

## ・ 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

## D. 考察

今回HBV患者の血清115サンプルについて検討した。HCC riskを上昇することが知られている C1653T, T1753V, A1762T, G1764A と HCC risk を低下させる G1896A 変異について検討した。HCC 発症を含めて詳細な臨床情報とあわせて検討することが必要と考えられた。また、同じサンプルについて pol 領域の薬剤耐性変異についても検討を進めていく必要がある。また、他分担者の結果ともあわせて解析していく。

GWAS 解析などの宿主因子と、ウイルスゲノム変異というウイルス因子をあわせて解析することにより、HCC 発症に関わるリスクの理解が進むことが期待される。

## E. 結論

HCC 発症者を含む HBV キャリアのウイルスゲノム解析をおこなった。臨床情報とあわせて解析を進める必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, **Wakita T**. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology*. 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
- (2) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, **Wakita T**. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 17;443(3):808-13.
- (3) Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, **Wakita T**, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with

humanized livers. *Gastroenterology*. 2014 Feb;146(2):562-72.

- (4) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, **Wakita T**. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013 Nov 1;288(44):31715-27

### 2. 学会発表

- (1) N Ogura, K Watashi, **T Wakita**. FORMATION OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR (ccc) DNA IN HepAD38.7 CELLS, A TETRACYCLINE INDUCIBLE HBV EXPRESSION CELL LINE. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (2) HH Aly, K Watashi, K Chayama, **T Wakita**. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (3) M Iwamoto, K Watashi, S Tsukuda, HH Aly, R Suzuki, H Aizaki, O Koiwai, H Kusuhara, **T Wakita**. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (4) K Watashi, G Liang, M Iwamoto, H Marusawa, K Kitamura, M Muramatsu, R Suzuki, J Li, S Tong, Y Tanaka, K Murata, H Aizaki, **T Wakita**. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)

- (5) K Watashi, A Sluder, S Matsunaga, A Ryo, S Nakajima, M Iwamoto, S Tsukuda, K Borroto-Esoda, M Sugiyama, Y Tanaka, M Mizokami, **T Wakita**. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (6) S Tsukuda, K Watashi, M Iwamoto, R Suzuki, H Aizaki, S Kojima, **T Wakita**. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (7) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、HH Aly、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆字、NTCP安定発現細胞株におけるB型肝炎ウイルス侵入機構の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- (8) HH Aly, K Watashi, K Chayama, **T Wakita**. Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- (9) 古賀れい奈、宮川敬、松永智子、渡士幸一、**脇田隆字**、梁明秀、Tetherin/BST-2はHBV複製を負に制御する、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 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

研究分担者：八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター長  
研究協力者：長岡 進矢 国立病院機構長崎医療センター 肝炎治療研究室長

分担研究課題：当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討

研究要旨：当院のゲノム検体提出例174例の臨床背景の検討をおこなう。検体採取時の血液検査値(ALT値、血小板数、HBeAg/Ab、HBV-DNA量、HBsAg量)、治療内容、背景肝病変、肝細胞癌の有無、HBsAg消失の有無を病態別に検討した。登録症例の平均年齢は55.4歳、男性：106例、女性：68例であった。HBeAg陽性例：29例(16.7%)、平均HBsAg量は3226 IU/mlであった。治療内容は核酸アナログ治療例：72例、インターフェロン治療例：16例、シーケンシャル療法：4例であった。背景肝病変は慢性肝炎：109例、肝硬変：65例、肝細胞癌合併は22例(12.6%)、HBsAg消失例は26例(15%)であった。病態の内訳はHBeAg(+)陽性ASC：4例(2%)、HBeAg(-)陰性ASC:57例(33%)、慢性肝炎：47例(27%)、肝硬変：65例(37%)であった。HBsAg量の比較では、HBeAg(+)ASCは38254 IU/mlで他の群と比較し有意に高値であった( $p<0.05$ )。肝細胞癌合併は肝硬変で19例(29%、肝細胞癌症例の90%)であり、他の群と比較し有意に高率であった( $p<0.01$ )。HBsAg消失例はHBeAg(-)ASC、肝硬変でそれぞれ12例(21%)、13例(20%)で、慢性肝炎と比較し有意に高率であった( $p<0.01$ )。

A. 研究目的

当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討をおこなう。

carrier:無症候性キャリア)、HBeAg(-)ASC、慢性肝炎、肝硬変の臨床背景について検討をおこなう。

B. 研究方法

当院より検体提出をおこなった 174 例の年齢、性別、検体採取時の ALT 値、血小板数、HBV-DNA 量、HBe 抗原抗体(HBeAg/Ab)、HBs 抗原(HBsAg)量、治療内容：核酸アナログ製剤：LAM(ラミブジン単独)、LAM+ADV(ラミブジン+アデフォビル併用)、ETV(エンテカビル単独)、インターフェロン製剤：n-IFN(天然型インターフェロン)、PEG-IFN(ペグインターフェロン)、シーケンシャル療法、背景肝病変、肝細胞癌の有無、HBsAg 消失の有無について検討をおこなう。

(倫理面への配慮)

患者に対しては血液検体の保存、研究使用に関する説明をおこない、紙面にて同意を取得した。

C. 研究結果

登録症例 174 例の平均年齢は 55.4 歳、男性：106 例、女性：68 例であった。HBe 抗原陽性：29 例(16.7%)、HBsAg 量：3226 IU/ml であった。核酸アナログ治療例は 72 例(LAM：6 例、LAM+ADV 併用：22 例、ETV：44 例)、インターフェロン治療例は 16 例(n-IFN：4 例、PEG-IFN：12 例)、シーケンシャル療法：4 例。背景肝病変は慢性肝炎 109 例、肝硬変 65 例、肝細胞癌合併は 22 例(12.6%)、HBsAg 消失例は 26 例(15%)

また、病態別HBeAg(+)ASC(Asymptomatic

であった(表 1)。病態別の臨床背景の内訳は、HBeAg(+)陽性 ASC : 4 例(2%)、HBeAg(-)陰性 ASC:57 例(33%)、慢性肝炎:47 例(27%)、肝硬変 : 65 例(37%)であった。

表1. 登録症例の臨床背景(n=174)

年齢(歳)	55.4
性別(男/女)	106/68
ALT値 IU/L	29.7
血小板数 $\times 10^4/\mu\text{L}$	17.4
HBV-DNA量,logcopies/ml	2.3
HBe抗原(+), n (%)	29 (16.7)
HBs抗原量, IU/ml	3226
核酸アナログ製剤(LAM/LAM+ADV/ETV)	6/22/44
インターフェロン製剤(n-IFN/PEG-IFN)	4/12
シーケンシャル療法	4
背景肝病変(慢性肝炎/肝硬変)	109/65
肝細胞癌合併, n (%)	22 (12.6)
HBsAg消失例, n(%)	26 (15.0)

HBsAg 量は HBeAg(+)ASC : 38254 IU/ml、HBeAg(-)ASC : 2284 IU/ml、慢性肝炎 : 4248 IU/ml、肝硬変 : 1188 IU/ml で、HBeAg(+)ASC が他群と比較し、有意に高値であった( $p<0.05$ )。また肝硬変は慢性肝炎と比較し、HBsAg が有意に低値であった( $p<0.01$ )。肝細胞癌合併は肝硬変で 19 例(29%)、肝細胞癌症例のうち 90%)であり、HBeAg(-)ASC、慢性肝炎と比較し有意に肝発癌率が高率であった ( $p<0.001$ )。HBsAg 消失例は HBeAg(-)ASC、肝硬変でそれぞれ 12 例(21%)、13 例(20%)で、慢性肝炎と比較し有意に高率であった( $p<0.01$ )(表 2)。

