.10)。分離後の HCV replicon 細胞を再播種して、IFN- $\alpha$  で 24 時間刺激後の HCV RNA 量および抗ウイルス遺伝子 (OAS1 および MxA) の発現量をリアルタイム定量 PCR 法により解析した。

MAPKAPK3 を一過性に高発現させた場合、陰性コントロールの mock ベクターと比較して、OAS1 遺伝子の転写誘導は IFN- $\alpha$  刺激濃度 5 U/mL、50 U/mL および 100 U/mL において有意に抑制された (図 3.11-A)。同様に、MAPKAPK3 高発現により、MxA 遺伝子の転写誘導も mock ベクターと比較して各 IFN- $\alpha$  刺激濃度において有意に抑制された (図 3.11-B)。さらに MAPKAPK3 高発現により、mock ベクターと比較して、IFN- $\alpha$  の抗 HCV 作用は IFN- $\alpha$  刺激濃度 5 U/mL、50 U/mL および 100 U/mL において有意に減弱された (図 3.11-C)。

以上の結果より、MAPKAPK3 高発現により、I 型 IFN の抗ウイルス作用に重要な OAS1 遺伝子および MxA 遺伝子の発現が抑制され、I 型 IFN の抗 HCV 作用が減弱されることが示された。

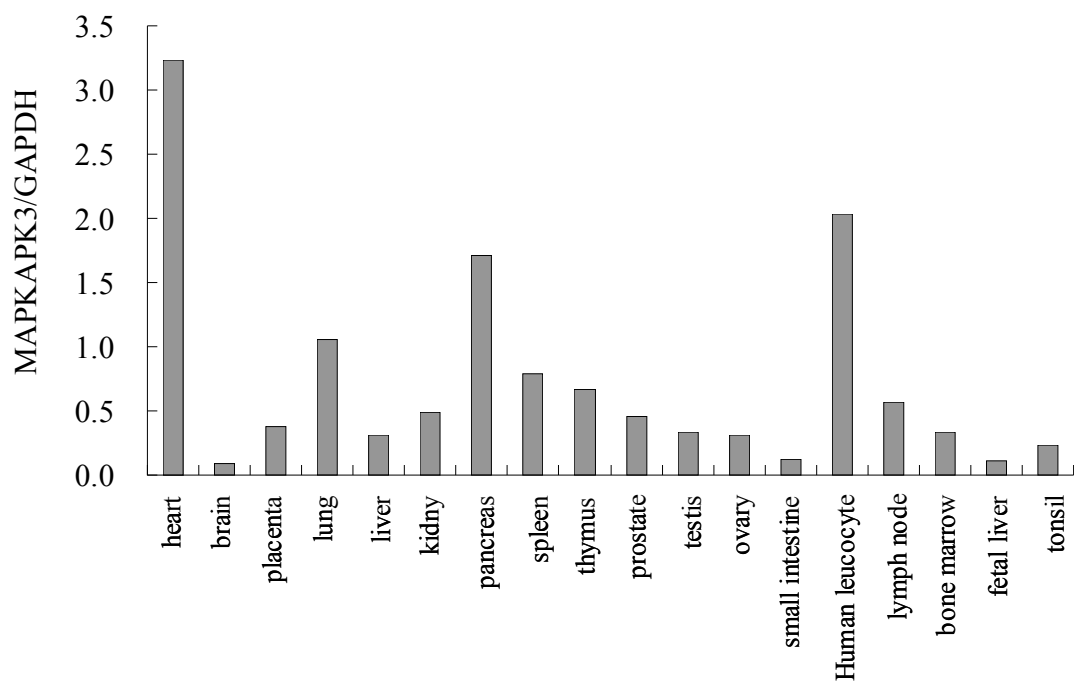


図 3.5 MAPKAPK3 mRNA の組織分布

MAPKAPK3 mRNA の組織分布をリアルタイム定量 PCR 法にて解析した。MAPKAPK3 遺伝子発現量は、内部標準遺伝子 GAPDH により補正した。

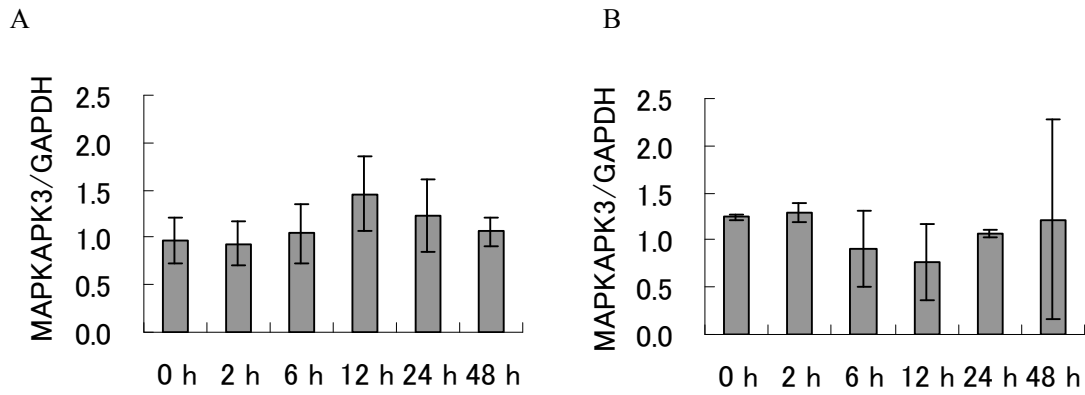


図 3.6 I 型 IFN 刺激による MAPKAPK3 遺伝子の発現誘導

I 型 IFN (IFN- $\alpha$ ) 刺激による MAPKAPK3 遺伝子の発現誘導をリアルタイム定量 PCR 法にて解析した。(A) ヒト肝癌由来細胞株 Huh7 細胞および (B) ヒト急性 T 細胞白血病株 Jurkat 細胞の培養上清に IFN- $\alpha$  を終濃度 1000 U/mL の濃度で添加して、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間および 48 時間後に細胞を回収した。MAPKAPK3 遺伝子発現量は、内部標準遺伝子 GAPDH により補正した。

