

取得した。また、臨床情報、検体を用いた研究の妥当性につきあらかじめ申請し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た内容について検討した。

C. 研究結果

症例の内訳：B 群は 195 例(42.2%)、C 群は 138 例(29.9%)、BC 群は 13 例(2.8%)、NBNC 群は 116 例(25.1%)であった。

NBNC 群の臨床病理学的特徴

1. 患者因子

B 群、NBNC 群では年齢 (56.1 ± 9.5 , $67.9 \pm 9.3^*$)に有意差を認めたが、T.Bil (0.8 ± 0.4 , 0.8 ± 0.3), Alb (4.1 ± 0.4 , 4.1 ± 0.4), ICG R15 (15.2 ± 9.9 , 15.4 ± 8.5 %), 男女比 (164:31, 104:12)は同様に分布していた。

2. 肉眼的腫瘍因子

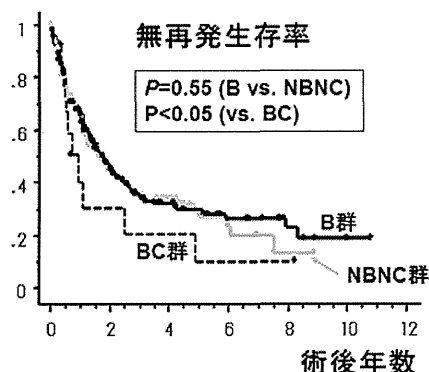
肝硬変の合併例は B 群で 45%、NBNC 群で 22%であった($p < 0.05$)。腫瘍最大径は B 群で 5.7 ± 4.4 cm、NBNC 群で 7.0 ± 4.5 cm であった($p < 0.05$)。血中 AFP, AFP-L3 分画、PIVKA-II、腫瘍個数は両群間に有意差を認めなかった。

3. 組織学的腫瘍因子

分化度、組織学的門脈浸潤、静脈浸潤、肝内転移は B 群、NBNC 群間で有意差を認めなかった。

4. 切除成績

BC 群が無再発生存率・累積生存率とも有意に不良であった。NBNC 群と B 群の予後は同等であった。



HBV 既感染症例の臨床病理学的特徴

5. 患者因子、腫瘍因子、予後

NBNC 群を HBV 既感染の有無で分類すると、n (66, 39)年齢 (67.2 ± 9.2 , 70.7 ± 9.8),

T.Bil (0.8 ± 0.4 , 0.7 ± 0.3), Alb (4.1 ± 0.4 , 4.0 ± 0.4), ICG R15 (16.0 ± 8.5 , 15.9 ± 9.1 %), 男女比 (58:8, 36:3)であり、有意な変化を認めなかった。患者因子(血中 AFP, AFP-L3, 肝硬変合併率)、腫瘍因子(腫瘍最大径、腫瘍個数、腫瘍肉眼型、組織学的分化度、組織学的門脈侵襲、組織学的静脈侵襲)、予後(無再発生存、累積生存)に有意差を認めなかった。

D. 考察

HBV 既感染、発癌、再発について、今回の検討では因果関係を見出せなかった。糖尿、アルコール多飲の合併と肝硬変、発癌、再発について更なる解析が必要であろう。また、いわゆるオカルト HBV と HBV 既感染、発癌、再発の関係を明らかにすることも今後の課題であろう。

今後、B, BC, NBNC の各群における無再発生存、累積生存に深く関与すると考えられる、肝癌再発、異時性発癌、肝線維化、肝硬変の進展を病理組織学的に解析し、遺伝子発現プロファイルと比較することにより、B 型肝炎に特異的な病態進行のメカニズムを明らかにすることが求められる。

今回は標的分子を見出せなかったが、今後、絞り込まれた時に機能解析を行うために、HepG2 細胞に任意の遺伝子を強発現あるいはノックダウンし得る tet-on, tet-off 系を構築した。薬剤添加の有無により、tet-off 系では強発現、発現停止を繰り返し行える。tet-on 系に sh-RNA の発現ベクターを構築すると、薬剤を添加時にのみ Sh-RNA が発現し、内因性の転写活性を阻害できる。すなわち、任意の遺伝子を自由に制御し得る。機能解析の対象を炙り出すことが喫緊の課題である。

E. 結論

NBNC 群の患者、腫瘍、組織学的因子は B 群と近似した。HBV 既感染は糖尿、アルコール多飲と同様に NBNC 群の最も多い併存病態であり、肝発癌や悪性度への関与が推測されるが、NBNC 群の再発、生存に有意な影響を与えなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Kakisaka T, Tsuruga Y, Todo S, Taketomi A. Analysis of the risk factors for early death due to disease recurrence or progression within 1 year after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. World J Surg Oncol; 2012 Jun 14;10:107
- 2) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa JI, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. Hepatology 2013 (In press)

2. 学会発表

- 1) 第 111 回日本外科学会定期学術集会 柿坂達彦、神山俊哉、中西一彰、横尾英樹、蒲池浩文、田原宗徳、谷口雅彦、松下通明、藤堂 省：「混合型肝癌 10 例の臨床病理学的検討」