表2. 病態別の臨床背景(n=174)

	HBeAg(+)ASC	HBeAg(-)ASC	慢性肝炎	肝硬変
症例数	4	57	47	65
年齢(歳)	59.8	58.4	47.5	58.1
性別(男/女)	2/2	32/25	27/20	45/21
ALT値 IU/L	29	23	43	26
血小板数 $\times 10^4/\mu\text{L}$	21.6	18.1	17.6	16.5
HBV-DNA量,LC/ml	8.5	2.4	2.6	1.6
HBe抗原(+), n (%)	4(100)	0(0)	18(38)	7(11)
HBs抗原量, IU/ml	38254	2284	4248	1188
核酸アナログ製剤	0	0	28	44
インターフェロン製剤	0	0	15	1
肝細胞癌合併, n (%)	0(0)	1(2)	2(4)	19(29)
HBsAg消失例, n (%)	0(0)	12(21)	1(2)	13(20)

## D. 考察

当院の検体提出症例は B 型慢性肝疾患の各病態である HBeAg+/-ASC、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌が網羅され、PEG-IFN、核酸アナログの治療介入がなされている症例も多く含まれている。長期フォロー例が多く、HBsAg 消失例が 26 例(15%)も比較的多数含まれている。

## E. 結論

当院のゲノム検体提出例の病態の内訳は、HBeAg(-)ASC、慢性肝炎が約 30%、肝硬変が約 40%であった。B 型慢性肝疾患の病態毎で HBsAg 量に有意差を認めた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Bae SK, **Yatsushashi H**, Takahara I, Tamada Y, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Ishibashi H. Sequential occurrence of acute hepatitis B among members of a high school Sumo wrestling club. *Hepatology Res.* 2013 Sep 6.
- (2) 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.* 2013 Jul 29.
- (3) 長岡進矢, **八橋 弘**. インターフェロン治療, -III. 治療編, 2. 抗ウイルス薬による治療-. *HEPATOLOGY PRACTICE 1 B 型肝炎の診療を極める -基本から最前線まで. 田中榮司他, 文光堂, 東京, pp.97-103, 2013.10.11, 216 頁*
- (4) **八橋 弘**. . HBV とその感染症の基礎, 4. HBV 感染の診断法. *de novo B 型肝炎 - HBV 再活性化予防のための基礎知識 -*, 持田智編集, 医薬ジャーナ

ル社，大阪，pp.55-67，2013.9.20，175  
頁

- (5) **八橋 弘** .PegIFN と HBs 抗原量 .別冊・  
医学のあゆみ B 型肝炎 - 最新治療コ  
ンセンサス，溝上雅史編集，医歯薬出  
版株式会社，東京，pp.63-68，2013.7.15，  
133 頁
- (6) **八橋 弘** . 肝疾患 急性肝炎(B型).  
治療過程で一目でわかる 消化器薬物  
療法 STEP 1・2・3 .一瀬雅夫，岡 政  
志，持田 智編集，メジカルビュー社，  
東京，pp.154-158，2013.4.1，303 頁
- (7) **八橋 弘** . ウイルス肝炎と肝癌の撲滅  
を目指した実地診療のすすめかた，B  
型肝炎の自然経過と治療の進歩 - 実地

医家はどのように対処すればよいのか  
- . Medical Practice 30(2) : 186-193，  
2013.2.1.

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

研究分担者：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  
研究協力者：田中 榮司 信州大学医学部内科学第二講座 教授

分担研究課題：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

研究要旨：【目的】B型慢性肝炎に対するentecavir（ETV）治療における、耐性株出現に関わるウイルス変異について検討した。【対象と方法】7例のETV耐性例について、治療前および耐性出現後の30 pointについてHBVの全塩基配列を決定し、breakthrough(BT)群とnon-response（NR）群に分けて比較検討した。【結果】BT群では全例lamivudine(LMV)に対するYMDD耐性変異が出現し、8/11 pointでETVに対する追加変異を認めた。しかしながら、NR群では治療開始前および耐性時における既報のETV耐性変異は見られず、また、BTの治療前の塩基配列と比較しても有意な変異は見られなかった。【結語】B型慢性肝炎に対するETV治療の耐性は、Breakthrough型とnon-response型でその機序が異なっており、Breakthrough型ではHBVのポリメラーゼ領域に遺伝子変異が生じることにより耐性を獲得するが、non-response型では遺伝子変異がないにもかかわらず耐性を示す。後者には宿主側の要因が関与している可能性があり、今後検討が必要である。

#### A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療は血中の HBV DNA を減少させ、肝炎を鎮静化させることにより、肝線維化の進展を止め、肝細胞癌の発生率を低下させることができる。しかしながら、耐性株が生じると、HBV の再上昇が見られ、肝炎が再燃し、時に重症化する症例が見られる。今回我々は、entecavir(ETV)に対する耐性株が出現した症例について、HBV 全遺伝子配列を用いて耐性変異を検討した。

#### B. 研究方法

対象は、ETVに対し耐性の出現した 7 例（男性 5 例、年齢中央値 54 歳）でHBV遺伝子型は 6 例がgenotype Cであった。4 例は lamivudine(LMV)からの移行例であり、3 例は初回投与例であった。投与期間の中央値は 1.7 年であった。7 例についてETV開始前の 9pointとETV耐性株が出現した 21 pointについてHBVの全塩基配列を決定し、比較検

討した。患者群を 4 例のbreakthrough(BT)群と 3 例のnon-response(NR)群( HBV DNAの 2 logcopies/mlの低下が見られない群 )に分けて比較した。BT群からは、治療前 5 point、耐性株出現後 11 pointの解析を行い、NR群からは治療前 4 point耐性株出現後 10 pointの全塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

今回の研究は信州大学医学部の倫理委員会により承認されたものであり、患者さん個々より書面での承諾を得ている。

#### C. 研究結果

BT 群においては治療前に既報の耐性変異を有している症例はなかったが、耐性株出現後は全ての症例で LMV 耐性変異である reverse transcriptase C ドメイン 204 番の YMDD 変異を認めた。しかしながら、3/11 point で ETV 耐性における追加変異の B180 および B169 の変異は認められなかった。そ

れに対し、NR 群では既報の ETV 変異は認められず、また、そのほかに治療前と耐性株出現後において共通に有意に変化した配列は見られなかった。また、NR 群と BT 群の治療前配列を比較しても有意な変異は見られなかった。

#### D. 考察

これらの結果より、ETV の耐性には一旦 HBV DNA が減少するものの、耐性株が生じ、breakthrough を起こしてくるものと、遺伝子に変異が生じず、治療開始より治療効果が悪い 2 つの状態が有り、耐性の仕方に違いがあるものと思われた。

#### E. 結論

B 型慢性肝炎に対する ETV 治療における耐性には耐性遺伝子変化によるものと、耐性株が生じず、最初から耐性を示すものがあり、後者は宿主の因子が関与している可能性が高いと思われる。今後宿主因子についての解析が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Morita S, **Matsumoto A**, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura

T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res.* 2013 Jul 16.

