

・ 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 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しながら、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、解析に必要となるゲノムワイド 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、解析に必要となるゲノムワイド 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., Ikeo, 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”, 座談会, 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。サザンプ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、ノザンプロットによる 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 マウスを実験室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, 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.
- (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):128-40,140.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： 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  
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  
当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討

研究要旨： 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 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。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。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

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)

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)

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

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/ $\text{mm}^3$ )、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。

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。

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

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。

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。

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

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。

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  $\leq 130$  ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) 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。

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

HBeAg陽性B型慢性肝炎の自然経過では、AFP値 $\geq 15$ (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。

HBeAgSC 症例であっても、HBeAgSC 時点の血小板 $\leq 130$  ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) 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。

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, Yatsunami 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, Yatsunami 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.
- (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. Hepatol Res. 2012. 42(12): 1168-74
- (10) Migita K, Abiru S, Ohtani M, Jiuchi Y, Maeda Y, Bae SK, Bekki S, Hashimoto S, Yesmambetov 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. Hepatol 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. 総合臨床 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. 日本臨床 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,  
**Yatsunami 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可能性がある。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る 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)等を行なうに際し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)等を行なうに際し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。

#### D. 考察

上記研究プロトコー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

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) Wu S, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, **Yokosuka O**. Initial virological response and viral mutation with adefovir dipivoxil added to ongoing Lamivudine therapy in Lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci*. 2011 Apr;56(4):1207-14.
- (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*. 2011 Jan;54(1):19-25.
- (3) Bekku D, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, **Yokosuka O**. Long-term follow-up of patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26(1):122-8.
- (4) Kamezaki H, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, Imazeki F, **Yokosuka O**. Emergence of entecavir-resistant mutations in nucleos(t)ide-naïve Japanese patients infected with hepatitis B virus: virological breakthrough is also dependent on adherence to medication. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Sep;46(9):1111-7.
- (5) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Shirasawa H, **Yokosuka O**. Nuclear receptor mRNA expression by HBV in human hepatoblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 2011 Dec 15;312(1):33-42.
- (6) Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, **Yokosuka O**. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2011 Oct;18(10):e508-15.
- (7) Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, **Yokosuka O**. Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci*. 2012;9: 27-32.
- (8) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, **Yokosuka O**. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. *Anticancer Res*. 2012 Sep;32(9):3775-83.
- (9) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, **Yokosuka O**. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis*. 2012 Aug 1;206(3):415-20.
- (10) Suzuki E, Chiba T, Zen Y, Miyagi S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Miyazaki M, Iwama A, **Yokosuka O**. Aldehyde dehydrogenase 1 is associated with recurrence-free survival but not stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2012 Nov;42(11):1100-11.
- (11) Yan J, Kanda T, Wu S, Imazeki F, **Yokosuka O**. Hepatitis A, B, C and E virus markers in Chinese residing in Tokyo, Japan. *Hepatol Res*. 2012 Oct;42(10):974-81.
- (12) Arai M, Togo S, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, **Yokosuka O**. Quantification of hepatitis B surface antigen can help predict spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Apr;24(4):414-8.
- (13) 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.
- (14) 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.

- (15) 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.
- (16) 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.

- (17) 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 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：	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）の再活性化に関与する要因を明らかにするためには、その増殖能を規定する生体側の要因とともに、ウイルス学的背景を明らかにする必要がある。そこで、核酸アナログ製剤投与後にHBe抗体陽性、HBV-DNA量2.1 Log copy/mL未満が1年以上持続し、コア関連抗原が3.0 Log IU/mL未満になった症例を対象として、同製剤の投与を中止し、その後のHBV-DNA量の増加速度と、ウイルス遺伝子の塩基配列の関連を解析した。ポリメラーゼ蛋白terminal protein domainのaa15~17はDDEと酸性アミノ酸が連続しているが、生体内で増殖速度の遅かった症例から単離したHBV株では、その何れかが中性アミノ酸に置換する変異が高率に観察された。同領域のアミノ酸変異によるHBV増殖速度の差異は、Huh-7D12細胞を用いたin vitro実験によって確認され、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の臨床経過とも矛盾がなかった。以上より、ポリメラーゼ蛋白terminal protein domainにおけるaa15-17のアミノ酸変異はHBVの増殖能を規定し、肝病態の成立に関与すると考えられた。

#### A. 研究目的

HBVは東アジアに蔓延しており、我が国では約150万人のキャリア、約1,000万人の既往感染例が存在する。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、この過程で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、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、生体内におけるウイルスの増殖能を規定する要因を明らかにする必要がある。