- 2) 第 23 回日本胆肝膵外科学会・学術集会 中西一彰、神山俊哉、横尾英樹、柿坂達彦、田原宗徳、蒲池浩文、松下通明、藤堂省：「下大静脈・右心房に進展した原発性肝癌に対する外科治療」
- 3) 第 112 回日本外科学会 川俣 太、蒲池浩文、西原広史、永生高広、本間重紀、高橋典彦、神山俊哉、藤堂省、武富紹信：「胆管癌における Mesothelin 発現の免疫組織学的検討」
- 4) 第 112 回日本外科学会 横尾英樹、神山俊哉、中西一彰、柿坂達彦、敦賀陽介、若山顕治、蒲池浩文、武富紹信：「R0 をめざした局所進行肝内胆管癌の外科治療戦略」

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 24 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：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

分担研究課題：IL28B 遺伝子多型と B 型慢性肝炎の病態および治療応答性との関連についての検討

研究要旨：B 型肝炎ウイルス持続感染者の病態を規定する宿主要因は不明であり、抗ウイルス治療効果の規定要因は明らかではない。HCV に対するインターフェロン治療効果を規定する IL28B 遺伝子多型が HBV においても治療効果と関連するかは検討課題である。本研究では、B 型肝炎における肝線維化進展や抗ウイルス治療反応性を規定する宿主要因を検討することを目的とするが、本年度は臨床検体の収集と、Peg-interferon 治療例における IL28B 遺伝子と治療反応性との関連の検討を行なった。Peg-interferon を投与した 40 例のうち、DNA が最終できた 26 例の B 型慢性肝炎を対象として、IL28B 遺伝子 SNP rs8099917 をタイピングし、臨床像との関連性を検討した。GG minor type は 3.8%、TG hetero type は 15.4%、TT major type は 80.8%であった。肝線維化進行例（F3-4）の頻度、Core Promoter 遺伝子変異は IL28B と関連しなかった。Peg-interferon 治療による 12 週時点で、HBV DNA の減衰は TG/GG の+0.2 Log に対し TT では-2.2 Log、コア関連抗原の減衰は、TG/GG では-0.15 Log に対し TT では-0.24 Log、HBs 抗原量の減衰は、TG/GG の-0.01 Log に対し TT では-0.24 Log であり、0.5 Log 以上の HBs 抗原量の減少が得られた 4 例は全例が TT であった。B 型慢性肝炎においても、IL28B 遺伝子多型が Peg-interferon 治療効果を規定する可能性がある。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス持続感染者の病態は、HBe セロコンバージョンに伴い肝炎が鎮静化し臨床的治癒状態となる非活動性キャリアから、慢性肝炎が持続し肝硬変、肝細胞癌に進展する症例まで極めて多彩であり、このような病態を規定する要因については専らウイルス遺伝子変異から検討されてきたが、病態を規定する宿主要因は不明である。また、抗ウイルス治療である核酸アナログは 90%以上の症例で HBVDNA が陰性化するため治療効果に個人差はないと想定されてきたが、HBVDNA が陰性化した症例の中でも長期継続治療により HBs 抗原が消失する症例は 10 年で 10%であり、その規定要因は明らかではない。インターフェロン治療により HBe セロコンバージョンが

得られる症例は 30%だが、HCV に対するインターフェロン治療効果を規定する IL28B 遺伝子多型が HBV においても治療効果と関連するかは、検討課題である。本研究では、B 型肝炎における肝線維化進展や抗ウイルス治療反応性を規定する宿主要因を検討することを目的とするが、本年度は臨床検体の収集と、Peg-interferon 治療例における IL28B 遺伝子と治療反応性との関連の検討を行なった。

B. 研究方法

B 型慢性肝炎に対して Peg-interferon を投与した 40 例のうち、DNA が最終できた 26 例を対象として、IL28B 遺伝子 SNP rs8099917 をタイピングし、臨床像との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

当院 IRB で承認された臨床研究計画に基づき、宿主遺伝子解析について書面で説明し、同意を得ることができた症例に置いてのみ解析を行った。

C. 研究結果

26 例中 GG minor type は 1 例 3.8%、TG hetero type は 4 例 15.4%、TT major type は 21 例 80.8%であった。

肝線維化進行例 (F3-4) の頻度は、TG/GG では 40%、TT では 9.5%、Core Promoter 遺伝子変異は TG/GG では 60%、TT では 76%であった。

HBe 抗原陽性例における HBe 抗原量の減衰は、12 週時点で TG/GG では -0.32 Log、TT では -0.30 Log と同等であった。-0.5 Log 以上の減少は、TG/GG では 25%、TT では 22%に得られ、差が見られなかった。

HBV DNA の減衰は、12 週時点で TG/GG では +0.2 Log であったのに対し、TT では -2.2 Log であり、2.0 Log 以上の減少が得られた 9 例は全例が TT であった。