#### 2. 学会発表

- (1) **松本 昌博**, 森田 進, 田中 榮司. 高感度 HBV RNA 定量系による B 型慢性肝炎核酸アナログ治療例の病態解析. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.
- (2) 奥原 禎久, 梅村 武司, 城下 智, 柴田 壮一郎, 木村 岳史, 森田 進, 小松 通治, **松本 昌博**, 吉澤 要, 田中 榮司. Entecavir 治療中における B 型慢性肝炎患者の血清サイトカイン、ケモカインの検討. 第 49 回日本肝臓学会総会 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：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院 研究院長  
千葉大学大学院医学研究院 消化器 腎臓内科学 教授  
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院 消化器 腎臓内科学 講師  
今関 文夫 千葉大学総合安全衛生管理機構 機構長 教授  
中本 晋吾 千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学 助教  
分担研究課題：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）

研究要旨：血中HBV DNAレベルに及ぼす宿主規定因子の検討を明らかにするためB型  
肝炎無症候性キャリア、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌患者の血液を千葉大学生命倫理  
委員会に申請承認が得られた研究プロトコルに基づき千葉大学医学部附属病院消化  
器内科にて採取、収集を引き続き行なった。また、HBVワクチンに対するHBVワクチン  
反応者および非反応者が存在することが知られており、その宿主規定因子の検討を明ら  
かにするためHBVワクチン反応者および非反応者の血液を採取、収集した。今後可能で  
あれば本研究班により集められた血液サンプルでGenome-wide association study (GWAS)  
等を行なっていただきその宿主規定因子を探索検討する。

#### A. 研究目的

これまでに HBe 抗原の存在や HBV DNA 高値は肝硬変や肝細胞癌発生の独立した危険因子であることが報告されている。しかしこれまでに血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子は不明であり、特に慢性肝炎で、その宿主因子を明らかにすることを目的とする。

また、HBV ワクチンに対する HBV ワクチン反応者および非反応者が存在することが知られており、その遺伝子レベルでの解析は、今後の B 型肝炎対策上重要である。

#### B. 研究方法

本研究班により集められた血液サンプルを用いて Genome-wide association study (GWAS)等を行なっていただきその宿主規定因子を探索検討する。本年度は平成 23 年 9 月 12 日千葉大学生命倫理委員会で承認が得られた研究プロトコル[研究課題名「B 型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主

遺伝子因子の探索研究」( 受付番号 308 ) に基づき血液採取、収集血液採取、収集を行なう。

#### ( 倫理面への配慮 )

倫理面への配慮：千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮を行なっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱う。

#### C. 研究結果

本年度までに B 型肝炎患者 42 名の同意承諾を得た後に血液採取、および臨床データ収集を行なった。また HBV ワクチンに対する HBV ワクチン反応者および非反応者合計 125 名の同意承諾を得た後に血液採取、収集を行なった。

#### D. 考察

上記研究プロトコルに基づき今後も血液採取、収集を行なう。

また、得られた GWAS の結果を解析し、B 型肝炎の病態に及ぼす宿主因子を検討する予定である。

#### E. 結論

本年度までに B 型肝炎患者 42 名および HBV ワクチンに対する HBV ワクチン反応解析用検体 125 名分の遺伝子解析用血液採取、収集を行なった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, **Yokosuka O**. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. *Cytokine* 64(2): 577-83, 2013.
- (2) Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, **Yokosuka O**. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. *Immunol Lett* 152(1): 8-15, 2013.
- (3) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, **Yokosuka O**. Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese

patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region. *PLoS One* 8(9): e73615, 2013.

- (4) Miyauchi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, **Yokosuka O**. Efficacy of lamivudine or entecavir against virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients. *Int J Med Sci* 10(6): 647-52, 2013.
- (5) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, **Yokosuka O**. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. *Int J Med Sci* 10(5): 567-74, 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：	持田 智	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	教授
研究協力者：	中山 伸朗	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	准教授
	菅原 通子	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	講師
	吉野 廉子	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	助教
	内田 義人	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	助教

分担研究課題：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

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の再活性化、劇症化に關与する要因を明らかにするためには、その生体側の要因とともに、増殖能を規定するウイルス学的背景を明らかにする必要がある。そこで、我々は核酸アナログ製剤の投与中止後における血清HBV-DNA量の増加速度と、ウイルス遺伝子の塩基配列の關連を解析し、ポリメラーゼ蛋白terminal protein domainにおけるaa15-17のアミノ酸変異が増殖能を規定し、これら酸性アミノ酸が連続する領域の何れかが中性アミノ酸に置換すると増殖速度が低下する可能性を見出した。今回はHuh-7D12細胞を用いた実験によって、これら生体内で觀察された現象がin vitroでも再現されることを確認した。また、B型劇症肝炎および免疫抑制・化学療法で再活性化して血清HBV-DNA量が短期間に高値になった症例では、同領域のアミノ酸配列が増殖速度の高度であるウイルスと同様であった。また、データベースを用いてgenotype AのHBV株で同領域のアミノ酸配列を見ると、変異率はAa株に比して増殖能が低いことが知られているAe株で低率であった。以上より、polymerase蛋白terminal protein domainにおけるaa14-19のアミノ酸変異はHBVの増殖能を規定し、肝病態の成立に關与すると考えられた。

#### A. 研究目的

HBV感染者は全世界で約40億人存在し、うち2億4,000万人はキャリアで、年間60万人が肝疾患に起因して死亡していると推定される。HBVキャリアでは、ウイルスに対する免疫応答が生じた際に、血清HBV-DNA量が高値の場合に肝炎が成立し、これが長期間に及ぶと慢性肝炎から肝硬変へと進展して、肝癌を併発する場合がある。また、キャリアのみならず既往感染例は、免疫抑制・化学療法実施時にHBVの再活性化を生じ、血清HBV-DNA量が高値になると重症肝炎を発症するリスクがある。従って、HBV感染者における肝病態を規定する要因としては、宿主因子とともにウイルス

増殖能を規定する要因を明らかにする必要がある。

そこで、我々は核酸アナログによる抗ウイルス療法が著効し、その投与を中止したB型慢性肝疾患症例で、ウイルス血症再燃時の血清HBV-DNA量の推移を評価し、生体内におけるウイルス増殖能を検討した（病院IRB承認）。この検討における核酸アナログ中止基準は、HBe抗原陰性、HBV-DNA量が2.1 Log copies/mL未滿が1年以上継続し、さらにHBVコア關連抗原量が3.0 Log IU/mL未滿である。202例中34例（16.8%）がこの基準を満たしたが、HBs抗原量に関する規定を設けなかったため22

例 (64.7%) でウイルス血症が再燃した。但し、これら再燃例における血清 HBV-DNA 量の増加速度は症例によって異なり、4.0 Log copies/mL 以上に上昇する期間は 2 週から 16 週以降まで多彩であった。そこで、再燃時に単離した HBV の全塩基配列を解析したところ、生体内でのウイルス増殖能と genotype、pre-core、basal core promoter 変異には関連が見られなかったが、nt2,349 から nt2,357 は増殖速度が遅い症例で変異が多かった。この領域はコア蛋白の ORF では aa151-153 に、ポリメラーゼ蛋白では terminal protein domain (TPD) の aa15-17 に相当するが、後者は DDE と酸性アミノ酸が連続しており、その何れかが中性アミノ酸に置換された HBV 株は生体内における増殖速度が遅かった。

そこで、HBV のポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15-17 がその増殖能を規定することを明らかにするために、Huh-7D12 を用いた in vitro での検討を行った。また、HBV の増殖能が亢進していると推定される B 型劇症肝炎および de novo B 型肝炎から単離した HBV 株および増殖速度が遅いとされる genotype Ae 株で塩基配列を解析し、病態との関連を検討した。