一方、HBVに対する抗ウイルス療法は核酸アナログの導入によって多大なる進展を遂げた。2000年にlamivudine、2004年にadefovir、更に2006年にはentecavirが保険認可され、現在では3種類の核酸アナログが使用可能となっている。これら薬物を使い分けることで、キャリアの大部分で慢性肝疾患の進展を防止することが可能となった。また、キャリアおよび既往感染例における免疫抑制・化学療法実施時のHBV再活性化は、核酸アナログの投与によって重症肝炎の発症を予防できるようになっている。しかし、医療経済的な観点では、これら症例で核酸アナログを中止することが求められる。厚労省研究班は血清HBs抗原量およびコア関連抗原量を指標とした核酸アナロ

グの中止基準を発表したが、この基準を満たす症例は一部であり、大部分の症例では投薬を継続せざるを得ないのが現状である。

そこで、我々は血清 HBV-DNA 量、コア関連抗原量が 1 年以上にわたって検出感度未満を持続する症例で、核酸アナログを中止した後のウイルス動態と HBV の全塩基配列を比較することで、その増殖速度を規定するウイルス側の要因を検討した。更に、これら症例から単離した HBV の DNA を Huh-7D12 細胞に移入する *in vitro* 実験によって、その機能を検証した。

## B. 研究方法

対象は血清 HBV-DNA 量が 4.0 Log copies/mL 以上で核酸アナログ投与を開始した B 型慢性肝疾患 202 症例。HBe 抗体陽性で血清 HBV-DNA 量 2.1 Log copies/mL 未満が 1 年以上持続した症例でコア関連抗原を 8 週間隔で測定し、2 回連続で検出感度 (3.0 Log IU/mL) 未満を示した場合に核酸アナログを中止した。血清 HBV-DNA 量は中止後 16 週までは 2 週ごと、その後は 4 週ごとに測定し、4.0 Log copies/mL 以上になった症例では、ウイルスの全塩基配列を解析し、核酸アナログを再開した。

また、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。

さらに、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。なお、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

202 例のうち中止基準を満たしたのは計 34 例 (16.8 %) で、中止後に再燃の見られなかった症例は 8 例 (23.5 %) であった。再燃した 26 例のうち 1 例は中止時にインターフェロンを用いた sequential 療法を実施しており、これを除いた 25 例で生体内における血清 HBV-DNA の上昇速度とウイルス遺伝子の塩基配列との関連を検討した。

これら 25 例のうち 24 症例でウイルス遺伝子の全塩基配列を検討し、うち 17 例 (70.8%) は genotype B (Bj: 16 例、Ba: 1 例) で、これらには pre-core 変異を伴うウイルス株が多かった。一方、7 例 (29.2%) は genotype C で、これらには pre-core と basic core promoter 変異をとともに伴ったウイルス株が多かった。

一方、これら症例で血清 HBV-DNA の増加速度を評価すると、genotype、pre-core 変異、basal core promoter 変異との間には明らかに関連が認められなかった。しかし、genotype B、C の何れのウイルス株の場合でも、生体内における増殖速度の遅い症例では、nt2,349 から nt2,357 にかけての変異が高率に認められた。

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。

Huh-7D12 細胞を用いた *in vitro* 実験では、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 ( n=3 ) は生体内での増殖速度の遅い株に比して、中間の株は 5.9 倍、速かった株は 11.6 倍高値であった。なお、DNA の導入効率は何れの細胞でも同等であった。

また、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 から nt2,357 の変異がウイルス増殖に關与する可能性を見出した。同部位はコア領域の ORF では aa151 から aa153 に、ポリメラーゼ領域の ORF では aa15 から aa17 に相当し、前者では R151Q/G、R152Q or G153C、後者では D15/E、D16N or E17D/G/N の変異が観察された。これらのうち、ポリメラーゼ領域の変異は terminal protein domain に相当し、アミノ酸の極性が変化することから、その primer 機能に影響する可能性がある。

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。また、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) 吉野廉子, 菅原通子, **持田 智**. B 型慢性肝炎における核酸アナログの中止基準: 再燃例におけるウイルス増殖速度からの解析. ワークショップ「B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の継続と終了をめぐって」. 第 48 回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012 年 6 月.
- (2) 内田義人, 神山淳一, 内木佳代子, 吉野廉子, 菅原通子, **持田 智**. B 型肝炎ウイルスの増殖速度を規定するウイルス側要因の解析. シンポジウム「B 型肝炎診療: ウイルス増殖と免疫反応から」. 第 39 回日本肝臓学会東部会, 東京, 2012 年 12 月.
- (3) 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, Amsterdam, 2013 April.

