

201320005A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 26 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳永 勝士

平成 26 (2014) 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 人類遺伝学分野 徳永 勝士)
(資料)別紙1 研究体制 ----- 7

II. 分担研究報告

1. 臨床検体及び付帯情報の収集 ----- 9
(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 ----- 12
(国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 五條堀 孝)
3. ウイルス因子の解析 ----- 14
(国立感染症研究所 脇田 隆宇)
4. 当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討 ----- 17
(国立病院機構長崎医療センター 八橋 弘)
5. B型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療耐性に関わる因子 ----- 20
(信州大学医学部附属病院 肝疾患診療相談センター 松本 晶博)
6. 血中HBV DNAレベルに及ぼす宿主規定因子の検討 (慢性肝炎、自然経過・肝癌)
----- 22
(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ウイルス側要因 ----- 24
(埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 持田 智)
8. 肝癌感受性遺伝子の同定 ----- 27
(東京大学大学院医学系研究科 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 -----	31
(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 -----	34
(北海道大学大学院医学研究科 消化器外科学分野 I 武富 紹信)	
11. B型慢性肝炎における線維化進展と関連する宿主遺伝子の検討-----	38
(武蔵野赤十字病院 消化器科 黒崎 雅之)	
12. HB ワクチン応答性に関する宿主の遺伝子研究 -----	40
(川崎医科大学 肝胆膵内科学 日野 啓輔)	
13. 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 -----	42
(北海道大学大学院医学研究科 消化器内科 夏井坂 光輝)	
14. 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 -----	44
(名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学 楠本 茂)	
15. B型肝炎関連肝移植に対するHBV ワクチンによる抗体陽転化予測における HLA-DP の遺伝子解析の意義 -----	46
(九州大学大学院 消化器・総合外科 調 憲)	
16. B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析 -----	48
(東京大学医科学研究所 松田 浩一)	
17. B型肝炎ウイルス感染患者群のゲノム解析 -----	50
(国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター 西田 奈央)	
18. HLA-DP の機能解析 -----	53
(東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 宮寺 浩子)	
19. 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 -----	55
(金沢大学医薬保健研究域 本多 政夫)	

20. 多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発 -----	59
(統計数理研究所 間野 修平)	
21. HBV 陽性患者における HBV 遺伝子の解析及び宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響の解析 -----	62
(浜松医科大学感染症学講座 鈴木 哲朗)	
22. ウイルスマーカーの臨床的有効性評価 -----	65
(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 -----	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	83

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25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

研究協力者：澤井 裕美 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 特任助教

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. 検体・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. では各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人約3,000名に加えて、韓国人、タイ人、香港人についても検体収集を実施した。2. のゲノム解析では、1. のシステムで収集したHBV関連患者群1,356検体についてAXIOM ASI Arrayを用いたGWASを実施し、持続感染・線維化・癌化などの病態における関連候補SNPを同定した。HLA-DP多型解析では、日本人を含む東アジア集団の患者、健常者約3,200検体について大規模HLAタイピングを実施し、既報のHLAアレル以外に慢性化および病態進展と関連を示すアレルを新たに同定した。機能解析ではHLA-DPアレルの組み換えタンパク発現系を確立すると共に、HLA-ペプチド結合測定系を構築した。また、B型慢性肝炎から肝癌発症に関わる階層クラスター解析および遺伝子ネットワーク解析を行い、慢性肝炎ではDNA修復・機能未知遺伝子が肝癌のAP1シグナルと関連しており、非癌部における遺伝子変化が肝癌発症と関連する事を示した。3. では臨床データとゲノム全域SNPタイピングのデータから、臨床情報とゲノム多型の相互作用の解析手法を確立した。4. ではGWASに用いた検体のウイルスゲノム配列を決定し、肝癌要因としてC1653T、A1762T/G1764Aなど複数を同定した。