コア関連抗原の減衰は、12 週時点で TG/GG では -0.15 Log であったのに対し、TT では -0.24 Log であり、1.0 Log 以上の減少が得られた 2 例は両者とも TT であった。

HBs 抗原量の減衰は、12 週時点で TG/GG では -0.01 Log であったのに対し、TT では -0.24 Log であり、0.5 Log 以上の HBs 抗原量の減少が得られた 4 例は全例が TT であった。

D. 考察

Peg-interferon 治療の 12 週時点における治療反応性をウイルス量の変化から解析すると、HBV DNA、コア関連抗原、HBs 抗原量のいずれも TT において TG/GG よりも高度の減衰が得られていた。さらに症例数を積み重ねて解析する必要があるが、IL28B 遺伝子多型が Peg-interferon 治療効果を規定する可能性がある。核酸アナログにおける治療反応性についても、同様に検討する必要がある。

E. 結論

B 型慢性肝炎においても、IL28B 遺伝子多型が Peg-interferon 治療効果を規定する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M & Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet 2012; 13:47.
- 2) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K & Mizokami M. Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. PLoS One 2012; 7:e39175.

2. 学会発表

- 1) 第 48 回 肝臓学会総会 シンポジウム 1 「B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の HBs 抗原と発癌に対する効果」
- 2) JDDW2012 パネルディスカッション 「東アジアにおける B 型肝炎発癌予測モデルの有用性：日本人に基づくデータマイニング・モデルの国外コホート検証、および国外発癌予測スコアの日本人コホートによる検証」

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 24 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：日野 啓輔 川崎医科大学 肝胆膵内科学 教授
研究協力者：仁科 惣治 川崎医科大学 肝胆膵内科学 助教
横須賀 収 千葉大学大学院 消化器・腎臓内科 教授
今関 文夫 千葉大学総合安全衛生管理機構 教授
田中 靖人 名古屋市立大学大学院 病態医科学講座 教授

分担研究課題：HB ワクチン応答性に関する宿主の遺伝子研究

研究要旨：本研究班の研究課題である「B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子の遺伝子解析」の一環としてHBワクチン応答性に関する宿主因子の遺伝子解析のための血液検体ならびに臨床データを収集する。今年度は川崎医科大学倫理委員会の承認を得て、川崎医科大学附属病院ならびに川崎医科大学の新規入職職員、医学部生および川崎病院全職員の血液検体の収集を行っている。さらに、千葉大学ならびに名古屋市立大学の協力も得て血液検体を収集する予定であるが、両大学においては現在倫理委員会へ研究承認を申請中である。

A. 研究目的

本研究班の研究課題である「B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子の遺伝子解析」の一環としてHBワクチン応答性に関する宿主因子の遺伝子解析のための血液検体ならびに臨床データを収集する。

B. 研究方法

平成 24 年度 HB ワクチン接種対象者（事前採血で HBs 抗原陰性、HBs 抗体陰性を確認された、川崎医科大学新規入職職員（65 名）、川崎医科大学医学部生（120 名）および川崎医科大学附属川崎病院職員（約 200 名））に対し、HB ワクチン 3 回目接種時に本研究の同意を得たうえで、遺伝子解析用採血を行う。HB ワクチン応答性は通常 90～95%程度であることを考慮すると、HB ワクチン不応答者の検体が非常に少ないことが予想される。そこで川崎医科大学で平成 21 年～23 年度に HB ワクチン接種歴のある医学部生ならびに教職員のうち、HBs 抗体陰性者に対して同意を得た後に同様に、遺伝子解

析用採血を行う。

さらに、研究協力機関である千葉大学と名古屋市立大学においても倫理委員会申請後に遺伝子解析用採血を行う。

（倫理面への配慮）

研究方法に記載したように本研究の内容について当該機関の倫理委員会の承認を得た後に、文書での同意を得て遺伝子解析用採血を行う。

C. 研究結果

現在、血液検体収集中ならびに倫理委員会申請中であり、研究結果はない。

D. 考察

HB ワクチン応答性はHBs抗体獲得できるか否かで明確に判定できるため、HB ワクチン不応答者の検体数がある程度確保できれば、HB ワクチン応答性を規定する宿主遺伝子の同定が実現できる可能性は高いと予想される。

E. 結論

HB ワクチン応答性に関する宿主因子の遺伝子解析のための血液検体ならびに臨床データを収集する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Keisuke Hino, Sohji Nishina, Yuichi Hara
Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: insights from recent evidence. Clin J Gastroenterol 2012;5:251-6.
- 2) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K.
No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.

BMC Med Genet

2012;13;4710.1186/1471-2350-13-47.

- 3) Matsui M, Motoki Y, Inomoto T, Miura D, Kato Y, Suenaga H, Hino K, Nojima J.
Temperature-related effects of adenosine triphosphatase-activated microglia on pro-inflammatory factors. Neurocrit Care 2012;17;293-300.