## B. 研究方法

### (1) In vitro での検討

核酸アナログ中止後に血清 HBV-DNA 量が 4.0 Log copies/mL 以上に上昇した期間が 4 週以内、4~12 週、12 週以降であった genotype B1/Bj の感染例から夫々単離したウイルス株 (AB900095、AB900107、AB900112) の全長 DNA を Huh-7D12 細胞に導入し、培養上清の HBV-DNA 量を経時的に測定した。導入効率は pSEAP2-Basic Vector を同時に導入し、培養上清の SEAP 酵素活性で確認した。

### (2) 肝疾患症例における検討

以下の症例から単離した HBV 株でウイルス DNA の全塩基配列を解析し、ポリメラーゼ蛋白 TPD における aa15-17 のアミノ酸

配列を検討した。1) HBV 急性感染による劇症肝炎症例、2) 血液悪性腫瘍に対する化学療法後に HBV 再活性化し、3 か月間で血清 HBV-DNA 量が既往 5.4 Log copies/mL まで上昇した既往感染例、3) Genotype Ae の HBV 株による急性肝炎症例。Genotype Aa と Ae 株に関しては、NCBI database によって、aa15-17 のアミノ酸配列を検証した。

## C. 研究結果

### (1) In vitro での検討

導入した HBV-DNA のコア蛋白に関しては、3 株は何れも aa151~153 が RRG でアミノ酸変異は認められなかったが、ポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 は増殖速度の遅かった株 (AB900112) のみに E17G 変異が見られ、他の 2 株 (AB900095、AB900107) は配列が DDE の野生株であった。

培養 6 時間後の上清における HBV-DNA 量 (平均  $\pm$  SD, n=3) は生体内での増殖速度の遅い株が  $2.0 \pm 0.5 \times 10^8$  copies/mL であったのに対して、中間の株は  $11.8 \pm 1.3 \times 10^8$  copies/mL、速かった株は  $23.1 \pm 5.4 \times 10^8$  copies/mL で、夫々 5.9 倍、11.6 倍であった。なお、DNA の導入効率は何れの細胞でも同等であった。

### (2) 肝疾患症例における検討

B 型劇症肝炎急性感染例から単離した HBV 株は genotype C で pre-core が変異株、ポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 は DDE で野生株の配列を示した。HBV 再活性化例から単離した HBV 株は genotype C で pre-core と basal core promoter はともに野生株であったが、ポリメラーゼ領域は DDE で野生株であった。一方、急性肝炎患者から単離した genotype Ae 株は同領域のアミノ酸配列は DDG であり、極性の異なる変異が認められた。また、NCBI database による検討では、同領域のアミノ酸配列は、genotype Aa 株では DDE であったが、Ae 株は DDG が大部分であり、Bj ないし C 株で増殖速度の遅い株と同様の配列を示した。

#### D. 考察

核酸アナログ中止後における血清 HBV-DNA 量の増加速度を評価することで、生体内におけるウイルスの増殖速度を評価することが可能であった。ウイルス遺伝子の全塩基配列を解析して、血清 HBV-DNA 量の増加速度との関連を見ることで、nt2,349~2,357 の変異がウイルス増殖に關与する可能性があり、これに相当するポリメラーゼ蛋白 TPD における aa15~17 のアミノ酸変異がその primer 機能に影響し、増殖能を規定すると想定された。この仮説は Huh-7D12 細胞を用いた in vitro 実験でも確認され、劇症肝炎、急性肝炎および HBV 既往感染から再活性化した症例でも臨床経過との関連性が認められた。

Genotype A 株の中では一般に増殖速度が遅いとされる Ae 株では同領域が変異株と同様のアミノ酸配列を示すのに対して、Aa 株の配列は野生株と一致している。Genotype Bj、C 株でもポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 の配列が Aa 株、Ae 株の何れを呈するかによって、その感染例の病態が規定される可能性がある。

#### E. 結論

HBV のポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 のアミノ酸配列は、その増殖速度を規定し、感染例における再活性化、重症化などの病態を規定する可能性があると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Yoshino K, Uchida Y, Sugawara K, Kouyama J, Naiki K, Inao M, Nakayama N, **Mochida S**. The aa15-17 amino acid sequence in the terminal protein domain of

the hepatitis B virus polymerase as a viral factor affecting replication activity of the virus. (submitted)

##### 2. 学会発表

- (1) Yoshino K, Uchida Y, Sugawara K, Kouyama J, Naiki K, Nakayama N, **Mochida S**. The aa15-17 amino acid sequence in the terminal protein domain of HBV polymerase as a viral factor affecting in vivo replication activity of the virus. EASL 2013, Am-sterdam, 2013 April.
- (2) 内田義人, 神山淳一, **持田 智**. B 型肝炎の病態を規定する可能性がある新たなウイルス要因: ポリメラーゼ領域 aa15-17 の変異. シンポジウム「B 型肝炎: 概念の変遷とその臨床的意義」. 第 49 回日本肝臓学会総会, 東京, 2013 年 6 月.
- (3) Uchida Y, Yoshino K, Sugawara K, Kouyama J, Naiki K, Nakayama N, **Mochida S**. The aa15-17 amino acid sequence in the terminal protein domain of HBV polymerase as a viral factor affecting in vivo as well as in vitro replication activity of the virus. The Liver Meeting 2013 AASLD, Washington, 2013 November.

#### 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：小池 和彦 東京大学大学院医学系研究科 教授  
研究協力者：近藤 祐嗣 東京大学医学部附属病院 助教

分担研究課題：肝癌感受性遺伝子の同定

研究要旨：本邦におけるB-HCCの家族歴の実態を明らかにするため、当科に2007年～2011年に入院したB-HCC 125例（男性99例、女性26例、平均年齢60.5歳）の家族歴を、診察時の問診および過去の診療記録により調査した。当科におけるB-HCCでは、親、同胞にHBV慢性感染が判明している例はそれぞれ39例（31%）、29例(23%)、HCC歴が判明している例は7例（6%）、9例（7%）であった。家族歴の有無による、発癌年齢や生命予後への影響については今回の調査では明らかではなく、複数の同胞にB-HCCが確認された濃厚家族歴をもつ4例に限ってみても同様であった。家族歴は、問診が唯一の情報源であるが、臨床医の家族歴への関心があまり高いとは言えないことと、本人自身も家族歴を把握していない例があり、漏れのない正確な情報の集積が今後の課題である。

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）感染症は世界で最も蔓延しているウイルス肝炎であり、我が国でも 100 万人を超える持続感染者が存在する。HBV を感染宿主から完全に排除することは出来ず、持続感染者の一部は肝硬変や肝細胞癌の発症に至り、致命的経過をたどるため、HBV 関連肝疾患は今後も医学的ならびに医療経済的に大きな問題であり続けると推測される。HBV 感染症と、それに引き続く肝硬変、肝細胞癌を的確に治療するためには、ウイルス因子のみならず、宿主（患者）因子を考慮することが必要である。本研究は、HBV 関連肝細胞癌の発生や再発、および線維化の進行に影響を与える感受性遺伝子の同定を目的とする。

#### B. 研究方法

東京大学消化器内科における HBV 関連肝細胞癌症例の発癌時期、部位、治療効果、再発の様式等の臨床情報を、前向きにデータベースに登録する。本学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た

研究計画に基づき、患者の同意を得て血球の採取、保存を行い、本学および共同研究施設にて網羅的遺伝子多型解析を実施する。

#### （倫理面への配慮）

新GCPを遵守し、臨床試験の目的・方法、検査の副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した。

#### C. 研究結果

(1)B 型肝炎関連肝癌(B-HCC)の家族歴に焦点を当てた報告は少ないが、これまでの報告を総合すると、親・同胞に HCC 患者が存在すれば本人の発癌リスクは 2～3 倍程度になるものと推測される。本邦における B-HCC の家族歴の実態を明らかにするため、当科に 2007 年～2011 年に入院した B-HCC 125 例（男性 99 例、女性 26 例、平均年齢 60.5 歳）の家族歴を、診察時の問診および過去の診療記録により調査した。当科にお

