

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 23～25 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：日本全国の検体収集施設から臨床検体（B型肝炎患者群、健常対照群）および臨床情報を収集するための検体・臨床情報管理システムを構築した。統一したフォーマットの簡易版データシートおよび詳細版データシートの2種類を準備し、収集した臨床検体に対して臨床情報を検体・臨床情報管理システム内で自動的に紐づけることができるようにした。本研究において、計1,163検体のB型肝炎患者群および健常対照群を収集し、そのうち1,100検体については簡易版データシートの紐付けが完了し、343検体については詳細版データシートの紐付けが完了した。加えて、アジア諸国を中心とした海外の研究施設（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）との共同研究体制を整えた。本研究に関連して、20報の論文報告、3報の学会発表、および1件の特許出願を行った。

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

以下に3年間の研究結果をまとめる。

- (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。
- (2) 収集したゲノムDNAの濃度測定、濃度調整、および96ウェルプレートへの分注作業を自動で行えるシステムを構築した。
- (3) 検体・臨床情報管理システムを利用して合計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）。
- (4) 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。
- (5) 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。

- (6) 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。
- (7) 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) Kusakabe A, Tanaka Y, Inoue M, Kurbanov F, Tatematsu K, Nojiri S, Joh T, Tsugane S, **Mizokami M**. A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. *J Gastroenterol* 46(1):117-124, 2011.
- (2) Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol* 54(1):19-25,

2011.

- (3) Yokosuka O, Kurosaki M, Imazeki F, Arase Y, Tanaka Y, Chayama K, Tanaka E, Kumada H, Izumi N, **Mizokami M**, Kudo M. Management of hepatitis B: Consensus of the Japan Society of Hepatology 2009. *Hepatol Res* 41(1):1-21, 2011.
- (4) Gulube Z, Chirara M, Kew M, Tanaka Y, **Mizokami M**, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus isolates from Zimbabwean blood donors. *J Med Virol* 83(2):235-244, 2011.
- (5) Sugauchi F, Tanaka Y, Kusumoto S, Matsuura K, Sugiyama M, Kurbanov F, Ueda R, **Mizokami M**. Virological and clinical characteristics on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. *J Med Virol* 83(3):412-418, 2011.
- (6) Yuen MF, Ka-Ho Wong D, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, **Mizokami M**, Lai CL. Transmissibility of Hepatitis B Virus (HBV) Infection through Blood Transfusion from Blood Donors with Occult HBV Infection. *Clin Infect Dis* 52(5):624-632, 2011.
- (7) Tatematsu K, Tanaka Y, Sugiyama M, Sudoh M, **Mizokami M**. Host sphingolipid biosynthesis is a promising therapeutic target for the inhibition of hepatitis B virus replication. *J Med Virol* 83(4):587-593, 2011.
- (8) Sugiyama M, Inui A, Shin IT, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, **Mizokami M**. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 41(10):936-945, 2011.
- (9) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related

- hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet.* 2012
- (10) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, **Mizokami M**. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One.* 2012;7(6):e39175
- (11) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, **Mizokami M**, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 7(9) e44743, 2012
- (12) Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, **Mizokami M**, Hou J. Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China. *PLoS One* 7(6): e38241, 2012
- (13) Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takachi R, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tsugane S; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142(7): 1468-75, 2012
- (14) 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)
- (15) 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
- (16) 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
- (17) 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
- (18) 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
- (19) 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

- (20) 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

- (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 23～25 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た検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行いながら、取得したデータを用いてネットワーク解析をおこなった。特に、HBVと相互作用をする可能性のある遺伝子について、そのネットワークがどこまで分かっているかの探索を行い、システム構築に寄与した。

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ことを目的とする。

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方法をとった。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ことに協力した。

（倫理面への配慮）

ネットワーク解析を行う際データを使用するために、倫理面の配慮が必要となった場合には、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うようにした。