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

C 型慢性肝炎治療効果予測のための検査方法及び検査用キット 特許 5070552 号 加藤宣之、池田正徳、是永匡紹、日野啓輔

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 24 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：坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科 消化器内科学分野 教授

分担研究課題：HB 感染集積家系における宿主因子の探索：北海道における家族内感染

研究要旨：本分担研究で我々は、同一家系内に集積する慢性HBV感染者を対象にGWASおよび全エクソーム解析を実施し、B型慢性肝炎発症およびB型肝炎ウイルス排除に関わる新しい宿主遺伝要因を探索することである。現在対象者の検索および臨床データ、検体の収集調査を行い、DNA 検体収集の準備を進めている。本研究の成果により B 型肝炎の自然経過に関連するあらたな宿主遺伝子多型が見いだされる可能性がある。

A. 研究目的

日本全国におけるB型肝炎ウイルスキャリア率（HBs抗原陽性率）は1.3%であるが、北海道のそれは2.4%と高率であることが知られている。HBV感染母体からの垂直感染によるHBVキャリアは20歳代までにセロコンバージョンを来し臨床的治癒に向かう症例（85%）と、慢性肝炎に移行し、肝硬変・肝臓癌に発展する症例(15%)に二分される。これまで日本人を含むアジア人サンプルを用いたGWASから、HBV慢性感染の経過に関連する遺伝子多型として、HLA-DPA1, -DPB1が同定されている(Kamatani et al. 2009)。しかしそのオッズ比は低く他の宿主遺伝要因が存在することは明らかである。

本分担研究の目的は、同一家系内に集積する慢性HBV感染者を対象にGWASおよび全エクソーム解析を実施し、B型慢性肝炎発症およびB型肝炎ウイルス排除に関わる新しい宿主遺伝要因を探索することである。

B. 研究方法

1. 家系調査と検体収集：HBV 多発家系内の症例を中心に臨床データ、検体の収集調査を行う。
2. 既知の遺伝子関連解析：
HLA-DPA1/DPB1/DQ (Kamatani, Nat Gen 2009; Nishida, Plos One 2012)
3. 探索的遺伝子解析：慢性感染、肝発癌、

肝線維化進展に関連する遺伝子のスクリーニング、絞り込みを行う。

C. 研究結果

HBV 慢性感染多発家系内の症例を中心に臨床データ、検体の収集調査を行い、HBV 感染 21 家系、3 人以上の HBV 陽性兄弟 9 家系を同定した。現在臨床情報の収集および、DNA 検体収集の準備を進めている。

D. 考察

現在 B 型肝炎関連 SNP として HLA-DP が同定されているが、本研究では HLA を共有する同一家系間で生じる異なった HBV 感染臨床像の患者を対象にすることによりあらたな関連遺伝子多型が同定される可能性がある。

E. 結論

本研究の成果により B 型肝炎の自然経過に関連するあらたな宿主遺伝子多型が見いだされる可能性があり、引き続き症例情報の集積を遂行する。

F. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka Y, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K,

- Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; Epub ahead of print.
- 2) Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, Sakamoto N, Tanaka Y, Nakamura M. Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(2):250-260.
- 3) Kobayashi T, Hige S, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Ogawa K, Chuma M, Sakamoto N, Asaka M: Anemia and thrombocytosis induced by ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012; 47(11):1228-1237.
- 4) Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. *Hepatology* 2012; 55(1):20-29.
2. 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

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 24 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：楠本 茂 名古屋市立大学大学院医学研究科腫瘍免疫内科学 講師

分担研究課題：B 型肝炎ウイルス再活性化に関連する遺伝子解析の検体収集・臨床情報収集

研究要旨：がん化学療法・免疫抑制療法後のB型肝炎ウイルス再活性化に関連する遺伝子解析を行い、再活性化リスク因子を同定することを目的とする。再活性化リスクの高い患者集団である、抗CD20モノクローナル抗体リツキシマブ＋ステロイド併用悪性リンパ腫例を対象として遺伝子解析用の検体および臨床情報収集を検討した。
現在進行中の多施設共同前方視的研究（UMIN000001299）に参加している全国68施設にアンケート調査（回答率94%）を行い、94例のde novo B型肝炎発症例を把握し、うち57例（60.6%）でヒト遺伝子研究への同意取得可能見込みであった。
26年度はプロトコール作成および検体・臨床情報収集を行う予定である。

A. 研究目的

がん化学療法・免疫抑制療法後の B 型肝炎ウイルス再活性化に関連する遺伝子解析を行い、再活性化リスク因子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

平成24年8月より、徳永班HBV再活性化担当として参加し、リツキシマブ＋ステロイド併用化学療法中の悪性リンパ腫例におけるHBV再活性化（de novo B型肝炎）リスク因子解明のため、GWAS（genome-wide association study）を含むヒト遺伝子解析研究を行うための徳永班・溝上班共同プロジェクトの立ち上げを計画した。先立ち実行可能性を検討するため、アンケート調査を行った。

