

患者DNAを hybridization させ、polymerase 反応で、蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer : FRET) に基づきアレル特異的 MGB probe の蛍光を検出する。

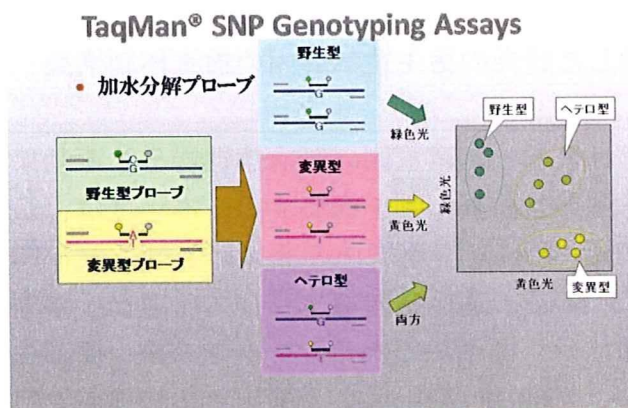


図 1 . TaqMan Genotyping 原理

C. 研究結果

シーケンス解析により DNA 配列の分かっている DNA を用いて、TaqMan® SNP Genotyping Assays を用いた rs8099917 の SNP s の判定結果は、図 2 に示すように、明確にメジャーホモ接合体 (TT)、ヘテロ接合体 (TG)、マイナーホモ接合体 (GG) 遺伝子を検出可能であった。次に、C 型肝炎患者 43 検体による rs8099917 の SNP s のシーケンス解析結果は、メジャータイプ (TT) が 24 検体 (55.8%)、ヘテロタイプ (TG) が 18 検体 (41.9%)、マイナータイプ (GG) が 1 例 (2.3%) であった。同時に測定した TaqMan® SNP Genotyping Assays を用いた rs8099917 の SNP s の判定結果も、シーケンス結果と完全に一致した。

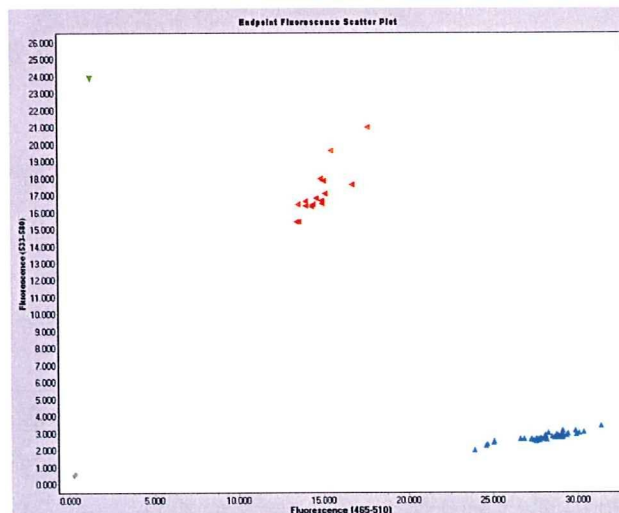


図 2 . TaqMan Genotyping 測定結果

D. 考察

TaqMan® SNP Genotyping Assays を用いた rs8099917 の SNP s の判定結果は良好で、シーケンスに比べ、特異性は同等と考えられた。さらに、操作も格段に簡便で DNA 抽出後、DNA 濃度調整の必要もなく、PCR 中に 7900HP により自動で蛍光測定を行う。DNA 抽出で 2 時間、7900HP 測定と判定が約 2 時間の合計 4 時間で、結果が出せるため、通常のシーケンスでの PCR、PCR 精製、BigDyeterminator 反応、Dye 除去、3130XL での電気泳動、シーケンス解析といった煩雑な工程が全くいらないので工数の大幅な削減と、人為的ミス、コンタミネーションの防止に貢献すると考えられる。また、1 検査あたりのコストも DNA 抽出が約 2000 円、TaqMan® SNP Genotyping Assays (40 × probe, primer mix 6000assay/180000 円、2 × TaqMan Genotyping Master Mix 20000assay10 μL 系/970000 円) が 78.5 円と非常に安いと考えられた。

E. 結論

TaqMan® SNP Genotyping Assays は、シーケン

ス法に比べ非常に安価であり、検査センターなど民間期間でも容易に測定可能な多検体処理（96または384検体を1回に測定）でき、解析とレポートの自動化により簡便で工数（人件費）削減につながり、実用的で、有望な測定系であることが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al.
Interferon λ s and the single nucleotide polymorphisms: A mile stone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res*, in press.
2. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M.
Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res*. 2010. 40(1):14-30.
3. Mukaide M, Tanaka Y, Shin-I T, et al.
Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010. 54(2):882-9.
4. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al.
Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009. 41(10):1105-9.
5. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al.
A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese

patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*.

2009. 83(20):10538-47.

6. 田中靖人, 徳永勝士, 溝上雅史.

IL28B: C型肝炎治療効果を規定する遺伝子多型C型肝炎に対するテーラーメイド治療の確立を目指したゲノムワイド関連解析肝胆膵 2009. 59 (6): 1187-1193.

2. 学会発表

1. ゲノムワイド関連分析による肝炎の宿主遺伝要因の探索. 田中靖人、徳永勝士、溝上雅史. 第13回日本肝臓学会大会（シンポジウム7）
2. B型肝炎に対する Adefovir、Entecavir の治療成績と多剤耐性変異株に対する Tenofovir の有効性. 菅内文中、田中靖人、溝上雅史. 第13回日本肝臓学会大会（シンポジウム10）
3. Identification of genetic variants in the *HLA-DP* locus associated with chronic hepatitis B in a genome-wide association study. Kentato Matsuura, Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Shuhei Hige, Yasuhiro Asahina, Kiyooki Ito, Fuminaka Sugauchi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston 2009.
- 4.

G. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

テーラーメイド治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

分担研究者：黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 副部長

分担研究課題：C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN・RBV 併用療法における治療効果規定
因子のデータマイニング解析

研究要旨：GWASによりPeg-IFN・RBV併用療法の治療効果規定因子として同定されたIL28Bを組み込み、C型慢性肝炎に対するPeg-IFN・RBV併用療法の治療効果予測因子についてデータマイニング解析を行った。その結果、IL28B遺伝子多型が最も重要なウイルス非陰性化予測因子であり、さらにHCVRNA量、血小板数、ISDR変異を組み合わせることにより、ウイルス非陰性化率が82%の治療抵抗性症例と5%の治療感受性症例を同定できた（Kurosaki et al. in submission）。GWAS解析結果を臨床に応用し、個別化治療を実践する上で有用なアルゴリズムが構築できた。

A. 研究目的

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法によりウイルス完全排除が達成される症例は約 50%であり、治療抵抗性の機序解明は臨床的に重要な課題である。治療抵抗性にはウイルス因子と生体因子の両者が関与する。本研究班の共同研究により、インターフェロン治療効果を規定する宿主要因が IL28B の SNP であることが解明された。本研究では、宿主、ウイルス因子をデータマイニング手法を用いて統合的に解析することにより、これらの基礎的研究成果を一般臨床に応用する上での、理解しやすいアルゴリズムを構築することを目的とした。

B. 研究方法

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行した症例 500 例を集積し、ウイルス遺伝子変異（ISDR 変異数、Core アミノ酸変異）、ウイルス量、IL28B 遺伝子 SNP を含む、種々の要因を投入して、治療効果と関連する因子を決定木手法で解析した。

C. 研究結果

- 治療中に HCVRNA が陰性化しない NVR は、解析集団全体では 30%であった。IL28B、Core70 アミノ酸変異は単変量では両者とも NVR と有意に関連したが、多変量解析では Core70 は有意因子ではなかった。その原因は、両者間の密接な相関関係であることが判明した。NVR 予測因子を同定するためのデータマイニング解析では IL28B が最も効率的な予測因子として同定された。IL28B が minor であれば NVR は 74%、major であれば 13%であった。IL28B が Minor のなかでも血小板数 14 万未満では、82%が NVR であった。一方、IL28B が Major のなかでは、HCVRNA が 600KIU/ml 未満であれば NVR の確率はわずか 5%であり、HCVRNA が 600KIU/ml 以上であっても、血小板数が 12 万以上であれば NVR は 10%と低率であった。
- SVR は全体の 40%であった。ISDR と IL28B は SVR と関連する独立因子であった。予測因子を同定するためのデータマイニング解析では、やはり IL28B が最も効率的に SVR を同定する因子であっ

た。IL28B が Minor であれば SVR の確率はわずかに 16%であったのに対し、Major では 51%であった。Major であれば、87%は治療中に HCVRNA が陰性化するが、そのなかでも、HCVRNA が 600KIU/ml 未満 (SVR73%)、HCVRNA が 600KIU/ml 以上でも ISDR が変異型 (SVR67%)、HCVRNA が 600KIU/ml 以上で ISDR が野生型でも血小板数が 12 万以上 (SVR54%) では SVR 率が高かった。逆に、HCVRNA が 600KIU/ml 以上、ISDR が野生型で血小板数が 12 万未満の症例は IL28Bmajor であっても SVR は 23%と低かった。

D. 考察

データマイニング解析により、ペグインターフェロン・リバビリン療法の治療前効果判別アルゴリズムを構築した結果、IL28B が最も重要な治療抵抗性因子であった。このデータマイニング解析結果に基づき、現状の標準治療では効果が見込めない症例を見分けることが可能であり、また NVR にはならないものの SVR を達成するためには十分な薬剤投与量を確保、あるいは治療期間を延長すべき症例を同定することが可能であり、患者状態に応じた個別化治療の判断基準になるアルゴリズムが作成できた。

E. 結論

データマイニング解析により、ペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果を規定する因子を統合的に解析し、GWAS 解析により見出された知見を、臨床応用するためのアルゴリズムを構築できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M.,

Kurosaki M., Matsuura K., Sakamoto N., et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet. 2009;41(10):1105-9.

(2)Itakura J., Kurosaki M., Itakura Y., Maekawa S., Asahina Y., Izumi N., et al. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Biosystems. 2009;12:12.

(3)Kurosaki M., Matsunaga K., Hirayama I., Tanaka T., Sato M., Yasui Y., et al. A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. Hepatol Res. 2010; in press.

2. 学会発表

(1) データマイニング解析に基づく C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果予測と治療戦略 黒崎雅之、岩崎学、平松直樹、鈴木義之、坂本直哉、坂本穰、菅内文中、泉並木 第 45 回日本肝臓学会総会 (2009 年 6 月)

(2) Impact of Mutations in ISDR and Core Region of HCV on Pretreatment Prediction of Sustained Virological Response to Pegylated-interferon Plus Ribavirin Therapy: Classification and Regression Tree Analysis. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Namiki Izumi. 16th International Symposium on HCV and related viruses (2009 年 10 月)

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

テーラーメイド治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

分担研究者：本多政夫 金沢大学医学部先端医療技術学 教授

分担研究課題：肝炎の進展、治療反応性に寄与する宿主遺伝子発現データベースの構築

研究要旨：肝炎の進展や IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性に加え、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いも明らかにされることが期待される。一方で、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが必要であり、病態の解明と治療への応用という観点からも重要である。本年度は、PegIFN+Rib 併用療法を受けた C 型慢性肝炎症例の治療前の肝組織遺伝子発現と IL28B 遺伝子多型との関連性を検討し、両者の関連性を明らかにした。遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析を組み合わせることにより、病態の解明と新しい治療法開発が可能になると考えられた。

