

- (3) 楠本茂：癌化学療法による B 型肝炎ウイルス再活性化の対策と問題点 医学のあゆみ 437-442 頁 242 巻 5 号 (医歯薬出版株式会社) 2012 年 8 月
- (4) 楠本茂、田中靖人：多発性骨髄腫治療における B 型肝炎ウイルス再活性化のリスクとその対策 医学のあゆみ 1051-1056 頁 242 巻 13 号 (医歯薬出版株式会社) 2012 年 9 月
- (5) 楠本茂、田中靖人：de novo B 型肝炎の臨床的重要性 264-270 頁 Medical Practice 30 巻 2 号 (文光堂) 2013 年 2 月
- (6) 楠本茂：造血器腫瘍における B 型肝炎再活性化の現状 360-367 頁 最新医学 68 巻 3 号 (最新医学社) 2013 年 3 月
2. 学会発表
- (1) Kusumoto S, Tanaka Y, Susuki R, et al.: Prospective nationwide observational study of hepatitis B virus (HBV) DNA monitoring and preemptive antiviral therapy for HBV reactivation in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma following rituximab containing chemotherapy: results of interim analysis. Poster presentation, in 54th ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA/ December 8-11, Blood. 2012 Nov; 120 (21): abstract 2641.
- (2) 楠本茂、田中靖人、溝上雅史： B 細胞性リンパ腫治療における、月 1 回の HBV-DNA モニタリングは HBV 再活性化による肝炎発症対策として有用である JDDW2012 肝 PD1-3 2012 年 10 月 神戸
- (3) 楠本茂、田中靖人、田中榮司、溝上雅史：リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中の B 型肝炎ウイルス再活性化のリスク 第 48 回日本肝臓学会総会 WS11-2 2012 年 5 月 金沢
- (4) 楠本茂、田中靖人、溝上雅史：HBV-DNA モニタリングによる、リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中の B 型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する多施設共同前方視的観察研究：中間解析結果 第 99 回日本消化器病学会総会 W3-6 2013 年 3 月 鹿児島
- (5) 楠本茂：造血器腫瘍に対する化学療法中の HBV 再活性化対策 第 74 回日本血液学会学術集会 コーポレートセミナー 2012 年 10 月 京都
- (6) Mori F, Kusumoto S, et al.: Potent antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human ATL mouse model 第 74 回日本血液学会学術総会, 口演発表 (OS-1-103), 京都, 2012.
- (7) Masaki A, Kusumoto S, et al.: Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOG mouse model. 第 74 回日本血液学会学術総会, 口演発表 (OS-2-110), 京都, 2012.
- (8) Susuki T, Kusumoto S, et al.: Successful treatment of Guillain-Barre syndrome following allogeneic bone marrow transplantation. 第 74 回日本血液学会学術総会, ポスター発表 (PS-2-302), 京都, 2012.
- (9) Totani H, Kusumoto S, et al.: Reactivation of hepatitis B virus infection in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 74 回日本血液学会学術総会, ポスター発表 (PS-2-356), 京都, 2012.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
該当事項なし
 2. 実用新案登録
該当事項なし
 3. その他
該当事項なし

固形がんに対する化学療法施行時の B 型肝炎の再活性化の早期予測に関する検討

研究分担者：池田公史	国立がん研究センター東病院 肝胆膵内科
研究協力者：伊藤清顕	愛知医科大学 消化器内科
大川和良	大阪府立成人病センター 肝胆膵内科
大崎往夫	大阪赤十字病院 消化器内科
楠本 茂	名古屋市立大学 腫瘍・免疫内科学
工藤正俊	近畿大学 消化器内科
熊田 卓	大垣市民病院 消化器科
近藤俊輔	国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科
土井俊彦	国立がん研究センター東病院 消化器内科
灘野成人	四国がんセンター 肝胆膵内科
古瀬純司	杏林大学 内科学腫瘍科

研究要旨：固形がんに対する化学療法施行時の B 型肝炎ウイルス (HBV) の再活性化は、B 型肝炎表面抗原 (HBs 抗原) 陽性例ではあらゆる癌腫で報告があり、その割合は 10-40%前後であるが、HBs 抗原陰性で B 型肝炎表面抗体 (HBs 抗体) または B 型肝炎コア抗体 (HBc 抗体) HBs 抗体陽性例からは、まとまった報告は限られている。本研究班では、固形がんに対する化学療法において、HBs 抗原陽性例、HBs 抗原陰性で HBc 抗体または HBs 抗体陽性例からの HBV の再活性化の実態と早期予測の可能性について検討する。固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化に関する多施設共同観察研究において、登録された 389 例を 1 年間、経過観察したのち、高感度 HBV DNA 測定法を用いて、早期に HBV の再活性化が予測できるかどうかを検討する。