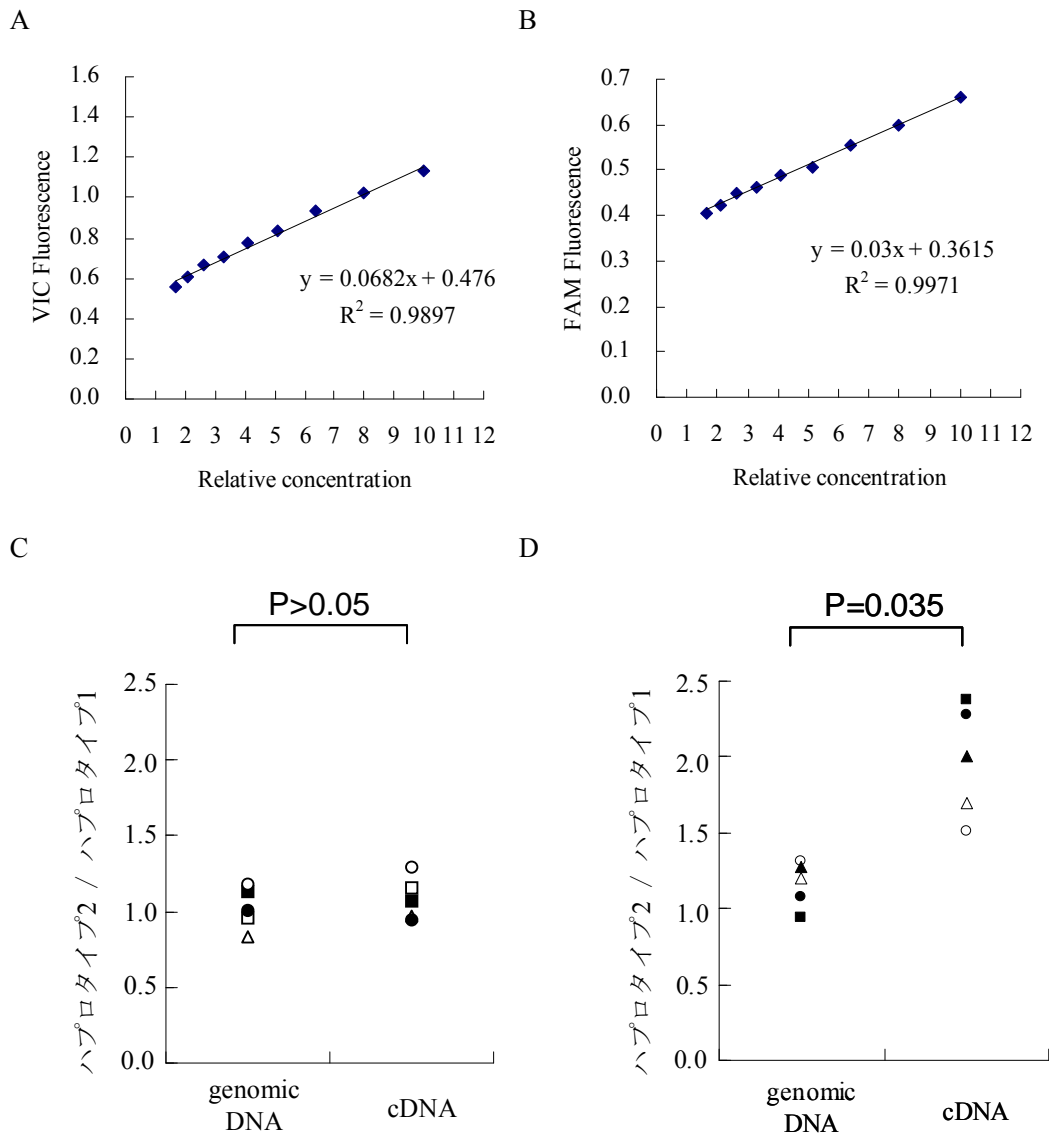
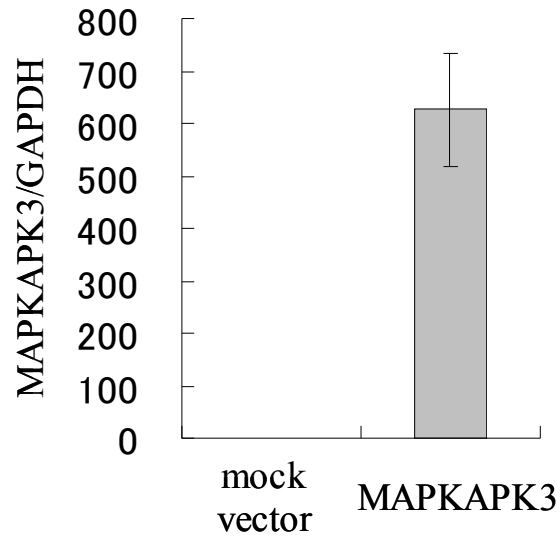


