

2) 細断組織： 赤血球の混入が多かったため、金属メッシュを通した後に洗浄し、さらに溶血処理を要した。コラゲナーゼ消化に至るまでに時間を要したために、盲端状組織からの分離よりも生細胞の回収率は低かった。

3) 低温酸素化による組織修復： 移植臓器の低温酸素化灌流用に自作した灌流液を使用した。灌流液を酸素化し、約 20°C で 30 分灌流した。その後、上記 1) あるいは 2) の分離操作を行った。検体処理までに阻血時間が 3 時間を超えた検体では、通常の培養では生細胞が回収されなかったが、低温酸素化処理を行った場合にのみ生細胞を培養できた症例があった。

比較的温阻血時間が短い場合には、低温酸素化なしでも生細胞が回収された。この場合にも低温酸素化によって回収率は向上した印象があったが、細胞量に限りがあるため、細胞数カウントは行わなかった。

4) 培地の選択： 同様の処理を行った細胞を、種々の培地で培養した。培養 3 日目までに多くの細胞が細胞死に陥ったが、Williams' E, DMEM, F12mixture を混合し、FBS、ニコチナマイド、デキサメサゾン、ITS mixture を添加した培地では、1 日目から接着する細胞が多数存在した。特に、低温酸素化後に分離し、上記培地で培養を始めた場合には、他の方法と比べ生細胞の回収率が高かった。その後の培養においても、細胞を良好に維持した。

何れの処理を行っても、培養 3 日目に接着している細胞の中には、旺盛に分裂、増殖する敷石状の細胞集団が存在した。当初から観察可能な肝細胞は、時間経過と共に増殖細胞に囲まれて、同定が困難になった。この細胞種は繊維芽細胞と考えられ、DMSO 添加培地では増殖せず、寧ろ積極的に細胞死に陥った。その結果、当初観察されていた肝細胞が再び観察されるようになった。

た。これを繰り返し、10 週目まで肝細胞を維持し得た。

D. 考察

本研究では、門脈遮断から肝摘出、検体処理までに要する時間が阻血時間となるが、冷蔵せずに 3 時間を超えた症例においても、組織修復処置を行えば初代培養が可能であることを示した。

系統的な灌流が困難な症例でも、ブロックであれば採取可能な場合は多い。本法を用いることにより、特殊な設備なしに、初代培養が可能になるはずである。

本研究では肝細胞は 10 週にわたって維持されたが、目的である HBV 感染が維持された細胞であるかは検討していない。今後、HBV 感染状態の推移を明らかにする必要がある。

肝細胞と繊維芽細胞の関係も精査が必要である。繊維芽細胞は不要な細胞の混入なのか、あるいは、肝細胞の維持に必要なのかは今後の課題である。

様々な工夫によって回収率を向上させる余地があるものの、手術、病理診断、細胞分離を担当するチームが、細胞培養の重要性を認識し、温阻血時間を可能な限り短縮し、摘出後には清潔操作で冷蔵することを心がけることを共通認識とした検体収集システムを構築することが最重要課題である。そのうえで、回収率を向上させる技術を駆使して、貴重な細胞リソースを構築すべきであろう。

E. 結論

B 型肝炎細胞癌の外科的切除によって得られた肝臓から肝細胞を分離し、10 週目まで維持し得た。B 型肝炎感染肝細胞における炎症、線維化、発癌の基礎研究に重要なリソースを構築できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H,