C. 研究結果

平成 23 年度は、解析に必要なゲノムワイド SNP タイピングデータ、臨床情報、サンプル情報等を取得するための準備期間だった。そのため、国立国際医療研究センターおよび東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室が共同で進めている、検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行った。

平成 24 年度は、解析に必要なゲノムワイド SNP タイピングデータ、臨床情報、サンプル情報等を取得した。そのため、国立国際医療研究センターおよび東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室が共同で

進めている、検体収集・臨床情報蓄積システム構築への協力を行った。また、ヒトゲノムにおいてB型肝炎ウイルスと相互作用をもつ可能性のある遺伝子とそのネットワークの構築を行った。

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あって、最新の関係するネットワーク解析に資する検索や情報の提供を行い、システム構築に貢献した。

D. 考察

ゲノムワイドSNPタイピングデータを用いたネットワーク解析の方法に関する検討を行いながら、本研究課題を遂行した。

今後は、本研究課題で行ったゲノムワイドSNPタイピングデータを用いたネットワーク解析の方法が一般化するものと考察された。

E. 結論

平成23年度は、取得が予定であったデータを用いたネットワーク解析を行い、平成24年度は、取得したデータを用いたネットワーク解析で意義ある結果を出すことを目指して研究開発をおこなった。平成25年度には、このようなネットワーク解析が支障なく行うようにできて、システム構築に貢献できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fukuchi, S., Hosoda, K., Homma, K., **Gojobori, T.** and Nishikawa, K. (2011). Binary classification of protein molecules into intrinsically disordered and ordered segments. *BMC Struct Biol.* 11 (1): 1-29.
- (2) Barrero, R., Keeble-Gagnère, G., Zhang, B., Moolhuijzen, P., Ieko, K., Tateno, Y., **Gojobori, T.**, Guerrero, F., Lew-Tabor, A. and Bellgard, M. (2011). Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics.* 12 (328): 1-17.
- (3) Bousquet, J., Anto, J., Sterk, P., Adcock, I., Brahmachari, S., Roca, J., Agusti, A., **Gojobori, T.**, Auffray, C., et al. (2011). Systems medicine and integrated care to combat chronic noncommunicable diseases. *Genome Medicine.* (3 (43): 1-12.
- (4) Taniya, T., Tanaka, S., Yamaguchi-Kabata, Y., Imanishi, T., **Gojobori, T.** (2012). A prioritization analysis of disease association by data-mining of functional annotation of human genes. *Genomics* 99(1):1-9.
- (5) Kodama, Y., Mashima, J., Kaminuma, E., **Gojobori, T.**, Ogasawara, O., Takagi, T., Okubo, K., Nakamura, Y. (2012). The DNA Data Bank of Japan launches a new resource, the DDBJ Omics Archive of functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue):D38-42.
- (6) Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Itou, T., Ito F., **Gojobori, T.**, and Sakai, T. (2011). Evolutionary history of dog rabies in Brazil. *J of General Virology* 92: 85-90..
- (7) Hatin, W., Nur-Shafawati, A., Zahri, M., Xu, S., Jin, L., Tan, S-G, Rizman-Idid, M., Zifalil, B., and **Gojobori, T.**, The HUGO Pan-Asian SNP Consortium (2011). Population genetic structure of eninsular Malaysia Malay sub-ethnic groups. *PLoS One.* 6(4): e18312 (1-5).
- (8) Anai, Y., Ochi, H., Watanabe, S., Nakagawa, S., Kawamura, M., **Gojobori, T.**, and Nishigaki, K. (2012) Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of Recombinant Viruses *J. of Virology* 86 (16): 8634-44.
- (9) 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.
- (10) 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*