A. 研究目的

肝炎の進展や IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性の違いや、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いが明らかにされることが期待される。一方で、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。

B. 研究方法

PegIFN+Rib 併用療法を施行した C 型慢性肝炎症

例につき、治療前の肝組織及び末梢血単核球（PBMC）の遺伝子発現プロファイリングを解析した。さらに治療前と治療中の肝生検組織から遺伝子発現プロファイリングを行い、IFN 治療に伴う遺伝子発現の変化と治療反応性についても検討を加えた。

C. 結果

PegIFN+Rib 併用療法を施行した症例の治療前の肝生検組織では興味深いことに Interferon stimulated gene (ISG) を高発現している群と低発現している 2 群に群別されることが明らかとなった。すなわち C 型肝炎ウイルス感染に伴う生体の反応が宿主によって異なっている可能性が示唆された。ISG を高発現している群では IFN 療法の反応が不良であり、ISG 低発現群では IFN 療法

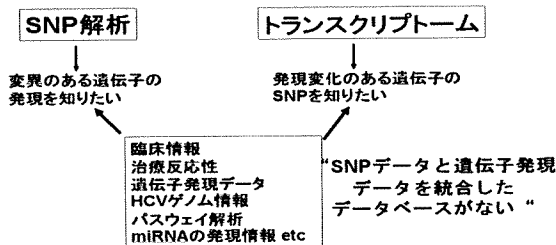
の反応が良好である傾向が認められた。

IL28B 遺伝子多型と肝組織遺伝子発現の関連性を解析すると、肝組織における ISG と発現と IL28B 遺伝子多型の関連性が見出された。

D. 考察

遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析を組み合わせるにより、病態の解明と新しい治療法開発が可能になると考えられた。現在、SNP データと遺伝子発現データを統合したデータベースはなく、これらのデータベースの構築により宿主因子の解明が望まれる。

SNPデータと遺伝子発現データの統合



E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma.

Hodo Y, Hashimoto SI, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Genomics. 2010 Jan 21. [Epub ahead of print]

2) dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma.

Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S.

Liver Int. 2009 Nov 30. [Epub ahead of print]

3) CD14+monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes.

Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S.

Diabetes. 2009 Dec 3. [Epub ahead of print]
4) Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma.

Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S.

Hepatology. 2009 Apr;49(4):1098-112.

5) EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features.

Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW.

Gastroenterology. 2009 Mar;136(3):1012-24. Epub 2008 Dec 6.

6) Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.

Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S.

J Hepatol. 2009 Jan;50(1):100-10. Epub 2008 Oct 12.

7) Ootsuji H, Honda H, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M.

Altered Hepatic Gene Expression Profiles Associated with Myocardial Ischemia.

Circulation: Cardiovascular Genetics 2010 Feb 1;3(1):68-77. Epub 2009 Dec 1

8) La protein required for IRES-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication

Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S.

Journal of Infectious Diseases 2010 in press

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

テーラーメイド治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

研究分担者：長尾由実子 久留米大学医学部消化器疾患情報講座 准教授

研究協力者：佐田通夫 同大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授

分担研究課題：口腔扁平上皮癌における重複癌の検討-HCV 感染とインスリン抵抗性

研究要旨：頭頸部扁平上皮癌（SCC）は、全身の癌を母集団とした場合に比して、有意に多重複癌の発症率が高い。一方、頭頸部 SCC は、C 型肝炎ウイルス（HCV）が引き起こす肝外病変の一つである。そこで、口腔 SCC 患者について HCV 感染者と非感染者における重複癌並びにインスリン抵抗性について検討した。対象は、1992 年～1994 年に口腔 SCC を発症し、初めて久留米大学病院を受診し入院加療した患者 60 例。観察期間は、久留米大学初診から最終再来日まで（2008 年 10 月 17 日直近日）。レトロスペクティブにカルテを調査すると共に、全診療科から提出された病理組織学的診断を確認した。口腔 SCC 患者 60 例において、多重複癌発生率は 35%、HCV 抗体陽性率は 26.7% であった。HCV 抗体陽性者における多重複癌発生率（62.5%）は、HCV 抗体陰性者（25%）よりも有意に高率であった。HCV 抗体陽性者における多重複癌として最も認められた臓器は肝臓（肝細胞癌）であり、HCV 抗体陰性者では胃（腺癌）であった。多変量解析により重複癌発生に関わる因子は、Stage IV、HCV 抗体陽性、70 歳以上の年齢層であった。さらに、インスリン抵抗性が、HCV 感染者における重複癌に関与している可能性が推察された。HCV 感染のある口腔 SCC 患者では、とくに多重複癌について注意深く経過観察する必要がある（Nagao Y, Sata M. Med Sci Monit 2009; 15: 453-459）。

A. 研究目的

頭頸部扁平上皮癌（SCC）は、全身の癌を母集団とした場合に比して、有意に多重複癌の発症率が高いことが知られている。一方、C 型肝炎ウイルス（HCV）は、種々の病態を引き起こすウイルスであり、扁平苔癬や口腔 SCC もその一つである。

口腔 SCC 患者は、他の消化器癌の中で HCV 感染率が高い（Nagao Y, Sata M et al: J Oral Pathol Med 1995）（Nagao Y, Sata M et al: Hepatol Res 1997）。また、久留米大学病院で入院加療した 1974 年～1995 年までの口腔 SCC 患者 327 例における

多重複癌例は 57 例（17.4%）であり、重複癌患者の HCV 感染率は、口腔単発癌と比べ高い（Nagao Y, Sata M et al: Hepatol Res 1997）。