図 3.7 健康人末梢血単核球および慢性 C 型肝炎患者肝生検試料における ASTQ 法 tag SNPrs3792323 (A/T)と連鎖不平衡となり MAPKAPK3 の 3'UTR に位置するマーカー SNP rs1385025 (A/G) について、両 SNP ともヘテロ接合型の健康人および慢性 C 型肝炎患者について解析した。これら各人の tag SNP rs3792323 とマーカー SNP rs1385025 で構成されるハプロタイプは、ハプロタイプ 1 (A-A) およびハプロタイプ 2 (T-G) の 2 種類となる。検量線作成のため、ゲノム DNA 由来 PCR 産物の公比 1.25 の段階希釈系列を用い、相対濃度 (Relative concentration) を横軸に、VIC (A) および FAM (B) 蛍光強度を縦軸にプロットして、 $r^2$  値を算出した。5 名分の健康人末梢血単核球 (C) および慢性 C 型肝炎患者肝生検試料 (D) において、ハプロタイプ 1 およびハプロタイプ 2 特異的 MAPKAPK3 の相対濃度比(ハプロタイプ 2/ハプロタイプ 1)をプロットした。各健康人および患者は、No.1 (●)、No.2 (○)、No.3 (▲)、No.4 (△)および No.5 (□) により示す。統計学的有意性は unpaired t test により検定した。肝生検試料での有意差は triplicate で 3 回繰り返し実験により再現性を確認した。

A



B

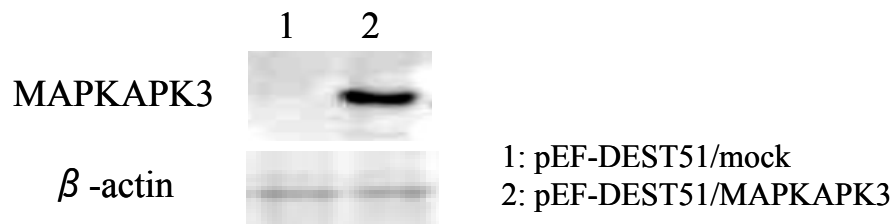


図 3.8 MAPKAPK3 発現ベクターによる一過性過剰発現の確認

ヒト肝癌由来細胞株 Huh7 細胞に MAPKAPK3 発現ベクター (pEF-DEST51/MAPKAPK3) またはコントロールベクター (pEF-DEST51/mock) を一過性に導入した 48 時間後に回収して、リアルタイム定量 PCR 法 (A) およびウェスタンブロットティング法 (B) により、MAPKAPK3 発現量を解析した。内部標準として、リアルタイム定量 PCR 法では GAPDH により発現量を補正した。ウェスタンブロットティング法では  $\beta$ -actin の発現量を確認した。

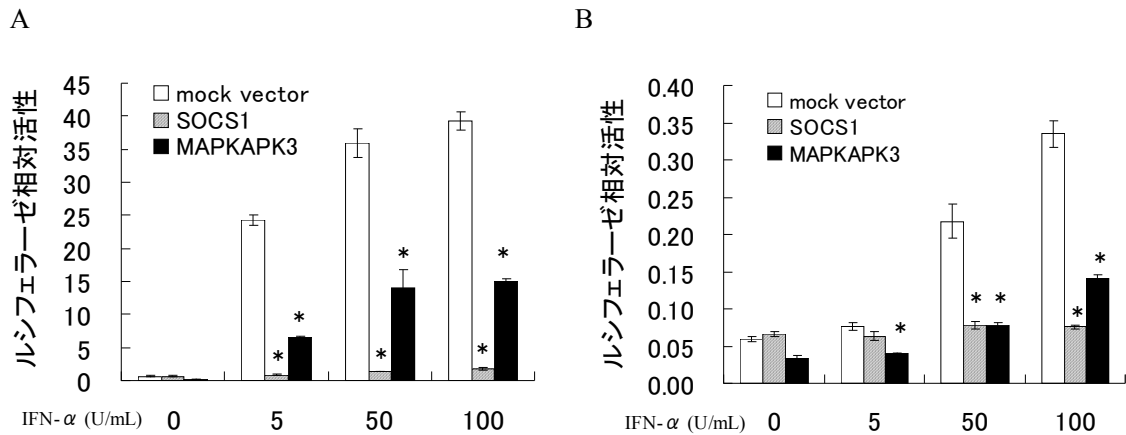


図 3.9 I 型 IFN シグナル伝達に対する MAPKAPK3 の抑制作用の解析

MAPKAPK3 の高発現が I 型 IFN シグナル伝達に与える影響を解析するため、I 型 IFN (IFN- $\alpha$ ) 刺激による ISRE および GAS 配列からの luciferase 遺伝子の転写誘導を指標とした reporter gene assay を行った。ヒト肝癌由来細胞株 Huh7 細胞に 10 ng の firefly luciferase vector pISRE-TA-Luc (A) または pGAS-TA-Luc (B) と 1 ng renilla luciferase vector pRL-TK を導入し、同時に 40 ng の MAPKAPK3 発現ベクター、陰性コントロールとして mock ベクターまたは陽性コントロールとして SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) 発現ベクターを導入した。遺伝子導入の 24 時間後に IFN- $\alpha$  を添加して、さらに 24 時間培養後に Dual-Luciferase Assay kit を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。firefly luciferase 活性は renilla luciferase 活性によって導入効率の補正を行い、縦軸にルシフェラーゼ相対活性として示した。統計学的検定は、Kruskal-Wallis test により多群間の有意性を確認した後に、Scheffe's test により 2 群間の有意性を検定した。各群 3 サンプルずつ解析 (triplicate) して、実験は 3 回繰り返し行った。データは平均値±標準偏差で示す。\*は各 IFN- $\alpha$  濃度での陰性コントロールと比較した P 値が 0.05 未満であることを示す。