2. 学会発表

- (1) **五條堀 孝** (2011) 「組織からの発現 RNA網羅的解析とデータベース化」、会合「組織バンク設立のための検討会」、筑波大学（茨城県つくば市）4月22日
- (2) **T. Gojobori** (2011) “Vision from Data-intensive Life Science: Genome Information-oriented Society”, High Level Symposium to Commemorate CODATA’s 45th Anniversary, CEODE Headquarters, Beijing, China, 10月30日
- (3) **T. Gojobori** (2011) “Theme 4: Large-scale analysis of life data, Sub Theme D: Meta-genomic analysis and comparative genomic analysis”, HPCI戦略プログラム分野1：全体ワークショップ、理化学研究所（埼玉県和光市）12月4日
- (4) **T. Gojobori** (2012) “Genome Research with Big Data – How can we make “data driven scientific discovery” possible?–” (Keynote speech)、国際シンポジウム「Genome Research」（東京農業大学ゲノム解析センターご開催）、品川コクヨホール（東京）1月21日
- (5) **五條堀 孝** (2012) （発表）「肝炎ウイルス統合データベースの構築およびネットワーク解析」、厚生労働科学研究費補助金2班合同会議、KKRホテル東京（東京）1月27日
- (6) **Takashi Gojobori** (2012) “Vision from Data-Intensive Life Science: GENOME INFORMATION-ORIENTED SOCIETY“, 座談會, Taipei 2月22日
- (7) **Takashi Gojobori**(2013) “Genomic Landscape of Biodiversity: Big Data and Big Ideas” Seminar at Shandong Agricultural University, Shangdon, China 4月9日
- (8) **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 23～25 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

1. HBV 複製細胞として Hep2.2.15 細胞および HepAD38 細胞を入手した。感染感受性細胞として HepaRG 細胞を入手し、その HBV 感染感受性を検討した。また、初代培養ヒト肝細胞の HBV 感染感受性を検討した。HBV 感染動物モデルとして、ヒト肝細胞キメラマウスを作製し、ウイルスの感染感受性を確認した。

2. HBV が持続感染している HBe 抗原陽性無症候性キャリア 9 名の血清から、HBV DNA をクローニングしてその配列を決定

する。データベース上の既報の HBV ゲノム配列との相同性を確認する。さらに 1.3 倍長のゲノムを再構築してウイルス増殖性を検討する。

3. 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 100ul より QIAamp DNA Blood mini 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

1. HBV 複製、感染感受性細胞および感染

動物モデル

HBV 複製細胞として Hep2.2.15 細胞および HepAD38 細胞を入手した。HepAD38 細胞ではテトラサイクリンの on, off により HBV の複製増殖をスイッチングが可能となることを確認した。両細胞ともに培養上清にウイルス粒子を分泌していることを抗 HBs 抗体による免疫沈降後の HBV ゲノムの HBV ウイルスゲノム検出により確認した。サザンブロットおよびリアルタイム PCR によるウイルスゲノムの検出系、ノザンブロットによる RNA の検出系を構築した。HepaRG 細胞は細胞を播種してから約 2 週間分化させることにより感染感受性を誘導できる。分化した状態で約 10% の細胞に感染を確認した。初代培養ヒト肝細胞に HBV を感染させると接種ウイルス量に依存してウイルス感染を確認した。高ウイルス量の摂取ではほぼ 100% の細胞に感染を確認した。uPA-NOG マウスを実中研の末水博士より供与いただいた。凍結ヒト初代培養肝細胞を uPA-NOG マウスに経脾臓的に移植して作製したヒト肝細胞移植 uPA-NOG マウスに HBV を接種したところ持続的な感染が成立した。

2. 新規 HBV 複製系の確立

収集した患者サンプルの HBV 遺伝子型は A が 3 名、B が 1 名、C が 5 名であった。すべての症例で HBV DNA は 8.8 log copies/mL 以上と高値であった。またすべて HBe 抗原は陽性、HBe 抗体は陰性であった。血清サンプルから total DNA を抽出して、HBV 特異的プライマーにより HBV DNA を増幅した。さらにすべての PCR 産物を 4 クローン以上クローニングしてそのコンセンサス配列を決定した。データベース上の各遺伝子型ウイルス遺伝子との相同性は、ほとんどのサンプルで 95% 以上であった。現在発現プラスミドの構築が終了して、その複製増殖能を検討中である。