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	生命情報研究センター 特任教授
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	臨床研究センター長
松本 晶博	信州大学医学部附属病院	肝疾患診療相談センター	准教授
横須賀 收	千葉大学大学院医学研究院		研究院長
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	消化器内科学	教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部	病理学	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
黒崎 雅之	武蔵野赤十字病院	消化器科	部長
日野 啓輔	川崎医科大学	肝胆膵内科学	教授
夏井坂 光輝	北海道大学大学院医学研究科	消化器内科	助教
楠本 茂	名古屋市立大学院医学研究科	腫瘍・免疫内科学	講師
調 憲	九州大学大学院	消化器・総合外科	准教授
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	客員研究員
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・寄生虫学分野	教授
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学（ウイルス学）	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る。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、研究を実施した(別紙 1 参照)。

1. 臨床情報収集（溝上、八橋、持田、横須賀、小池、本多、松本、坂元、武富、黒崎、日野、夏井坂、楠本、調）

日本全国の研究協力施設から、サンプル(DNA および血清)を効率的に収集し、詳細な臨床情報と共に管理するシステムを構築した。新規に収集したサンプルは SRL にて DNA および血清を抽出した後に国立国際医療研究センターへ送られる。既に DNA および血清を抽出済のサンプルについては、各施設から直接国立国際医療研究センターに送られる。各施設で収集された臨床情報は、連結可能匿名化された後に国立国際医

療研究センターに送られる。

また、アジア各国との共同研究体制を整え、東京大学および国立国際医療研究センターとの MOU 契約を取り交わした。

2. ゲノム解析・機能解析（徳永、松田、西田、本多、宮寺）

(1) ゲノムワイド関連解析

新規の宿主遺伝要因を探索する事を目的として、収集した HBV 関連患者群の合計約 3,000 検体のうち、1,356 検体を対象としてゲノムワイド SNP タイピングを実施した。タイピングには Affymetrix 社の AXIOM ASI 1 Array（約 60 万種の SNP を搭載）を用いた。Overall call rate の平均は 99.41%、DishQC の平均は 0.969 となった。タイピング結果に基づいて、持続感染・繊維化・癌化などの各病態についてゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施した。

(2) 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および検証

B 型慢性肝炎(CH-B)37 例、CH-B 関連肝癌(HCC-B)17 例および 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解析を行った。また、高い相関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、クラスターを結びグラフ化することでネットワーク構築を試みた。さらに、HCC-B 及び HCC-C 各 10 症例の癌部のエクソーム解

析を次世代シーケンサーにて行った。

(3) HLA-DP タンパク質の発現系構築

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, *04:02, *05:01, *09:01) の安定発現株を哺乳類線維芽細胞株、昆虫細胞株を用いて作成した。HBs 抗原の一部の領域について合成ペプチドを作製し、HLA-DP との結合を解析した。プレート上に固相化した HLA タンパク質への標識ペプチドの結合を測定することにより、HLA-ペプチド相互作用を検出した。

3. 統計解析・情報 (五條堀、間野)

臨床情報と SNP の交互作用の網羅的解析の手続きを考察し、研究代表者らの GWAS データについて、臨床情報と全ての SNP の間の交互作用を探索した。具体的には、肝炎治療の奏功について、交互作用項のないロジスティックモデルと交互作用項のあるロジスティックモデルの尤度比を検定した。また、検出された交互作用の治療奏功における予測力の評価として、ROC 曲線の下面積の増加の意味で、交互作用の有るモデルが有意に奏功予測を改善するかどうかを検討した。

4. ウイルス因子 (脇田、田中、鈴木)

HBs 抗原陽性の肝がん患者 238 例検体と、年齢を一致させた非肝がん患者(無症候性キャリア、慢性肝炎) 171 例をコントロールとして、検体を採取、DNA 抽出、ウイルス遺伝子配列を決定し、肝がん特異的変異の有無を検索した。

(倫理面への配慮)

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。また、各々の研究分担者及び研究協力者が所属する機関においても、倫理審査委員会から承認を得たのちにサンプル収集を実施した。

C. 研究結果

1. 検体収集・臨床情報蓄積システムを利用した検体収集の実施

各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人、台湾人(健常者群および HBV 患者群)について検体収集を実施した。また、検体・臨床情報を補完するソフトウェア開発とサーバ整備も実施した。日本人検体については、全国より約 3,000 検体が収集され、そのほとんどに臨床情報(簡易)の付加が完了した。また海外検体については、合計 2,695 検体(韓国、香港、タイ、台湾)を収集した。