- Kamiyama T, **Taketomi A**, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.
- (2) Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, **Taketomi A**. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int*. 2013 Nov;29(11):1147-52.
- (3) Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, **Taketomi A**. Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium. *World J Surg Oncol*. 2013 Oct 5;11:259.
- (4) Shibasaki S, Takahashi N, Toi H, Tsuda I, Nakamura T, Hase T, Minagawa N, Homma S, Kawamura H, **Taketomi A**. Percutaneous transhepatic gallbladder drainage followed by elective laparoscopic cholecystectomy in patients with moderate acute cholecystitis under antithrombotic therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013 Sep 11.
- (5) Okada T, Honda S, Miyagi H, Kubota KC, Cho K, **Taketomi A**. Liver fibrosis in prenatally diagnosed choledochal cysts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Aug;57(2)
- (6) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, 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 Jun;57(6):2314-25
- (7) Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, **Taketomi A**, Ikegami T, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y. Human early liver regeneration after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma: special reference to age. *Scand J Surg*. 2013 Jun 1;102(2):101-5.
- (8) Ijichi H, Shirabe K, **Taketomi A**, Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y. Clinical usefulness of (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Hepatol Res*. 2013 May;43(5):481-7.
- (9) Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, **Taketomi A**. Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2013 Mar 2;11:52.
- (10) **Taketomi A**, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surg Today*. 2013 Mar;43(3):289-92
- (11) Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, **Taketomi A**, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology*. 2013;80(3):146-54.

2. 学会発表

- (1) 横尾 英樹, 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 若山 颯治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, **武富 紹信**, 大腸癌多発肝転移に対する外科切除のタイミング 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
- (2) 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 若山 颯治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, **武富 紹信**, 肝門側からの展開困難な血管合併切除を要する左葉系肝門部胆管癌に対する術式の工夫 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
- (3) 若山 颯治, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 中西 一彰, 嶋村 剛, 藤堂 省, **武富 紹信**, 下大静脈/右心房腫瘍栓を有する肝細胞癌に対する肝切除 第 25 回日本肝胆膵外科学

- 学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013
- (4) 敦賀 陽介、蒲池 浩文、若山 颯治、柿坂 達彦、横尾 英樹、神山 俊哉、武冨 紹信、当科における門脈再建法、第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013
- (5) 柿坂 達彦、神山 俊哉、横尾 英樹、若山 颯治、敦賀 陽介、蒲池 浩文、武冨 紹信、肝細胞癌リンパ節転移症例に対する治療法の検討、第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013
- (6) 川俣 太、蒲池 浩文、永生 高広、西原 広史、田原 宗徳、神山 俊哉、藤堂 省、武冨 紹信、細胞内の局在に着目した肝外胆管癌における Mesothelin 発現の免疫組織学的検討、第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013
- (7) 大畑 多嘉宣、横尾 英樹、柿坂 達彦、敦賀 陽介、蒲池 浩文、神山 俊哉、武冨 紹信、肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 の有用性、第68回日本消化器外科学会総会、宮崎、7月17日-19日、2013
- (8) 若山 颯治、神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、敦賀 陽介、蒲池 浩文、武冨 紹信、肝尾状葉腫瘍切除における3D画像によるシミュレーションの有用性、第68回日本消化器外科学会総会、宮崎、7月17日-19日、2013
- (9) 蒲池 浩文、敦賀 陽介、若山 颯治、柿坂 達彦、横尾 英樹、山下 健一郎、神山 俊哉、武冨 紹信、左葉系切除を要する高度進行胆道癌に対する Transparenchymal glissonean approach を用いた血行再建法、第68回日本消化器外科学会総会、宮崎、7月17日-19日、2013
- (10) 神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、蒲池 浩文、若山 颯治、敦賀 陽介、三浦 信明、西村 紳一郎、藤堂 省、武冨 紹信、血清中糖鎖の網羅的解析による肝細胞癌新規バイオマーカーの開発、第68回日本消化器外科学会総会、宮崎、7月17日-19日、2013
- 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：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