ける B-HCC では、親、同胞に HBV 慢性感染が判明している例はそれぞれ 39 例 (31%)、29 例 (23%)、HCC 歴が判明している例は 7 例 (6%)、9 例 (7%) であった。家族歴の有無による、発癌年齢や生命予後への影響については今回の調査では明らかではなく、複数の同胞に B-HCC が確認された濃厚家族歴をもつ 4 例に限ってみても同様であった。家族歴は、問診が唯一の情報源であるが、臨床医の家族歴への関心があまり高いとは言えないことと、本人自身も家族歴を把握していない例があり、漏れのない正確な情報の集積が今後の課題である。

(2) 当科にて構築した統括的な肝疾患データベースを活用し、肝細胞癌を合併した慢性 B 型肝炎患者 154 例の血清を抽出し、臨床的データとともに網羅的遺伝子多型解析のために提供した。

#### D. 考察

本邦における新規肝細胞癌の発生は漸減傾向にあり、特に C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の減少が目立つが、HBV 関連肝細胞癌は依然減少しておらず、今後も数十年にわたり、一定数の発癌例が認められると推測される。近年の核酸アナログ製剤の登場により、HBV の増殖を直接抑制できるようになった結果、多くの症例で肝炎の沈静化や線維化の抑制が得られるようになり、発癌率の低下や生命予後の改善が得られると期待されるが、肝炎や線維化が軽微であっても発癌に至る例は存在する。発癌リスクの的確な把握のためには、ウイルス因子や通常の臨床情報に加え、宿主遺伝的因子の解析が不可欠であると考えられる。

また、家族歴の情報は、宿主因子の一端を解明する手がかりとなる可能性があるが、そのためには基本的な問診の重要性を再認識する必要がある。

#### E. 結論

HBV 関連肝細胞癌患者の臨床データを蓄積し、血球検体の採取を行ってきた。今後の研究班における網羅的多型解析に用いていく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, **Koike K**, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
- (2) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, **Koike K**. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. J Gastroenterol 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24258409.
- (3) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, **Koike K**, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. Int J Cancer 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.
- (4) Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, **Koike K**. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. Biochem Biophys Res Commun 2013 Jul 23. doi:pii: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.
- (5) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, **Koike K**. Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. J Gastroenterol 2013 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23783841.
- (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 HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.
- (7) Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, **Koike K**. Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life. *Psychooncology* 2013 May 19. doi:10.1002/pon.3300. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686523.
- (8) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, **Koike K**. CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.
- (9) Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, **Koike K**. Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor. *PLoS One* 2013;8(11):e78346. PubMed PMID: 24223793
- (10) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, **Koike K**, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
- (11) Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, **Koike K**. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. *Sci Rep* 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.
- (12) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, **Koike K**, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432(1):22-27. PMID: 23376718.
- (13) Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, **Koike K**. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. *Sci Rep* 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.
- (14) Ikeda K, 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. *Hepatology* 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.
- (15) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Ohtomo K, Omata M, Yoshida H, **Koike K**. Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi: 10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- (16) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, **Koike K**, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
- (17) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, **Koike K**. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1

expression. Hepatology 2013;57:162-170.  
PMID: 22898998.

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：坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部 教授

分担研究課題：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

研究要旨：biliary / stem cell markerであるCK19、EpCAM、CD133、癌抑制遺伝子である p53、癌遺伝子である  $\beta$ -cateninの肝細胞癌における発現および臨床病理学的な特徴、予後に関する検討を行った。Biliary / stem cell marker陽性の肝細胞癌、p53陽性の肝細胞癌では悪性度（分化度、vp/im等）、線維性間質との関連が見られた。 $\beta$ -catenin陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP値、PIVKA値との相関のみがみられた。またHBs抗原との関連が、CK19陽性の肝細胞癌およびp53陽性の肝細胞癌で見られた。予後に関しては、CK19が一番強く関連すると考えられた。CK19陽性の肝細胞癌とEpCAM陽性の肝細胞癌、EpCAM陽性の肝細胞癌とp53陽性の肝細胞癌では関連が認められたが、その他では関連は認めなかった。以上、CK19の発現は、De novo発癌との関連、B型肝炎との関連が示唆されるが、さらに悪性度に係わる機序、サブクラス分類との関連を検討する予定である。

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス(HBV)感染に伴う肝細胞癌では、明瞭な多段階発癌過程を示さないいわゆる de novo 発癌を起こす症例があり、肝癌全体の予後の改善には de novo 発癌に関する更なる研究が望まれる。本研究は、de novo 発癌の分子病理像や多段階発癌との異同をより明確にすることにより、個々の肝癌症例に最適な診断・治療の選択を可能とすることを目的とする。B 型肝炎関連肝癌の発癌や悪性度に特異的な分子やシグナル伝達経路の異常を特定することは、より有効な早期診断法・悪性度診断法の開発や新規治療標的の同定、さらには個別化治療に繋がると期待される。

#### B. 研究方法

- 1) B 型肝炎関連肝癌における de novo 発癌と多段階発癌の分子機構  
幹細胞マーカー発現と癌幹細胞性の解析、癌遺伝子・癌抑制遺伝子異常との関連の解析

シグナル伝達経路異常と de novo 発癌、多段階発との関連の解析、並びに分子標的薬剤反応性の解析

- 2) B 型肝炎関連肝癌の網羅的遺伝子発現解析およびプロテオーム解析

癌部並びに非癌肝組織、肝癌細胞株を用いた、網羅的発現解析とプロテオーム解析

上記にて同定された特異的分子異常の臨床病理学的意義の解析、並びに機能解析

#### （倫理面への配慮）

ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号 16-34）。

### C. 研究結果

biliary / stem cell marker である CK19、EpCAM、CD133、癌抑制遺伝子である p53、癌遺伝子である  $\beta$ -catenin の肝細胞癌における発現および臨床病理学的な特徴に関する検討を行った。研究材料は、慶應義塾大学病院で 2003-2010 年に肝細胞癌と診断された肝切除検体 211 例であり、結節ごとに免疫染色および臨床病理学的因子、線維性間質増生、予後について検討した。壊死の強いもの、混合型肝癌や細胆管癌および胆管癌様所見を含むものは除外した。免疫染色の評価方法は、CK19 は結節の 5%以上、EpCAM は 10%の腫瘍細胞に染まるものを陽性とした。また、p53 は結節の 5%以上で濃い核の染色像を示すもの、 $\beta$ -catenin は 10%以上の核ないし細胞質に明瞭な染色所見を認めるものを陽性(異常所見陽性)とした。CD133 は正常でのコントロールである胆管では陽性であったが、殆どの症例で陽性像は得られず、評価から除外した。線維性間質に関しては HE 染色と EVG 染色で評価し、結節の 30%以上を占めるものを陽性とした。AFP は 21ng/ml 以上、PIVKA は 40ng/ml 以上を高値とした。