2-1. HBV 感染に伴う各病態の宿主遺伝要因同定を目的としたゲノムワイド関連解析

B型肝炎の慢性化に関連する宿主遺伝要因の探索を目的とし、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 523 検体をケース群、健常者群 640 検体をコントロール群として GWAS を実施した。既報の HLA-DP を含む HLA 領域で 471SNP、それ以外の領域で 58SNP が関連候補 SNP として選ばれた。また、繊維化進展に関連する遺伝要因の探索を目的とし、肝硬変患者群 211 検体をケース群、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 523 検体をコントロール群として GWAS を実施した。その結果、59SNP が関連候補 SNP として選ばれた。更に、癌化に関連する遺伝要因の探索を目的とし、HBV 陽性肝癌患者群 473 検体をケース群、無症候キャリア及び慢性肝炎患者群 516 検体をコントロール群として GWAS を実施した。その結果、110SNP が関連候補 SNP として選ばれた。

2-2. HLA-DP アリルの組換えタンパク発現系の構築

HLA-DP アリル産物 6 種類を哺乳類細胞、昆虫細胞を発現宿主として発現し、組換え HLA-DP タンパク質を得た。HBs 抗原の数カ所の領域について 10-15mer の合成ペプチドを作製し、HLA-ペプチド結合解析を行った。

2-3. 東アジア集団の大規模 HLA タイピング

日本人、韓国人、香港人、タイ人の健常者群、HBV 患者群、ウイルス排除群について検体収集を実施し(約 3,200 検体)、HLA-DPA1/DPB1 の HLA タイピングを実施した。日本人の健常者群と HBV 患者群の HLA-DPB1 アリルで関連解析を行い、*HLA-DBP1*05:01*, **04:02* で関連が見られ、先行研究と同様の結果が得られた。またそれ以外に 2 つのアリル (*DPB1*09:01*, *DPB1*02:01*) でも関連が見られ、韓国人でも同様の傾向が示された。また、慢性肝炎患者群と肝硬変および肝癌患者群の比較から、*DPB1*02:01* が病態の進展に関連する事が示された。

2-4. 遺伝子ネットワーク解析の実施

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 API 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 API シグナルの制御を受けていた。さらに興味深いことに API 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、API 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。HCC-B 及び HCC-C 各 10 症例の癌部のエクソーム解析を次世代シーケンサーにて行った結果、HCC-B 及び HCC-C 共通して Wnt シグナルの変異が認められ、HCC-B では P53/Notch シグナル、HCC-C では JNK/PI3K の経路に遺伝子変異が多い傾向が見られた。今後、トランスクリプトーム解析と併せた詳細な解析が必要と考えられた。

3. 臨床情報と SNP の相互作用解析

女性において、共変量として年齢と各 SNP の型をとり、それらの交互作用を探索したところ、SNP rs1287948 において、 $P=7 \times 10^{-8}$ と Bonferroni の多重比較の補正の下でもなお有意な交互作用が検出された。さらに、ROC 曲線の下面積を計算したところ、交互作用のないモデルでは 0.704、交互作用のあるモデルでは 0.867 であり、交互作用のあるモデルは交互作用のないモデルを DeLong の検定の意味で有意に優越した。したがって、rs1287948 と年齢の交互作用は女性における治療奏功の予測因子であると考えられた。

次に、共変量として、研究代表者らにより発見された IL28 の近傍の SNP の型と年齢を用いる場合と、さらに rs1287948 と、その年齢との交互作用を追加して用いる場合の予測力の比較を検討した。前者の ROC 曲線の下面積が 0.839 であるのに対して、後者では 0.934 であり、本研究で発見された rs1287948 を用いたモデルは、用いない既存のモデルを有意に優越した。

4. ウイルスゲノム解析

肝がん患者238例検体と、非肝がん患者171例について付帯情報を比較した結果、男性の割合と genotype C の割合が肝がん患者で有意に高かった ($p < 0.0001$)。これらの内、ウイルス遺伝子データが得られた肝がん患者156例検体と、非肝がん患者138例について解析を行った結果、A1762T/G1764A 変異が肝がん患者で有意に高かった ($p < 0.05$)。