- (4) 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.

- (5) 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 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：小池 和彦 東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授  
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：東京大学消化器内科における、最近10年間（平成15年1月～平成24年12月）のHBV関連肝細胞癌の入院治療患者数は233例であった。当科ではHBV関連肝細胞癌入院患者の臨床情報の詳細につき前向きにデータベース化するとともに、書面による同意を得て血液検体を収集し、本学ならびに共同研究施設における遺伝子多型解析に用いるシステムを構築してきた。また、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の守秘義務、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) 東京大学消化器内科における、最近 10 年間(平成 15 年 1 月~平成 24 年 12 月)の HBV 関連肝細胞癌の入院治療患者数は 233 例であった。このうち同意を得られた症例の検体採取を行なった。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。

2) 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。

## 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、肝炎症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) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.

- (4) 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.
- (5) 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. (2011 IF=9.154)
- (6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, **Koike K**. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2013 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23689989.
- (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 Nov 4;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. PubMed PMID: 24120137.
- (11) 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.
- (12) **Koike K**. The oncogenic role of hepatitis C virus. *Recent Results Cancer Res* 2014;193:97-111. PMID: 24008295.
- (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. PubMed PMID: 23989853.
- (14) Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, **Koike K**, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study. *Hepatology* 2013;43:906-910. PMID: 23279215.
- (15) 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.

- (16) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo 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. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, **Koike K**. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother* 2012;18(6):883-890. PubMed PMID: 22760340.
- (20) Mikami S, Tateishi R, Akahane M, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Yoshida H, **Koike K**. Computed Tomography Follow-up for the Detection of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Initial Radiofrequency Ablation: A Single-center Experience. *J Vasc Interv Radiol* 2012;23(10):1269-1275. PubMed PMID: 22999746.
- (21) Nakagawa H, Isogawa A, Tateishi R, Tani M, Yoshida H, Yamakado M, **Koike K**. Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with serum superoxide dismutase activity and metabolic syndrome in a Japanese population. *J Gastroenterol* 2011;47(2):187-194. PubMed PMID: 21976134.
- (22) Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Satoh Y, Yoshida H, Kinoshita H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Shiina S, Sato T, Obi S, Hoshino T, Nagatomo R, Okubo S, Yokota H, **Koike K**, Yatomi Y, Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. *J Hepatol* 2012;57(2):330-336. PubMed PMID:22521349.
- (23) Ikeda H, Tejima K, Masuzaki R, Yatomi Y, **Koike K**. Reply to the letter by H. Mawatari et al. regarding "Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly". *J Gastroenterol* 2012; 47:608. PubMed PMID:22388886.
- (24) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Shiina S, Omata M, **Koike K**. Assessment of disease progression in patients with transfusion-associated chronic hepatitis C using transient elastography. *World J Gastroenterol* 2012;18(12):1385-1390. PubMed PMID: 22493553; PubMed Central PMCID: PMC3319966.
- (25) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, **Koike K**. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2012;47(4):477-485.
- (26) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, **Koike K**. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2012;107(4):569-577. PubMed PMID: 22158026.
- (27) Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Shiina S, **Koike K**, Omata M.

Influence of serum HBV DNA load on recurrence of hepatocellular carcinoma after treatment with percutaneous radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2011 Sep;5(3):767-773.

- (28) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, **Koike K**. MicroRNA122 is a key regulator of  $\alpha$ -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2011 Jun 7;2:338.
- (29) Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, **Koike K**. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2011;129:2226-2235.
- (30) Ikeda H, Tateishi R, Enooku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, **Koike K**, Yatomi Y. Prediction of

hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(10):2204-2211.

- (31) Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, **Koike K**, Yatomi Y. Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2011;412(13-14):1201-1206.

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 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：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：組織プロテオーム解析により肝細胞癌進展の新規分子マーカーとして同定されたタリン-1の臨床病理学的意義につき解析した。タリン-1低発現群に比べ、高発現群において肝細胞癌の分化度は有意に低く、門脈浸潤を伴っている率が有意に高かった。さらに、高発現群は低発現群に比して、有意に無病生存期間が短かった。本研究により、肝細胞癌進展に伴いタリン-1の発現が上昇することが明らかにされ、予後予測にも有用である可能性が示唆された。biliary / stem cell marker、癌遺伝子・癌抑制遺伝子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。-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。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. 研究方法

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、多段階発癌との関連の解析、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

