

201125038A

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

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究  
(H23-肝炎-一般-005)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳永 勝士  
平成 24 (2012) 年 3 月

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

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究  
(H23-肝炎-一般-005)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究 ----- 1  
(東京大学大学院医学系研究科 徳永 勝士)  
(資料) 別紙 1 HBV 研究体制図、別紙 2 臨床検体の集約と解析の手順

## II. 分担研究報告

1. 臨床検体及び付帯情報の収集 ----- 11  
(国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター 溝上 雅史)
2. B型肝炎ウイルス感染の病態別におけるネットワーク解析 ----- 13  
(国立遺伝学研究所 生命情報・DDB J 研究センター 五條堀 孝)
3. ウイルス因子の解析 ----- 16  
(国立感染症研究所ウイルス第二部 脇田 隆宇)
4. HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎患者の肝発癌に寄与する因子の検討 ----- 21  
(国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 八橋 弘)
5. 連続変数型遺伝子関連解析法の開発とそれを用いた B 型肝炎ウイルス遺伝子の機能性変異部位の同定 ----- 23  
(信州大学医学部附属病院 松本 晶博)  
(資料) 図 1.HBV の進化関連遺伝子変異解析
6. 血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子の検討 ----- 26  
(千葉大学大学院医学研究院 横須賀 収)
7. B 型肝炎ウイルスの生体内における増殖速度を規定する要因の検討 ----- 28  
(埼玉医科大学 持田 智)
8. 肝癌感受性遺伝子の同定 ----- 31  
(東京大学大学院医学研究科 小池 和彦)

9. B型肝炎関連肝癌の早期診断・悪性度診断法の基礎的研究	35
(慶應義塾大学医学部 坂元 亨宇)	
10. 背景肝疾患から見た肝発癌の病態解析	38
(北海道大学大学院医学研究科 武富 紹信)	
11. B型肝炎ウイルス関連疾患の全ゲノム関連解析	40
(東京大学医科学研究所 松田 浩一)	
12. B型肝炎ウイルス感染患者群のゲノム解析	42
(国立国際医療センター 西田 奈央)	
13. HLA-DP の機能解析	45
(東京大学大学院医学系研究科 宮寺 浩子)	
14. B型肝炎ウイルス感染の病態別におけるトランスクリプトーム解析	47
(金沢大学医学部 本多 政夫)	
15. 多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発	50
(統計数理研究所 間野 修平)	
16. オカルトHBVが疑われた核酸アナログ投与症例のHBV遺伝子解析	52
(浜松医科大学医学部 鈴木 哲朗)	
17. ウイルスマーカーの臨床的有効性評価	55
(名古屋市立大学大学院医学研究科 田中 靖人)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	73

# I. 総括研究報告書

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）  
総括研究報告書（平成 23 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な  
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

研究代表者：徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 教授

研究要旨： B型肝炎ウイルス(HBV)感染後の臨床経過のうち、HBV持続感染、HBV関連肝癌、HBV再活性化、HBV重症化(劇症化)、インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性に関連する宿主遺伝因子を網羅的に探索する為、班を4つのチーム (1. 臨床情報収集、2. ゲノム解析・機能解析、3. 統計解析・情報、4. ウイルス因子) から構成して研究を行った。1.では検体収集・臨床情報蓄積システムの構築を行った。2.では健常者420検体を用いた新規SNPタイピング技術の検証、遺伝子発現プロファイルを利用したネットワーク解析、およびHLA-DPタンパク質の発現系構築を行った。3.では疾患に関連する臨床とゲノムの相互作用解析手法の確立を行った。4.ではHBVの複製増殖細胞、感染感受性細胞および感染動物モデルの基礎検討を行った。

検体収集・臨床情報蓄積システムの構築と新規SNPタイピング技術の検証により、多施設によるサンプル収集からゲノムワイド関連解析までを迅速に行えるシステムが整った。また、遺伝子発現プロファイルを利用したネットワーク解析やHLA-DPタンパク質の発現系構築により、HBV感染に伴う病態に関連する遺伝子の発現解析や機能解析を行う準備も整い、ウイルス因子を同定する為の実験系の準備も進んでいる。更に、これら全ての因子の関連を調べる為の解析方法の検討も行われている。来年度以降も、疾患発症機序の解明へ向けた遺伝子発現解析と遺伝子機能解析を目的とした実験系、新たな解析方法等を統合し、新たな遺伝要因の同定と疾患発症機序の解明を目指す。

研究分担者

溝上 雅史	国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター センター長
五條堀 孝	国立遺伝学研究所生命情報 DDB J 研究センター 教授
脇田 隆宇	国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長
八橋 弘	国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 治療研究部長
松本 晶博	信州大学医学部付属院 消化器内科 特任研究員
横須賀 収	千葉大学大学院 腫瘍内科学 教授
持田 智	埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 教授
小池 和彦	東京大学大学院医学系研究科 消化器内科 教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部 病理学教室 教授