A. 研究目的

化学療法施行時に、肝炎ウイルスが再活性化し、時には劇症化する報告が最近、散見されている。B 型肝炎ウイルス (HBV) の再活性化は、リツキサソ併用化学療法などでよく報告され、最近ではエベロリムスなどの分子標的治療薬での HBV の再活性化の報告も見られるようになり、化学療法施行時の肝炎ウイルスの再活性化が、注目されるようになった。固形がんに対する化学療法施行時の HBV の再活性化は、B 型肝炎表面抗原 (HBs 抗原) 陽性例ではあらゆる癌腫で報告があり、その割合は 10-40%前後であるが、HBs 抗原陰性で B 型肝炎表面抗体 (HBs 抗体) または B 型肝炎コア抗体 (HBc 抗体) HBs 抗体陽性例からは、まとまった報告は限られている。本研究班では、固形がんに対する化学療法において、HBs 抗原陽性例、HBs 抗原陰性で HBc 抗体または HBs 抗体陽性例からの HBV の再活性化の実態と早期予測について検討する。

B. 研究方法

固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化に関する多施設共同観察研究において、登録された 389 例を 1 年間、経過観察したのち、高感度 HBV DNA 測定法を用いて、早期に HBV の再活性化が予測できるかどうかを検討する。

C. 研究結果

固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化に関する多施設共同観察研究において、症例集積を行い、2012/05/31 で 389 例が登録され、症例集積を終了した。その内訳は、HBs 抗原陽性例が 39 例、HBs 抗原陰性で HBc 抗体または HBs 抗体陽性例が 347 例 (症例報告書未回収 3 例) であった。これまでに、HBs 抗原陽性例から 5 例、HBs 抗原陰性で HBc 抗体または HBs 抗体陽性例から 3 例の再活性化が報告されている。今後、389 例を 1 年間、経過観察した後、固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化の現

状を明らかにする。また、HBV の再活性化の早期予測因子となる可能性のある項目として、高感度 HBV DNA の測定を行い、再活性化が早期に予測可能かどうかを検証する。

D. 考察

高感度 HBVDNA 検出系として、現在、国立国際医療研究センターで開発している新規核酸抽出法と新規 PCR 検出法を組み合わせることで高感度化させることが可能である。予備的な結果では、4 コピー/mL を検出することが出来るため、早期に再活性化予備群を捉え、囲い込むことが出来ると考えられる。また、高感度 HBV 抗原検出系の開発も進めている。特異性の高い抗体を独自に複数取得しており、それらに化学発光系、化学蛍光系の検出反応を組み合わせることで高感度化させる。抗原検出系のほうが HBVDNA 検出系よりも安価に利用できることから、完成した際のメリットは大きい。この高感度 HBV DNA の測定系にて HBV の再活性化の早期予測の検討の意義は大きいと考える。

E. 結論

固形がんに対する化学療法施行時の HBV 再活性化の早期予測を目的として、高感度 HBV DNA 測定法を用いて、早期に HBV の再活性化が予測できるかどうかを、今後、検証する予定である。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

- 1) Ikeda M. Reactivation of Hepatitis B Virus in Patients Receiving Chemotherapy. Jpn J Clin Oncol 2013 Jan;43(1):8-16.
- 2) Hagiwara S, Sakurai T, Nishina S, Tanaka K, Ikeda M, Ueshima K, Minami Y, Inoue T, Yada N, Kitai S, Takita M, Nagai T, Hayaishi S, Arizumi T, Park AM, Munakata H, Nishida N, Kudo M. Characteristic Pattern of Reactivation of Hepatitis B

Virus during Chemotherapy for Solid Cancers. Dig Dis. 2012;30(6):541-6.

- 3) Shiba S, Kondo S, Ueno H, Morizane C, Ikeda M, Okusaka T. Hepatitis B Virus Reactivation during Treatment with Multi-Tyrosine Kinase Inhibitor for Hepatocellular Carcinoma. Case Rep Oncol. 2012;5(3):515-9.

2. 学会発表

- 1) 池田公史. がん治療による B 型肝炎ウイルス再活性化と対策. 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2012/07/28 大阪
- 2) 池田公史. 化学療法施行時の B 型肝炎の再活性化-現状と対策 JDDW2012 肝臓学会 2012/10/11 神戸
- 3) 池田公史. 化学療法により再活性化する B 型肝炎-どう対応すべきか?- 第 50 回日本癌治療学会学術集会 2012/10/25 横浜
- 4) 新家卓郎、熊田卓、桐山勢生、谷山誠、久永康宏、豊田秀徳、金森明、多田俊史、安東直人、安田論、坂井圭介、木村純、安藤祐資、山本健太、曾根康博. 悪性リンパ腫に対するリツキシマブ併用化学療法における B 型肝炎再活性化の検討-ガイドライン前後の比較-. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012/06/08 金沢
- 5) 安田論、熊田卓、豊田秀徳. 抗腫瘍剤・免疫抑制剤使用時の HBV マーカーの検討. 第 16 回日本肝臓学会大会. 2012/10/10 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他