分担研究課題：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

研究要旨：C型慢性肝炎において線維化進行と関連するSNPがGWASにより同定された。同SNPのB型慢性肝炎の線維化との関連は不明である。本研究では、これらのSNPとB型慢性肝炎の病態との関連性を検討した。B型慢性肝炎138例を対象とし、MERTK(rs4374383)、GLT8D2(rs2629751)、TULP1(rs9380516)をTaqman法でタイピングし、線維化ステージとの関連を検討したところ、MERTKのAAはF3-4では13%に対してF0-2では0-4%と線維化進行例で高頻度であった。MERTKのAAは、肝硬変では17%、慢性肝炎では8%、非活動性キャリアでは7%であり、病期の進行と関連する傾向を認めた。一方、GLT8D2およびTULP1のgenotypeと肝線維化とは関連を認めなかった。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎の病態は多彩であり、HBV 持続感染にもかかわらず線維化が進行しない非活動性キャリアから、線維化が進行し肝硬変、肝がんに進展する症例も存在する。ウイルス側の因子としては、HBV DNA 量が高値で持続することが病期進展の要因とされるが、宿主側の要因は不明である。最近 C 型慢性肝炎において線維化進行と関連する SNP が GWAS により同定された。同 SNP の B 型慢性肝炎の線維化との関連は不明である。本研究では、これらの SNP と B 型慢性肝炎の病態との関連性を検討した。

B. 研究方法

B 型慢性肝炎 138 例を対象とし、MERTK(rs4374383)、GLT8D2(rs2629751)、TULP1(rs9380516)を Taqman 法でタイピングした。Genotype と肝線維化ステージとの関連、臨床病期との関連性を検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析においては、当院の臨床研究委員会に置いて妥当性を審議し、承認を得ている。研究に当たっては、文書で説明し

遺伝子解析研究の同意を取得している。試料は匿名化し、個人情報を実際に保護している。

C. 研究結果

MERTK の AA は F3-4 では 13%に対して F0-2 では 0-4%と線維化進行例で高頻度であった。MERTK の AA は、肝硬変では 17%、慢性肝炎では 8%、非活動性キャリアでは 7%であり、病期の進行と関連する傾向を認めた。

一方、GLT8D2 の GG は、F3-4 では 13%に対して、F2 では 19%、F0-1 では 11%であり線維化との関連はなかった。GLT8D2 の GG は、肝硬変では 0%、慢性肝炎では 14%、非活動性キャリアでは 7%であり、病期の進行とも関連しなかった。

TULP1 の CT は、F3-4 では 21%に対して、F2 では 33%、F0-1 では 24%であり線維化との関連はなかった。TULP1 の CT は、肝硬変では 33%、慢性肝炎では 23%、非活動性キャリアでは 36%であり、病期の進行とも関連しなかった。

D. 考察

C型肝炎で線維化進行と関連するSNPのうち、MERTKはB型慢性肝炎に置いても線維化進行や病期の進行とある程度の関連を認めたが、GLT8D2およびTULP1のgenotypeと肝線維化とは関連を認めず、C型肝炎とB型肝炎では、線維化進行と関連する宿主因子が異なる可能性が示唆された。

E. 結論

C型肝炎で線維化進行と関連するSNPは、B型肝炎においては大きなインパクトはない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kurosaki M, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Izumi N. Serum HBV RNA as a possible marker of HBV replication in the liver during nucleot(s)ide analogue therapy. J Gastroenterol 2013; 48:777-778

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 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：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 講師
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た後、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ならびに臨床データを収集した。また、千葉大学においても倫理委員会承認後、ワクチン接種対象者の血液検体を収集した。名古屋市立大学では同様に倫理委員会承認後、主としてワクチン不応者の血液検体を収集する予定である。

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。

（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ならびに臨床データの収集を行う。

B. 研究方法

平成24年度HBワクチン接種者210名（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、川崎医科大学医学部生および川崎医科大学附属川崎病院職員）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、3回目ワクチン接種後1ヶ月目のHBs抗体測定時に遺伝子解析用採血を行った。現在、平成25年度HBワクチン接種対象者に対しても本研究に対する同意を取得中である。研究協力機関である千葉大学と名古屋市立大学では倫理委員会の承認を得、千葉大学では血液検体を収集が終了し、名古屋市立大学では現在検体収集中である。