武富 紹信	北海道大学大学院医学研究科	消化器外科学分野 I	教授
松田 浩一	東京大学医科学研究所	ヒトゲノム解析センター	准教授
西田 奈央	国立国際医療センター	肝炎・免疫研究センター	上級研究員
宮寺 浩子	東京大学大学院医学系研究科	人類遺伝学分野	助教
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系	先端医療技術学講座	教授
間野 修平	統計数理研究所	数理・推論研究系	准教授
鈴木 哲朗	浜松医科大学医学部医学科	感染症学講座ウイルス学	教授
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科	ウイルス学分野	教授

## A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)感染後の臨床経過は非常に個人差が大きい。臨床経過に影響を及ぼす因子としては、年齢、性別、他の肝炎ウイルスとの共感染、HBV 遺伝子型等が挙げられ、特に HBV 遺伝子型と病態の関連については詳しく調べられてきた。一方宿主の遺伝因子についても、慢性 B 型肝炎の発症については候補遺伝子アプローチにより幾つかの遺伝子の関与が示されており、さらにゲノムワイド関連解析により HLA-DP 遺伝子の関連が示された。しかしそれ以外の遺伝因子の関与についてはまだ殆ど解明されていない。

本研究では、HBV 持続感染、HBV 関連肝癌、HBV 再活性化、HBV 重症化（劇症化）、インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性などに関連する宿主遺伝因子を網羅的に探索する事を目的とする。

## B. 研究方法

本研究では、班を 4 つの組織(1. 臨床情報収集、2. ゲノム解析・機能解析、3. 統計解析・情報、4. ウイルス因子)に分類し、研究を進める(別紙 1 参照)。

### 1. 臨床情報収集(溝上、八橋、横須賀、持田、小池、松本、坂元、武富)

本研究を行うにあたり、代表者である徳永の所属する東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会から承認を得た。引き続いて、各々の研究分担者及び研究協力者が所属する機関の倫理審査委員会に申請し、すでに大部分の委員会から承認を得て、サンプル収集を開始している。

また、本研究では、日本全国の研究協力施設からサンプル (DNA、血清) を効率的に収集し、そのサンプルに関する詳細な臨床情報をデータベース化して管理する。加えて解析した SNP 情報や統計解析結果をデータベースに集約して、研究分担者間で解析結果を共有することにより、研究の一層の進展を実現する。

### 2. ゲノム解析・機能解析(徳永、松田、西田、本多、宮寺)

#### 1) 新規 SNP タイピング技術の検証

病態別にゲノムワイド関連解析を実施し、新規の宿主因子を網羅的に探索する。慢性 B 型肝炎の発症に関わることが明らかとなっている HLA-DP 遺伝子の遺伝子型で層別化した解析を実施するためには、できるだけ多くの検体を用いてゲノムワ

イド SNP タイピングを行う必要がある。そのため、一度に 96 検体の SNP タイピングが可能であり、かつ 1 検体あたりの費用が他の方法の半分以下で済む Affymetrix 社の AXIOM Genome-Wide ASI 1 Array plate (以下 AXIOM ASI Array)を用いる。AXIOM ASI Array は、アジア集団に特化した約 60 万の SNP 解析用プローブが搭載されており、日本を含む東南アジア集団を対象とした解析に適したプラットフォームである。

## 2) 遺伝子発現プロファイルを利用したネットワーク解析

慢性肝炎から肝癌発症に関わる遺伝子群のネットワーク解析ならびに検証を試みる。B 型慢性肝炎 (CH-B) 37 例、CH-B 関連肝癌 17 例 (HCC-B) および C 型慢性肝炎 (CH-C) 35 例、CH-C 関連肝癌 (HCC-C) 17 例の肝組織を用いる。各群における発現上昇・低下する遺伝子を選定し、各群での階層クラスターを行う。VIF (variance inflation factor) を stopping rule として用い、各群での至適階層クラスター数を決定する。各クラスターにおける発現プロファイルの平均を算出し、偏相関係数を用いて各クラスター間の関係を検討する。高い偏相関係数を示すクラスター間には真の因果関係を有することより、クラスター間を結びグラフ化することでネットワーク構築を試みる。また、CH-B と HCC-B 間および CH-C と HCC-C 間における高い偏相関を示す、遺伝子クラスターを同定し、発癌に関わる遺伝子群の推定を行う。

## 3) HLA-DP タンパク質の発現系構築

GWAS において同定された、B 型肝炎慢性化に対する感受性・抵抗性と有意に関連を示す HLA-DP アリル、および、関連を示さない中立性アリル (HLA-DPA1\*01:03, \*02:01, \*02:02, HLA-DPB1\*02:01, \*03:01, \*04:01, \*05:01, \*09:01) cDNA を HLA 標準細胞株よりクローニングし、バキュロウイルス発現系、哺乳類繊維芽細胞株を用いて組換え HLA-DP タンパク質を発現する。これらの組換え HLA-DP タンパク質を用いたペプチド-MHC 結合アッセイを行い、抵抗性アリルに特異的に結合しうるウイルス抗原を同定する。