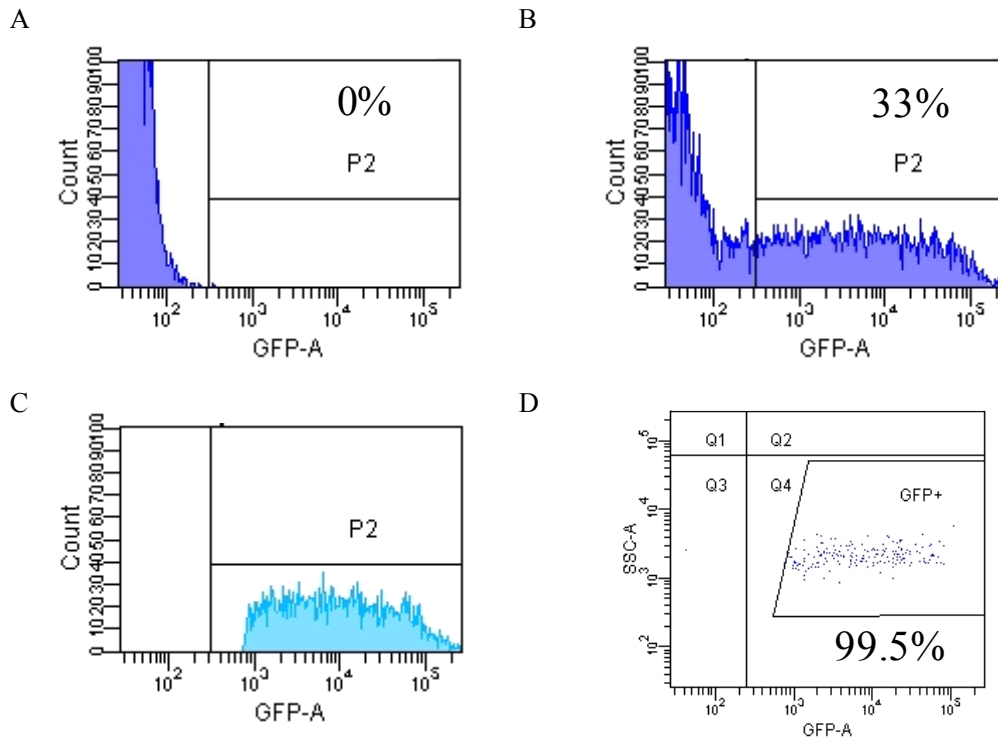


図 3.10 GFP 陽性 HCV replicon 細胞のソーティング

HCV replicon 細胞に GFP 発現ベクターを導入し、同時に MAPKAPK3 発現ベクター (pEF-DEST51/MAPKAPK3) または mock ベクター (pEF-DEST51/mock) を導入した。導入 24 時間後に回収して、GFP 陽性細胞を FACS Vantage フローサイトメトリーを用いて分離した。HCV replicon 細胞 (A) および GFP 発現ベクター導入 HCV replicon 細胞 (B) の蛍光強度より、GFP 陽性細胞として分離する範囲を指定した (C)。分離後の HCV replicon 細胞における GFP 陽性率を示す(D)。