3. GWAS 解析を行った症例の HBV ゲノム解析

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。

また、新規 HBV 複製系の樹立に用いた HBe 抗原陽性 HBV キャリアのウイルスゲノムは比較的単一であり、その複製増殖活性も旺盛であると予測される。複製増殖に関わるウイルス因子の解析を進める必要がある。そのために様々なコホートの HBV ゲノム解析を実施する。

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, Kusahara 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, Kusahara 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
- (5) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, **Wakita T**. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology*. 2013 144(1):56-58.e7.
- (6) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, **Wakita T**. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol*. 2012 86(19):10805-20.
- (7) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, **Wakita T**, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.
- (8) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, **Wakita T**, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem*. 2011 286(43):37264-73.
- (9) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, **Wakita T**. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.
- (10) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, **Wakita T**, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 54(2):425-33.
- (11) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, **Wakita T**, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-40.e1-2.

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23～25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：斐 成寛 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科
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
阿比留正剛 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科医長

分担研究課題：① HBe抗原陽性B型慢性肝炎患者の肝発癌に寄与する因子の検討
② HBe抗原セロコンバージョン時点からの肝発癌因子の解析
③ 当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討

研究要旨：① 1991年～2005年の当院におけるHBe抗原陽性B型慢性肝炎症例において、B型慢性肝炎の自然経過における肝発癌因子、HBeAgセロコンバージョン(HBeAgSC)確認時期と肝発癌との関係を検討した。AFP値>15(ng/ml)、年齢 \geq 45才以上の2因子が肝発癌に寄与する独立因子であった。またHBeAgSC時年齢が若年(30歳以下)の群では観察期間内肝発癌例は見られなかったが、SC時年齢45歳以上の群では発癌リスクが有意に上昇していた。② 同様の対象で、HBeAgSC後の肝発癌因子に関して検討した。9例(9%)でHBeAgSC後発癌を認め、単変量解析では、HBeAgSC時の年齢・血小板・LCにおいて有意差を認め、多変量解析ではHBeAgSC時の血小板 $<130(\times 10^3/\text{mm}^3)$ が独立因子として抽出された。観察開始時・HBeAgSC時・最終観察時の血小板中央値は、非HCC群と比べてHCC群で低下する傾向にあった。③ 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った。検体採取時の血液検査値、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%)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

- ① HBe抗原陽性B型慢性肝炎の自然経過における発癌因子を検討する。(平成23年度)
- ② HBeAgSC時点を確認し得た症例において、その後の発癌因子に関して検討する。(平成24年度)
- ③ 当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討をおこなう。(平成25年度)

B. 研究方法

- ① 対象は1991年から2005年までに長崎医療センターで初回肝生検を施行し、6ヵ月以上自然経過をフォローし得たHBeAg陽性B型慢性肝炎190例；年齢中央値36(12-74才)、男性/女性:133/57例、genotype B/C:1/189例、肝線維化F1/2/3/4:15/60/44/26/45例、血小板中央値18.5(4.3-33.8万/ mm^3)、ALT中央値

121(13-2200 IU/L)、AFP 中央値 7.0(0-97 ng/ml)、HBV DNA 量中央値 7.6(3.6 -8.9 log copies/mL)、コアプロモーター変異 野生型/混合型/変異型:48/43/99例である。肝生検時上記データにて、その後の発癌に寄与する因子をCox比例回帰分析、Kaplan-Meyer法、Logrank test、にて検討した。観察期間中央値は5.5(0.6-20.0年)であり、途中から核酸アナログが投与された群(78/190例)は投与開始時点で観察打ち切りとした。