de novo B 型肝炎における HBV 遺伝子変異と予後の関連

研究分担者：梅村武司 信州大学医学部消化器内科

研究協力者：田中榮司 信州大学医学部消化器内科

研究要旨：*de novo* B 型肝炎は通常の急性 B 型肝炎より劇症化率が高く、劇症化した症例の死亡率が極めて高いことが明らかとなっているがその理由については未だ不明である。本年度は既報の劇症肝炎に関連する 9 カ所のウイルス変異について *de novo* 肝炎 16 例と急性 B 型肝炎 15 例について検討を行った。急性肝炎と比較して *de novo* 肝炎症例に高率な変異は認めなかった。*de novo* 肝炎症例の劇症化に関連のあるウイルス変異も認めなかった。来年度は全塩基配列の検討を行いウイルス側の特徴について検討を行う予定である。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアおよびその既感染者では、移植、悪性腫瘍、リウマチ・膠原病などの治療に抗腫瘍製薬、免疫抑制薬を使用すると、その使用中または使用後に HBV が再活性化して肝機能異常を起こしうる。特に、HBV 既感染者で起こるものを *de novo* B 型肝炎と称している。本邦の疫学調査から *de novo* B 型肝炎は通常の急性 B 型肝炎より劇症化率が高く、劇症化した症例の死亡率が極めて高いことが明らかとなっているがその理由については未だ不明である。本年度は *de novo* B 型肝炎の劇症化に関連するウイルス変異の有無について検討を行った。

B. 研究方法

de novo B 型肝炎 16 例 (劇症化 5 例・非劇症化 11 例) と急性 B 型肝炎 15 例 (劇症化 3 例・非劇症化 12 例) について劇症肝炎と関連があると報告されている 9 カ所のウイルス変異 (T1753V, T1754V, T1762A, G1764A, G1896A, G1899A, T1961A, C1962D, A2339G) を測定した。保存血清から DNA を抽出し PCR で増幅し、直接塩基決定法で確認した。解析はウイルス変異が *de novo* B 型肝炎の発症・劇症化に関連があるかそれぞれ検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部倫理委員会で承認されており、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

1) *de novo* B 型肝炎と B 型急性肝炎におけるウイルス変異の比較

16 例の *de novo* B 型肝炎と 15 例の B 型急性肝炎症例における 9 カ所のウイルス変異の検討を行った。*de novo* 肝炎では G1896A 変異が 9 例 (57%) と高率であったが、急性肝炎と比較して有意な差は認めなかった。(図 1)

2) *de novo* B 型肝炎症例の劇症化と関連するウイルス変異の検討

5 例の劇症化症例と 11 例の非劇症化症例について比較検討を行った。図 2 で明らかのように何れのウイルス変異も両群ではほぼ同率であり有意な差は認めなかった。

3) 劇症肝炎症例におけるウイルス変異の違い

劇症肝炎を発症した *de novo* 肝炎 5 例と急性肝炎 3 例について比較検討を行った。(図 3) 急性肝炎例では T1753V の変異を 3 例 (100%) で認めているが *de novo* 肝炎例では 1 例も認めておらず有意な差を認めた。

4) 非劇症化症例におけるウイルス変異の違い

次いで、劇症肝炎にならなかった *de novo* 肝炎 11 例と急性肝炎 12 例について比較検討を行った。(図 4) 急性肝炎症例で G1896A が 6/12 (50%) と *de novo* 肝炎症例 1/11 (9%) と比較して高率であったが $P=0.069$ と差は認めなかった。

D. 考察

9カ所のウイルス変異の検討では急性B型肝炎と比較してde novo B型肝炎に高率に存在する変異はなかった。さらに、*de novo* B型肝炎の劇症化症例に特徴的な変異は認めなかった。劇症化症例の検討では急性肝炎ではde novo肝炎と比較してT1753V変異の比率が高かった。

E. 結論

9カ所のウイルス変異の検討では*de novo* B型肝炎の劇症化に関連する変異は認められなかった。来年度は全塩基配列の決定を行い、その特徴について検討を行う予定である。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

2. 学会発表

梅村武司、城下智、田中榮司 本法における*de novo* B型肝炎症例の背景と予後 第48回日本肝臓学会総会 2012年6月 金沢

梅村武司、田中榮司 *De novo* B型肝炎におけるHBV遺伝子変異と予後との関連 第16回日本肝臓学会大会 2012年10月神戸

Umemura T, Ota M, Katsuyama Y, Joshita S, Kiyosawa K, Tanaka E, and the Japan *de novo* hepatitis group. Viral Factors of Patients with Fulminant Hepatic Failure Due to Hepatitis B Virus Reactivation from HBsAg-negative Status AASLD 2011, Boston, USA, 2012.11.