## 3. 統計解析・情報(五條掘、間野)

本研究で構築されるデータベースに多型情報と臨床情報が蓄積された後に先進的なバイオインフォマティクス、統計解析を実施する。多型の選択には、Lasso や Elastic Net などの正則化回帰を用いることが基本である。Group Lasso により有用な多型のグループを抽出する。さらに、ガウシアングラフィカルモデルにより、疾患に関わる多型と臨床情報の交互作用をグラフ表示することで、推論に供する。

## 4. ウイルス因子(脇田、田中、鈴木)

ウイルス遺伝子解析を行い、患者臨床情報との関連解析を行うとともに、以下の細胞・動物実験系の確率を目指す。

1) HBV 複製細胞として Hep2.2.15 細胞および HepAD38 細胞を入手する。

2) HBV 感染感受性細胞 : HepaRG を入手し、その HBV 感染感受性を検討する。ま



た、初代培養ヒト肝細胞の HBV 感染感受性を検討する。

3) HBV 感染動物モデル：ヒト肝細胞キメラマウスを作製し、ウイルスの感染感受性を確認する。

### C. 研究結果

研究代表者である徳永は、宿主因子の網羅的探索のための新たな SNP タイピング技術の検証を、健常者 420 検体を用いて西田と共同して行った。また検体の収集・臨床情報の蓄積に必要なシステムの開発を溝上、西田と共同して行った。また、ゲノムワイドなメチレーション解析方法についても共同研究を行った。

#### 1. 検体収集・臨床情報蓄積システムの構築(溝上、西田、徳永)

サンプル収集から解析までを効率的に行うためのシステムを構築した。全部で 10 ステップから構成され(別紙 2 参照)、①DNA・血清サンプルと臨床情報(簡易版)の登録(ステップ 1~3)、②臨床情報(詳細版)の追加作成(ステップ 4~6)、③SNP タイピングデータ取得と登録(ステップ 7~9)、④SNP タイピングデータを用いた解析結果の登録と共有(ステップ 10)の 4 段階に分類される。①と②では、サンプル登録および臨床情報取得を迅速かつ正確に行うため、臨床情報を 2 度に分けて登録する形式を採用した。臨床情報は全て電子媒体(パスワード付き)で管理し、そのままデータベースに蓄積可能にする事で、タイピングミス等による不整合を防止した。③では、サンプル調製とプレート作成を自動化する事により、サンプルの取り違えを防止した。SNP タイピングデータ取得の方法は、1 度に大量の検体を処理

する事が可能な AXIOM ASI Array を採用する。④では、サンプル情報、臨床情報(詳細版)、SNP タイピングデータをデータベース化して管理し、さらに統計解析結果を登録する。データベースには班員全員がアクセス制限された環境下で接続することができ、解析結果を共有する。

#### 2-1. 健常者 420 検体を用いた新規 SNP タイピング技術の検証(西田、徳永)

東京大学医学系研究科人類遺伝学教室で所持している 420 人の健常者について、AXIOM ASI Array を用いた SNP タイピングを行った。スキャンエラー 7 検体、call rate が 97% 以下になった 5 検体については再スキャンを行い、遺伝子型の再決定を行った。Overall call rate の平均は 99.42 となり、Dish QC の平均は 0.967 になった。次に Batch effect が存在するかを、全検体を用いた場合とプレート毎に遺伝子型を決定した場合で比較した。その結果、Dish QC では判別できない Batch effect が存在することが分かった。また、90 検体以上で Batch 単位の遺伝子型を決定する事で、call rate が改善する傾向が見られた。

ゲノムワイド関連解析における擬陽性を押さえる為、2 段階の条件で SNP filtering を実施した(Table 1)。

Table 1 健常者420検体の解析結果(SNP数)

Total (IN/DEL含む)		600,307
SNP call rate	< 99%	52,960
SNP call rate	< 95%	10,060
MAF	< 5%	153,390
MAF	< 1%	87,354
MAF	0%	56,735
HWEp	< 0.001	21,034

SNP call rate が 95%以上でハーディー・ワインバーグ平衡の P 値が 0.1%以上の SNP のうち、マイナーアリル頻度(MAF) が 5%以上では 425,767 SNPs、MAF が 1%以上では 485,812 SNPs が、それぞれ解析可能な SNP として選択された。

## 2-2. 遺伝子発現プロファイルを利用したネットワーク解析(本多)

CH-B、CH-C、HCC-B、HCC-C それぞれにおいて、順に 11、7、10、12 クラスターを用いた各群でのネットワーク構築が可能であった。HCC-C では発現上昇を 4 つの遺伝子クラスターで認め、これらはそれぞれ細胞増殖群、間質系細胞群、免疫応答群、腫瘍マーカー群であり、主にリンパ球や間質で発現する遺伝子を多く含んでいた。一方、発現低下のクラスター群の多くは代謝関連遺伝子にて形成されており、これらの遺伝子は主に肝細胞で発現する遺伝子であった。これらの遺伝子発現と密接に関連する CH-C の遺伝子クラスターは、ケモカインを中心とした炎症に関わるクラスターであり、おもにリンパ球で発現する遺伝子であった。一方、HCC-B の遺伝子発現は HCC-C とは異なり、細胞増殖群が多く、免疫応答群が少ない傾向が認められた。またこれら遺伝子発現と密接に関連する CH-B の遺伝子クラスターは CH-B の炎症に関わる遺伝子群のほか、主に肝細胞にて発現する機能未知の遺伝子群であった。