② 1991年から2005年までの当院初診HBeAg陽性231症例のうち、その後HBeAgSCを来し自然経過でフォローされた100症例を対象とし、後ろ向き解析を行った。Genotypeは全てC。HBeAgSC後に核酸アナログを投与された例に関しては、投与開始時点で観察打ち切りとした。観察期間中に肝発癌を来した群(HCC群)と、それ以外(非HCC群)に関して、年齢・性別・ALT・血小板・AFP・肝硬変(LC)有無・HBVDNA・プレコア変異・コアプロモーター変異・HBeAg陽転化有無・HBeAg陰性肝炎有無の各項目で比較検討した。

③ 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。

また、病態別HBeAg(+)^{ASC}(Asymptomatic 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。

(倫理面への配慮)

本研究は、後ろ向き観察研究であり、患者の個人情報への扱いについては連結可能匿名化をおこなうなど十分な配慮のもとで解析をおこなった。

C. 研究結果

① 190例中観察期間内の発癌11例で、累積発癌率は5/10/15/20年:2.6/7.5/12.7/ 27.2%であった。またCox比例回帰分析で、発癌に寄与する因子は、AFP \geq 15(ng/ml) (HR:8.29、 $p=0.01$)、年齢 \geq 45才(HR:4.62、 $p=0.041$)の2因子であった。

AFP値 \geq 15(ng/ml)($n=70$)の累積発癌率は5/10/15/20年:7.2/20.3/37.4/37.4%、AFP値 $<$ 15(ng/ml)($n=120$)は5/10/15/20年:0/0/0/21.9%であった($p<0.001$)。また、年齢 \geq 45歳($n=49$)の累積発癌率は5/10/15/20年:6.8/26.0/44.5/44.5%、年齢 $<$ 45歳($n=141$)は5/10/15/20年:1.2/2.7/6.4/ 22.4%であった($p<0.001$)。

2因子を同時に満たした群($n=26$)において、累積発癌率は5/10/15年:12.0/39.5/100%と有意に他群より高かった。

観察期間中にHBeAgSCの確認ができた106例を対象としてHBeAgSC時の年齢30歳以下($n=35$)・31-45才($n=47$)・45歳以上($n=24$)の3群に層別化すると、各群での15年累積発癌率は0/23.4/57.5%であり、45歳以上の群において有意に発癌率が高かった。

② 観察期間(中央値8.2年)において、9例(9%)で肝発癌を認めた。単変量解析では、HBeAgSC時の年齢($p=0.008$)、血小板($p=0.003$)、LC($p=0.001$)において有意差を認めた。Cox比例ハザード解析では、そのうちHBeAgSC時の血小板 \leq 130($\times 10^3/\text{mm}^3$)が発癌の独立因子として抽出された(オッズ比8.450 [95%信頼区間1.424-50.138]、 $p=0.019$)。全100症例におけるHBeAgSC後累積発癌率は、5、10、15年で各4.3、9.8、18.9%であった。血小板 \leq 130($\times 10^3/\text{mm}^3$)($n=25$)におけるHBeAgSC後累積発癌率は、各16.3、37.2、49.8%であり、血小板 $>$ 130($\times 10^3/\text{mm}^3$)($n=75$)の各0、0、8.3%と比べて有意に高かった($p<0.001$)。また観察開始時・HBeAgSC時・最終観察時の血小板推移(中央値)は、非HCC群($n=91$)では各187、171、178($\times 10^3/\text{mm}^3$)であるのに対し、HCC群($n=9$)では各176、103、103($\times 10^3/\text{mm}^3$)

と低下傾向にあった。

③ 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%) であった。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。

D. 考察

① 2010年、Liawらは、HBeAgSC時年齢とその予後の関連性を報告している。即ち、HBeAgSCが30歳未満の場合には予後良好だが、40歳以後では有意にHBeAg陰性慢性肝炎・肝硬変・肝癌の発生率が高いと報告している。今回我々の検討でも、発癌に寄与する因子として初診時年齢が抽出された。さらに、HBeAgSCの確認ができた対象群で、HBeAgSC時の年齢で層別化して肝発癌についての解析をおこなったがLiawらの報告と同様に、HBeAgSC時年齢が発癌の予測因子となり得る事が示唆された。30歳以下でHBeAgSCする群と45歳以上でHBeAgSCする群の間には、ゲノムも含む宿主因子として如何なる違いがあるのか、今後検討をおこなう余地があると考えられた。