1. クッパー細胞、血管平滑筋細胞、胆管および類洞の内皮細胞が抗タリン-1 抗体により著しく染まったのに対して、非癌部の肝細胞のタリン-1 に対する免疫反応性は明らかに弱かった。癌に隣接する非癌部肝細胞の細胞質の染まりより強く癌細胞の細胞質が抗タリン-1 抗体で染まる場合を、癌細胞におけるタリン-1 の発現上昇とみなした。タリン-1 は、隣接する非癌部の肝細胞と比較し、早期肝細胞癌で有意に発現が上昇していた ( $p=0.003$ )。106 個の肝細胞癌結節検体の免疫組織化学的検索にて、肝細胞癌のタリン-1 に対する免疫反応性が統計学的有意差をもって癌の脱分化に伴い漸増することが示された ( $p=0.001$ )。低分化型肝細胞癌は、タリン-1 発現上昇を伴う癌細胞の割合の高さのみならず、タリン-1 の免疫染色による細胞質の染まりの強い染色強度が特徴的であった。異型結節は、肝細胞癌と比較し、タリン-1 発現上昇の割合が有意に低かった ( $p=0.003$ )。臨床病理学的因子とタリン-1 発現の関係について検討する際、調査をした 106 個の肝細胞癌結節のタリン-1 発現上昇を伴う癌細胞の割合の平均が 53% であったこともあり、検討対象となる検体をタリン-1 発現上昇癌細胞の割合が 50% 以上の群と 50% 未満の群とに分けた。予想された通り、癌の脱分化度は両群間で有意差があった ( $p=0.004$ )。非常に興味深い結果として、タリン-1 発現上昇癌細胞の割合が 50% 未満の群に比べ、50% 以上の群において門脈浸潤を伴っている率が有意に高いことが分かった ( $p=0.029$ )。これらの結果に一致して GeMDBJ 上の公開マイクロアレイデータでの検証にて、低分化型および門脈浸潤陽性肝細胞癌で、それぞれ高分化型および門脈浸潤陰性肝細胞癌と比較し、有意にタリン-1 の mRNA 発現が上昇していることが判明した (それぞれ  $p=0.034$ ,  $0.040$ )。背景因子では、ウイルス陰性群に比して陽性

群で高発現を認める傾向はみられたが有意ではなく、また B 型、C 型の間で有意差は認めなかった。追跡が可能であった 72 人の肝細胞癌患者の無病生存期間について分析したところ、タリン-1 発現上昇を伴う癌細胞の割合が 50% 以上の 47 人の患者では、同 50% 未満の 25 人の患者に比べ、有意に無病生存期間が短かった ( $p=0.039$ )。

2. 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) との関係のカプランマイヤー法にて検討した。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

1. プロテオーム解析の結果と一致して、非癌部肝細胞と比較した大多数の肝細胞癌細胞でタリン-1 発現が上昇していることが、免疫組織化学的解析にて確認された。癌の脱分化度に伴う肝細胞癌のタリン-1 に対する免疫反応性の段階的な上昇は、肝細胞癌進行過程へのタリン-1 の関与を示唆している。一般的に、進行肝細胞癌の予後不良は、高率に認められる肝内転移および血管浸潤に関連付けられる。タリン-1 発現上昇を伴う肝細胞癌に有意に高率に門脈浸潤が認められたことは、肝細胞癌に対する肝部分切除術後の再発までの期間がタリン-1 発現上昇を伴う群において有意に短かったこととの関連があるものと思われ、タリン-1 の腫瘍マーカーとしての価値が予後予測においても見出されることが示唆された。タリン-1 は、インテグリン サブユニットの細胞質ドメインとアクチンフィラメントとを連

結させる作用のある数ある蛋白質の一つである。最近、タリン-1 が前立腺癌の細胞遊走、接着および浸潤を促進させることが報告された。加えてタリン-1 は、接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase、FAK) を動員することにより、接着斑におけるシグナル伝達にも役割を果たしていると考えられている。FAK は Src や Ras を動員し、下流のシグナル経路を活性化させることが報告されている。このような知見は、タリン-1 発現上昇を伴う肝細胞癌で高率に認められた門脈浸潤と関連付けられる可能性がある。

2. 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

タリン-1 は肝細胞癌において、癌進行度に応じて発現が増加し、予後予測のマーカーとして役立つ可能性が示唆された。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 -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) Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, **Sakamoto M**. Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 80: 406-415, 2011
- (2) Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, **Sakamoto M**, Izumi N. Expression of keratin19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Oncology* 80: 278-288, 2011
- (3) Yamazaki K, Masugi Y, **Sakamoto M**.

Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: altering transforming growth factor- $\beta$  signaling in hepatocarcinogenesis. *Dig Dis.* 29: 284-8, 2011.