## 2-3. HLA-DP タンパク質の発現系構築(宮寺)

各種の HLA-DP アリルについて組換えタンパク質の細胞表面発現をフローサイ

トメトリーにて確認した。一部のアリルについてタンパク質を精製するとともに、ペプチド結合測定を実施した。

## 3. 交互作用解析手法の確立(間野)

まだデータが得られていない状況であるから、本年度は準備段階として、データのクリーニングの手続きを確立し、臨床データと全ゲノムタイピングのデータから疾患に関連する臨床とゲノムの交互作用の解析手法を確立することを目指した。具体的には、Lasso や Elastic Net を独自に実装し、その性能を評価するに留まらず、本年度に発表された stability selection を用いて多型を選択する手法も検討した。Group Lasso、ガウシアングラフィカルモデルについても、その有効性を考察した。それらの手法を代表者らが過去に関わった研究のデータに適用し、有用性を評価することができた。

## 4. HBV の複製増殖細胞、感染感受性細胞および感染動物モデルの基礎検討(脇田)

HBV 複製細胞として Hep2.2.15 細胞および HepAD38 細胞を入手した。両細胞ともに培養上清にウイルス粒子を分泌していることを確認し、サザンブロットおよびリアルタイム PCR によるウイルスゲノムの検出系、ノザンブロットによる RNA の検出系を構築した。HepaRG 細胞は細胞を播種してから約 2 週間分化させることにより感染感受性を誘導できる。分化した状態で約 10%の細胞に感染を確認した。初代培養ヒト肝細胞に HBV を感染させると接種ウイルス量に依存してウイルス感

染を確認した。uPA-NOG マウスを実中研の末水博士より供与いただき、ヒト初代培養肝細胞を移植して作製したヒト肝細胞移植したマウスにHBVを接種したところ持続的な感染が成立した。

#### D. 考察

1. 検体収集・臨床情報の蓄積システムを構築した事によって、今後行われるサンプル収集からタイピングデータ取得までの工程を効率よく実施できると期待される。

2-1. AXIOM ASI Array を用いた健常者サンプルのゲノムワイド SNP タイピングにより、プレート毎に遺伝子型を決定する事で精度の高いデータを得られる事が確認された。今後、HBV 患者群の SNP タイピングについても AXIOM ASI Array を行うことで、多数のサンプルを効率よく処理し、ゲノムワイド関連解析を行うことが可能となった。

2-2. Bioinformatics の手法を用い、CH-B 関連肝癌ならびに CH-C 関連肝癌での遺伝子発現ならびに遺伝子群のネットワークの違いが明らかとなった。今後、SNP と関連する遺伝子発現変化を同定する上で、重要な知見と考えられる。

2-3. これまで HLA-DP を介した HBs 抗原提示について少数の報告があるが、疾患感受性、抵抗性の決定に関わる HBs 抗原部位は同定されていない。今後、細胞レベル、および精製 HLA-DP 組換えタンパク質を用いたペプチド結合アッセイを最適化し、HLA-DP\*04:02 など抵抗性アリルを介したウイルス排除に関わる HBs 抗原ペプチド領域の同定、および結合特異性、親和性の解析によりこれらのメカニズムの解明を行う。

3. 来年度はデータが得られることが期待されるので、本年度に開発した手法を適用する。

4. ウイルスの遺伝子解析と患者臨床情報の関連解析に加えて、今後は患者ゲノム情報も組み合わせた解析も目指す。また HBV を解析するための細胞・動物実験系の構築と確認を実施した。来年度は患者由来のウイルス解析を実施する。

#### E. 結論

検体収集・臨床情報蓄積システムの構築と新規 SNP タイピング技術の検証により、多施設によるサンプル収集からゲノムワイド関連解析までを迅速に行えるシステムが整い、すでに患者検体の収集を開始した。また、遺伝子発現プロファイルを利用したネットワーク解析や HLA-DP タンパク質の発現系構築により、HBV 感染に伴う病態に関連する遺伝子の発現解析や機能解析を行う準備も整いつつある。更にウイルス因子を同定する為の実験系の準備も進みつつあり、これら全ての因子の関連を調べる為の解析方法の検討も行われている。

来年度以降はこれらのシステムを利用して効率的に研究を遂行する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M; Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Association of IL28B variants with response

to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b., *J Med Virol.* 83(5): 871-8 (2011)

2) Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsunami H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M: Genome-wide association study identified ITPA/DDR1GK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C., *Hum Mol Genet.* 20 (17): 3507-16 (2011)

3) Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N: Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther.* 16(5): 685-94 (2011)

4) Ogoshi K, Hashimoto SI, Nakatani Y, Qu W, Oshima K, Tokunaga K, Sugano S, Hattori M, Morishita S, and Matsushima K: Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics.* 98(4): 280-287, 2011.