（倫理面への配慮）

アンケート調査項目において患者の特定されない内容に限定した。

C. 研究結果

現在進行中の多施設共同前方視的研究（UMIN000001299）に参加している全国 68 施設にアンケート調査（回答率 94%）を行

い、94 例の de novo B 型肝炎発症例を把握し、うち 57 例（60.6%）でヒト遺伝子研究への同意取得可能見込みであった。

D. 考察

同意取得困難な理由として、リンパ腫再発による原病死、転院、および劇症肝炎による死亡が挙げられた。また、同プロジェクト参加への主な問題点として、1）ヒト遺伝子研究審査に時間がかかる、審査機関がない。2）再活性化症例がない、少数例であることが挙げられた。

E. 結論

26 年度はプロトコール作成および検体・臨床情報収集を行う予定である。

F. 研究発表

平成 24 年度において特記事項なし

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 24 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：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

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析

研究要旨：MICA多型及び分泌型MICAのHBV陽性肝癌の発症リスクや予後に与える影響について検討した。その結果、HBV陽性肝癌の発症リスクと相関する事、またMICAの遺伝子多型と分泌型MICA値が有意な相関を示すことを明らかとした。さらに分泌型MICA陽性肝癌症例では、予後が不良であった。以上の結果よりMICAが予後マーカーであるだけでなく、治療標的としても有望であることが示された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析を通して、疾患の発症リスク予測や発癌メカニズムの解明を行う。

B. 研究方法

MICA多型及び分泌型MICAのHBV陽性肝癌の発症リスクや予後に与える影響について検討した。解析に用いた症例は、HBV陽性肝癌症例407例、慢性B型肝炎症例699例、健常人コントロール5679症例である。SNP rs2596542のタイピングは、イルミナGeneCHIP、インベーター法、タックマン法にて行った。統計解析には、Cochran-Armitage trend testを用いた。また111名のHBV陽性肝癌患者血清を用いて血清中のsMICAをELISA法にて測定した。sMICAと遺伝子多型及び予後との関連解析にはKruskal-Wallis test, log-rank testを用いた。

（倫理面への配慮）

本解析に用いた症例は全て、インフォームドコンセントを取得済みで、また各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

上記の解析によって、rs2596542がHBV

陽性肝癌の発症リスクと関連を示すことが明らかとなった。さらにrs2596542とsMICA値も関連を示した。またsMICAが高値の肝癌症例では予後が不良であった。

D. 考察

rs2596542とsMICAについてはHCV陽性肝癌と同様の結果であり、遺伝子多型がMICAの発現制御に重要であることが示された。一方、HCV陽性肝癌とHBV陽性肝癌とではリスクアレルが逆転しており、この原因としては、MICAの存在状態が関与すると推測される。膜型ではNK細胞を活性化することによって癌抑制遺伝子として機能するのに対し、分泌型はdecoy receptorと機能することで、NK細胞の活性を抑制することが報告されており、癌化を促進すると考えられる。HBV陽性肝癌では様々なMMPが活性化しており、その結果分泌がの寄与が高くなるため、リスクアレルが逆転する結果になったと考えられる。

E. 結論

本解析の結果、MICA多型及び分泌型MICAが慢性B型肝炎及びHBV陽性肝癌患者の予後因子として有用であることが明らかとなった。上記の結果より、MICAに対する抗体がHBV陽性肝癌の治療標的となりうることを示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. PLoS One. 2012;7(9):e44743. Epub 2012 Sep 14.
- 2) A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. J Hepatol. 2013 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024.

2. 学会発表

- 1) Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma. ISVHLD 2012 25th June 2012 (Invited speaker).
- 2) 遺伝子から分かる癌になりやすい体質

とは 山梨県立中央病院 がん拠点病院
勉強会 26th July 2012

- 3) Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma KSLM 16th Oct 2012 (Invited speaker).
- 4) ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索ー病気になりやすい体質とは？ー第2回 Diabetes and endocrinology Forum 29th Nov 2012 (招待講演)
- 5) 発癌関連遺伝子解析 10年のあゆみ「オーダーメイド医療実現化プロジェクト 10年間の歩みと未来への一歩」28th Jan 2013 (Invited)
- 6) GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis JCA-AACR joint symposium 25th Feb 2013 (Invited)
- 7) MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 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

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 24 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：西田 奈央 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
上級研究員

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染患者群のゲノム解析

研究要旨：B型肝炎ウイルスに感染した宿主側の病態促進因子及び薬剤応答性を規定する遺伝要因の解明を目的として、約60万種類のSNPを対象としたゲノムワイド関連分析を実施する。今年度は、日本人健常者全418検体を対象として、3つのゲノムワイドSNP解析用プラットフォームを用いた解析が終了した。これらの解析データをImputation解析における参照配列として用いることで、ゲノムワイド関連解析でB型肝炎慢性化に関わる関連遺伝子や、病態進展に関わる遺伝子の探索での取りこぼし（擬陰性関連）を防ぐことが可能になると期待される。また、本研究で決定した日本人の参照配列は、本研究のみならずヒト疾患研究においても有用な情報になるとなることから、論文報告後に公開データベースに登録する予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象としたゲノムワイド関連分析を行うことにより、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主（ヒト）因子、治療効果に寄与する宿主因子、ウイルス感染感受性に寄与する宿主因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