- (4) Yokoo H, Yasuda J, Nakanishi K, Chuma M, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, **Sakamoto M**. Clinicopathological significance of nuclear factor- $\kappa$ B activation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 41: 240-9, 2011.
- (5) Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, **Sakamoto M**, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y. *J Hepatol.* 2012.
- (6) 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.
- (7) 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 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：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：

[1] 九州大学大学院総合外科にて施行された肝細胞癌(HCC)に対する肝切除症例(279例)の病態解析を行った。HCV(+)(49%)、HBV(+)(18%)、HCV(+)/HBV(+)(3%)、HCV(-)/HBV(-)(NBNC; 30%)であった。AFB1-DNA付加体は279例中6%に認められ、HCV群0%、HBV群10%、NBNC群16%であった。NBNC群におけるAFB1陽性例(n=13)とAFB1陰性例(n=70)を比較すると、肝機能、背景肝疾患、肝硬変の程度に有意差はなかった。p53変異は279例中22%に認められ、G:C T:A transversionは19例であった。p53変異とAFB1陽性は相関しなかったが、codon249変異を認めた3例は全てAFB1陽性であった。アフラトキシンは非肝炎ウイルス性HCCの原因の一つである。

[2] 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野（以下、当科）にて施行された、HCC初回切除症例(462例)の病態解析を行った。NBNC群(25%)とHBsAb(+)(42%)の患者、腫瘍、組織学的因子は近似していた。HBV既感染は再発、生存とは関係しなかった。BC型重合感染群(2.1%)では累積生存、無再発生存共に有意に悪化した。NBNC群のうちHBV既感染(n=66)とHBV非感染(n=39)を比較すると、HBV既感染は累積生存、無再発生存に影響を与えず、一方、B型、BC型重合感染HCCの予後はHBV感染の状態が深く関与した。

[3] 肝細胞癌初回切除症例(521例)を予後不良の危険因子の個数から分類し、病態解析を行った。癌関連死亡(n=150, 78.1%)のうち、術後1年以内の癌関連死は48例(32%)を占めた。AFP > 1,000(ng/ml), 腫瘍数 ≥ 4, 腫瘍サイズ ≥ 5 cmが術後1年以内の早期死亡の危険因子であった。これらの危険因子を有さない(Risk 0)群の5年生存率は85.4%であり、術前に危険因子を3つ有する場合には手術以外の治療を考慮する必要があると考えられた。

[4] 当科にて切除されたB型HCC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。コラゲナーゼ灌流により肝細胞を分離後、初代培養した。3時間以上の温阻血肝では生細胞率はほとんどなく、培養3日目には大部分の肝細胞は死滅した。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し、肝細胞は10週目まで維持された。HBV感染を背景に持つヒト肝細胞の初代培養が可能であった。

A. 研究目的

[1] 本邦における肝細胞癌(HCC)のうち 10 - 20%が B 型肝炎ウイルス(HBV)感染を背景として発症しているが、近年ウイルス肝

炎を母地としない HCC が増加している。本課題では B 型 HCC の病態を精査し、治療の標的となり得るメカニズムを見出すことだが、その対照として肝炎ウイルス非感染

HCC の病態を理解することは重要である。そこで強力な肝発癌物質である Aflatoxin B1(AFB1)による HCC の特徴を明らかにする。

[2] B 型肝炎および B 型肝炎ウイルス感染既往が肝発癌にどのように影響するかを明らかにする。

[3] 術後 1 年以内の早期死亡(Early Death; ED)は、HCC の生存率を低下させる要因として重要である。術後早期死亡(ED)群を術前に予測し得る方法があれば、非手術治療によって成績を改善できる可能性があり、少なくとも QOL を改善するはずである。ED 群および非早期死亡(NED)群の病態を解析し、その予後予測因子を見出すこと本研究の目的である。

[4] 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

[1] 九州大学総合外科(前任施設)にて 2004 年から 2008 年に HCC に対して肝切除を施行した 279 例を対象とした。抗 HCV 抗体(+)136 例(49%)、HBs 抗原(+)50 例(18%)、抗 HCV 抗体(+)/HBs 抗原(+)9 例(3%)、抗 HCV 抗体(-)/HBs 抗原(-)84 例(30%)に分け、AFB1-DNA 付加体を免疫組織化学染色で検討し、さらに p53 遺伝子の exon5-exon9 を PCR-direct sequencing 行い point mutation を検討した。

[2] 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 (以下、当科と略記)で行った HCC の初回切除例の臨床病理学的な特徴と治療成績を検討した。