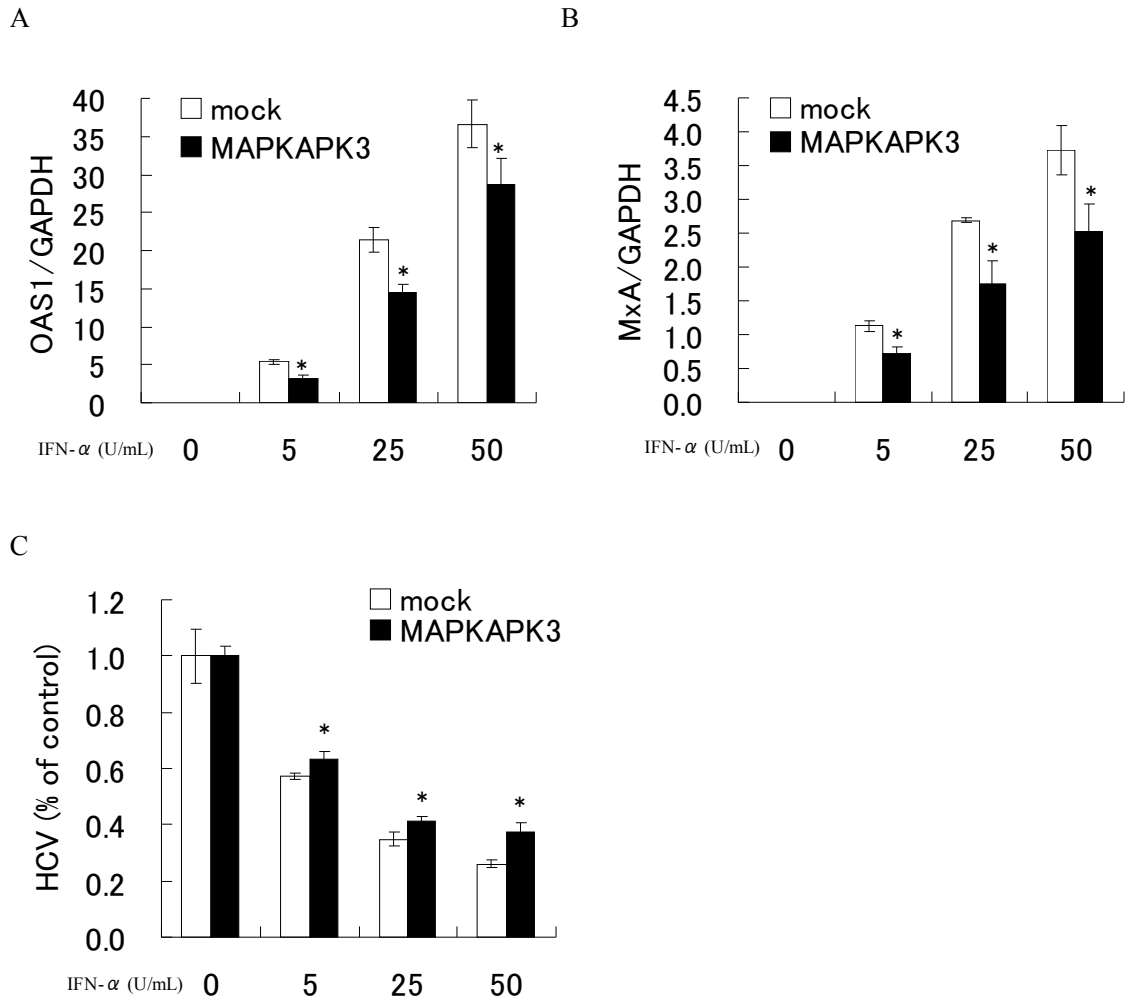


図 3.11 I 型 IFN の抗 HCV 作用に対する MAPKAPK3 の抑制作用の解析

HCV RNA が自律複製する HCV replicon 細胞に GFP 発現ベクターを導入し、同時に MAPKAPK3 発現ベクター (pEF-DEST51/MAPKAPK3) または mock ベクター (pEF-DEST51/mock) を導入した。導入 24 時間後に GFP 陽性細胞を FACS Vantage フローサイトメトリにより分離した後に、I 型 IFN (IFN- $\alpha$ ) 刺激 24 時間後の OAS1 遺伝子 (A)、MxA 遺伝子 (B)、および HCV RNA (C) の発現をリアルタイム定量 PCR 法にて解析した。各遺伝子発現量は、内部標準遺伝子 GAPDH により補正した。図 C の縦軸は IFN- $\alpha$  未刺激時の HCV RNA 量を基準として、各 IFN- $\alpha$  濃度での HCV RNA 量の比 (% of control) を示す。実験は 3 回繰り返し行い、代表データを示す。各群 3 サンプルずつ解析して (triplicate)、データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示す。\*は各 IFN- $\alpha$  濃度でのベクターコントロールと比較した P 値が 0.05 未満であることを示す (Student's t-test)。

### 3.4 考察

本章では、慢性 C 型肝炎患者の IFN 治療効果に対する MAPKAPK3 遺伝的多型の機能的意義を検討した。その結果、tag SNP rs3792323 の IFN 抵抗性対立遺伝子 T において MAPKAPK3 転写活性が高いこと (図 3.7)、MAPKAPK3 高発現により I 型 IFN シグナル伝達が抑制され (図 3.9)、I 型 IFN の抗 HCV 作用が減弱されることを明らかにした (図 3.11)。

ASTQ 法の結果、MAPKAPK3 遺伝的多型による転写活性への影響は、末梢血単核球では認められず、肝生検試料において認められた。その原因として、肝臓特異的発現に関与する転写制御配列に遺伝的多型が存在することで、肝臓特異的に MAPKAPK3 転写活性が変化する可能性が考えられた。そこで、MAPKAPK3 プロモーターの転写制御配列を TFSEARCH (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) により検索した結果、転写予想開始点の-821bp (GenBank Accession NT\_022517.17, contig position 50593783) に肝臓特異的発現に関与する転写因子 liver-enriched transcriptional activator protein (LAP) (62,63) の結合配列の存在が予測された。肝臓は HCV が慢性感染する臓器であるため興味深い知見と考えられたが、現時点では Hapmap data base および代表的な SNP data base である NCBI の Entrez SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>) には LAP 結合配列上に SNP は登録されていない。今後、LAP 結合配列も含め MAPKAPK3 プロモーターの遺伝的多型を解析して、MAPKAPK3 転写活性の違いの原因となる真の機能的な多型を同定することは重要な課題である。また、イントロンや 3' UTR の遺伝的多型により mRNA 安定性や転写活性が変化することも報告されているため、真の機能的な多型の同定にはさらに広範囲な解析の必要性も考えられる。

Luciferase reporter assay の結果、MAPKAPK3 は I 型 IFN の抗ウイルス作用に重要な ISRE および GAS 配列からの転写誘導を抑制することが示された (図 3.9)。I 型 IFN の抗ウイルス作用における MAPKAPK3 の機能はこれまで不明であったため、興味深い知見と考えられる。MAPKAPK3 のホモログである MAPKAPK2 は、IFN- $\alpha$  シグナル伝達の活性化に関与することが報告され (20)、MAPKAPK3 と MAPKAPK2 は相反する機能を担うと考えられる。MAPKAPK2 を高発現させた luciferase reporter assay の予備検討では、IFN- $\alpha$  シグナル抑制作用は認められないため (data not shown)、IFN- $\alpha$  シグナル抑制作用には MAPKAPK3 特異的な下流分子が重要と考えられる。これまでに、IFN- $\alpha$  刺激で活性化される MAPKAPK3 特異的な下流分子は不明であり、今後の解析が望まれる。

p38 MAP キナーゼ経路は、ISRE および GAS 配列に結合する転写因子 ISGF3 および GAF の形成・核移行には関与せず (14,16,20)、核移行後の転写活性を制御する可能性が高いと考えられている (14)。核移行後の ISGF3 および GAF の転写活性化には転写共役因子との相互作用が重要であり、相互作用する転写共役因子として E1A-binding protein (64)、cyclic AMP responsive element binding protein (CREB)-binding protein (65) および general control nondepressible 5 (66) など報告されている。p38 MAP キナーゼ経路の下流分子である MAPKAPK3 が、これら相互作用の制御に関与する可能性も含めて、今後のさらなる解析