D. 考察

本プロジェクトで構築した検体収集・臨床情報の蓄積システムを利用して検体収集を開始した。収集されたサンプルは現時点で、日本、韓国、香港、タイを合わせると約 5,700 検体にのぼり、さらに共同研究グループが約 1,300 検体を保有する。今後これらの検体は、より大規模な GWAS やその結果の検証に用いることが期待される。また、B 型肝炎慢性化・ウイルス排除について HLA-DP の HLA タイプを詳細に検討する事で、病態の解明およびリスク予測遺伝子検査法の開発に役立つことが期待される。HLA-DP については組換えタンパク発現系の構築も進んでおり、抗原ペプチドとの複合体など、より詳細な解析が期待できる。

既に B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除や肝臓については一部新規遺伝要因を報告しているが、今後はこのシステムを用いてより大規模な解析を実施することで、新規の遺伝要因を同定する事が可能になると考えられる。また、線維化進展や癌化においても新規遺伝要因の同定が期待される。同時に、遺伝子ネットワーク解析により同定された遺伝子群、ウイルスゲノム配列中の多型を組み合わせた解析も期待される。

E. 結論

本研究では、班を 4 つの組織から構成し、研究を実施した。1) 各病態の臨床情報・検体収集体制を確立し、日本人、韓国人、タイ人、香港人、台湾人（健常者群、HBV 患者群およびウイルス排除群）約 5,700 検体を収集した。2) ゲノム解析では、慢性化・線維化進展・癌化に関連する宿主遺伝要因

を網羅的に探索し、各病態について関連候補 SNP を検出した。機能解析では、HLA-DP アリルの組み換えタンパク発現系を哺乳類繊維芽細胞株および昆虫細胞株を用いて構築し、結合実験を開始した。また、日本を含む東アジア集団サンプル約 3,200 検体について大規模 HLA タイピングを実施し、慢性化及び病態進展に関与する HLA-DPB1 アリルを同定した。更に、B 型慢性肝炎から肝臓発症に関わる階層クラスター解析および遺伝子ネットワーク解析を行い、慢性肝炎では DNA 修復・機能未知遺伝子が肝臓の AP1 シグナルと関連しており、非癌部における遺伝子変化が肝臓発症と関連する事を示した。3) 統計解析手法については、臨床データと全ゲノム SNP タイピングのデータから、臨床情報とゲノム多型の交互作用の解析を実施した。4) ウイルス因子の同定では、肝臓患者および非肝臓患者の HBV ゲノム配列を決定し、肝臓癌連変異を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishida N, **Tokunaga K**, and Mizokami M: Genome-wide association study reveals host genetic factors for liver diseases. *J. Clin. Translat. Hepatol.* (in press)
- (2) **Tokunaga K**: Lessons from genome-wide search for disease-related genes with special reference to HLA-disease associations. *Genes* 5: e84-96, 2014.
- (3) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wai-Kay, Yuen Man-Fung, Nawarat Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn Sang Hoon, Han Kwang-Hyub, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Jong-Hon Kang, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M,

Tokunaga K., and Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. PLoS One. 9(2): e86449, 2014.

2. 学会発表

- (1) **徳永勝士**：ゲノム・遺伝子解析研究がもたらす革新（教育講演）、第 62 回日本医学検査学会、香川、2013.5.18.
- (2) 澤井裕美、西田奈央、松田浩一、馬渡頼子、田中靖人、溝上雅史、**徳永勝士**、中国集団における HBV 陽性肝癌感受性候補 SNP の東アジア集団での検証、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.7.
- (3) **Katsushi Tokunaga**: Single nucleotide polymorphisms(SNPs) in humans: Associations with disease susceptibilities and drug responses, International Conference in Medicine and Public Health 2013 (ICMPH2013) “Healthy Society beyond Frontiers”, Mahidol University, Bangkok, 2013. 6.25.
- (4) Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Masaya Sugiyama, Wai-Kay Seto, Man-Fung Yuen, Yong Poovorawan, Sang Hoon Ahn, Kwang-Hyub Han, Kentaro Matsuura, Yasuhito Tanaka, Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Jong-Hon Kang, Shuhei Hige, Tatsuya Ide, Kazuhide Yamamoto, Isao Sakaida, Yoshikazu Murawaki, Yoshito Itoh, Akihiro Tamori, Etsuro Orito, Yoichi Hiasa, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Eiji Mita, Kazuyuki Suzuki, Keisuke Hino, Eiji Tanaka, Satoshi Mochida, Masaaki Watanabe, Yuichiro Eguchi, Masaaki Korenaga, Yoriko Mawatari, Minae Kawashima, **Katsushi Tokunaga**, Masashi Mizokami, Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2013, Washington DC, 2013
- (5) **徳永勝士**：肝炎の診断と治療、(シンポジウム「GWAS 成果と応用」) 第 58 回日本人類遺伝学会大会、仙台、

2013.11.21.