G. 知的財産権の出願・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

図1 *de novo*肝炎と急性肝炎におけるウイルス変異の比較

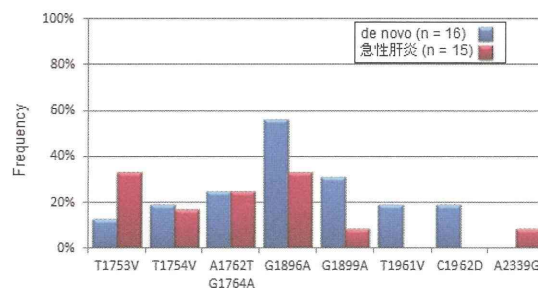


図2 *de novo*肝炎の劇症肝炎発症例におけるウイルス変異の違い

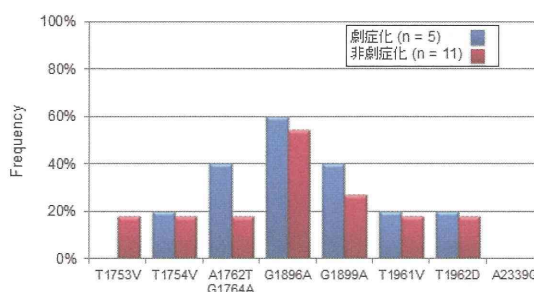


図3 劇症肝炎症例におけるウイルス変異の違い

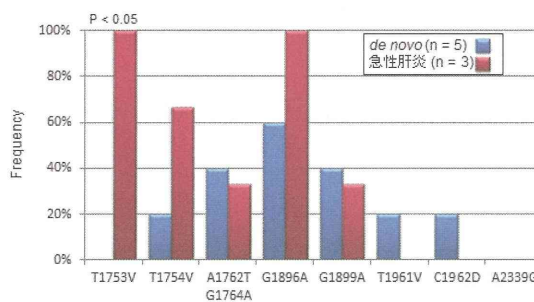
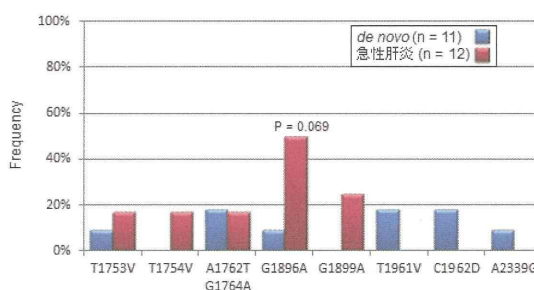


図4 非劇症肝炎症例におけるウイルス変異の違い



免疫を主にしたワクチン応答性

研究分担者：村田一素 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

研究要旨：本研究は、B型慢性肝炎の病態に関わるウイルス要因と宿主要因を本研究班にて解明した後に、免疫学的に検証することを目的としている。よって、GWAS結果が出るまでは研究を開始できないため、現在待機中である。

A. 研究目的

GWASにて得られた結果を免疫学的に検証する。

B. 研究方法

HBVワクチン接種6か月後のHBs抗体価が10mU/ml未満であった健康成人および年齢・性をマッチさせたHBs抗体が高値を示す(>100mU/ml)健康成人を対象にDNA、血清、リンパ球(PBMC)を採取し、ELISpot assayを用いて免疫学的解析を行う。なお、免疫学的解析にはGWASおよびHLA-peptide matching解析の結果を用いる。

C. 研究結果

GWASの結果待ち。

D. 考察

GWASの結果待ち。

E. 結論

GWASの結果待ち。

F. 研究発表(本研究に関わるもの)

1. 論文発表

(1). Zeissig S, Murata K, Sweet L, Publicover J, Hu Z, Kaser A, Bosse E, Hussain MM, Balschun K, Rocken C, Arlt A, Gunther R, Hampe J, Schreiber S, Baron JL, Moody DB, Liang TJ, Blumberg RS. Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective

immunity. *Nat Med* 2012;18:1060-1068.

(2) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2012;42:958-965.

(3) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2012; 56: 1448-1456.

(4). Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN-λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2012 (*in press*)

(5) 村田一素. B型肝炎ウイルス感染における宿主免疫応答の重要性 -特にNKT細胞の関与について-. *肝臓* 2013;54:7-18.