以下の手順でサンプルの準備からゲノム解析まで実施した。

- (1) 各研究参加施設で採取した血液サンプルは連結可能匿名化した後、SRLにおいてゲノムDNAの抽出を行う。DNA・血清サンプルはSRLから国際医療研究センターへ送られ、同センター内に一括保管される。
- (2) 各研究参加施設で収集された患者情報は連結可能匿名化された後、国際医療研究センターへ送られ、患者データベース構築に使用される。
- (3) 上記の患者情報をもとに、(A) HBV持続感染、(B) HBV繊維化進展、(C) HBV関連

肝癌、(D) HBV再活性化、(E) HBV重症化(劇症化)、(F) 薬剤応答性、(G) ワクチン応答性、(H) HBV家族内感染の8グループに分類し、DNAサンプルと患者情報にゲノム解析用のIDを付与する。また、比較対照群として健常群500例を目標として収集する。(4) 二重匿名化したDNAサンプルと患者情報は、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野へ搬送された後、同施設において約60万SNPが搭載されたAXIOM Genome Wide ASI Array Plates (Affymetrix)を用いたゲノムワイドSNP解析を実施する。AXIOM Genome Wide Array Platesは、アジア系集団での解析に適した約60万か所のSNPが搭載されている。(5) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野が所有する連結不可能匿名化された日本人健常群420検体をAXIOM Genome Wide ASI Array Platesでタイピングし、本研究における日本人健常対照群として用いる。(6) ゲノムワイド関連解析で使用しなかった検体は、続くReplication study（再現性確認）において使用する。

(倫理面への配慮)

本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言（平成 20 年 10 月修正）を遵守する。かつ、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）、およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 17 年 6 月 29 日一部改正）に則って本研究を実施するものとする。研究遂行者の供与される情報は、個人識別情報を除き供与される。即ち、連結可能匿名化とする。個人情報に関しては、個人情報識別管理者（国府台病院：管理課長、国立国際医療研究センター病院：企画戦略室長）をおき、情報管理には細心の注意を払う。また、患者個人識別情報と検体との対応表は、独立の鍵が掛かる場所に厳重に保管する。さらに、個人情報の管理をパソコンで行う場合には、当該パソコンをネットに連結することなく単独で使用し、独立の鍵の掛かる場所に厳重に保管する。

C. 研究結果

本年度の研究結果を以下にまとめる。

- (1) 日本人健常群 420 検体を対象として、約 240 万種の SNP を搭載した Illumina Human OMNI2.5-8 BeadChip を用いたゲノムワイド SNP タイピングを実施した。同一の 420 検体について、約 90 万種の SNP を搭載した Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 によるゲノムワイド SNP タイピングも完了した。昨年度にデータ取得を終えた Affymetrix AXIOM ASI array（約 60 万種の SNP を搭載）によるゲノムワイド SNP 解析データと合わせて、日本人集団のゲノム構造を解析するために必要となるデータ取得を完了した。
- (2) ゲノムワイド関連解析による B 型慢性肝炎患者群、健常対照群および B 型肝炎ウイルス排除群（HBsAg 陰性、HBc 抗体陽性）の比較から、HLA-DPA1/HLA-DPB1 遺伝子が B 型肝炎の慢性化および B 型肝炎ウイルスの排除に寄与することを論文報告した。
- (3) HBV 関連肝がんに関連すると報告された KIF1B 遺伝子が日本人、韓国人、香港人では関連が再現されないことを明らかにし

た。また、この成果を論文報告した。

- (4) 日本人健常群 420 検体について、HLA タイピング（HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DPB1）を実施した。日本人健常群 420 検体の Affymetrix AXIOM ASI array の SNP データおよび HLA タイピングデータを用いて分子進化的解析を実施したところ、日本人集団において HLA-DPB1*04:01 が強い Positive selection を受けたことを明らかにした。また、この成果を論文で報告した。

- (5) GWAS 後の Replication 解析に適した DigiTag2法の技術改良を実施した。解析結果を得るまでに13時間を要していたが、技術改良により7時間で解析結果が得られるようになった。また、この成果を論文で報告した。

D. 考察

日本人健常者合計 418 検体について、合計 3 つのゲノムワイド SNP 解析用プラットフォームを用いて、約 400 万種の SNP に対する遺伝子型を決定した。これらのデータを用いて連鎖不平衡解析を実施し、日本人のゲノム構造を明らかにすることで、Imputation 解析における参照配列として用いることができる。本研究のみならず今後のヒト疾患研究において、この参照配列を用いて Imputation 解析を実施することが可能となる。

B 型慢性肝炎や HBV 排除に関わる関連遺伝子として、HLA-DP 遺伝子以外の新しい遺伝子を発見することはできていない。Imputation 解析により検出される新たな候補遺伝子を対象とした Replication 解析を実施することが来年度の目標となる。