5) Nishida N, Mawatari Y, Sageshima M, Tokunaga K: Highly Parallel and Short-Acting Amplification with Locus-Specific Primers to Detect Single Nucleotide Polymorphisms by the DigiTag2

Assay. *PLoS One.* 7(1): e29967 (2012)

## 2. 学会発表

1) Tokunaga K, Lessons from genome-wide search for disease-related genes, The 20<sup>th</sup> Annual Conference of Korean Genome Organization, Gangneung, Korea, 2011.

2) Nishida N, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Koike A, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Mizokami M, Tokunaga K, A genome-wide association study identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, International Congress of Human Genetics 2011, Montreal, 2011.

3) Nishida N, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Tokunaga K, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2011, San Francisco, 2011.

4) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上 雅史、徳永勝士、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎ウイルス排除機構に関する遺伝的要因の探索、第 56 回日本人類遺伝学会、幕張、2011

5) 澤井裕美、西田奈央、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上雅史、徳永勝士、B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除機構と HLA-DP との関連、日本組織適合学会第 20 回大会、三島、2011

6) 西田奈央、田中靖人、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、提嶋恵美、小笠原有子、石橋良美、馬場菜津美、溝上雅史、徳永勝士、B 型肝炎慢性化、B 型肝炎ウイルス排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定、

第 34 回日本分子生物学会、横浜、2011

7) Nishida N, Sawai H, Sugiyama M, Matsuura K, Han K-H, Koike A, Ahn SH, Tokunaga K, Tanaka Y, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean, The 22<sup>nd</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei, 2012.

8) Sawai H, Nishida N, Matsuda K, Han K-H, Ahn SH, Matsuura K, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K, No association for Chinese hepatocellular carcinoma

susceptibility SNP in Japanese and Korean populations, The 22<sup>nd</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei, 2012.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