**対象**：2001 年から 2010 年までに当科で行った初回肝切除症例 462 例を 4 群に分類した：HBs 抗原陽性の 195 例(B 群)、HCV 抗体陽性の 138 例(C 群)、HBs 抗原と HCV 抗体両方が陽性の 13 例(BC 群)、両方とも陰性の 116

例(NBNC 群)。

**解析**：B, BC, NBNC 群における、臨床病理学的因子、予後を腫瘍因子、宿主因子から比較検討した。また、HBV 既感染の有無がこれらの因子とどのように関わるかを比較検討した。ただし、HBV 既感染とは、HBs 抗原陰性、HBs 抗体陽性あるいは HBc 抗体陽性の症例と定義した。

[3]**対象**：当科で 1997 年から 2009 年までに施行された HCC の初回切除例 (521 例)を対象とし、1 年以内に死亡した群(ED 群: n=48; 9.2%)と非早期死亡群 (NED 群: n=473; 90.8%)に群分けし、臨床病理学的な特徴と治療成績を検討した。

**解析**：ED, NED 群における、臨床病理学的因子、予後を腫瘍因子、宿主因子から比較検討した。

[4] 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、細断片の低温酸素化を行い、組織修復を試みた。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 415 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、九州大学大学院医学研究科および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] 1) AFB1-DNA 付加体の免疫組織学的検討：AFB1-DNA 付加体の平均の染色数(核1000個あたり)は31%(5 - 80%)であり全例肝細胞核に認められた。

AFB1-DNA 付加体は279例中18例(6%)に認められ、HCV群0%、HBV群10%、NBNC群16%とHBV群およびNBNC群で有意に陽性であった。

NBNC群におけるAFB1陽性例(n=13)とAFB1陰性例(n=70)を比較検討したところ、肝機能、背景肝疾患(アルコール多飲の有無、NASHなど)、肝硬変の程度に有意差を認めなかった。

2) p53 変異の検討：p53 変異は279例中41例(22%)に認められた。Exon5:13例、exon6:11例、exon7:12例、exon8:10例、exon9:2例。G:C T:A transversionは19例、G:C A:T transversionは12例であった。P53変異とAFB1-DNA 付加体陽性との間には有意な相関は認めなかったものの、codon249変異を認めた3例は全てAFB1-DNA 付加体陽性であった。

### [2] NBNC 群の臨床病理学的特徴

#### 1. 患者因子

B群、NBNC群では年齢(56.1±9.5, 67.9±9.3\*)に有意差を認めたが、T.Bil(0.8±0.4, 0.8±0.3)、Alb(4.1±0.4, 4.1±0.4)、ICG R15(15.2±9.9, 15.4±8.5%)、男女比(164:31, 104:12)は同様に分布していた。

#### 2. 肉眼的腫瘍因子

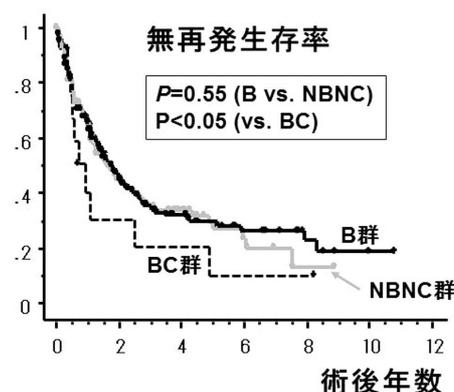
肝硬変の合併例はB群で45%、NBNC群で22%であった(p<0.05)。腫瘍最大径はB群で5.7±4.4 cm、NBNC群で7.0±4.5 cmであった(p<0.05)。血中AFP、AFP-L3分画、PIVKA-、腫瘍個数は両群間に有意差を認めなかった。