C. 研究結果

現在、検体収集中ならびに検体解析中のため研究結果はない。

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

一夕を収集する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tomiyma Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T, **Hino K**. Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein in augmented through suppression of AMPK/PGC-1 α signaling. *Hepatology Res* doi:10.1111/hepr.12254. 2013.
- (2) **Hino K**, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatology Res. C*. 2013;44:123-32.
- (3) **Hino K**, Nishina S, Hara Y. Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: Mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28 Suppl 4:93-8.
- (4) Korenaga K, Korenaga M, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, **Hino K**. Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Res* 2013;43:1284-94.
- (5) Tomiyama Y, Takenaka K, Kodama T, Kawanaka M, sasaki K, Nishina S, Yoshioka N, Hara Y, **Hino K**. Risk factors for survival and the development of hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 2013;52:1553-9.
- (6) Nakamura M, Nakashima H, Tsutsumi K, Matsumoto H, Muta Y, Ueno D, Yoshida K, **Hino K**, Urakami A, Tanaka M. First jejunal vein oriented mesenteric excision

for pancreatoduodenectomy. *J Gastroenterol* 2013;48:989-95.

- (7) Kawanaka M, Nishino K, Suehiro M, Goto D, Urata N, Oka T, Kawamoto H, Nakamura H, Yodoi J, **Hino K**, Yamada G. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with vitamins E and C: a pilot study. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 2013;5:11-16.
- (8) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanak Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, 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, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLOS One* 2014;9:e86449.

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

なし

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：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

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を目的に本研究は遂行される。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。

（倫理面への配慮）

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2008年10月修正）」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25年2月8日全部改正）」を遵守して実施する。

研究実施に係る試料等を取扱う際は、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮する。遺伝子解析の結果も同様に個人情報とは分離し保管される。固有の通し番号と個人識別情報の対応表は個人識別情報管理者によって厳重に保管される。研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。

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) Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, **Natsuizaka M**, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2013. (in press).
- (2) **Natsuizaka M**, Kinugasa H, Kagawa S, Whelan KA, Naganuma S, Subramanian H, Chang S, Nakagawa KJ, Rustgi NL, Kita Y, Natsugoe S, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Rustgi AK and Nakagawa H. IGFBP3 promotes esophageal cancer growth by suppressing oxidative stress in hypoxic tumor microenvironment. *Am J Cancer Res*. Jan 15;4(1):29-41. 2014.

2. 学会発表

- (1) **Natsuizaka M**, Kagawa S, Whelan KA, Chang S, Kinugasa H, Ohashi S, Naganuma S, Sakamoto N, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Diehl JA, Herlyn M,

Rustgi AK, Nakagawa H. Transforming Growth Factor-beta and Notch1 Cooperate to Repress NOTCH3 to Facilitate Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Initiating Capability in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Digestive Disease Week and the 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, May 18-21, 2013.

- (2) Kagawa S, Nakagawa K, **Natsuizaka M**, Kinugasa H, Whelan KA, Chang S, Subramanian H, Ohashi S, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Diehl JA, Herlyn M, Nakagawa H, Rustgi AK. Inactivation of the Retinoblastoma Protein-Dependent Senescence Checkpoint Functions Permits Notch1 to Gain Oncogenic Tumor Promoting Activity. Digestive Disease Week and the 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, May 18-21, 2013.
- (3) Kinugasa H, **Natsuizaka M**, Kagawa S, Whelan KA, Subramanian H, Chang S, Ohashi S, Naganuma S, Diehl JA, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Herlyn M, Nakagawa H. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Regulates Esophageal Tumor Initiating Capability via a Novel Insulin-Like Growth Factor-Independent Antioxidant Activity. Digestive Disease Week and the 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, May 18-21, 2013.