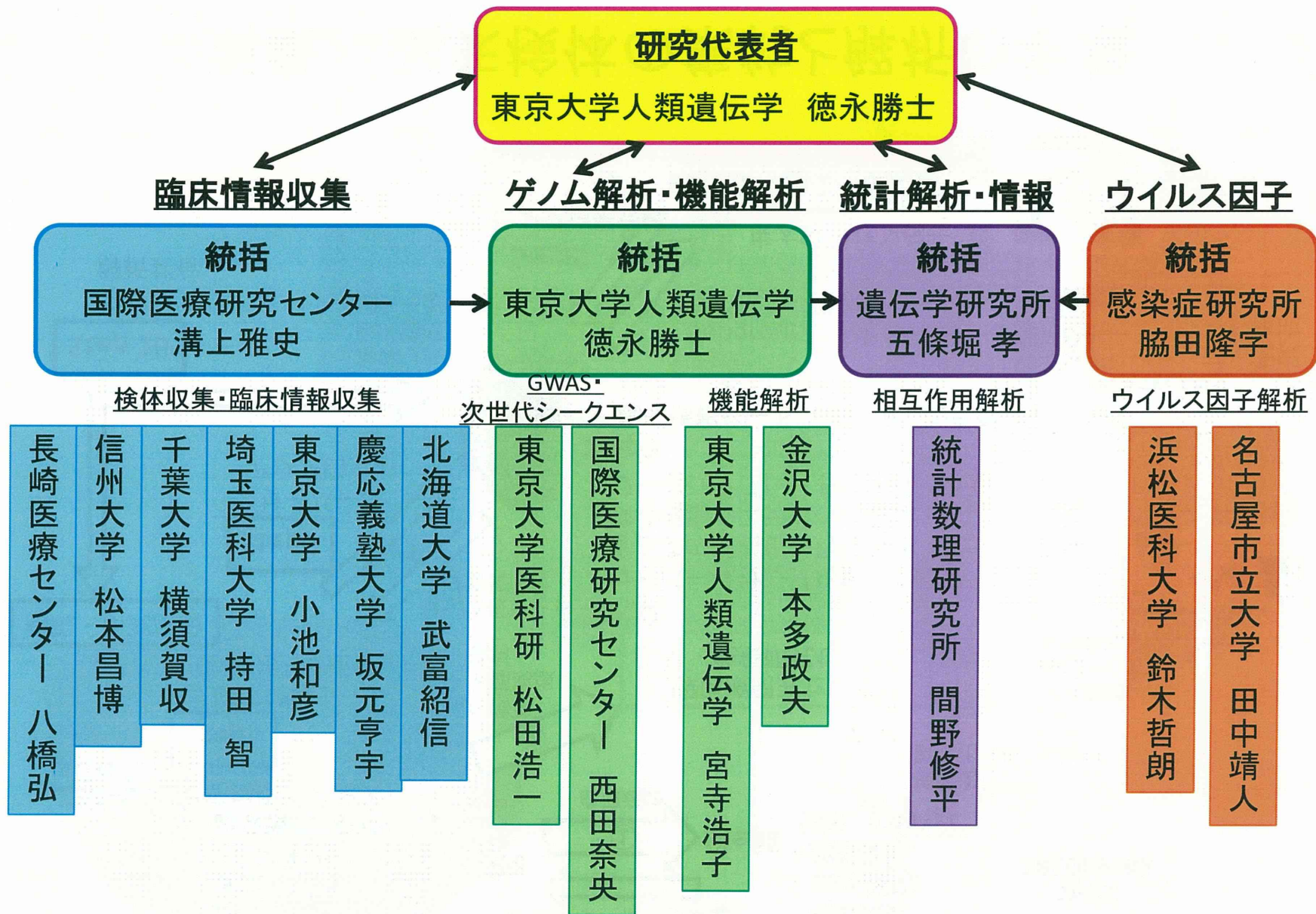
なし

2. 実用新案登録

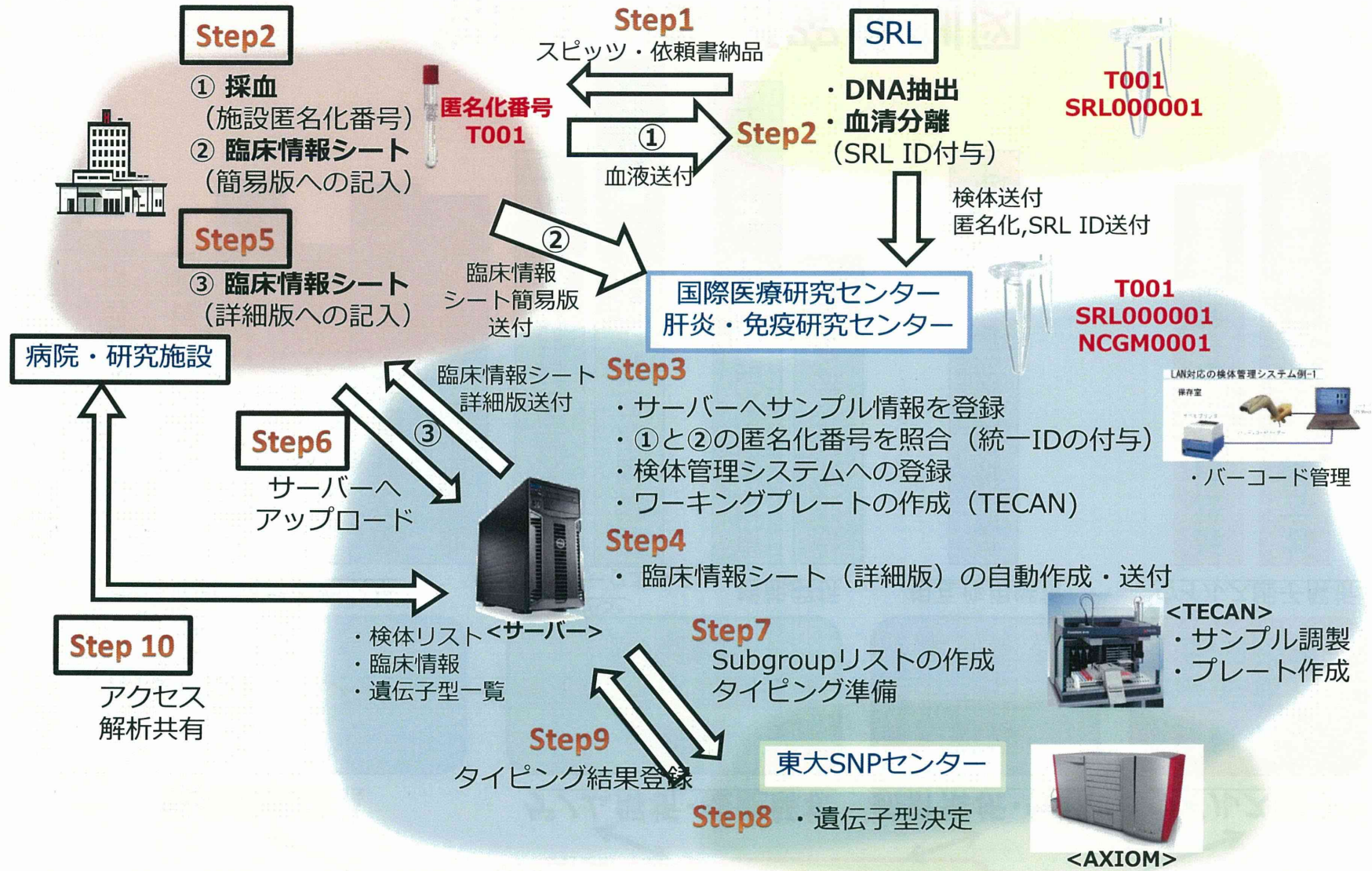
なし

3. その他

なし



別紙1 HBV研究体制図



## 別紙2 臨床検体の集約と解析の手順

## Ⅱ. 分担研究報告書



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 23 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な  
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：溝上 雅史 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター  
センター長