### 3. 組織学的腫瘍因子

分化度、組織学的門脈浸潤、静脈浸潤、肝内転移はB群、NBNC群間で有意差を認めなかった。

### 4. 切除成績

BC群が無再発生存・累積生存率とも有意に不良だったが、NBNC群とB群の予後は同等であった。



HBV 既感染症例の臨床病理学的特徴

### 5. 患者因子、腫瘍因子、予後

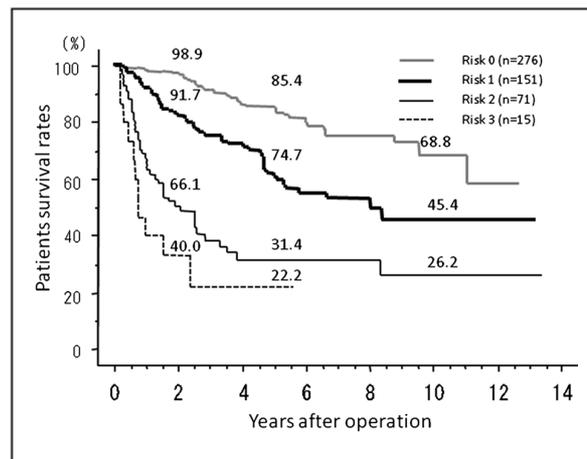
NBNC群をHBV既感染の有無で分類すると、n(66, 39)年齢(67.2±9.2, 70.7±9.8)、T.Bil(0.8±0.4, 0.7±0.3)、Alb(4.1±0.4, 4.0±0.4)、ICG R15(16.0±8.5, 15.9±9.1%)、男女比(58:8, 36:3)であり、有意な変化を認めなかった。患者因子(血中AFP、AFP-L3、肝硬変合併率)、腫瘍因子(腫瘍最大径、腫瘍個数、腫瘍肉眼型、組織学的分化度、組織学的門脈侵襲、組織学的静脈侵襲)、予後(無再発生存、累積生存)に有意差を認めなかった。

[3] 死因は癌進展(150; 78.1%)、手術関連死(1; 0.5%)、肝不全(15; 7.8%)、その他(26; 13.5%)であった。多変量解析の結果、早期死亡の危険因子は以下の通りであった：血清アルブミン(<4 g/dl)、Child-Pugh分類(B)、根治度(R0, R1)、腫瘍数(≥4)、腫瘍サイズ(≥5cm)、肉眼的脈管浸潤(門脈・肝静脈)、AFP(>1000ng/ml)、AFP-L3(40%<)、PIVKA-II(1000m AU/ml<)、肝硬変、分化度(壊死)、顕微鏡的脈管浸潤(門脈・肝静脈)、遠隔転移。

1年以内に癌進展によって死亡するリスク(HR)は、AFP(>1000ng/ml; vs. ≤200)では4.098 (p=0.0079)、腫瘍数(≥ 4; vs. <4)では3.535 (p=0.0208)、腫瘍サイズ(≥ 5cm; vs. 2-5)では3.687 (p=0.0295)、低分化(vs. mod.)では2.8 (p=0.0179)、vp1 (vs. vp0)では5.02 (p=0.0037)、vp2 (vs. vp0)では8.507 (p=0.0034)であった。

1年以内に癌進展によって死亡するリスク(HR)を危険因子なし(risk0; n=276)を基準として危険因子の保有数で比較すると、危険因子1つ(risk1)ではHRが7.856、risk2では46.468、risk3では136.5であった。術後生存日数は risk0,1,2,3 群で著明な相異が認められた(図右)。

- [4] 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。これを繰り返し、10週目まで肝細胞を維持し得た。

#### D. 考察

[1] 食物への Aflatoxin 暴露は発展途上国では認められるが、本邦では輸入制限などによりその暴露は少ないと言われてきた。Aflatoxin は p53 codon 249 に bulky な DNA 付加体を形成し、G → T transversion の原因となり、高頻度に肝細胞癌を引き起こす (Nature 1991, Lancet 1991)。今回の検討で、その頻度は少なかったものの、p53 遺伝子 codon249 変異を認めた 3 例は全て AFB1-DNA 付加体陽性であったことから、本邦における非ウイルス性肝細胞癌の原因の一つとして aflatoxin を考慮しなければならないことが示唆された。

[2] HBV 既感染、発癌、再発について、

今回の検討では因果関係を見出せなかった。糖尿、アルコール多飲の合併と肝硬変、発癌、再発について更なる解析が必要であろう。また、いわゆるオカルト HBV と HBV 既感染、発癌、再発の関係を明らかにすることも今後の課題である。

今後、B, BC, NBNC の各群における無再発生存、累積生存に深く関与すると考えられる、肝癌再発、異時性発癌、肝線維化、肝硬変の進展を病理組織学的に解析し、遺伝子発現プロファイルと比較することにより、B 型肝炎に特異的な病態進行のメカニズムを明らかにすることが求められる。

[3] 多くの悪性度マーカーや、臨床病理学的な危険因子が提唱されていたが、予後予測は確実ではない。従来の予測方法に加えて、術前に診断可能な AFP(>1000ng/ml)、腫瘍数( $\geq 4$ )、腫瘍サイズ( $\geq 5$ cm)、によって評価することによって、適切な治療を提供する一助となるはずである。