が必要である。

HCV RNAが自律複製するHCV replicon細胞にMAPKAPK3を高発現させた結果、I型IFNの抗ウイルス作用に重要なOAS1遺伝子およびMxA遺伝子の転写誘導が抑制され(図3.11-A, B)、IFN- $\alpha$ による抗HCV作用が減弱された(図3.11-C)。OAS1遺伝子およびMxA遺伝子はウイルス感染細胞内での直接的な抗ウイルス作用の惹起に重要であり、これら遺伝子の発現が抑制された結果、IFN- $\alpha$ の抗ウイルス作用が減弱されたと考えられる。tag SNP rs3792323のIFN抵抗性対立遺伝子Tの場合、肝臓でのMAPKAPK3転写活性が高いことが示されたため(図3.7)、慢性C型肝炎患者では肝臓でのMAPKAPK3高発現が原因となって、IFN- $\alpha$ の抗HCV作用が減弱され、十分な治療効果が得られないことが示唆された。今後、MAPKAPK3発現量の違いがIFN治療効果に寄与する程度を明らかにするためには、多数の患者肝生検試料を用いたMAPKAPK3発現量と治療効果との相関解析が重要と考えられる。また、HCV感染のin vivo病態モデルとして、ヒト肝細胞をもつキメラマウスも開発されているため、このin vivoモデルを用いてIFN- $\alpha$ の抗HCV作用に対するMAPKAPK3高発現または発現抑制の影響を評価することも重要と考えられる。

以上より、新規のIFN感受性関連遺伝子であるMAPKAPK3の遺伝的多型は、肝臓における発現量の違いを介して治療効果の個人差に関与することが示唆された。本研究の成果は、臨床上の課題であるIFN治療効果の個人差の一つの原因を示唆する重要な発見と考えられた。今後さらにMAPKAPK3作用機序の詳細な解析が必要であり、その作用機序の解明により新しい治療方法や治療薬の開発につながる有用な知見が得られることも期待される。