分担研究課題：臨床検体及び付帯情報の収集

研究要旨：研究班のサンプル管理のためのシステムの構築を行った。臨床データについては、簡易版データシートと詳細版データシートに分けることにより、臨床医の手間を軽減し、サンプル収集が用意になる形式を選択した。サンプルについては、回収、抽出を専門会社に受託することで品質を一定化させた。サンプルの情報と実験データを一括して管理できるデータサーバーを構築し、サンプルの選択と解析を一括して実施できる環境を整えた。本システムにより、次年度以降に実施する遺伝子解析を効率的にかつ正確に行うことができると考えられる。

A. 研究目的

本年度においては、班員から提出される予定の臨床検体の収集システムの構築を目指した。

B. 研究方法

臨床情報を収集するための項目の選定、サンプルの回収経路の確立を SRL 株式会社と共同研究先と打ち合わせた。

（倫理面への配慮）

本研究班で使用する検体については、各施設の倫理委員会で承認を得られたもののみとなっており、情報の管理と検体の管理については外部と切断されたデータサーバーを組むことで安全性を保った。

C. 研究結果

臨床情報について臨床検体収集を担当する班員らとの検討を重ねて、臨床医の手間を軽減するという目的から、臨床データを 2 つに分けて収集することとした。まず、簡易版データシートにより、サンプルの概要を記入する。この簡易版データシートとサンプルを合わせてまず回収する。これにより、サンプル収集を簡略化し、回収しや

すい体制とした。その後、この情報に基づいて研究デザインを立てる。

研究デザインは複数あり、それぞれに解析の特性が異なるため、それぞれに合わせた詳細な臨床データを集める必要がある。研究デザインが立った段階で詳細版データシートを検体提出した各班員に送付する形式とした。

サンプルについては、新規に患者から取得されるものについては SRL 株式会社経由で国府台病院に送付する形式とした。サンプルの品質を一定化するために、ゲノムの抽出と血清の分離は SRL で行うこととした。

送付されたサンプルと臨床データについては、統合サーバーを新規に構築することで、サンプルの情報から実験データまでを一括して管理できるシステムを準備した。サンプルはフリーザーで保存されることになるが、その位置を正確に記憶させるための検体管理システムも合わせて導入した。これにより、必要なサンプルの位置と情報がリンクすることになり、効率的な検索と使用が可能となる。

D. 考察

本研究を推進するための基礎を整えた。

本システムにより，サンプルの受け入れを簡便かつ正確に行い，その後続く遺伝子解析を効率的に行うことができる。

#### E. 結論

次年度以降に行われる遺伝子解析のための情報基盤を整えた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kusakabe A, Tanaka Y, Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, Joh T, Tsugane S, Mizokami M. A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. *J Gastroenterol* 46(1):117-124, 2011.

2. Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol* 54(1):19-25, 2011.

3. Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, Mizokami M, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res* 41(1):1-21, 2011.

4. Gulube Z, Chirara M, Kew M, Tanaka Y, Mizokami M, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus isolates from Zimbabwean blood donors. *J Med Virol* 83(2):235-244, 2011.

5. Sugauchi F, Tanaka Y, Kusumoto S, Matsuura K, Sugiyama M, Kurbanov F, Ueda R, Mizokami M. Virological and clinical characteristics on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. *J Med Virol* 83(3):412-418, 2011.

6. Yuen MF, Ka-Ho Wong D, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK,

Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of Hepatitis B Virus (HBV) Infection through Blood Transfusion from Blood Donors with Occult HBV Infection. *Clin Infect Dis* 52(5):624-632, 2011.

7. Tatematsu K, Tanaka Y, Sugiyama M, Sudoh M, Mizokami M. Host sphingolipid biosynthesis is a promising therapeutic target for the inhibition of hepatitis B virus replication. *J Med Virol* 83(4):587-593, 2011.

8. Sugiyama M, Inui A, Shin IT, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 41(10):936-945, 2011.

##### 2.学会発表

なし

#### G. 知的所得権の出願・登録状況

##### 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 23 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な  
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：五條 堀 孝 国立遺伝学研究所 DDBJ 研究センター 教授

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染の病態別におけるネットワーク解析

研究要旨：ヒトゲノムから B 型肝炎ウイルス(HBV)感染に伴う複雑な病態がどのように産み出されているのかを、ゲノムネットワーク解析を行う事により明らかにする事を目的とする。平成 23 年度は、国立国際医療研究センターおよび東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室が共同で進めている、検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行った。来年度以降は、取得が予定されているデータを用いたネットワーク解析を行うことを予定している。

A. 研究目的

本研究では、ヒトゲノムから B 型肝炎ウイルス(HBV)感染に伴う複雑な病態がどのように産み出されているのかを、多種多様な遺伝子やタンパク質間、そしてウイルス因子との相互作用における協調的ネットワークの解明を通じて明らかにする事を目的とする。

B. 研究方法

ゲノムネットワークの解明には SNP タイピング結果の結合だけでなく、HBV 感染に関わる臨床情報の新規および既知のデータを統合し、それら多様な情報を一元的に提供することが求められる。そのため、情報技術者と生命科学者の協同体制により研究を進める必要がある。ネットワーク情報システムの構築にあたっては、国際 DNA 配列データバンク(DDBJ/EMBL/GenBank:INSD)として長年培われてきた生命情報データベース構築に関する経験と知識を用いつつ、ヨーロッパ、アメリカ合衆国との INSD 活動で得られた国際性を利用して開発したプラットフォームを利用する。更に、別のプロジェクトで行われている技術を取り込むことにより、データ統合の質的向上を図り、かつ我が国独自の研究基盤を構築する。