本調査では、1992 年～1994 年に口腔 SCC を発症し、初めて久留米大学病院を受診し入院加療した患者 60 例について、HCV 感染者と非感染者における重複癌ならびにインスリン抵抗性について検討した。

B. 研究方法

全対象患者は、初診時もしくは入院時に上部消

化管検査、腹部エコー検査、生化学検査、肝炎ウイルスマーカーが検査された。

重複癌発生の観察期間は、久留米大学初診から最終再来日まで（2008年10月17日直近日）とした。レトロスペクティブにカルテを調査すると共に、全診療科から提出された病理組織学的診断を確認した。

重複癌の定義は、(i) 個々の腫瘍は、明らかに悪性像を呈する、(ii) 個々の腫瘍は、別個に存在する、(iii) 一方の腫瘍は、他方からの転移ではないとした。第1癌と第2癌の診断間隔が6ヶ月未満を同時性、6ヶ月以上を異時性とした。口腔内に複数の腫瘍が多発した場合は、同じ組織型は口腔多発癌、異なる組織型は重複癌とし、今回の検討では口腔多発癌は除外した。

(倫理面への配慮)

本調査は、久留米大学病院を受診した患者が、治療の一環として受けたカルテを基に調査を行ったものであり、本研究のために新たに検査を実施したものではない。

C. 研究結果

口腔 SCC 患者 60 例において、多重重複癌の発生率は 35% (21/60)、HCV 抗体陽性率は 26.7% (16/60) であった。

HCV 抗体陽性者における多重重複癌発生率 (62.5%) は、HCV 抗体陰性者よりも有意に高率であった (表 1)。HCV 抗体陽性者における多重重複癌として最も多く認められた臓器は肝臓であり、HCV 抗体陰性者では胃であった。

表 1

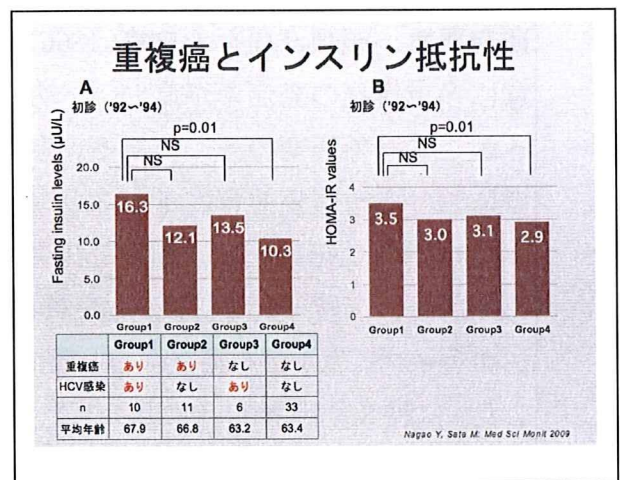
HCV感染有無による重複癌の発生			
	HCV抗体陰性 n=44 (%)	HCV抗体陽性 n=16 (%)	P value
年齢	64.3±14.5	66.1±11.0	NS
男性・女性	30・14	9・7	NS
発生数	11 (25.0)	10 (62.5)	P<0.01
重複癌 発生臓器	胃 6	肝臓 5	
	食道 2	大腸 2	
	皮膚 2	肺 1	
	甲状腺 1	甲状腺 1	
	咽頭 1	骨髄 1	
	腎臓 1	(AML)	
	肝臓 1		
発生時期	同時性6・異時性6※	同時性5・異時性5	

※ 胃内一食道一皮膚の同時性発生例、異時性以下重複癌発生例あり

重複癌 21 例と口腔単発癌 39 例における有意な因子は、肝疾患の既往歴、輸血歴、HCV 抗体陽性率であった。多変量解析により重複癌発生に関わる因子は、StageIV、HCV 抗体陽性、70 歳以上の年齢層であった

HCV 感染のある重複癌患者は、HCV 感染も重複癌も認めない SCC 患者よりも、初診時のインスリン値が有意に高かった (図 1)。

図 1



D. 考察

わが国で 1997 年～2001 年までに全国で病理解剖された症例総数は 134,997 例であり、このうち舌癌剖検症例は 321 例である。321 例中、多重重複癌発生率は 35.2% (113/321) で、発生臓器は、肺、肝臓、食道、甲状腺等と報告されている。国内における舌癌剖検症例の重複臓器の第 2 位は肝臓であることから、HCV と口腔 SCC は強い関連があることが推測された。

E. 結論

HCV 感染のある口腔 SCC 患者は、HCV 感染のない患者に比べ、高率に多重重複癌を発生した (62.5%、P<0.01)。HCV 抗体陽性者における多重重複癌として最も多く認められた臓器は肝臓であった。口腔 SCC 患者は、HCV 感染の有無だけで

なく多重複癌についてもスクリーニングする必要がある。HCV感染者においても肝疾患以外の疾患について診査すべきである。

F. 研究発表

論文発表

1. Nagao Y, Matsuoka H, Kawaguchi T, Sata M. Aminofeel® improves the sensitivity to taste in patients with HCV-infected liver disease. Med Sci Monit 2010 in press.
2. Nagao Y, Matsuoka H, Seike M, Yamasaki K, Kato J, Nakajima T, Miyazaki Y, Ohno T, Inuzuka S, Ohira H, Yokosuka O, Yatsuhashi H, Mori T, Honda K, Kawaguchi T, Ide T, Sata M. Knowledge about *Vibrio vulnificus* infection in Japanese patients with liver diseases: A prospective multicenter study. Med Sci Monit 2009; 15: 115-120.
3. Nagao Y, Sata M. High incidence of multiple primary carcinomas in HCV-infected patients with oral squamous cell carcinoma. Med Sci Monit 2009; 15: 453-459.
4. 佐田通夫, 長尾由実子, 大坪維範, 岡村 孝. C型肝炎. HCV感染とB cell clonality, 口腔癌、インスリン抵抗性についての検討. 犬山シンポジウム記録刊行会 2010; 27: 137-142.
5. 長尾由実子, 佐田 通夫. C型肝炎でみられる肝外病変にはどのようなものがあるのか? 現場の疑問に答える 肝臓病診療 Q&A 中外医学社 東京 113-116頁.
6. 長尾由実子, 佐田通夫. C型肝炎ウイルス感染者における医療連携の在り方. 医療情報誌 シュネラー 2009; 71: 22-27.
7. 長尾由実子. 進歩する肝疾患診療と病診連携 「インターフェロン治療の理解・認知不足の背

景を探る～患者・医師対象アンケート調査からの考察～」 Medical Tribune 2009: 144.