Replication 解析で用いるタイピング手法の一つである DigiTag2 法の技術改良を実施したことで、今後の Replication 解析をより短時間で終了することが可能となった。

E. 結論

本研究において、ゲノムワイド SNP 解析は約 60 万種の SNP が搭載された AXIOM Genome Wide ASI Array Plates を使用するが、

精度の高い日本人の参照配列を用いて Imputation 解析を実施することで、ゲノムワイド SNP 解析において真の疾患関連 SNP を取りこぼすことなく検出することができるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. 2012;7(1):e29967
- 2) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 2012
- 3) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One. 2012;7(6):e39175
- 4) Kawashima M, Ohashi J, Nishida N, Tokunaga K. Evolutionary Analysis of Classical HLA Class I and II Genes Suggests That Recent Positive Selection Acted on DPB1*04:01 in Japanese Population. PLoS One. 2012;7(10):e46806

2. 学会発表

- 1) 西田奈央、ウイルス性肝炎にみる宿主因子とウイルス因子、日本人類遺伝学会 第 57 回大会、京王プラザホテル、2012
- 2) 西田奈央、田中靖人、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、徳永勝士、溝上雅史、日本人および韓国人における 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 16 回日本肝臓学会大会、神戸、2012
- 3) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Asako Koike, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, The associations of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance are widely replicated in East-Asian populations, 61th Annual ASHG Meeting, San Fransisco, 2012
- 4) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Meta-analysis identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in East-Asian populations, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2012, Boston, 2012
- 5) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Investigating the novel host genetic factors associated with treatment response for HCV patients, The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", KEIO Plaza Hotel, 2012
- 6) 馬渡頼子、西田奈央、中伊津美、徳永勝士、溝上雅史、DigiTag2 法における PCR プライマー設計パラメータの検証、第 35 回日本分子生物学会年、福岡、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

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 24 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：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
研究協力者：高柳 彩 東京大学大学院医学系研究科 大学院生

分担研究課題：HLA-DP の機能解析

研究要旨：日本人を含む東アジア人集団を対象としたゲノムワイド関連解析(GWAS)により、B型肝炎慢性化に関わる最も大きな遺伝要因が*HLA-DPA1*、*DPB1*遺伝子領域内の多型であることが近年明らかにされた。このことは、HLA-DPタンパク質によるHBV由来ペプチド断片の提示と、HLA-DPアレル間のペプチド提示能の違いがB型肝炎慢性化の進行に大きく関与することを示唆する。本研究の目的は、慢性B型肝炎抵抗性アレルHLA-DPB1*04:01, *04:02タンパク質が結合するHBs抗原ペプチドを同定し、HBVウイルス排除に関わるウイルスエピトープを推測することである。具体的には分担研究者らが既に確立したHLA-ペプチド結合測定系を用いて、慢性B型肝炎抵抗性HLA-DPアレル(HLA-DPB1*04:01, *04:02)がアレル特異的に結合するHBs抗原ペプチドをHBs抗原ペプチドライブラリーより探索する。

A. 研究目的

B型肝炎慢性化及びウイルス排除に関連する最も強い遺伝要因は6番染色体短腕HLA領域中の*HLA-DP*遺伝子領域である(Kamatani, et al. (2009) *Nat. Genet.*; Nishida, et al. (2012) *PLoS One*)。東アジア集団で高頻度に存在する*HLA-DPB1**05:01はB型肝炎慢性化と強く関連し、ヨーロッパ集団で最も高頻度に存在する*HLA-DPB1**04:01, *04:02はB型肝炎慢性化抵抗性と強く関連する。これらの知見はHLA-DPを介したHBVウイルス排除のメカニズムが、B型肝炎慢性化及びHBV持続感染罹患率の地域差を生じる主要因であることを強く示唆する。しかし、B型肝炎慢性化におけるHLA-DPタンパク質の役割はこれまで明らかではない。本研究では、慢性B型肝炎抵抗性アレル(HLA-DPB1*04:01, *04:02)産物がHBs抗原の一部の領域をアレル特異的に提示し抵抗性を獲得している可能性に着目し、HLA-DPが結合するHBs抗原ペプチドを同定する。

B. 研究方法

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アレル、および、関連を示さない中立性アレル（HLA-DPA1*01:03, *02:01, *02:02, HLA-DPB1*02:01, *03:01, *04:01, *05:01, *09:01）の安定発現株を哺乳類繊維芽細胞株を用いて作成した。また、HLA-DRアレルと陽性コントロールペプチドを用いて、HLA-ペプチド結合測定系を確立した。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

解析対象とするHLA-DPアレルについて、安定発現株を作成し、HLA-DP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。

HLA-ペプチド結合測定系の構築を、HLA-DRタンパク質および、結合親和性既知の15-merペプチド複数種類を用いて行った。HLAタンパク質はβサブユニットC末端にHisタグを付加し、哺乳類繊維芽細胞株を用いて組換えタンパク質として発現した。安定発現株から界面活性剤可溶性分画を調整し、これを96well NTA-Ni コート