(倫理面への配慮)

今後ネットワーク解析を行う際データを使用するために、データを取得している各参加機関、さらに分担者が所属する国立遺伝学研究所の研究倫理審査委員会に申請を行っている。

C. 研究結果

平成 23 年度は、解析に必要となるゲノムワイド SNP タイピングデータ、臨床情報、サンプル情報等を取得する為の準備期間だった。そのため、国立国際医療研究センターおよび東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室が共同で進めている、検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行った。

D. 考察

来年度以降に取得される予定のゲノムワイド SNP タイピングデータを用いたネットワーク解析の方法に関して、予備的検討を行いたい。

E. 結論

来年度以降は、取得が予定されているデータを用いたネットワーク解析を行う。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Fukuchi S, Hosoda K, Homma K, Gojobori T, Nishikawa K. Binary classification of protein molecules into intrinsically disordered and ordered segments. *BMC Struct Biol*. 2011 Jun 22; 11(1):1-29.

2) Barrero RA, Keeble-Gagnère G, Zhang B, Moolhuijzen P, Ieko K, Tateno Y, Gojobori T, Guerrero FD, Lew-Tabor A, Bellgard M. Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics*, 2011 Jun 24;12(328): 1-17.

3) Bousquet J, Anto JM, Sterk PJ, Adcock IM, Chung KF, Roca J, Agusti A, Brightling C, Cambon-Thomsen A, Cesario A, Abdelhak S, Antonarakis SE, Avignon A, Ballabio A, Baraldi E, Baranov A, Bieber T, Bockaert J, Brahmachari S, Brambilla C, Bringer J, Dauzat M, Ernberg I, Fabbri L, Froguel P, Galas D, Gojobori T, Hunter P, Jorgensen C, Kauffmann F, Kourilsky P, Kowalski ML, Lancet D, Pen CL, Mallet J, Mayosi B, Mercier J, Metspalu A, Nadeau JH, Ninot G, Noble D, Oztürk M, Palkonen S, Préfaut C, Rabe K, Renard E, Roberts RG, Samolinski B, Schünemann HJ, Simon HU, Soares MB, Superti-Furga G, Tegner J, Verjovski-Almeida S, Wellstead P, Wolkenhauer O, Wouters E, Balling R, Brookes AJ, Charron D, Pison C, Chen Z, Hood L, Auffray C. Systems medicine and integrated care to combat chronic noncommunicable diseases. *Genome Med*. 2011 Jul 6; 3(7):43: 1-12.

4) Taniya T, Tanaka S, Yamaguchi-Kabata Y, Hanaoka H, Yamasaki C, Maekawa H, Barrero RA, Lenhard B, Datta MW, Shimoyama M, Bumgarner R, Chakraborty R, Hopkinson I, Jia L, Hide W, Auffray C, Minoshima S, Imanishi T, Gojobori T. A prioritization analysis of disease association by data-mining of functional annotation of human genes. *Genomics*, 2012 Jan;99(1): 1-9.

5) Kodama Y, Mashima J, Kaminuma E, Gojobori T, Ogasawara O, Takagi T, Okubo K, Nakamura Y. The DNA Data Bank of Japan launches a new resource, the DDBJ Omics Archive of functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan; 40(Database issue):D38-42.

6) Kobayashi Y, Suzuki Y, Ito T, Ito F, Gojobori T, and Sakai T. Evolutionary history of dog rabies in Brazil. *J of General Virology* 2011; 92: 85-90..

7) Hatin W, Nur-Shafawati A, Zahri M, Xu S, Jin L, Tan S-G, Rizman-Idid M, Zifalil, B, Gojobori T., and others. Gene dosage imbalance of human chromosome 21 in mouse embryonic stem cells differentiating to neurons. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18312 (1-5).

### 2. 学会発表

1) 五條堀 孝 (2011)「組織からの発現 RNA 網羅的解析とデータベース化」、会合「組織バンク設立のための検討会」、筑波大学（茨城県つくば市）4月22日

2) T. Gojobori (2011) “Vision from Data-intensive Life Science: Genome Information-oriented Society”, High Level Symposium to Commemorate CODATA’s 45th Anniversary, CEODE Headquarters, Beijing, China, 10月30日

3) T. Gojobori (2011) “Theme 4: Large-scale analysis of life data, Sub Theme D: Meta-genomic analysis and comparative genomic analysis”, HPCI 戦略プログラム分野1：全体ワークショップ、理化学研究所（埼玉県和光市）12月4日

4) T. Gojobori (2012) “Genome Research with Big Data – How can we make “data driven scientific discovery” possible?–” (Keynote speech) 国際シンポジウム「Genome Research」（東京農業大学ゲノム解析センター開催）、品川コクヨホール（東京）1月21日