8. 長尾由実子, 今福信一, 佐田通夫. ご存じですか? ビブリオ・バルニフィカス感染症 中外製薬株式会社 2009: 1-4.

学会発表

1. 長尾由実子, 佐田通夫. HCV あるいは HBV 感染者における歯科治療時の自己申告調査. 第 83 回日本感染症学会総会・学術講演会 2009. 4. 23-24 東京
2. 長尾由実子, 佐田通夫. 歯科医療従事者における B 型並びに C 型肝炎ウイルス感染調査. 第 83 回日本感染症学会総会・学術講演会 2009. 4. 23-24 東京
3. 長尾由実子, 佐田通夫. 分岐鎖アミノ酸 (BCAA)・亜鉛含有食品が味覚感度に及ぼす影響. 日本咀嚼学会学術大会第 20 回記念大会 2009. 10. 3-4 福岡
4. 長尾由実子, 佐田通夫. インターフェロン治療の理解・認知不足の背景を探る～患者・医師対象アンケート調査からの考察. JDDW 2009. 10. 14-17 京都

G. 知的所得権の所得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

テーラーメイド治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

分担研究者：五條 堀 孝 国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター
遺伝情報分析研究室 教授

分担研究課題：肝炎ウイルス統合データベースの構築

研究要旨：宿主（ヒト）側と肝炎ウイルス側双方の要因に注目し、広範なサンプルより両データを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次的にデータベース化する際に必要となるスキーマを設計する。本年度は、DNAチップとは異なるアッセイ系(DigiTag2)により解析したSNP情報、および新たに対象となった臨床情報について、従来の情報と同一の枠組みで管理、解析できるようデータベースを改良し、その有効性を検証した。

A. 研究目的

本研究は、ヒト側・ウイルス側双方の要因を統合的に解析することが特徴であり、それに必要な基盤として、両データを網羅的に収集し相互参照的解析を可能とするデータベースを構築する。

B. 研究方法

今年度新たに解析対象となったデータは、昨年度までのゲノムワイド関連解析(分担研究者・徳永教授)により発見された薬剤応答性と強い相関を示す SNP を対象に遂行された、DigiTag2 法による解析結果、および、それに関連する臨床情報である。昨年度までに構築したデータベーススキーマを基に、登録済みデータを含めてそれらを統一的に管理、解析できるよう改良する。

C. 研究結果

SNP および SNP 解析結果に関連するテーブルより、Affymetrix GeneChip に依存する部分をアッセイ系情報として独立させた。また、臨床情報における数値データは、数値型(整数または浮動小数点実数)および文字列型で二重管理する方式へ移行し、検索の容易さと記述の柔軟性の両立を

実現した。併せて、登録済みデータの同期のため、データ移行のプロセスを策定した。

D. 考察

SNP 関連テーブルをアッセイ系に依存しない形式へ移行することで、登録済みデータとの統一的な管理、解析が実現できたと考えられる。また、今後の拡張性も期待できる。臨床情報の記述形式の変更により、利利用者はデータの由来や種類によらず同様の手順で検索、参照することができ、利便性の向上が実現できたと考えられる。

E. 結論

昨年度までの成果に機能追加を遂行し、対象となる情報の拡張および、利用者の利便性の向上を実現した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi Y, Suzuki Y, Itou T, Carvalho AA, Cunha EM, Ito FH, Gojobori T, Sakai T (2010). Low genetic diversities of rabies virus populations within different hosts in Brazil. *Infect Genet Evol.* (In press).
2. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y,

- Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM, Tomonaga K. (2010). Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes Identification of endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes *Nature* 463(7277): 84-87.
3. Kaminuma, E., Mashima, J., Kodama, Y., Gojobori, T., Ogasawara, O., Okubo, K., Takagi, T. and Nakamura, Y. (2010). DDBJ launches a new archive database with analytical tools for next-generation sequence data. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): D33-38.
 4. Takeda, J., Suzuki, Y., Sakate, R., Sato, Y., Gojobori, T., Imanishi, T. and Sugano, S. (2010). H-DBAS: Human-transcriptome DataBase for Alternative Splicing, update 2010 *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): D86-90.
 5. Yamasaki, C., Murakami, K., Takeda, J., Sato, Y., Noda, A., Sakate, R., Habara, T., Nakaoka, H., Todokoro, F., Matsuya, A., Imanishi, T., and Gojobori, T. (2010). H-InvDB in 2009, extended database and data-mining resources for human genes and transcripts. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): D626-632.
 6. The HUGO Pan-Asian SNP Consortium, Abdu, M., Ahmed, I., Brahmachari, S., Gojobori, T., Liu, E., Sugano, S., Suzuki, Y., Tokunaga, K., Zilfalil, B.A., Indian Genome Variation Consortium (2009). Mapping Human Genetic Diversity in Asia. *Science* 326: 1541-1545.
 7. Suzuki, Y., Gojobori, T. and Kumar, S. (2009). Methods for incorporating the hypermutability of CpG dinucleotides in detecting natural selection operating at the amino acid sequence level. *Mol. Biol. Evol.* 26 (10) : 2275-84.
 8. Clemente, JC., Ikeo, K., Valiente, G., Gojobori, T. (2009). Optimized ancestral state reconstruction using Sankoff parsimony. *BMC Bioinformatics* 10 (51) : 1-27.
 9. Sugawara, H., Ikeo, K., Fukuchi, S., Gojobori, T. and Tateno, Y. (2009). DDBJ Dealing with Mass Data Produced by the Second Generation Sequencer. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D16-8.
 10. Shimada, MK., Matsumoto, R., Hayakawa, Y., Sanbonmatsu, R., Gough, C., Yamaguchi-Kabata, Y., Yamasaki, C., Imanishi, T. and Gojobori, T. (2009) VarySysDB: a human genetic polymorphism database based on all H-InvDB transcripts. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D810-5.
 11. Fukuchi, S., Homma, K., Sakamoto, S., Sugawara, H., Tateno, Y., Gojobori, T. and Nishikawa, K. (2009). The GTOPI database in 2009: updated content and novel features to expand and deepen insights into protein structures and functions. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D333-7.
2. 学会発表
1. 五條堀 孝 (2009)「肝炎ウイルス・データベースの構築と宿主ファクターの研究応用」、厚生労働科研費 4 班合同会議、国立感染症研究所 (東京) 2 月 7 日
 2. 五條堀 孝 (2009)「遺伝学から見る新型インフルエンザ」、医看工総会、三島商工会議所 (静岡) 6 月 22 日
 3. 五條堀 孝 (2009)「ペタゲノミクスの到来 - 生命情報の超大量時代をどう乗り越えるか」(特別講演)、GCOE 若手支援シンポジウム、京王プラザホテル札幌 (北海道) 9 月 30 日
 4. 五條堀 孝 (2009)「肝臓病: トランスレーショナル・リサーチへのゲノム情報戦略」“LIVER DISEASE: Strategic approach of genomic information to translational research” (特別講演)、日本肝臓学会大会、京都国際会議場 (京都) 10 月 15 日
 5. T. Gojobori (2009) ” Introduction to International databases”、日本肝臓学会 The 8th Single Topic Conference “HBV Now in Asia” & Special Hands-on Seminar “How to Master Bioinformatics of Hepatitis Viruses Using International Databases”、国際医療センター (東京) 11 月 23 日
 6. 五條堀 孝 (2010)「肝炎ウイルスデータベース構築とホストファクター研究への応用」、厚生労働科研費 4 班合同会議、国立感染症研究所 (東京) 1 月 6 日
- G. 知的所得権の所得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