- (6) 西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、**徳永勝士**、溝上雅史、B 型肝炎慢性化および病態進展に関わる HLA-DP 遺伝子のアジア人集団における横断的解析、日本人類遺伝学会 第 58 回大会、仙台、2013
- (7) 西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、**徳永勝士**、溝上雅史、アジア人集団における B 型肝炎患者を対象とした HLA-DP 遺伝子の横断的解析、第 36 回日本分子生物学会年、神戸、2013

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：B 型肝炎の慢性化の素因の検出方法

発明者：**徳永勝士**、澤井裕美、溝上雅史、西田奈央

出願日：2013 年 8 月 30 日

出願番号：特願 2013-179634

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究体制

研究代表者

東京大学人類遺伝学 徳永勝士

臨床情報収集

ゲノム解析・機能解析

統計解析

ウイルス因子

統括

国際医療研究センター
溝上雅史

統括

東大・人類遺伝
徳永勝士

統括

遺伝研
五條堀 孝

統括

感染研
脇田隆字

検体収集・臨床情報収集

GWAS・
次世代シーケンス 機能解析

相互作用
解析

ウイルス因子解析

九州大学 調憲

名古屋市立大学 楠本茂

北海道大学 夏井坂光輝

川崎医科大学 日野啓輔

武蔵野赤十字病院 黒崎雅之

北海道大学 武富紹信

慶応義塾大学 坂元亨宇

長崎医療センター 八橋弘

信州大学 松本昌博

千葉大学 横須賀収

埼玉医科大学 持田 智

東京大学 小池和彦

東京大学医科研 松田浩一

国際医療研究センター 西田奈央

東京大学人類遺伝学 宮寺浩子

金沢大学 本多政夫

統計数理研究所 間野修平

浜松医科大学 鈴木哲朗

名古屋市立大学 田中靖人

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 25 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：検体・臨床情報管理システムの詳細版データシートの改定（HBVウイルス量の記載方法の修正など）を行い、検体収集施設から送付されたサンプル（ゲノムDNA、血清）に対応する臨床情報（簡易版データシート、詳細版データシート）を収集した。

今年度は、新たに959検体を収集し、合計1,163検体のうち1,100検体に対応する簡易版データシートを収集し、検体・臨床情報管理システムへ登録した。また、1,163検体のうち343検体については詳細版データシートを用いた臨床情報の収集が完了し、同システムへの登録も完了した。

A. 研究目的

班員から提出される臨床検体を収集・管理し、臨床情報や解析データを紐づけることのできるシステムを構築する。

B. 研究方法

検体収集の協力施設から臨床検体を収集する体制を整え、各協力施設から臨床情報をデータベース化する。データベースへの検体情報や臨床情報の登録が簡便かつ正確に実施できるように、収集する臨床情報の項目を選定し（簡易版データシート、詳細版データシート）、検体収集と共に情報収集を進める。

（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

今年度の研究結果を以下にまとめる。

(1) 国内の研究協力施設で採血した B 型肝炎患者のゲノム DNA、血清サンプルを SRL 経由で国立国際医療研究センター・国府台病院に収集・保管する検体・臨床情報収集システムを構築した。今年度はこのシステムを利用して 959 例を収集し、合計 1,163 検体のゲノムと血清を収集した（SRL 経由：763 検体、施設直送：400 検体）。

(2) 簡易版データシートを用いた臨床情報の収集を進め、SRL 経由で収集した 763 検体のうち 700 検体、および施設直送 400 検体のすべてについての臨床情報を収集した。