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：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。今年度は、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、プロトコールを作成した。現在進行中の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施設のメンバーおよび東京大学、国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センターのメンバーと検討し、発生頻度の低いHBV再活性化例およびコントロール群の設定について協議、質の高い試験デザインが構築できた。今後、実際の検体収集およびヒト遺伝子解析を実施する予定である。

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

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として、血液内科、肝臓内科およびヒト遺伝子解析のエキスパートメンバーとが共同で試験デザインを検討した。

（倫理面への配慮）ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省・経済産業省、平成 25 年 2 月 8 日全部改正）に則り、プロトコール作成した。

C. 研究結果

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、プロトコールを作成した。

D. 考察

現在進行中の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 施設のメンバーおよび東京大学、国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センターのメンバーと検討し、発生頻度の低い HBV 再活性化例およびコントロール群の設定について協議、質の高い試験デザインが構築できた。

E. 結論

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、プロトコールを作成した。今後は検体収集および遺伝子解析を実施予定である。

F. 研究発表
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 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：調 憲 九州大学大学院 消化器・総合外科 准教授
研究協力者：吉住 朋晴 九州大学大学院 消化器・総合外科 講師
前原 喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科 教授

分担研究課題：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

研究要旨：B型肝炎関連肝移植はB型肝炎による末期肝不全レシピエントによるものとHBc抗体陽性ドナーからなり、成人間生体肝移植例の約30%を占める。それらの症例では肝移植後のHBVの再活性化を予防するため、核酸アナログとヒト高力価HBs抗体(HBIG)の生涯にわたる投与を必要とする。HBIGの投与を中止するためにはHBVワクチンによる抗体陽転化が必要である。しかしながら、陽転率が低く、ワクチン接種前の陽転化予測ができないため、ワクチン接種率は低い。われわれはHLA-DPの遺伝子多型の測定により抗体の陽転化が予測できると考え、測定した。4例のワクチン接種例では無効、有効例各2例でHLA-DPの遺伝子多型は明瞭に区別された。HLA-DPの遺伝子多型解析は肝移植後のHBVワクチン接種のコンパニオン診断として有用な可能性がある。

A. 研究目的

B型肝炎関連肝移植後のHBVワクチン接種後のHBs抗体陽転化の予測を目的としてHLA-DP領域の遺伝子多型の解析を行う。

B. 研究方法

HBV関連肝移植の14例でHLA-DPB1の遺伝子多型を測定した。

(倫理面への配慮)

同意取得後採血を施行した。対象者への不利益はなし。

C. 研究結果

HBs抗原陽性例では80%でGGであったが、陰性例では78%でGAであった。また、抗体陽転化はすべてGGで、抗体陽転化できなかったものはすべてGAであった。

D. 考察

B型肝炎関連肝移植では肝移植後のHBV

の再活性化を予防するため、核酸アナログとヒト高力価HBs抗体(HBIG)の生涯にわたる投与が必要で患者のQOL低下と莫大な医療費を必要とする。HBIGの投与を中止するためにはHBVワクチンによる抗体陽転化が必要である。しかしながら、陽転率が低く、ワクチン接種前の陽転化予測ができないため、ワクチン接種率は低い。われわれはHLA-DPの遺伝子多型の測定により抗体の陽転化が予測でき、患者のQOL向上、医療費削減に貢献しうると考える。

HLA-DPの遺伝子多型はHBs抗原に対する抗体産生能を規定している可能性があり、肝移植に至る要因となっている可能性があるとともに、肝移植後のワクチン接種による抗体陽転化を予測できる可能性がある。

E. 結論

HLA-DPの遺伝子多型解析は肝移植後のHBVワクチン接種のコンパニオン診断と

して有用な可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ijichi H, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Ikeda T, Kawanaka H, Uchiyama H, Yamashita Y, Morita M, Oki E, Mimori K, Sugimachi K, Saeki H, Watanabe M, **Shirabe K**, Maehara Y. Recurrent hepatitis B following recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. Fukuoka Igaku Zasshi. 2013;104:376-82.