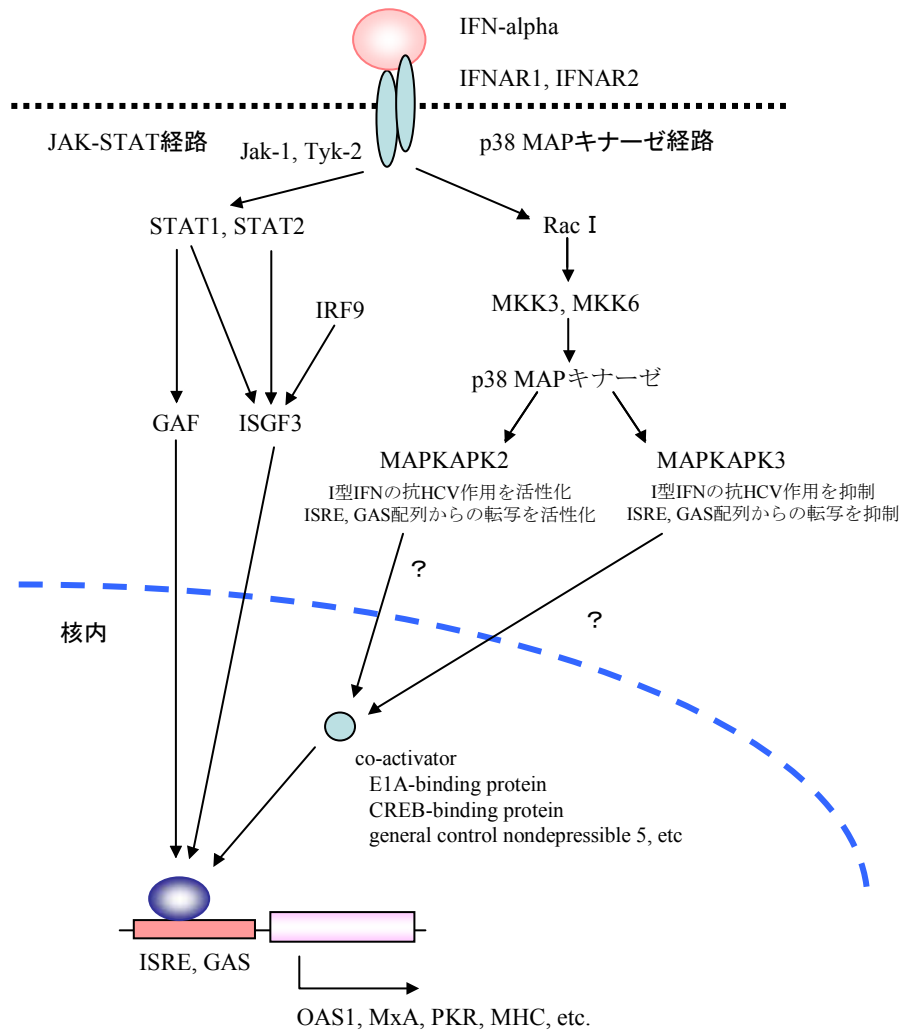


図 3.12 I 型 IFN の抗ウイルス作用に対する MAPKAPK3 作用機序の一つの仮説

#### 4. 結論

本研究により、以下を明らかにした。

1. MAPKAPK3 遺伝子領域の tag SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A)が HCV 遺伝子型 1b 感染患者における慢性 C 型肝炎の IFN 治療効果と関連する。
2. tag SNP rs3792323 (A>T) および rs616589 (G>A)の低頻度対立遺伝子 T および A が優性の IFN 抵抗性対立遺伝子である。
3. 多変量 Logistic 回帰分析の結果、tag SNP rs3792323 および rs616589 と IFN 治療効果との関連は tag SNP rs3792323 に代表される。
4. tag SNP rs3792323 (A>T)の IFN 抵抗性対立遺伝子 T をもつ場合、非著効となる可能性が 3.4 倍高い。
5. tag SNP rs3792323 と  $r^2>0.8$  の強い連鎖不平衡を示す MAPKAPK3 遺伝子領域のその他の SNP も同様に、HCV 遺伝子型 1b 感染患者の IFN 治療効果と有意に関連する。
6. MAPKAPK3 遺伝子の全てのコーディング領域には、アミノ酸置換または欠失を伴う遺伝的多型は認められない。
7. MAPKAPK3 mRNA は広範囲の組織に発現して、HCV が慢性感染する肝臓では中程度の発現が認められる。
8. ヒト肝癌由来株 Huh7 細胞およびヒト急性 T 細胞白血病由来株 Jurkat 細胞では、MAPKAPK3 mRNA の発現は恒常的であり、IFN- $\alpha$  刺激による発現変動は認められない。
9. tag SNP rs3792323 (A>T)の IFN 抵抗性対立遺伝子 T において、肝臓での MAPKAPK3 転写活性が高い。
10. MAPKAPK3 高発現により IFN- $\alpha$  シグナル伝達が抑制され、IFN- $\alpha$  の抗 HCV 作用が減弱される。
11. 慢性 C 型肝炎患者に対する IFN 治療効果の個人差の原因として、肝臓における MAPKAPK3 発現量の違いが関与することが示唆された。

本研究の成果は、臨床上の課題である IFN 治療効果の個人差の一つの原因を示唆する重要な発見と考えられる。IFN 治療効果の個人差の原因の解明は、ウイルス側因子や薬剤因子に加え、患者側因子も進みつつある。今後、患者個人に最適な治療を選択する個別化医療が可能になるものと期待される。

## 謝辞

本研究の発表の機会を与えていただきました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座・竹家達夫教授に深く感謝いたします。また、バイオサイエンス研究科修士課程におきまして、これまでの研究生活の土台となる基礎を教えていただきました北海道大学大学院医学研究科免疫学分野・瀬谷司教授に心から感謝いたします。

本論文を審査して下さいました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科動物遺伝子機能学講座・川市正史教授、教育連携講座大阪府成人病センター疾患分子遺伝学・加藤菊也教授、動物遺伝子機能学講座・石田靖雅准教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終止適切な御指導、御助言を賜りました広島大学大学院歯歯学総合研究科分子病態制御内科学・茶山一彰教授、越智秀典講師に深く感謝いたします。終止適切な御指導、御助言を賜りました東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・中村祐輔教授、虎ノ門病院・熊田博光分院長、理化学研究所ゲノム医科学研究センター統計解析研究チーム・鎌谷直之チームリーダーに深く感謝いたします。また、本研究への参加に同意いただきました患者の皆様およびご家族の皆様、本研究にご協力いただきました広島大学大学病院、広島大学関連病院および虎ノ門病院の皆様には、研究および様々な面でお世話になり心から感謝いたします。

研究の楽しさ、厳しさを教えて頂きました三重大学生物資源学部分子遺伝育種学教室・掛田克行准教授、大阪府成人病センター免疫学部門の皆様には深く感謝いたします。最後に、研究センターの生活を支えてくれた妻に心から感謝します。

2010年3月

## 参考文献

1. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. (2000) Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* **132**, 296-305.
2. Ohno O, Mizokami M, Wu RR, Saleh MG, Ohba K, Orito E, et al. (1997) New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J Clin Microbiol.* **35**, 201-207.
3. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **347**, 975-982.
4. Management of hepatitis C. (1997) *NIH Consensus Statement* **15**, 1-41.
5. Hoofnagle JH. (1994) Therapy of acute and chronic viral hepatitis. *Adv Intern Med.* **39**, 241-275.
6. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, et al. (1995) Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **22**, 1050-1056.
7. Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, Lipka GM, Purdie DM, Clouston AD, et al. (2006) Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut* **55**, 529-535.
8. Gao B, Hong F, Radaeva S. (2004) Host factors and failure of interferon-alpha treatment in hepatitis C virus. *Hepatology* **39**, 880-890.
9. Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, et al. (2007) A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 985-990.
10. Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. (2001) Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology* **33**, 708-712.
11. Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, et al. (2004) Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat.* **11**, 271-276.
12. Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. (2002) Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol.* **36**, 271-277.
13. Uddin S, Plataniias LC. (2004) Mechanisms of type-I interferon signal transduction. *J*