(3) 詳細版データシートを用いた臨床情報の収集を進め、SRL 経由で収集した 763 検体のうち 181 検体、施設直送 400 検体のうち 162 検体についての臨床情報を収集した。

(4) 詳細版データシートの改定（ウイルス量の記載方法の修正）を行った。

(5) 収集したゲノム DNA すべての濃度測定を実施し、均一濃度への調整を実施した。

(6) アジア各国（インドネシア、タイ、アルゼンチン、ミャンマー、ウズベキスタン、モンゴル、キルギスタン、台湾）における HBV 研究の拠点施設と共同研究体制（MOU の作成）を整えた。

D. 考察

統一したフォーマットを用いた臨床情報の収集体制が整い、収集したサンプル（ゲノム DNA、血清）との一対一の対応付けが自動的に実施できるようになった。本研究において、B 型肝炎関連の様々な病態を対象としたゲノム解析を実施するために必須となるサンプルおよび詳細な臨床情報を網羅的に収集することが可能となった。

E. 結論

サンプル及び臨床情報を取り違えることなく管理することは、ゲノム解析を進めるうえで最も重要なポイントとなる。本研究で構築した検体・臨床情報管理システムは、B 型肝炎を対象とした研究のみならず、様々な疾患ゲノム研究においても有用なツールとなることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nao Nishida, Hiromi Sawai, Koichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Masaya Sugiyama, Wai-Kay Seto, Man-Fung Yuen, Nawarat Posuwan, Yong Poovorawan, Sang Hoon Ahn, Kwang-Hyub Han, Kentaro Matsuura, Yasuhito Tanaka, Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Jong-Hon Kang, Shuhei Hige, Tatsuya Ide, Kazuhide Yamamoto, Isao Sakaida, Yoshikazu Murawaki, Yoshito Itoh, Akihiro Tamori, Etsuro Orito, Yoichi Hiasa, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Eiji Mita, Kazuyuki Suzuki, Keisuke Hino, Eiji Tanaka, Satoshi Mochida, Masaaki Watanabe, Yuichiro Eguchi, Naohiko Masaki, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Yoriko Mawatari, Jun Ohashi, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, and **Masashi Mizokami**, New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. PLoS One. 2014 (in press)
- (2) Kusumoto S, Tanaka Y, **Mizokami M**, Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved

HBV infection following rituximab-containing chemotherapy. Hepatology. 2013

- (3) Kusumoto S, Tanaka Y, **Mizokami M**, Ueda R. Is Antiviral Prophylaxis Necessary to Prevent Hepatitis B Virus (HBV) Reactivation in Patients With HBV-Resolved Infection Receiving Rituximab-Containing Chemotherapy? J Clin Oncol. 31(35):4480, 2013
- (4) Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, **Mizokami M**, Oubiña JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behaviour regarding its parental genotypes. J Gen Virol 94 2724-8, 2013
- (5) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, **Mizokami M**; Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. Hepatology 59(1):89-97, 2014
- (6) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, **Mizokami M**, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. Clin Infect Dis 57(7): 935-42, 2013
- (7) Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, **Mizokami M**, Ueda R, Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. Hepatol Res. 2013

2. 学会発表

- (1) Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Masaya Sugiyama, Wai-Kay Seto, Man-Fung Yuen,

Yong Poovorawan, Sang Hoon Ahn, Kwang-Hyub Han, Kentaro Matsuura, Yasuhito Tanaka, Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Jong-Hon Kang, Shuhei Hige, Tatsuya Ide, Kazuhide Yamamoto, Isao Sakaida, Yoshikazu Murawaki, Yoshito Itoh, Akihiro Tamori, Etsuro Orito, Yoichi Hiasa, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Eiji Mita, Kazuyuki Suzuki, Keisuke Hino, Eiji Tanaka, Satoshi Mochida, Masaaki Watanabe, Yuichiro Eguchi, Masaaki Korenaga, Yoriko Mawatari, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, **Masashi Mizokami**, Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2013, Washington DC, 2013

- (2) 西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、徳永勝士、**溝上雅史**、アジア人集団における B 型肝炎患者を対象とした