結果は CK19 陽性例が 12/211 例(5.6%)、EpCAM 陽性例は 25/211 例(11.8%)、p53 陽性例は 20/211 例(10.4%)、 $\beta$ -catenin 陽性例は 18/211(8.5%)であった。臨床病理学的因子について検討したところ、CK19 陽性例では CK19 陰性例と比較して有意に、分化度が低く、門脈浸潤例が多く、線維性間質を有する症例が多かった。EpCAM 陽性例は EpCAM 陰性例に比べて有意に、分化度が低く、線維性間質を有する症例が多かった。p53 陽性例は p53 陰性例に比べ、分化度が低く、門脈浸潤が多く、線維性間質を有する症例が多かった。 $\beta$ -catenin 陽性例は AFP、PIVKA 値が高いものが多かった。マーカー同士の関連に関しては、CK19 陽性例と EpCAM 陽性例、EpCAM 陽性例と p53 陽性例で有意な関連が見られた。

予後に関しては、Disease Free Survival (DFS)および Overall Survival (OS)との関係

を Kaplan-Meier 法にて検討した。CK19 陽性例は CK19 陰性例と比べて、有意に再発率が高かったが ( $p < 0.05$ )、生存率に関しては有意な差は見られなかった( $p = 0.185$ )。EpCAM 陽性例、p53 陽性例および  $\beta$ -catenin 陽性例では陰性例と比べて、再発および生存率に関する有意な差は得られなかった。p53 陽性例に関しては再発例が多く見られたが、今回の検討では統計学的には有意ではなかった。またウイルス学的背景因子との関連に関しては、CK19 陽性例および p53 陽性例では陰性例に比べて、HBs 抗原陽性のものが有意に多かった( $p < 0.05$ )。いずれも HCV 抗体陽性率に関する相関は見られなかった。EpCAM 陽性例および  $\beta$ -catenin 陽性例では、HBs 抗原陽性率、HCV 抗体陽性率との相関はいずれも認めなかった。

### D. 考察

CK19 に関しては肝細胞癌で免疫染色が陽性となる症例があることが知られ、分化度が低く、stage が進行した癌で多く、術後の再発率やリンパ節転移率が高いとされる。また EpCAM、CD133 も同様の報告が見られ、EpCAM 過剰発現は stage の進行や生存期間に係わり、CD133 陽性例は予後が悪いとされる。p53 陽性例に関しては、肝細胞癌に関しては免疫染色のみでの検討は難しいとの報告も見られるが、悪性度にかかわる因子であり、予後不良との関連が推測される。 $\beta$ -catenin 陽性例は予後不良とする報告が見られる。

今回の検討では、Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌および p53 陽性の肝細胞癌では悪性度(分化度、門脈浸潤)、線維性間質と相関することが示された。 $\beta$ -catenin 陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP 値、PIVKA 値との相関のみが見られた。また HBs 抗原との関連が、CK19 陽性の肝細胞癌および p53 陽性の肝細胞癌で見られた。予後に関しては、CK19 が一番強く関連すると考えられた。今回検討したマーカー同士の関連は一部で見られるものの、それぞれ個々のマーカーが異なる悪性度を反映している可能性が考え

られた。今後、発癌様式との関連などについてさらに解析を進め、さらに悪性度に係わるマーカーに関して検討し、サブクラス分類との関連を検討する予定である。またそれぞれの marker 同士の関連についても詳細に解析し、各 marker が陽性となることの意義を一層明らかにしていきたいと考えている。

#### E. 結論

Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌、p53 陽性の肝細胞癌では、有意に悪性度が高く、線維性間質を有することが示された。また  $\beta$ -catenin 陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP 値、PIVKA 値との相関のみが見られた。各 marker 間での関連は認めるものの、予後、ウイルス学的背景因子などに差異も認められ、さらに悪性度に係わるマーカーに関して検討し、サブクラス分類との関連を検討する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, **Sakamoto M**. Leucine- rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 319: 113-21, 2013.
- (2) Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, **Sakamoto M**. Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. *Exp Cell Res*. 319: 35-44, 2013.

##### 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：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 教授

分担研究課題：背景肝疾患から見た肝発癌の病態解析

研究要旨：B型肝炎細胞癌患者の切除組織から非腫瘍部の細胞を分離、初代培養した。コラゲナーゼ灌流、濾過、遠心、コラーゲンコートディッシュを組み合わせることで肝細胞を培養した。分離操作を始めるまでに3時間以上が経過した、長時間温阻血肝からの培養では生細胞はほとんど得られなかった。温阻血時間が2-3時間の症例では生細胞が10%程度あったが、培養3日目には大部分の肝細胞は死滅し、残った生細胞のうち肝細胞は10%以下であった。培養中に繊維芽細胞が旺盛に増殖し、結果的に培養日数の経過とともに肝細胞の比率はさらに低下した。臓器保存・修復の技術を併用することにより、培養3日目までの生細胞数を増加させることができたが、肝細胞の比率は同様であった。DMSO含有培地により繊維芽細胞を減少させ肝細胞の比率を上げられたが、肝細胞数は変わらなかった。肝細胞は10週目まで維持し得た。さらに詳細な条件検討が必要だが、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。

A. 研究目的

B 型肝炎感染肝細胞を初代培養し、ウイルス存在下での各種ストレスに対する反応を評価し得る細胞ソースを提供するシステムを構築する。

B. 研究方法

切除肝組織の病理診断に影響がない部分を採取し、以下の方法で細胞を分離、培養した。

- 1) 採取した盲端状の肝組織では、断面の門脈断端にカニューレションし、前灌流後にコラゲナーゼ灌流、コラゲナーゼ消化した。
- 2) 盲端状ではない組織では、血管断端から可及的に wash out し、直ちに2mm角に細断し、洗浄後にコラゲナーゼ消化した。
- 3) 上記の各々のコラゲナーゼ処理を行う前に、われわれが独自に作成した臓器灌流保存用の灌流液を用いて低温酸素化灌流、あるいは、細断片を低温酸素

化液に浸漬し、組織の修復を試みた。修復後に分離培養することにより、初代培養細胞の回収率が向上するかを検討した。

- 4) Williams' E, DMEM/F12 に FBS、ニコチナマイド、デキサメサゾン、ITS mixture 等を添加し、細胞増殖に適した培地を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 4 1 5 号）に従い、事前に書面にてインフォームド・コンセントを取得した。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

- 1) 盲端状組織：前灌流およびコラゲナーゼ灌流により、赤血球が除去され、シングルセル化も容易であった。

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 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るべきであろう。

#### 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, Natsuzaka 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- $\kappa$ 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, Kurogochi 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 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, **武置 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 顕治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, **武置 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 顕治, 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, **武置 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 顕治、柿坂 達彦、横尾 英樹、神山 俊哉、**武重 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 顕治、敦賀 陽介、蒲池 浩文、**武重 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、**武重 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、**武重 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 顕治、神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、敦賀 陽介、蒲池 浩文、**武重 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 顕治、柿坂 達彦、横尾 英樹、山下 健一郎、神山 俊哉、**武重 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 顕治、敦賀 陽介、三浦 信明、西村 紳一郎、藤堂 省、**武重 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と、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) Tomiyama 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 $\alpha$  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 κB/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 遺伝子のプロモーター領域について機能的な SNP の探索を行なった。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事が示された。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事が示された。

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, Zuber 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-DPB1*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= $1.55 \times 10^{-7}$ 、 $OR=0.50$ )。

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 抗原の数力所の領域について 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(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

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：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：これまでに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り、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ることを明らかにした。

本年度は、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。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/Noctch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。

#### 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

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。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。

### (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。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。

### D. 考察

これまでに 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にした。今回の次世代シーケンサーを用いた肝癌のエクソーム解析では CH-B 関連肝癌と CH-C 関連肝癌のゲノム異常の違いが示唆された。遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサーを用いたゲノム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 や次世代シーケンサーを用いたゲノム異常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) Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, **Honda M**, Kaneko S. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 60(1):127-134. 2014.