- Biochem Mol Biol.* **37**, 635-641.
14. Plataniias LC. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* **5**, 375-386.
  15. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* **67**, 227-264.
  16. Uddin S, Lekmine F, Sharma N, Majchrzak B, Mayer I, Young PR, et al. (2000) The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem.* **275**, 27634-27640.
  17. Li Y, Batra S, Sassano A, Majchrzak B, Levy DE, Gaestel M, et al. (2005) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) 3 and MKK6 by type I interferons. *J Biol Chem.* **280**:10001-10010.
  18. Uddin S, Majchrzak B, Woodson J, Arunkumar P, Alsayed Y, Pine R, et al. (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem.* **274**, 30127-30131.
  19. Mayer IA, Verma A, Grumbach IM, Uddin S, Lekmine F, Ravandi F, et al. (2001) The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem.* **276**, 28570-28577.
  20. Li Y, Sassano A, Majchrzak B, Deb DK, Levy DE, Gaestel M, et al. (2004) Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling. *J Biol Chem.* **279**, 970-979.
  21. Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, et al. (2004) Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* **321**, 722-727.
  22. Matsuyama N, Mishiro S, Sugimoto M, Furuichi Y, Hashimoto M, Hijikata M, et al. (2003) The dinucleotide microsatellite polymorphism of the IFNAR1 gene promoter correlates with responsiveness of hepatitis C patients to interferon. *Hepatol Res.* **25**, 221-225.
  23. Kruglyak L, Nickerson DA. (2001) Variation is the spice of life. *Nat Genet.* **27**, 234-236.
  24. Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. (2003) Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet.* **33**, 457-458.
  25. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* **296**, 2225-2229.
  26. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. (2001) High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet.* **29**, 229-232.
  27. Patil N, Berno AJ, Hinds DA, Barrett WA, Doshi JM, Hacker CR, et al. (2001) Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science.* **294**, 1719-1723.

28. Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF. (2004) Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* **4**, 850-860.
29. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, et al. (2001) Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet.* **29**, 233-237.
30. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. (2003) The International HapMap Project. *Nature* **426**, 789-796.
31. International HapMap Consortium. (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature.* **437**, 1299-1320.
32. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 9362-9367.
33. Pennisi E. Breakthrough of the year. (2007) Human genetic variation. *Science.* **318**, 1842-1843.
34. Risch NJ. (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* **405**, 847-856.
35. Botstein D, Risch N. (2003) Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* **33** Suppl, 228-237.
36. Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, Imazeki F, Hashimoto E, Hayashi N, et al. (1997) Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. *Gastroenterology* **113**, 558-566.
37. Naito M, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Nagano M, Ito N, et al. (2005) SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* **40**, 381-388.
38. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. (1994) Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* **19**, 1513-1520.
39. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. (2002) Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet.* **32**, 650-654.
40. Devlin B, Risch N. (1995) A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* **29**, 311-322.
41. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* **21**, 263-265.
42. Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y. (2001) A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet.* **46**, 471-477.

43. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* **34**, 395-402.
44. Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. (1998) Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am J Hum Genet.* **63**, 1531-1540.
45. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445**, 881-885.
46. Freedman ML, Reich D, Penney KL, McDonald GJ, Mignault AA, Patterson N, et al. (2004) Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet.* **36**, 388-393.
47. Sithanandam G, Latif F, Duh FM, Bernal R, Smola U, Li H, Kuzmin I, et al. (1996) 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region. *Mol Cell Biol.* **16**, 868-876.
48. Ludwig S, Engel K, Hoffmeyer A, Sithanandam G, Neufeld B, Palm D, et al. (1996) 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol.* **16**, 6687-6697.
49. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* **110**, 357-368.
50. Maizels ET, Mukherjee A, Sithanandam G, Peters CA, Cottom J, Mayo KE, et al. (2001) Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol.* **15**, 716-733.
51. Neufeld B, Grosse-Wilde A, Hoffmeyer A, Jordan BW, Chen P, Dinev D, et al. (2000) Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J Biol Chem.* **275**, 20239-202342.
52. Naito M, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Nagano M, Ito N, et al. (2005) SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* **40**, 381-388.
53. Feld JJ, Hoofnagle JH. (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**, 967-972.
54. Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z. (2002) Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* **35**, 1002-1009.
55. Hoofnagle JH, Lau D, Conjeevaram H, Kleiner D, Di Bisceglie AM. (1996) Prolonged therapy of chronic hepatitis C with ribavirin. *J Viral Hepat.* **3**, 247-252.

56. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399-401.
57. Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kondo K, Kitamura Y, et al. (2001) Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion-transporting polypeptides, and three NADH:ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J Hum Genet.* **46**, 668-683.
58. Guo JT, Bichko VV, Seeger C. (2001) Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol.* **75**, 8516-8523.
59. Osawa N, Koya D, Araki S, Uzu T, Tsunoda T, Kashiwagi A, et al. (2007) Combinational effect of genes for the renin-angiotensin system in conferring susceptibility to diabetic nephropathy. *J Hum Genet.* **52**, 143-151.
60. Kamiyama M, Kobayashi M, Araki SI, Iida A, Tsunoda T, Kawai K, et al. (2007) Polymorphisms in the 3' UTR in the neurocalcin delta gene affect mRNA stability, and confer susceptibility to diabetic nephropathy. *Hum Genet.* **122**, 397-407.
61. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
62. Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev.* **4**, 1541-1551.
63. Buck M, Turler H, Chojkier M. (1994) LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *EMBO J.* **13**, 851-860.
64. Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, et al. (1996) Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature.* **383**, 344-347.
65. Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE Jr. (1996) Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 15092-15096.
66. Paulson M, Press C, Smith E, Tanese N, Levy DE. (2002) IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. *Nat Cell Biol.* **4**, 140-147.