2. 学会発表

The 22th conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver
Feb 16-19, 2012 in Taipei PP07-005

(1). Ultrasensitive assay for genotyping of hepatitis B virus by use of an automated DNA extraction instrument. Kirikae I, Ito K, Mukaide M, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. PP08-021

(2). Risk factors for long-term persistence of serum HBsAg following acute hepatitis B virus infection in Japan. Ito K, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M. PP10-017

(3). Core promoter mutations specific for hepatitis B virus genotype D1 regulating viral replication. Sugiyama M, Sato S, Tanaka Y, Ito K, Murata K, Masaki N, Nakanishi M, Mizokami M. PP13-121

(4). Induction of interleukin-28B by ex vivo stimulation of peripheral blood mononuclear cells predicts the efficacy of pegylated interferon- α /ribavirin therapy in chronic hepatitis C Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Ito K, Imamura M, Masaki N, Mizokami M

The 20th United European Gastroenterology Week Oct 20-24, 2012, Amsterdam, Netherlands

(5). Hepatocyte lipid antigen presentation and natural killer cell activation as central regulators of the immune response against hepatitis B virus. Zeissig S, Murata K, Sweet L, Publicover J, Hu Z, Kaser A, Arlt A, Schreiber S, Baron JL, Moody DB, Liang TJ, Blumberg RS.

第 48 回 日本肝臓学会総会 (6 月 7 日～6 月 8 日、金沢)

(6). C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法における個別

化医療～多施設前向き研究からの考察～
正木尚彦、杉山真也、田中靖人、伊藤清頭、村田一素、青木孝彦、斉藤紘昭、松井哲平、今村雅俊、溝上雅史

(7). C 型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用. 杉山真也、平峯 智、西田奈央、伊藤清頭、村田一素、正木尚彦、宇都浩文、井戸章雄、坪内博仁、溝上雅史

(8). Toll-like receptor 7 agonist 刺激による末梢血リンパ球 IFN- α 3 誘導とその臨床的意義
村田一素、杉山真也、溝上雅史

The 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases (ISVHLD)
June 22-25, 2012, Shanghai International Convention Center

(9). Capacity of IFN-lambda3 production in PBMC determine the response to Peg-IFN/RBV treatment. Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Masashi Mizokami

第 16 回 肝臓学会大会 (JDDW 2012) (10 月 10 日～12 日、神戸)

(10). IL28B 遺伝子多型による治療効果予測不一致に寄与する宿主因子の検討
村田一素、杉山真也、溝上雅史

(11). 高齢 C 型慢性肝疾患における IL28B 測定と治療選択の現状. 是永匡紹、村田一素、溝上雅史

The 62th annual meeting of the American association for the study of liver diseases
Nov 9-13, 2012 in Boston

(12). Human BDCA3+ dendritic cells in blood and in the liver are a potent producers of IFN- α in response to hepatitis C

(13). Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara

T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T

(14). Interferon- β 3 determines response to pegylated interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C. Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Mizokami M

(15). Anti-interferon- β neutralizing antibodies interact with viral responses to interferon in patients with hepatitis C virus infection bearing interferon sensitive IL28B single nucleotide polymorphisms. Korenaga M, Korenaga K, Nishina S, Yoshioka N, Tomiyama Y, Hara Y, Sugiyama M, Nao Nishida, Murata K, Masaki N, Mizokami M, Hino K

(16). Meta-analysis identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in east-Asia populations

Nishida N, Tanaka Y, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Sugiyama M, Murata K, Korenaga M, Masaki N, Han KH, Tokunaga K, Mizokami M

The 10th JSH Single Topic Conference
“Hepatitis C: Best Practice Based on Science”
Nov 21-22, 2012 in Tokyo

(17). Different amount of IFN- β 3 determines the outcome of Peg-IFN/RBV therapy in HCV patients

(18). Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Mizokami M

(19). Human BDCA3+dendritic cells are a main producer of IFN- β and induce ISGs in response to Hepatitis C virus. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Hiramatsu N, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T,

Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T

(20). Anti-interferon- β neutralizing antibodies affect to viral responses to interferon in patients with hepatitis C virus infection bearing interferon sensitive IL28B SNPs. Korenaga M, Korenaga K, Nishina S, Yoshioka N, Tomiyama Y, Hara Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M, Hino K

第 39 回日本肝臓学会東部会 Dec 6-7、グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール

(21). HBV 遺伝子組み込みアデノウイルスを用いた B 型急性肝炎発症機序の検討
村田一素、T. Jake Liang、溝上雅史

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他

B型肝炎ウイルス再活性化例における HLA-DP の解析

研究分担者：宮寺 浩子 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野
研究協力者：高柳 彩 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

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 アリル間のペプチド提示能の違いが B型肝炎慢性化に関与することを示唆する。本研究は、慢性 B型肝炎抵抗性アリル *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を目的に行う。

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*)。B型肝炎慢性化と強く関連する *HLA-DPB1*05:01* は東アジア集団に高頻度に存在し、B型肝炎慢性化抵抗性と最も強く関連する *HLA-DPB1*04:01*、**04:02* はヨーロッパ集団で最も高頻度に存在する *DPB1* アリルである。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示唆する。B型肝炎ウイルス排除における 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型肝炎抵抗性アリル (*HLA-DPB1*04:01*、**04:02*)産物が提示する HBs 抗原ペプチドを、HLA-DP タンパク質を用いたペプチド結合アッセイ、T細胞アッセイによって同定する。