HLA-DP 遺伝子の横断的解析、第 36 回日本分子生物学会年、神戸、2013

- (3) 西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、徳永勝士、**溝上雅史**、B 型肝炎慢性化および病態進展に関わる HLA-DP 遺伝子のアジア人集団における横断的解析、日本人類遺伝学会 第 58 回大会、仙台、2013

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：B 型肝炎の慢性化の素因の検出方法

発明者：徳永勝士、澤井裕美、**溝上雅史**、西田奈央

出願日：2013 年 8 月 30 日

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 25 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 生命情報研究センター 特任教授

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ことを目的とする。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いながら、取得したデータを用いてネットワーク解析をおこなった。特に、HBVと相互作用をする可能性のある遺伝子について、そのネットワークがどこまで分かっているかの探索を行った。

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倫理面への配慮が必要となるデータを使用する場合には、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なうという方針をとった。

C. 研究結果

平成 25 年度は、H-Inv というヒト遺伝子の統合データベースの更新も行って、最新の関係するネットワーク解析を可能とした。

D. 考察

本研究課題のようなネットワーク解析が、このような感染症対策において、ヒトとのゲノム的な関係を知る上で、必須となるという考察を行った。

E. 結論

最終年度の平成 25 年度は、ヒト遺伝子統合データベースや活用でききる他のデータベースを用いて、関係するネットワーク解析ができるようになって、本研究課題のシス

テム構築に寄与した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nakagawa, S., Bai, H., Sakurai, T., Nakaya, Y., Konno, T., Miyazawa, T., **Gojobori, T.**, and Imakawa, K.: (2013) Dynamic Evolution of Endogenous Retrovirus-Derived Genes Expressed in Bovine Conceptuses during the Period of Placentation. *Genome Biol Evol* 5(2):296-306.
- (2) Takeda, J., Yamasaki, C., Murakami, K., Nagai, Y., Sera, M., Hara, Y., Obi, N., Habara, T., **Gojobori, T.**, Imanishi, T. (2013) H-InvDB in 2013: an omics study platform for human functional gene and transcript discovery. *NAR* 41(D1):D915-9

2. 学会発表

- (1) **Takashi Gojobori**(2013) “Genomic Landscape of Biodiversity: Big Data and Big Ideas” Seminar at Shandong Agricultural University, Shangdon, China 4月9日
- (2) **Takashi Gojobori** (2013) “Big Data needs Big Idea: What can we splve from genomic information?”, the 11th CJK Bioinformatics Training Course, Suzhou, China, June 17

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 25 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：脇田 隆字 国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長

分担研究課題：ウイルス因子の解析

研究要旨：本研究の目的は、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）因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのためにウイルス側因子も解析する。宿主ゲノム解析をおこなった検体についてウイルスゲノムについて塩基配列および機能解析をおこなう。

A. 研究目的

研究班の目的は、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因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのために患者毎にウイルスゲノムの解析も実施することにより、各種病態形成に関わる宿主遺伝要因間や宿主遺伝要因とウイルス因子間の相互作用も明らかにする。研究班では、1) HBV 持続感染、2) HBV 関連肝癌、3) HBV 再活性化、4) HBV 重症化（劇症化）、5) インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性、のそれぞれに関与する遺伝要因を同定する予定である。そこで、本分担研究では B 型肝炎患者群のウイルスを解析する。

B. 研究方法

田中班で収集された血清 45 サンプルおよび徳永班で収集された 70 サンプルの HBV DNA 解析をおこなった。血清 xxul より QIAamp MinElute Virus Spin kit を用いて HBV DNA を抽出後、nested PCR により遺伝子増幅し、塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料

はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

田中班の 45 サンプルでは遺伝子型 B が 6 検体、C が 33 検体、不明が 6 検体であった。HBV 感染者で HCC 発症者と非発症者が含まれるが、詳細な臨床情報はまだ得られていない。X-preC 領域で配列を決定できたのが、9 検体、pol 領域では 3 検体のみであった。徳永班の 70 サンプルでは X-preC 領域のみの検討で 36 検体において配列を決定できた。X-preC 領域の HCC 発症に関連すると考えられる塩基部位の配列は以下の通りであった。

1653	1753	1762	1764	1896
C/T/ND	T/V/ND	A/T	G/A	G/A/ND
35/7/3	33/9/2	25/19	25/19	30/13/1

ND:検出できず