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 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：松田 浩一 東京大学医科学研究所 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：発癌リスク感受性遺伝子である MICA のプロモーター領域の解析の結果、SP1 の結合に影響を与える機能的 SNP を同定した。この SNP の G アレル特異的に転写因子 SP1 が結合し、遺伝子の発現を活性化することが明らかとなった。またこの遺伝子多型と血中 MICA 濃度が有意な関連を示した。これらの結果より、MICA が肝癌の感受性領域の責任遺伝子であることが示された。また全ゲノム関連解析によって同定された予後関連遺伝子について、HBV 陽性肝癌、HBV 陽性肝硬変、慢性 B 型肝炎症例を用いて再現性を検討中である。

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 の活性化による肝癌治療・予防法の開発に向けて、MICA 遺伝子プロモーター領域について機能的な SNP の探索を行った。また新規の予後関連遺伝子の同定を目的として、HBV 陽性肝癌症例 230 例、HBV 陽性肝硬変症例 140 名、慢性 B 型肝炎症例 699 例を用いて GWAS でスクリーニングされた候補 SNP の再現性の検討を進めている。

（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

ゲノム創薬へ向けた研究として、遺伝子多型の MICA の発現調節機構の解明を進めた。MICA のプロモーターの解析の結果、rs2596538 の G アレル特異的に転写因子

SP-1 が結合し、MICA の転写を活性化することが示された。また Heat shock 等のストレス刺激によって、MICA の発現量が上昇することが明らかとなった（参考文献 1）。SP-1 に対して親和性が高い G アレルを持つ人では、血清 MICA 値が高く、肝癌の発症リスクが低くなることから、MICA が肝癌発症に対して予防的に働くことが示され、MICA の活性化が肝癌の治療に有用となりうることを示された。

HBV 陽性肝癌症例 230 例、HBV 陽性肝硬変症例 140 名、慢性 B 型肝炎症例 699 例を用いたタイピングについては、現在施行中である。

D. 考察

rs2596542 アレルと sMICA については HCV 陽性肝癌と同様の相関を示しており、HBV 陽性肝癌においても遺伝子多型が MICA の発現制御に重要であることが示された。GWAS で同定された rs2596542 は今回アレル特異的な SP1 の結合が示された rs2596538 と強い連鎖にあることから、rs2596538 が機能的な SNP である事、また MICA の発現量の違いが予後に影響を与えることが示された。しかしながら、HBV 陽性肝癌における MICA の寄与はそれほど高

くないため、今後新規の疾患感受性遺伝子の同定が必須である。現在我々は症例数を増やした解析を勧めている。

E. 結論

本解析の結果、MICA 多型が慢性 B 型肝炎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。現在新規の疾患感受性遺伝子の同定及びゲノム創薬に向けた研究を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, **Matsuda K**. PLoS One. 2013 Apr 11;8(4):e61279.
- (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 May;58(5):875-82.
- (3) Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility. Tanikawa C, Matsuo K, Kubo M, Takahashi A, Ito H, Tanaka H, Yatabe Y, Yamao K, Kamatani N, Tajima K, Nakamura Y, **Matsuda K**. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e63698.
- (4) Germline variants and advanced colorectal adenomas: adenoma prevention with celecoxib trial genome-wide association study. Wang J, Carvajal-Carmona LG, Chu JH, Zauberg AG; APC Trial Collaborators, Kubo M, **Matsuda K**, Dunlop M, Houlston RS, Sieber O, Lipton L, Gibbs P, Martin NG, Montgomery GW, Young J, Baird PN, Ratain MJ, Nakamura Y, Weiss ST, Tomlinson I, Bert gnolli MM. Clin Cancer Res. 2013 Dec 1;19(23):6430-7.