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*) の安定発現株を哺乳類繊維芽細胞株を用いて作成した。HLA-ペプチド結合測定系を HLA-DR アリルと陽性コントロールペプチドを用いて確立した。

C. 研究結果

B型肝炎慢性化に対する抵抗性 (*HLA-DPA1*01:03-DPB1*04:01*、**04:02*)、感受性 (*HLA-DPA1*02-DPB1*05:01*) 及び、弱い関連～中立性を示すアリル (*HLA-DPB1*02:01*、**03:01*、**09:01*) cDNA をマウス繊維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて導入し、安定発現株を作成した。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-DP タンパク質は発現量が HLA-DR と比較して低いと考えられているが、少なくとも *DPB1*05:01*、**09:01* 等については、発現誘導なしで高い細胞表面発現を示したため、これらのアリル産物はタンパク質として安定であると考えられる (図1)。

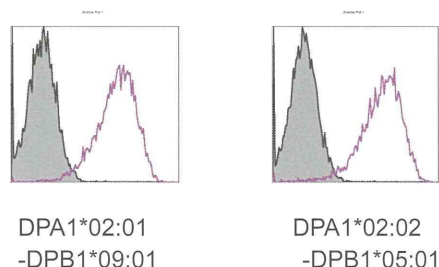


図1 DPA1-DPB1 安定発現株における細胞表面 DP 発現

また、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 HLA-ペプチド結合測定系を確立した。HLA-DRB1 タンパク質の C 末端に His タグを用いて確立した。

付加し、哺乳類繊維芽細胞株を用いて発現した。安定発現株を大量培養、発現誘導を行った後、界面活性剤可溶性分画を調整した。可溶性分画を NTA-Ni コートプレート上でインキュベートし HLA-DR タンパク質を His タグを介してプレート上に固定した。DR タンパク質に結合することが既知の陽性コントロールペプチドをビオチン標識ペプチドとして合成し、蛍光標識アビジンを用いて、HLA-DP タンパク質へのペプチドの結合を検出した。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、種々の条件検討を行い、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) を基に合成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。さらに、T 細胞エピトープ同定、HLA テトラマーの作成等により、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 (図 2)。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るため (図 3)、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、抵抗性 HLA-DP 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。

	alpha 1 domain											alpha 2 domain					
	1	2	3	4	5	6	7	11	31	50	83	111	127	160	228		
DPA1*0103	I	K	A	D	H	V	S	A	M	Q	T	K	L	F	T		
DPA1*0201	I	K	A	D	H	V	S	A	Q	R	A	R	P	V	P		
DPA1*0202	not sequenced							M	Q	R	A	R	P	V	P		

Association at DPB1	Prevalence in %	beta 1 domain																			beta 2 domain				
		8	9	11	35	36	55	56	57	65	69	76	84	85	86	87	88	170	178	205					
Protective	3-5%	DPB1*0402	L	F	G	F	V	D	E	I	K	M	G	G	P	M	R	T	M	V					
Protective	3-5%	DPB1*0401	L	F	G	F	A	I	A	E	I	K	M	G	G	P	M	R	T	M	V				
Protective/Neutral	22-24%	DPB1*0201	L	F	G	F	V	D	E	I	E	M	G	G	P	M	R	T	L	V					
Protective/Neutral	4-6%	DPB1*0202	L	F	G	L	V	E	A	E	I	E	M	G	G	P	M	R	T	L	V				
Neutral	3-4%	DPB1*0301	V	Y	L	F	V	D	E	D	L	K	V	D	E	A	V	K	I	L	V				
Risk-Neutral	38-39%	DPB1*0501	L	F	G	L	V	E	A	E	I	K	M	G	G	P	M	R	T	L	V				
Risk-Neutral	8.7-12%	DPB1*0901	V	H	L	F	V	D	E	D	I	E	V	D	E	A	V	K	I	L	V				
	-0.20%	DPB1*1301	V	Y	L	Y	A	A	A	E	I	E	I	D	E	A	V	K	I	L	V				
	-0.20%	DPB1*1401	V	H	L	F	V	D	E	D	L	K	V	D	E	A	V	K	I	L	V				

図 2

慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性・中立性 DPA1, DPB1 アリル間のアミノ酸多型

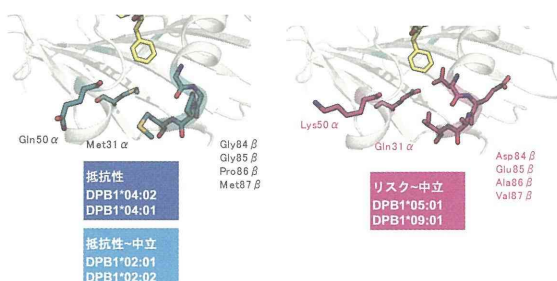


図 3

慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性 DPA1, DPB1 アリル間のアミノ酸多型 (P1 アンカー近傍) PDB: 3lqz を基に作成した。