② HBeAgSC は CHB 自然経過において重要なイベントであるが、特に Genotype C では HBeAgSC が遅れるため難治であるとされている。過去に Liaw らが 40 歳以上での HBeAgSC にて HBeAg 陰性肝炎・肝硬変・発癌のリスクがより高いと報告しているが、今回我々の解析でも 40 歳以上での HBeAgSC において発癌率が有意に高かった。多変量解析では血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) が独立因子として残ったが、HCV と比べ、HBV と血小板の相関の報告は少ない。一般的に HBeAgSC までは肝炎

を伴うため、肝線維化が進行し、血小板は低下する。HBeAgSC までの血小板推移に注目することは、B 型慢性肝炎の予後予測に有用であると考えられる。

③ 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

① HBeAg陽性B型慢性肝炎の自然経過では、AFP値 ≥ 15 (ng/ml)、年齢 ≥ 45 才以上が発癌肝発癌に寄与する独立因子であった。またHBeAgSC時年齢が若年(30歳以下)の群では観察期間内肝発癌例は見られなかったが、SC時年齢45歳以上の群では発癌リスクが有意に上昇していた。

② HBeAgSC 症例であっても、HBeAgSC 時点の血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) である症例は、その後の発癌に関して慎重なフォローアップが必要である。

③ 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, Yatsuhashi 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. Hepatol Res. 2013 Sep 6.
- (2) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsuhashi 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. I. 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. VI 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.
- (8) Bae SK, Yatsuhashi H, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Abiru S, Komori A, Migita K, Nakamura M, Ito M, Miyakawa Y, Ishibashi H. Prediction of early HBeAg seroconversion by decreased titers of HBeAg in the serum combined with increased grades of lobular inflammation in the liver. *Medical Science Monitor*. 2012 18(12): CR698-705
- (9) Toyama T, Ishida H, Ishibashi H, Yatsuhashi H, Nakamura M, Shimada M, Ohta H, Satoh T, Kato M, Hijioka T, Takano H, Komeda T, Yagura M, Mano H, Watanabe Y, Kobayashi M, Mita E. Long-term outcomes of add-on adefovir dipivoxil therapy to ongoing lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Hepatology Res*. 2012. 42(12): 1168-74
- (10) Migita K, Abiru S, Ohtani M, Jiuchi Y, Maeda Y, Bae SK, Bekki S, Hashimoto S, Yesmembetov K, Nagaoka S, Nakamura M, Komori A, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Yasunami M. HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population. *Transl Res*. 2012 Dec. 160(6): 443-4
- (11) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res*. 2012 Feb;42(2):139-149
- (12) Tamada Y, Yatsuhashi H, Masaki N, Nakamura M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Muro T, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H, Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H. Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. *Gut*. 2011 Nov 7.
- (13) 八橋 弘, 長岡進矢, 阿比留正剛. B 型肝炎に対する IFN 治療. *綜合臨牀* 60(1) : 81-6, 2011.1.1.
- (14) 八橋 弘, 長岡進矢, 玉田陽子. B 型急性肝炎の動向と診断・治療. *日本臨牀* 69(増 4) : 440-5, 2011.5.20.
- (15) 八橋 弘. 感染に由来するヒトの腫瘍—その現状と対策, B 型肝炎ウイルスと肝細胞癌. *臨床と微生物* 38(3) : 27-33, 2011.5.25.
- (16) 八橋 弘, 長岡進矢. ウイルス肝炎・治療/どのように実際の治療をすすめるか, HB ワクチンの今後—現状と将来—. *Medical Practice* 28(8) : 1449-52, 2011.8.1.