参考資料1：統合型肝炎ウイルスデータベース設計構築

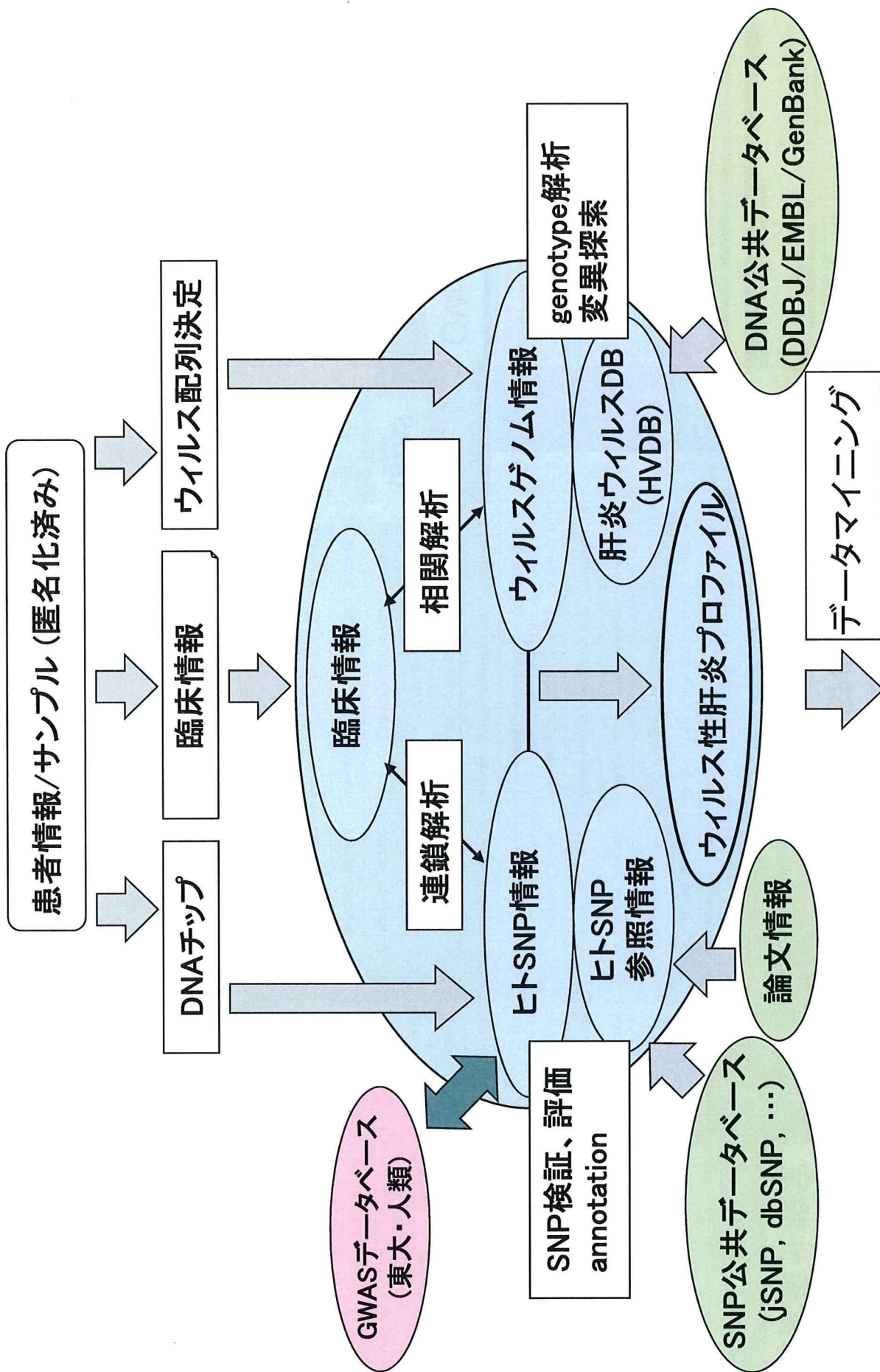
図1．データベース構築フロー

図2．SNPの検索

GWAS で得られた統計値や、SNP そのものの情報（関連する遺伝子、ゲノム上の位置、種類 cSNP/sSNP/iSNP/gSNP、など）、その他キーワードから SNP を絞り込み、リストアップできる。ここで、GWAS-DB、dbSNP の対応するエントリへリンクできる。

図3．検体情報の検索

2群を再定義し、case-control study を行うことができる。その第1ステップ。患者情報、ウイルス情報、診断情報を基にサンプルを検索し、グループ(群)として保存する。2回(以上)繰り返す。



テーラーメイド医療で利用

図1 データベース構築フロー

dbSNP

Single Nucleotide Polymorphism

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1273350

Allele: single nucleotide
Validation Class: C/G
Molecule Type: Genomic
Created/Updated In Build: 07/129
Map to Genome Build: 3.5
Clinical Association: unknown

Submitter records for this RefSNP Cluster

NCBI Accession ID	Handle/Submitter ID	Validation Status	Orientation	Allele
rs1983003	KWOKIOLP-000255-2675	✓	Forward	C/G
rs2460809	SC_JOM4AC007234_3_92317	✓	Forward	C/G
rs6930149	WL_SSAHASASNPINT_037889_1_90408	✓	Forward	C/G
rs14526243	PCN_SSAHASASNPchr16_NT_010393.14_94101	✓	Forward	C/G
rs2379243	PERLEGENchr16_623976	✓	Forward	C/G
rs65997620	AFFY15NP_A-1690788	✓	Forward	C/G
rs69338417	PERLEGENchr16_623976	✓	Forward	C/G
rs7927710	AFFY15NP_A-1783893	✓	Forward	C/G
rs77494959	HGSVChr12156_SNV_20070510 chr16_8688523	✓	Forward	C/G
rs7831919	HGSVChr12878_SNV_20070510 chr16_8688523	✓	Forward	C/G
rs8278479	HGSVChr18553_SNV_20070510 chr16_8688523	✓	Forward	C/G

GWAS database

ヒットSNP一覧

search significant SNPs

SNP ID		SNP annotation		mAF		P-value		Case count					
Affymetrix	dbSNP rsid	chr	position	gene	location	type	noAF	HWE	A vs B	AA	AB	BB	N
SNP_A-1781587	rs7326787	13	100783743	NALCN	intron	sSNP	0.047314578	4.846e-41	1.061e-05	187	15	9	2
SNP_A-1783893	rs1273350	16	8688523	ABAT	intron	sSNP	0.191666667	0.3801	7.208e-05	174	56	6	0
SNP_A-1791304	rs2370096	16	22466298	HS3ST2	upstream	gSNP	0.371165644	0.1654	5.428e-05	50	96	33	5
SNP_A-1799908	rs78111301	7	67070256		downstream	gSNP	0.191666667	0.0972	7.208e-05	2	64	170	0
SNP_A-1807208	rs9787098	1	34890869	C1orf94	downstream	gSNP	0.381861575	0.0036	8.274e-05	113	92	30	1
SNP_A-1825229	rs11718390	8	63654572	THOC7	downstream	sSNP	0.218240385	0.5005	8.564e-05	6	65	164	1
SNP_A-1839556	rs1035052	4	9954437	WDR1	upstream	gSNP	0.431034483	0.398	2.481e-05	47			
SNP_A-1840923	rs893875	8	1998505	MYO2	intron	sSNP	0.203571429	0.4395	6.689e-05	5			
SNP_A-1851754	rs210433	X	104834944		intron	sSNP	0.021428571	4.299e-32	9.749e-05	234			
SNP_A-1856607	rs2254064	12	102909433	GLT3D2	intron	sSNP	0.354385965	8.782e-31	7.612e-13	87			
	rs9309628	2	86025839	POLR1A	downstream	gSNP	0.171388102	0.0362	6.282e-06	125			
	rs2907392	17	64114631	FAM20A	upstream	gSNP	0.065822785	0.7308	2.298e-05	12			
	rs2285633	X	13644460		upstream	gSNP	0.382142857	2.764e-22	2.628e-05	54			

SNP ID 位置情報 統計解析結果

図2 SNPの検索

search clinical information - Mozilla Firefox
 ファイル (編集) 表示 (履歴) ツール (ヘルプ) <http://s2ast02.genesis.nic.ac.jp/9080/sn>