プレート上でインキュベートし HLA タンパク質を His タグを介してプレート上に固定した。さらに陽性コントロールペプチドを用いて HLA-ペプチド結合反応を行った。種々の条件検討（固定化タンパク質量・反応時間・バッファー組成・界面活性剤等）を行い、反応条件を最適化した。

H25 年度は、HBs 抗原タンパク質の全長配列(preS1)を基にペプチドライブラリを作成し、上述の組換え HLA-DP タンパク質及び HLA-ペプチド結合測定系を用いて、DP タンパク質が結合する HBs 抗原ペプチドを同定する。これらの解析により、慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性との関連と、HBs 抗原提示能との間の関係性を明らかにする。

D. 考察

HLA-DP を介した HBs 抗原提示と T 細胞応答については先行研究が少数報告されているが、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。また、HLA-DP タンパク質は他の HLA クラス II タンパク質と比較して発現量が低いことが知られており、HLA-DP が HBV 感染防御に寄与する機構は不明である。

慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性 HLA-DP アリルは 31 α 、51 α (DPA1)、84-87 β (DPB1)等の残基に特徴的な多型を持つ。これらの残基はペプチド P1 アンカー残基の選択性に影響を与えうするため、感受性・抵抗性 HLA-DP アリル群間では、ペプチド結合レパトアが顕著に異なる可能性がある。

今後、HLA-DPB1*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 抗原ペプチド領域を同定し、B 型肝炎慢性化のメカニズム、及び、東アジア集団における HBV 持続感染のメカニズム解明を目指したい。

E. 結論

慢性 B 型肝炎感受性及び抵抗性に関連する HLA-DP アリルの組換えタンパク質安定発現株を作成した。また、HLA-ペプチド結合測定系を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士

Peptide binding studies on HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B in East Asian population

第 16 回国際 H L A ワークショップ、第 26 回欧州組織適合性学会合同大会

2012 年 6 月 1 日 英国・リバプール

2) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士

慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析

第 21 回日本組織適合性学会大会

2012 年 9 月 15 日 東京

3) 高柳彩、宮寺浩子、徳永勝士

Functional analysis of HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B

第 41 回日本免疫学会学術集会

2012 年 12 月 7 日 神戸

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 24 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：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域 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トランスクリプトーム解析

研究要旨：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、B型肝炎ウイルス感染の病態や療法に対する反応性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。また、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型慢性肝炎（CH-B）、B型肝炎（HCC-B）およびC型慢性肝炎（CH-C）、C型肝炎（HCC-C）の肝組織を用い、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解析、ネットワーク解析を行った。Graphical Gaussian modeling(GGM)により、非癌部での遺伝子変化と癌部での遺伝子変化の関連性が明らかとなった。CH-BではDNA修復・機能未知遺伝子がHCC-BのAP1シグナルと関連し、CH-Cではケモカイン・インターフェロンシグナルとHCC-CのEGR1シグナルと関連していた。非癌部における遺伝子変化は肝癌発症と関連していると考えられた。

A. 研究目的

B型肝炎の病態の進展や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、B型肝炎ウイルス感染の病態や療法に対する反応性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

本年度は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た。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例の肝組織を用いた。またレーザーキャプチャー・マイクロダイセクシ

ョン（LCM）法により門脈領域の浸潤リンパ球（cells in the portal area (CPA)）と肝小葉領域細胞（cells in liver lobules (CLL)）を別々に採取し、領域特異的遺伝子発現のプロファイリングを検討した。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った。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した。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した。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た。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間で、MetaCoreツールにより既存の遺伝子間の相互関係を検証した。

（倫理面への配慮）

本研究において試料提供者、その家族・

血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

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、LCM解析からCPA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CLL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った。遺伝子クラスター間の関連をMetaCoreにて既報の遺伝子間関連と照合すると、非癌部でのこれらの遺伝子発現と癌部でのEGR1遺伝子の関連性が示唆された。癌部ではEGR1シグナルが細胞増殖・代謝シグナルを制御していた。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DNA修飾に関わる遺伝子や機能未知の遺伝子群であった。これらの遺伝子群は癌部でのAP1遺伝子の発現と関連しており、癌部に於ける多くの遺伝子がAP1シグナルの制御を受けていた。さらに興味深いことにAP1を含む遺伝子クラスター内にHBVの転写産物が含まれて

おり、AP1の活性化にHBVが関与している可能性が示唆された。慢性肝炎から肝癌へと経過を追えた症例に於いて、非癌部でのこれら癌化誘導遺伝子の発現は、その後の肝癌の発症と密接に関連していることが明らかとなった。

D. 考察

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。今後の、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る。

E. 結論

B型慢性肝炎、肝癌ならびにC型慢性肝炎、肝癌での遺伝子発現は異なっており、GWAS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た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Ueda T, Honda M, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai S, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. Genomics. in press
- 2) Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Hodo Y, Honda M, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S. Clinical Cancer Research. in press
- 3) Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T,