2. 学会発表

- (1) 2013年6月肝臓学会総会（予定）
「HBe抗原セロコンバージョン時点からの発癌因子解析」
- (2) APASL2012 Single Topic Conference
(Jeju, Korea)
“The risk factors of HCC development and age specific prognosis following HBeAg seroconversion in the patients with chronic hepatitis B” Bae SK, **Yatsunashi H.** et al.

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 23～25 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教室 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の解析

研究要旨：【目的】慢性B型肝炎に対する核酸アナログ治療は、B型肝炎ウイルス（HBV）のDNAを低下させ肝炎を抑えることにより、肝線維化を改善し、肝細胞癌の発症率を低下させることができる。しかしながら、中止により肝障害が悪化し、時に重症になるため、長期の服薬が必要となる。長期の服薬を行うと、核酸アナログ薬に対する耐性株が生じて効果が減じることがあり問題となっている今回我々は核酸アナログ耐性に関わる因子を、ウイルスおよび宿主側より解析を行っている。【方法】核酸アナログ薬であるラミブジン(LMV)、エンテカビル(ETV)の耐性出現例において、まず、ウイルス側の因子をみるために、HBVの全長の塩基配列を決定し、治療前と耐性株出現時の配列について比較した。また、新たに開発した連続変数型遺伝子関連解析法を用いて、治療前の遺伝子配列をもとに耐性株出現に関わる予測遺伝子変異を解析した。【結果】LMV 13例およびADV9例については、治療前のHBV全塩基配列より耐性に関わる変異集積部位を同定し、耐性出現予測を行ったところ、PPV 63%, NPV 82%であり(p=0080)、概ね予測が可能であった。また、ETV耐性7例については、再燃群4例と不応群3例に分けて治療前および耐性時の遺伝子配列を比較したところ、再燃群では既報の耐性変異が見られたが、不応群では遺伝子の変化が見られなかった。【結語】LAMおよびADVの耐性については、治療前予測ができる可能性がある。ETV耐性については、耐性株出現による再燃群と、変異がでない不応群とに大別される。不応群における耐性機序についてはy宿主側の因子を解析することが必要である。

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、lamivudine(LMV),および entecavir(ETV) に対する耐性株について、HBV 全遺伝子配列を用いて耐性変異を検討し、治療前予測を試みた。

B. 研究方法

対象は、治療から 9 年以上経過観察され

た LAM に耐性のある 9 例と LMV に耐性の生じなかった 13 例（全例 genotype C）および ETV に対し耐性の出現した 7 例 (genotype C 6 例、4 例は lamivudine(LMV)からの移行例、投与期間の中央値は 1.7 年)であった。LAM 耐性例の 9 例については治療前と耐性出現時、ETV 耐性例については、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。ETV 患者については、患者群を 4 例の breakthrough(BT)群と 3 例の non-response(NR)群 (HBV DNA の 2 log copies/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。LMV 投与例 22 例については、治療前の塩基配列を用いて連続変数型遺伝子関連解析法により耐性出現に関連する遺伝子多発領域を抽出し、治療前予測を行った。

(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

LMV 耐性株出現 9 例について治療前と耐性株出現時の遺伝子変異を比較したところ、全例で既報のポリメラーゼ AA204 YMDD 領域の LMV 耐性変異を認めた。一方、耐性の出現しなかった 13 例では、上記の耐性変異を認めなかった。また、22 例の治療前および 9 例の耐性出現時の全塩基配列を用いて連続変数型遺伝子関連解析法を用いて、耐性に関連する遺伝子変異を抽出したところ、既報の変異以外は有意な変異を認めなかった。次に、治療前の配列のみを用いて、連続変数型関連遺伝子解析法を用いて、耐性出現に関連する遺伝子変異を検討したところ、Core 蛋白領域の 200bp に集積部位を認めた。その領域を用いて、分岐系統樹を作成したところ、11 例ずつ 2 群に分かれ、片方の耐性株出現率は 2/11(18%)であり、もう一方は 7/11(63%)となったが、症例数の関係で有意には至らなかった($p=0.080$)。