ヒット検体情報一覧

search clinical information

submit ID	running ID	encrypt ID	hospital	sex	age	virus subtype	Core70	Core91	ISDR	clinical status	drug	treatment result	other lesion	liver biopsy factor A	liver biopsy factor F	Di cc
<input checked="" type="checkbox"/>	887309	2080008B02	EHI-09	愛媛	F	62	1b	W	2	CH	PEG/RBV	TR		1	1	0.1
<input checked="" type="checkbox"/>	887308	2080008B04	EHI-08	愛媛	F	54	1b	W		CH	PEG/RBV	TR		2	4	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	887318	2080008C08	EHI-17	愛媛	M	59	1b	W	1	CH	PEG/RBV	TR		1	1	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	887426	2080009A03	KF-25	京都府立	F	67	1	W	0	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882727	2080001A03	KAN-19	金沢	F	71		M	0	CH	PEG/RBV	TR		3	3	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882752	2080001A05	KAN-26	金沢	M	63		W	0	CH	PEG/RBV	TR		3	3	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882717	2080001A06	KAN-04	金沢	M	57		W	3	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882750	2080001B03	KAN-30	金沢	F	59		W	1	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882760	2080001B04	KAN-08	金沢	M	68		M	0	CH	PEG/RBV	TR		3	3	0.1
<input checked="" type="checkbox"/>	882718	2080001B07	KAN-05	金沢	M	44		W	0	CH	PEG/RBV	TR		1	1	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882720	2080001B08	KAN-16	金沢	F	62		W	0	CH	PEG/RBV	TR		3	3	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882724	2080001B09	KAN-21	金沢	F	65		W	0	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882746	2080001B10	KAN-33	金沢	M	46		M	0	CH	PEG/RBV	TR		3	3	0.1
<input checked="" type="checkbox"/>	882715	2080005B08	KAN-12	金沢	F	68		W	0	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	887295	2080008A03	TOT-50	鳥取	M	68				CH	PEG/RBV	TR		1	1	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	881406	2080008D04	MSNP-097	武蔵野黒崎	M	51	1b	M	0	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	881407	2080008D10	MSNP-101	武蔵野黒崎	M	50	1b	M	0	CH	PEG/RBV	TR		3	3	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	881400	2080009D06	MSNP-105	武蔵野黒崎	F	65	1b	M	1	CH	PEG/RBV	TR		2	2	0.2
<input checked="" type="checkbox"/>	882878	2080009D09	NCU-17	名古屋市大	F	58	1b	M	1	CH	PEG/RBV	TR		1	1	0.2

select all clear all
 PEG/RBV, TR save subset
 完了

検体サブグループ定義

図3 検体情報の検索

search clinical information

検索条件設定

search clinical information

search condition

virus type: HCV
 subtype: 1b
 Core70: W
 Core91: M
 ISDR: 0

patient hospital: all
 sex: both
 age: ---

diagnosis clinical status: all
 drug: PEG/RBV
 treatment result: SVR

any keyword:

SNP: B-HCCvsC-HCC, P<0.0001
 search reset

完了

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 21 年度）

テーラーメイド治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

分担研究者：新井 理 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

分担研究課題：ウイルス変異ーヒト SNP の結合解析・肝炎ウイルス統合データベースの構築

研究要旨：宿主（ヒト）側と肝炎ウイルス側双方の要因に注目し、広範なサンプルより両データを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次元的にデータベース化し解析する。本年度は、DNAチップとは異なるアッセイ系(DigiTag2)により解析したSNP情報を、従来の情報と同一の枠組みで管理、解析できるようデータベースを改良し、収集したデータの登録を行った。併せて、利用者が様々に検体群を定義して関連解析を遂行できるよう、インターフェースのプロトタイプを構築した。

A. 研究目的

本研究は、ヒト側・ウイルス側双方の要因を統合的に解析することが特徴であり、それに必要な基盤として、両データを網羅的に収集し相互参照的解析を可能とするデータベースを構築する。

B. 研究方法

昨年度までのゲノムワイド関連解析(分担研究者・徳永教授)により発見された薬剤応答性と強い相関を示す SNP を対象に遂行された、DigiTag2 方による解析結果を導入できるよう、昨年度までに構築したデータベースシステムを改良する。それを基に、利用者が関連解析を再実行する際に必要とされるインターフェースを検討する。

C. 研究結果

Affymetrix GeneChip 以外のアッセイ系および対象 SNP を登録できるよう、データベースシステムを改良し、314 件の DigiTag2 解析結果を登録した。患者の臨床情報の登録は昨年度より継続して遂行し、計 1073 件が登録済みとなった。収集した全情報を臨床情報より検索する機能、その

結果を検体群として保存する機能、それを用いて関連解析を再実行する機能を利用者インターフェースとして準備した。

D. 考察

データベースの改良(複数アッセイ系対応、検索機能と関連解析機能の統合)により、利用者の利便性が向上し、これをプラットフォームとして独自の解析を遂行することが可能と考えられる。また今後の拡張性も期待できる。

E. 結論

昨年度までの成果に機能追加を遂行し、対象となる情報の拡張および、利用者の利便性の向上を実現した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mukaide M, Tanaka Y, Shin-I T, Yuen MF, Kurbanov F, Yokosuka O, Sata M, Karino Y, Yamada G, Sakaguchi K, Orito E, Inoue M, Baqai S, Lai CL, Mizokami M.

Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. Antimicrob Agents Chemother. 2010. 54(2):882-9.

学会発表
なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
長尾由実子, 佐田通夫.	C型肝炎でみられる肝外病変にはどのようなものがあるのか?	河田純男, 佐々木 裕.	現場の疑問に答える肝臓病診療Q&A	中外医学社	東京	2009	113-116

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, <u>Kurosaki M</u> , Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, <u>Honda M</u> , Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, <u>Tokunaga K</u> , <u>Mizokami M</u> .	Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	Nature Genetics.	41(10)	1105-1109	2009
Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, <u>Tokunaga K</u> , <u>Mizokami M</u> .	Interferon λ s and the single nucleotide polymorphisms: A mile stone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	in press		2010