- (2) Nishida N, Sawai H; Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka 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, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DPA1/DPB1 alleles to hepatitis B virus-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia', submitted to PLOS Genetics, on which you are listed as an author. PLoS One. 2014. in press.
- (3) Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Diabetologia. DOI; 10.1007/s00125-013-3149-9. 2014. in press.
- (4) **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Hepatology. DOI; 10.1002/hep.26788. 2013. in press.
- (5) Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Hepatol Res. DOI; 10.1111/hepr.12266. 2013. in press.
- (6) Spaniel C, **Honda M**, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. MicroRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. PLoS One. DOI; 10.1371/journal.pone.0076867. 2013. in press.
- (7) **Honda M**, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. DOI; 10.1186/1471-2407-13-191. 2013. in press.
- (8) Miyahara K, Nouse K, Morimoto Y, Takeuchi Y, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, **Honda M**, Kaneko S, Sato T, Sato S, Obi S, Iwadou S, Kobayashi Y, Takaguchi K, Kariyama K, Takuma Y, Takabatake H, Yamamoto K; Okayama Liver Cancer Group. Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. 109(8):2072-2078. 2013.
- (9) Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, **Honda M**, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol. 43(11):2956-2968. 2013.
- (10) Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, **Honda M**, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology. 58(3):1133-1142. 2013.
- (11) Komura T, Sakai Y, **Honda M**, Takamura T, Wada T, Kaneko S. ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. Cell Immunol. 282(1):44-52. 2013.
- (12) Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M,

Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol.* 87(9):5270-5286. 2013.

- (13) 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. Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res.* 19(7):1827-1837. 2013.
- (14) Yamashita T, **Honda M**, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 57(4):1484-1497. 2013.

## 2. 学会発表

- (1) **Masao Honda**, Takayoshi Shirasaki, Tetsuro Shimakami, Akito Sakai, Rika Horii, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Hikari Okada, Mikiko Nakamura, Eishiro Mizukoshi and Shuichi Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are

differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. (口演 32242) 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2013).メルボルン 2013.

- (2) **Masao Honda**, Takayoshi Shirasaki, Tetsuro Shimakami, Akito Sakai, Rika Horii, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Hikari Okada, Mikiko Nakamura, Eishiro Mizukoshi and Shuichi Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes (口演 Parallel 35: HCV Pathogenesis) The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD 2013).ワシントンD.C. 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：間野 修平 統計数理研究所 准教授  
研究協力者：西野 穰 国立遺伝学研究所 特任研究員

分担研究課題：多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発

研究要旨：GWASでは非常に多数のSNPを調べるため、標準的な統計解析を適用することが難しい。標準的解析を行うためには、まず考慮すべきSNPを絞らざるをえない。本年度は、特に、全ゲノムのSNPと臨床情報の交互作用の検出を目的とした研究を実施した。考案した手続きにより提供されたデータを解析したところ、多重比較の調整を行ってもなお有意な効果として、年齢とSNPの交互作用が女性における治療奏功に關与することを示した。さらに、このSNPを用いることにより、従来のIL28のSNPのみによる奏功予測を有意に改善できることを示した。

#### A. 研究目的

GWASでは非常に多数のSNPを調べるため、標準的な統計解析を適用することが難しい。臨床的変量を組み合わせて、予測モデルの作成、交互作用の検定、グラフィカルモデルの推定など標準的解析を行うためには、まず考慮すべきSNPを絞らざるをえない。回帰モデルによる変量選択については、情報量基準によるステップワイズ法が標準的であるが、変量が非常に多く、いくつかの寄与を持つ変量があり、個々の寄与は強くない、というGWASにおいて想定される状況では、ステップワイズ法による変量選択は困難であることが指摘されており、L1正則化回帰を用いることが標準的である。

一昨年度は、既存のデータについて、L1正則化回帰による変量選択とガウシアン・グラフィカルモデルの推定を実施し、それらの有効性を確認した。しかし、L1正則化回帰により選択される変量は、リサンプリング標本、層別化標本などにおいて再現性が低いことが観察された。そこで、昨年度は、変量選択に関する一層の検討、全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価の二点を目的とした。前者については、

Elastic net+stability selectionによる変量選択について、GWASのデータサイズに耐える仕様で実装したソフトウェアを開発した。後者については、不完全浸透や表型模写があったとしても、症例対照研究は偽陽性を著しく減らすことを示した。

残った問題は、交互作用の網羅的検出であった。既存のアプローチは周辺効果に着目して選んだ因子に対して網羅的に交互作用を検定することであるが、主効果がなければ上手くいかないことは明らかである。一方、SNPだけでなく、臨床情報も網羅的に取得されるようになっている。臨床情報との交互作用は、医学的に非常に興味がある上に、遺伝子間の交互作用に比較すれば検定の数が少ないので、その検出は比較的容易であるにも拘わらず、それを認識した解析が行われていない。そこで、本年度は、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、提供されたデータに適用することで、その評価を行うことを目的とした。

#### B. 研究方法

まず、研究代表者らの過去の研究に使用

されたデータについて、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、共変量として各々の SNP のアレルの数と臨床情報を取り、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。

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。さらに、代表者らの過去の研究により強力な治療奏功の予測因子になっている IL28 に対して、検出された交互作用が上記の意味で有意に奏功予測を改善するかどうかについて検討した。

#### (倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、解析に供するデータを使用することについて、データを取得する各参加機関、分担者が所属する統計数理研究所の研究倫理審査委員会より承認を得た。

#### C. 研究結果

女性において、共変量として年齢と各 SNP の型を取り、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。

#### D. 考察

Rs1287948 は PARP1 という single strand brake の修復に働く遺伝子の下流にあるが、この遺伝子の阻害薬はトリプルネガティブの乳がんのための分子標的薬として期待されている。本研究の結果は、閉経後の女性において奏功確率が下がるという臨床的によく知られた事実を分子レベルでサポートするものであるが、さらに、この予後の悪化に PARP1 という遺伝子が関わることを示唆していると考えられる。

#### E. 結論

最近の GWAS においては、SNP だけでなく、臨床情報も網羅的に取得されるようになってきている。臨床情報との交互作用は、医学的に非常に興味がある問題でもある。本年度は、交互作用の網羅的検出を目的としつつも、周辺効果の存在を仮定しない手続きを考案し、実際のデータにおいてそれが機能することを実証した。今後は、提案した手続きが GWAS において必須のものとしてとらえられるべきであると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Nishino, J. and **Mano, S.** (2013) “Expected number of selected SNVs in filtering approaches”, special issue of Statistical Analysis of Biomarkers for Personalized Medicine in *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013: 179761. 13pp
- (2) **岡野修平**(2013)「ポストゲノム時代に遺伝疫学を考える」生物の科学「遺伝」67 巻 3 号, 368-381.
- (3) Nishino, J., Sugiyama, M., Nishida, N., Tokunaga, K., Mizokami, M. and **Mano S.** “The SNP  $\times$  age interaction on response to interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy in hepatitis C woman patients”, submitted to Journal of Medical Virology.