ETV 耐性については、再燃群(BT)と不応群(NR)群に分けて解析を行った。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

LMV の耐性については、YMDD 耐性株の出現により耐性を獲得し、その出現は治療前の遺伝子配列により予測することができると考えられる。また、ETV 耐性については、再燃例については耐性株の出現により耐性が生じるが、不応例については耐性に関わる遺伝子変異が同定できなかった。今後症例数を増やして検討すると共に、ETV 耐性に関わる宿主側の遺伝子変異について検討する必要があると思われる。

E. 結論

LMV 耐性変異の出現は関連遺伝子の解析により投与前に予測できる可能性がある。また、ETV 耐性については再燃群と不応群で分けて検討する必要があり、不応群については宿主因子の検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **Matsumoto A**, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 2012; 42: 139-149.
- (2) **Matsumoto A**, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S. Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 1006-1013.
- (3) 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. *Hepatol Res.* 2013 Jul

16.

2. 学会発表

- (1) 松本 晶博, 森田 進, 田中 榮司. B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療時の耐性株出現および治療中止後の各種マーカーの推移とその臨床的意義. 第97回日本消化器病学会総会 2011.
- (2) 松本 晶博, 森田 進, 山田 雪, 木村 岳史, 上條 敦, 城下 智, 梅村 武司, 一條 哲也, 吉澤 要, 田中 榮司. B型肝炎長期経過観察例におけるプレコア・コアプロモーター変異と各種HBVマーカーとの関係. 第47回日本肝臓学会総会 2011.
- (3) 松本 晶博, 吉澤 要, 田中 榮司. B型肝炎核酸アナログ薬治療における中止基準についての検討. 第15回日本肝臓学会大会 2011.
- (4) 松本 晶博, 森田 進, 田中 榮司. B型肝炎の自然経過例におけるHBsAg消失予測と、この予測を用いた核酸アナログ治療例での評価. 第48回日本肝臓学会総会 2012.
- (5) 松本 晶博, 吉澤 要, 田中 榮司. B型肝炎に対する抗ウイルス療法の継続と終了をめぐって B型肝炎に対する核酸アナログ薬中止をめざしたシーケンシャル療法の検討. 第48回日本肝臓学会総会 2012.
- (6) 森田 進, 松本 晶博, 上条 のぞみ, 市川 雪, 木村 岳史, 城下 智, 小松 通治, 梅村 武司, 吉澤 要, 田中 榮司. HBe抗原が陰性である慢性 B 型肝炎の発症の因子についての検討. 第48回日本肝臓学会総会 2012.
- (7) 松本 晶博, 吉澤 要, 田中 榮司. HBVジェノタイプとB型肝炎の病態 核酸アナログ中止後の肝炎再燃に対する HBV genotype の関与. 第99回日本消化器病学会総会 2013.
- (8) 梅村 武司, 城下 智, 松本 晶博. B型肝炎ウイルスの再活性化の現状と対策 De novo B型肝炎発症 HBV の全塩基配列決定とその特徴. 第99回日本消化器病学会総会 2013.
- (9) 松本 晶博, 森田 進, 田中 榮司. 高感度HBV RNA 定量系による B 型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.
- (10) 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 晶博, 吉澤 要, 田中 榮司. Entecavir 治療中における B 型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 23～25 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採取、収集した。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も採取、収集した。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)等を行なうていただきその宿主規定因子を探索検討する。なお、血液採取、データ収集に必要なための研究プロトコールは千葉大学生命倫理委員会に申請、承認を得た。この研究プロトコールに基づき千葉大学医学部附属病院消化器内科にて血液採取、収集を行なった。

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)等を行なう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ール[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、収集を開始した。

(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

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。