- (5) Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians. Zhang B, Jia WH, Matsuo K, Shin A, Xiang YB, **Matsuda K**, Jee SH, Kim DH, Cheah PY, Ren Z, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Ji BT, Pan ZZ, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Ahn YO, Kubo M, Thean LF, Park EJ, Li HL, Park JW, Jo J, Jeong JY, Hosono S, Nakamura Y, Shu XO, Zeng YX, Zheng W. Int J Cancer. 2014 Jan 21. doi: 10.1002/ijc.28733.

2. 学会発表

- (1) 発癌関連遺伝子解析 10 年のあゆみ バイオバンクシンポジウム 2013.1.28 品川、東京 (Invited speaker).
- (2) GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis. JCA -AACR joint symposium. 2013.2.25 Maui, Hawaii, U.S.A. (Invited speaker)
- (3) 遺伝子、生活習慣と癌について 平成 25年3月9日 第15回泌尿器疾患ゲノム解析研究会 高知 (Invited speaker).
- (4) MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 2012
- (5) 個別化医療へ向けた遺伝子多型研究 第13回 東京大学生命科学シンポジウム 2013.6.8 (Invited speaker).
- (6) The roles of gene-environmental interaction in human carcinogenesis. 日本癌学会シンポジウム 2013.10.2. 横浜
- (7) 「聞いて納得！ 遺伝子と病気の関係～がん・糖尿病・アレルギーなど～」市民公開講座 ひとりひとりに合った医療をめざして」 2013.12.8. 盛岡 (Invited speaker).

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：西田 奈央 国立国際医療研究センター 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：合計3,136例の日本人、韓国人、香港人、タイ人を含むアジア人集団を対象として、*HLA-DP*アレルタイピングを実施し、*HLA-DPA1*アレルおよび*HLA-DPBI*アレルを決定した。4桁の精度で決定することができた合計2,895例について、B型肝炎患者群、HBV排除群、健常対照群の3群に分けた関連解析を実施し、B型慢性肝炎の発症およびB型肝炎ウイルス排除に関わる*HLA-DP*アレルの同定を試みた。

日本人におけるB型慢性肝炎患者群と健常対照群の比較から、B型肝炎慢性化に対して進行性の関連を示す*HLA-DP*アレルを2種類、また抵抗性の関連を示す*HLA-DP*アレルを3種類同定した。また、韓国人および香港人において検出された進行性、抵抗性の関連を示す*HLA-DP*アレルは日本人で検出されたアレルと共通するが、タイ人で検出されるアレルは他の3集団とは異なることが明らかとなった。加えて、日本人と韓国人において、病態進展に対して抵抗性の関連を示す共通の*HLA-DP*アレルを1種類同定した。

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 25 年 2 月 8 日全部改正) 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

アジア人 4 集団 (日本人、韓国人、香港人、タイ人) の肝炎患者群、HBV 排除群、健常対照群の合計 3,167 例を対象として *HLA-DPA1*、*-DPB1* アリルタイピングを実施し、B 型肝炎慢性化に対する感受性・抵抗性を示す *HLA-DP* アリルの同定を試みた。

日本人における肝炎患者群と健常対照群の比較から、B 型肝炎慢性化に対して進行性の関連を示す *HLA-DP* アリルを 2 種類 (*DPB1*05:01*、**09:01*)、また抵抗性の関連を示す *HLA-DP* アリルを 3 種類 (*DPB1*02:01*、**04:01*、**04:02*) 同定した。

5 つのうち、進行性アリル *DPB1*09:01* および抵抗性アリル *DPB1*02:01* は、日本人において新規に同定された B 型肝炎慢性化に関連する *HLA-DPB1* アリルであった。また、韓国人および香港人において検出された進行性、抵抗性の関連を示す *HLA-DP* アリルは日本人で検出されたアリルと共通す