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：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授  
研究協力者：伊藤 昌彦 浜松医科大学感染症学講座 助教

分担研究課題：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

研究要旨：ウイルス因子解析グループとして、本研究班で収集されたHBV陽性肝疾患患者血清中のHBV遺伝子解析、特に肝癌の発症リスクに關与するHBV変異を解析した。肝細胞がん癌症例群と慢性肝炎+無症候性キャリア群で比較解析を行った結果、HBx/Enhancer II領域に含まれるC1653Tの変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いがHBV複製許容性に影響するかを、独自に樹立したHdo細胞と親細胞HuH-7を用いて解析した。遺伝子型A-Dの混合DNAを導入してHBV複製を調べた結果、Hdo細胞では4 HBV株とも同程度に複製するのに対し、HuH-7では遺伝子型Bが特に高複製を示した。HBV DNA複製において、ウイルス遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在するのかもしれない。

#### A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの数は、世界的には3億5000万人にのぼると推定される。HBVの持続感染、病態進展、治療薬応答性などに関与する宿主側及びウイルス側の両遺伝要因が明らかとなることにより新たな診断技術、治療法の開発へ繋がることを期待される。

本研究では、ウイルス因子解析グループとして、本研究班で収集されたHBV陽性肝疾患患者血清中のHBV遺伝子解析、特に肝癌の発症リスクに關与するHBV変異等を解析した。また、ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いがHBV複製許容性に影響するかの解析を行った。

#### B. 研究方法

QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて血清より total DNA を抽出し、PCR にてHBV DNA 断片を得、ダイレクトシーケンシングにて遺伝子配列を決定した。

HBV ゲノムの 1.24 倍長を含むプラスミド(遺伝子型 A, B, C, D)は国立国際医療研究センター溝上先生より分与された。両プラスミドをリプログラミング化細胞株 Hdo#17, Hdo#23 及び parental の Huh7 細胞へトランスフェクションし、経時的に培養上清また細胞を回収し、ELISA 法により HBe 抗原 IHBs 抗原を測定また HBV 塩基配列を決定した。

#### （倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施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た。提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。

## C. 研究結果

### 1) 患者検体の HBV 遺伝子解析

本研究班の 15 施設で収集され匿名化の上提供された HBV 陽性肝疾患患者血清について HBV 遺伝子解析を行った。これまでに患者 67 検体について、HBx, Enhancer II, Basal Core promoter, PreC/C 領域を含む nt1360 から nt2062 領域の HBV DNA 配列を決定した。ウイルス因子解析グループ(国立感染研、名古屋市立大、浜松医大)の全成績をまとめ、肝細胞がん癌症例群と慢性肝炎+無症候性キャリア群で比較解析を行った結果、HBx また Enhancer II に含まれる C1653T の変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

### 2) 宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響

ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いが HBV 複製許容性に影響するかを解析している。昨年度、肝がん細胞 Huh7 のリプログラミング化によって肝臓実質細胞及び胆管上皮細胞に分化しうるオーバル様細胞(Hdo#17, Hdo#23)を樹立した。HBV 遺伝子型 A と C をそれぞれ導入したところ、この細胞株は HBV 複製許容性を維持していることを見出した。本年度、細胞の分化度の違いが複製しやすい HBV 株が異なるかを明らかにするため、HBV 遺伝子型 A, B, C, D の各ゲノムを同量混和し、HuH-7, Hdo#17, Hdo#23 にそれぞれ導入して経時的に各細胞内の HBV DNA を解析した。遺伝子導入後 6 日目まで、各細胞内の HBV DNA は 4 種類の HBV 株ともほぼ同じ割合で検出された。しかしながら、9 日目では、Hdo#17, Hdo#23 では 4 HBV 株ともほぼ同等に検出されたのに対し、HuH-7 では遺伝子型 B (Bj)株が全 population の半数以上を占めた。

## D. 考察

本研究班で収集された HBV 陽性患者検体について、肝がん発症と関連しうる HBV 変異をウイルス因子解析グループで共同解析した。文献的には、T1464G, C1485T, 1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, G1896A などの点変異と肝癌発症との関連

が報告されている。今回の解析からそのうち C1653T 変異が肝癌発症と有意に関連することが示された。この変異は Enhancer II 配列また HBx の変異であり、HBV 遺伝子発現制御に影響が生じる可能性は考えられるもののこれまでその機序は明らかにされていない。同変異が間接的に細胞増殖等影響する可能性も含め詳細な分子機構解析が必要である。

昨年度、肝癌細胞のリプログラミング化操作によって樹立した Hdo 細胞は、肝実質細胞、胆管上皮細胞へ誘導可能な bipotential な性質を有するオーバル細胞(成体肝幹細胞とも呼ばれる)に近似していた。本年度は、この低分化細胞株と親細胞 HuH-7 を駆使して、細胞の分化度の違いが HBV 増殖性に及ぼす影響を調べた。その結果、一部の HBV 株(遺伝子型 B)は、Hdo 細胞よりも HuH-7 細胞で明らかに高増殖性を示すことが見出された。HBV の遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在する可能性が考えられる。キーとなる宿主側及びウイルス側要因を解明したい。

## E. 結論

1) HBx / Enhancer II 領域に存在する C1653T の HBV DNA 変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

2) HBV 複製において、遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在する可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, **Suzuki T**, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. J Biosci. Bioeng (in press).

### 2. 学会発表

(1) 中島謙治、伊藤昌彦、李媛、孫鎖鋒、**鈴木哲朗**、B 型肝炎ウイルス (HBV) プレゲノム RNA 核外移行機序の解析.

第 61 回日本ウイルス学会学術集会.  
神戸. 2013 年 11 月.

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：田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授  
研究協力者：村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任助教

分担研究課題：ウイルスマーカーの臨床的有効性評価

研究要旨：全国多施設共同研究により収集された症例の中で、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、ウイルス遺伝子解析を行った。結果：男性の割合( $p < 0.0001$ )、genotype C の割合( $p < 0.0001$ )、A1762T/G1764A 変異( $p < 0.05$ ) が肝がん患者で有意に高かった。これらは、従来から肝がんとの関連性が報告されているウイルス変異である。今後は宿主因子と組み合わせることで、より精度の高い診断が期待される。

#### A. 研究目的

本研究班の目的は、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(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。分担研究として、同一個体内でのウイルスゲノムの解析や遺伝子機能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ことである。

#### B. 研究方法

全国多施設共同研究により、検体および対応する臨床データと患者情報(付帯情報)の収集を行った。各施設において検体とデータは、連結可能な匿名化を行った上で提出頂いた。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)

ヒト由来試料の解析にあたり、新規試料については必ずインフォームドコンセントを

取得し、既存試料についてはインフォームドコンセントの取得されたもののみを取り扱い、解析データの公表に際しては個人情報保護を徹底する。

#### C. 研究結果

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

従来から報告されている、コアプロモーター領域の A1762T/G1764A 変異が発がんに関連していること、肝がん患者に genotype C の割合が高いことが示された。今後は宿主因子と組み合わせることで、より精度の高い診断が期待される。

#### E. 結論

本研究で検体を収集した日本人集団において、肝がんに関連するウイルス因子が同定された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, **Tanaka Y**. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population. PLoS One. 2014;9(1):e86007.
- (2) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, **Tanaka 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(2):e86449.
- (3) Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, **Tanaka Y**. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J Gastroenterol. 2013;19(37):6214-20.
- (4) 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, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.
- (5) 西田奈央, **田中靖人**, 杉山真也, 馬渡頼子, 石井真由美, 徳永勝士, 溝上雅史. C型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索. 第49回日本肝臓学会総会. 平成25年6月6日~7日. 東京.
- (6) 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. 平成25年6月6日~7日. 東京.

### 2. 学会発表

- (1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Matsuura K, **Tanaka Y**, Poovorawan Y. The variation of human leukocyte antigens (HLA) associated with chronicity and viral clearance in HBV infected Thai patients. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. June 6-10, 2013. Singapore.
- (2) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, **Tanaka Y**, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh

## 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