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(本研究に関わるもの)

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HLA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

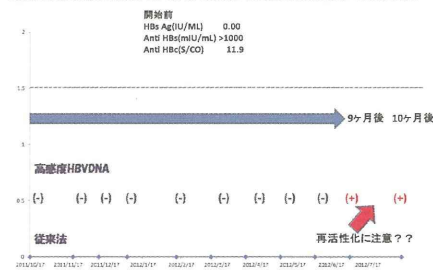
Functional analysis of HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B

第 41 回日本免疫学会学術集会

2012 年 12 月 7 日 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

観察後期に高感度HBVDNAが連続して検出された症例（再活性化-）



D. 考察

再活性化症例を、早期に発見するためには、従来法よりも高感度なHBVDNA測定系を用いる事が有用である。検出されたHBVDNAよりウイルス側要因（pre core 変異、core promoter 変異等）を検索することが可能になり、増殖要因が高い症例にのみ、抗ウイルス剤を投与することが可能になると考えられる。本測定法にて症例を積み重ね、更に宿主側の増殖因子を組み合わることで、再活性化症例、更には劇症化症例を予測できる可能性があり、強いては、現在の抗ウイルス剤予防投与症例を減少させ、医療費減少に貢献できると考える。

E. 結論

HBV 超高感度測定系を構築し、従来法より約 10 倍感度を上昇させることに成功した。高感度系陽性のみで再活性化予測は困難であるが、HBVDNA の検出により、従来法では検討不可能なウイルス変異測定が可能となり、更に宿主因子(HLADPB1)を加えることで予測効率を上昇させることが考慮された。

F. 健康危険情報

特記すべき情報なし

G. 研究発表（本研究関連のみ）

1. 論文発表

英文

- (1) Nishida N, Korenaga M, Mizokami M. et al. 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.

- (2) Sawai H, Korenaga M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet. 2012 Jun 19;13:47.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

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
横田和浩, <u>三村俊英</u>	リウマチ性疾患-再発性多発軟骨炎	門脇孝/永井良三	カラー版内科学	西村書店	東京	2012	1293-1294

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
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, <u>Korenaga M</u> , Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, <u>Mizokami M</u> .	Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean.	PLoS One.	7(6)	e39175	2012
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	No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.	BMC Med Genet.	13	47	2012

K, Itoh Y, Mita E, <u>Korenaga M</u> , Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, <u>Mizokami M</u> , Tokunaga K.					
Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, <u>Mizokami M</u> .	Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt.	J Med Virol.	84(4)	587-95	2012
Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, <u>Mizokami M</u> , Hou J.	Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China.	PLoS One.	7(6)	e38241	2012
Hamaoka K, Nagoshi S, Sugawara K, Naiki K, Uchida Y, Inao M, Nakayama N, Fujiwara K, <u>Mochida S</u> .	SNPs in the Promoter Region of Osteopontin Gene as a Possible Host Factor for Sex Difference in Hepatocellular Carcinoma Development in Patients with HCV.	Hepatol Int	In press		2013
Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, <u>Mochida S</u> , Onishi S, Tsubouchi H	Etiology and Prognosis of Fulminant Hepatitis and Late Onset Hepatic Failure in Japan: Summary of the Annual Nationwide Survey between 2004 and 2009	Hepatol Res	43	97-105	2013
Harigai M, <u>Mochida S</u> , Mimura T, Koike T, Miyasaka N	A Proposal for Management of Rheumatic Disease Patients with Hepatitis B virus Infection Receiving Immunosuppressive Therapy.	Mod Rheumatol	Epub ahead of print		2012

Sugawara K, Nakayama N, <u>Mochida S.</u>	Acute Liver failure in Japan: Definition, Classification, and Prediction of the Outcome.	J Gastro- enterol	47	849-861	2012
Nakayama N, Oketani M, Kawamura Y, Inao M, Nagoshi S, Fujiwara K, Tsubouchi H, <u>Mochida S.</u>	The Algorithm to Determine the Outcome of Patients with Acute Liver Failure; a Data Mining Analysis Using Decision Trees.	J Gastro- enterol	47	664-677	2012
Yokota K, Miyazaki T, Hemmatazad H, Gay RE, Kolling C, Fearon U, Suzuki H, <u>Mimura T</u> , Gay S, Ospelt C.	The Pattern-Recognition Receptor NOD1 Promotes Production of Inflammatory Mediators in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts.	Arthritis Rheum.	64	1329-133 7	2012
Asanuma YF, Shimada Y, Kouzu N, Yokota K, Nakajima K, Sato K, Akiyama Y, Isozaki M, Mikami AS, Kobayashi H, <u>Mimura T.</u>	Serum osteoprotegerin concentration is associated with carotid atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis.	Mod Rheumatol.	Epub ahead of print		2012
Nakajima R, Sakai F, <u>Mimura T</u> , Tokuda H, Takahashi M, Kimura F.	Acute- or Subacute-Onset Lung Complications in Treating Patients with Rheumatoid Arthritis.	Can AssocRadiol J.	Epub ahead of print		2012
Ota M, Sakamoto M, Sato K, Yoshida Y, Funakubo Asanuma Y, Akiyama Y, Yamakawa M, <u>Mimura T.</u>	Immunopathological analysis of Erdheim-Chester disease with massive ascites.	Intern Med.	51	2825-283 0	2012
Oketani M, <u>Ido A</u> , Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, <u>Mochida S</u> , Ohnishi S, Tsubouchi H;	Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the	Hepato Res.	43 (2)	97-105	2013