るが、タイ人で検出されるアリルは他の 3 集団とは異なることが明らかとなった。

アジア人 4 集団でのメタ解析を実施したところ、抵抗性アリル *DPB1*02:01*、および進行性アリル *DPB1*05:01* がアジア 4 集団における共通の *HLA-DPB1* アリルであることが明らかとなった。加えて、アジア人 4 集団において、肝癌患者群と慢性肝炎患者群の 2 群を比較したところ、*DPB1*02:01* アリルが病態進展に対して抵抗性の関連を示すことを明らかにした (P 値= 1.55×10^{-7} 、OR=0.50)。

上記の成果は論文で報告した (論文発表 (1)参照)。

D. 考察

アジア人集団を対象とした横断的な解析により、アジア人集団における B 型肝炎慢性化、および病態進展に関連する *HLA-DP* アリルを明らかにした。アジア人集団において、B 型肝炎慢性化や肝発癌に関連する *HLA-DP* アリルの共通性と異質性を明らかにする (ホスト因子) と共に、*HLA-DP* 分子に認識される HBs 抗原ペプチドを明らかにする (ウイルス因子) ことで、B 型肝炎慢性化や肝発癌の機序の明らかになることが期待される。

E. 結論

複数の集団を対象とした横断的なゲノム解析を行うことで、単一の集団を対象とした解析だけでは検出することのできない新たな疾患感受性遺伝子を同定することができるだけでなく、疾患感受性遺伝子の機能解明につながる新たな知見を得ることが可能となる。

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. 学会発表

- (1) **Nao Nishida**, Development of DigiTag2 for determination of human SNPs, International Conference in Medicine and Public Health 2013, The Symposium on SNP typing: Application in human and TB, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Bangkok, 2013.6.24-28
- (2) **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

- (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、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
- (4) **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

- (1) 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：宮寺 浩子 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

分担研究課題：HLA-DP の機能解析

研究要旨：B型肝炎慢性化のリスクと最も強く関連する遺伝要因はヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen (HLA)) クラスII領域内のHLA-DP領域の多型である。しかし、B型肝炎病態におけるHLA-DPの機能は不明である。本分担研究では、B型肝炎慢性化におけるHLA-DPタンパク質の機能を明らかにすることを目的として、結合ペプチドの探索を行った。

A. 研究目的

B 型肝炎慢性化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 による HBV 抗原提示が、B 型肝炎慢性化の機序に関与することを示唆する。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、その機能解析研究は HLA-DR, -DQ と比較して限られている。慢性 B 型肝炎抵抗性アリル(*HLA-DPB1*04:01*, **04:02*)産物は HBV 表面抗原タンパク質 (HBs 抗原)の一部の領域をアリル特異的に提示していると推測されるが、B 型肝炎慢性化の機序における HLA-DP の機能は不明である。本研究では、HLA-DP が結合する HBs 抗原ペプチドを同定することを目的として、HBs 抗原ペプチドと HLA-DP との相互作用解析を行った。

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*, **04:02*, **05:01*, **09:01*) の安定発現株を哺乳類繊維芽細胞株、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。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

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(data not shown)。

D. 考察

日本人集団に加え、他のアジア人集団を対象とした関連解析により、日本人集団には高頻度に存在しない複数の HLA-DP アリルと慢性 B 型肝炎との関連が見出されている

る(Nishida, et al. in press)。今後は、これらの HLA-DP アリルにおける多型と抗原提示能との関連、及び HBc, HBe 抗原ペプチドとの結合についても解析する必要がある。

E. 結論

日本集団において、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、HBs 抗原ペプチドとの結合解析を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) Cindy Chia-Jung Chen, 宮寺浩子、徳永勝士

Interaction analysis of HLA-DP protein

and HBV surface antigenic peptides in association to susceptibility of chronic hepatitis B 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013 年 11 月 21 日 仙台

- (2) Cindy Chia-Jung Chen, 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 42 回日本免疫学会学術集会

2013 年 12 月 12 日 幕張

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