	annual nationwide survey between 2004 and 2009.				
Oketani M, <u>Ido A</u> , Uto H, Tsubouchi H;	Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy.	Hepatol Res.	42 (7)	627-636	2012
Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayabashi M, Saitoh S, <u>Ikeda K</u> , Kobayashi M, Kumada H..	Long-term efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection in Japan	J Gastroenterol	47	814-822	2012
Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, <u>Ikeda K</u> , Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H..	Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naive chronic hepatitis B patients	J Hepatol	57	508-514	2012
Mori N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, <u>Ikeda K</u> , Kobayashi M, Kumada H.	Determinants of the clinical outcome of patients with severe acute exacerbation of chronic hepatitis B virus infection	J Gastroenterol	47	1022-1029	2012
<u>Ikeda K</u> , Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H.	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B	Hepatol Res	1872-034	In press	2012

Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H.	Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study	J Gastroenterol	10.1007/0535-012-0688-7	In press	2012
Susuki T, Kusumoto S, et al.	Successful salvage therapy using lenalidomide in a patient with relapsed multiple myeloma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Int J Hematol		in press	2013
Ishida T, Kusumoto S, et al.	Stevens-Johnson Syndrome associated with mogamulizumab treatment of Adult T-cell leukemia/lymphoma.	Cancer Sci.		in press	2013
Sato F, Kusumoto S, et al.	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model.	Leuk Res.	37	21-7.	2013
Susuki S, Kusumoto S, et al.	Tax is a potential molecular target for immunotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma.	Cancer Sci.	103	1764-73.	2012
成田朋子、楠本茂ら	ダサチニブおよび同種末梢血幹細胞移植にて長期寛解を得た、イマチニブ抵抗性の慢性骨髄性白血病急性転化	臨床血液		印刷中	2013
楠本茂、田中靖人	リンパ腫治療時の B 型肝炎ウイルス再活性化	内科	110	267-270	2012
楠本茂	癌化学療法による B 型肝炎ウイルス再活性化の対策と問題点	医学のあゆみ	242	437-442	2012
楠本茂、田中靖人	多発性骨髄腫治療における B 型肝炎ウイルス再活性化のリスクとその対策	医学のあゆみ	242	1051-1056	2012
楠本茂、田中靖人	de novo B 型肝炎の臨床的重要性	Medical Practice	30	264-270	2013

楠本茂	造血器腫瘍における B 型肝炎再活性化の 現状	最新医学	68	360-367	2013
Ikeda M	Reactivation of hepatitis B virus in patients receiving chemotherapy.	Jpn J Clin Oncol.	43 (1)	8-16	2013
Hagiwara S, Sakurai T, Nishina S, Tanaka K, Ikeda M, Ueshima K, Minami Y, Inoue T, Yada N, Kitai S, Takita M, Nagai T, Hayaishi S, Arizumi T, Park AM, Munakata H, Nishida N, Kudo M.	Characteristic pattern of reactivation of hepatitis B virus during chemotherapy for solid cancers.	Dig Dis.	30(6)	541-6	2012
Shiba S, Kondo S, Ueno H, Morizane C, Ikeda M, Okusaka T.	Hepatitis B Virus Reactivation during Treatment with Multi-Tyrosine Kinase Inhibitor for Hepatocellular Carcinoma	Case Rep Oncol.	5(3)	515-9	2012
Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T	Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing.	PLos One	7(4)	e35052	2012
池田公史	免疫抑制・化学療法に より発症する B 型肝炎 の再活性化	がん分子標 準的治療	10 (2)	60-65	2012
池田公史	化学療法により再燃 する B 型肝炎対策～ どう対応するべきか ～	Abbott NEWS	5 月号		2012
池田公史	化学療法により発症 する感染対策 : B 型肝炎	Tips on Oncology	1	8-11	2012
池田公史	固形がん領域におけ る B 型肝炎再活性化 の現状	最新医学	68 (3)	379-384	2013