本検討では術前診断可能な 3 つの危険因子を中心に解析したが、前記の如く多変量解析で示された危険因子はさらに多く、これらを組み合わせることで、今後さらに正確な予後予測が可能になるであろう術後の因子も含めたさらなる予測方法を見出すことにより、術前診断が risk1,2 群の予後を改善させる治療オプションを模索するべきであり、本データがその一助となるはずである。

[4] 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。

また、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。

以上の検討から、それぞれの癌に対する個別医療を実現するためには、患者由来の癌および背景肝の現状とゲノム情報を迅速に再現性のある方法論で精査するシステムが必要である。われわれの臨床情報と検体の凍結保存システムを発展させ、凍結融解、再培養可能な細胞リソースを構築できれば、本分野のさらなる発展に貢献すると考えられる。

現在、われわれは独自に見出した肝癌の悪性度マーカー候補分子について、各種のウイルスベクターを用いた強制発現、ノックダウンの系を構築し、癌の挙動を解析している。今後、ZFN/TALEN, CRISPR/Cas などの遺伝子制御法を併用して、より信頼度の高い検証システムを構築することにより、個別医療化への道筋が開かれるはずである。

## E. 結論

[1] 本邦における非肝炎ウイルス性肝細胞癌の原因としてアフラトキシンは否定できない。

[2] NBNC 群の患者、腫瘍、組織学的因子は B 群と近似した。HBV 既感染は糖尿、アルコール多飲と同様に NBNC 群の最も多い併存病態であり、肝発癌や悪性度への関与が推測されるが、NBNC 群の再発、生存に有意な影響を与えない。

[3] AFP(>1000ng/ml)、腫瘍数( $\geq 4$ )、腫瘍サイズ( $\geq 5$ cm)、術後 1 年以内の癌死の危険因子であり、術前に上記の 3 つの危険因子の全てを保有する症例では、手術以外の治療を第一選択にするべきである。一方、危険因子が少ない場合には、予後良好の可能性

があり、積極的な手術治療の適応である。

[4] B型肝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、発癌の基礎研究に必要な細胞リソースを構築できる基礎的な条件を確立した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Shirabe K, Toshima T, **Taketomi A**, Taguchi K, Yoshizumi T, Uchiyama H, Harimoto N, Kajiyama K, Egashira A, Maehara Y. Hepatic aflatoxin B1-DNA adducts and TP53 mutations in patients with hepatocellular carcinoma despite low exposure to aflatoxin B1 in southern Japan. *Liver Int.* 2011 Oct;31(9):1366-72.
- (2) **Taketomi A**, Takeishi K, Mano Y, Toshima T, Motomura T, Aishima S, Uchiyama H, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Total resection of the right hepatic vein drainage area with the aid of three-dimensional computed tomography. *Surg Today* 2012, 42(1): 46-51
- (3) Motomura T, Koga E, **Taketomi A**, Fukuhara T, Mano Y, Muto J, Konishi H, Toshima T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Efficacy of splenectomy in preventing anemia in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation is not dependent on inosine triphosphate pyrophosphatase genotype. *Hepatol Res.* 2012, 42(3): 288-95
- (4) **Taketomi A**, Shirabe K, Toshima T, Morita K, Hashimoto N, Kayashima H, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. The long-term outcomes of patients with hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation: a comparison of right and left lobe grafts. *Surg Today* 2012, 42(6): 559-64
- (5) Harada N, Shirabe K, Ijichi H, Matono R, Yoshizumi T, **Taketomi A**, Soejima Y, Maehara Y. Acoustic radiation force impulse imaging predicts postoperative ascites resulting from curative hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *2012, 151(6): 837-43*
- (6) Matono R, Yoshiya S, Motomura T, Toshima T, Kayashima H, Masuda T, Yoshizumi T, **Taketomi A**, Shirabe K, Maehara Y. Factors linked to longterm survival of patients with hepatocellular carcinoma accompanied by tumour thrombus in the major portal vein after surgical resection. *HPB (Oxford)* 2012, 14(4): 247-53
- (7) Takeishi K, **Taketomi A**, Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F, Maehara Y. Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatol.* 2012, 57(1): 77-83
- (8) Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Kakisaka T, Tsuruga Y, Todo S, **Taketomi A**. Analysis of the risk factors for early death due to disease recurrence or progression within 1 year after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*; 2012 Jun 14;10:107
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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)
- (14) Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, **Taketomi A**, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2314-25
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) **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
- (19) 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, **武重 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, **武重 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, **武重 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 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：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 型慢性肝炎の病態と関連する宿主遺伝子の検討

研究要旨：

本研究では、B型肝炎における肝線維化進展や抗ウイルス治療反応性を規定する宿主要因を検討することを目的とした。C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果を規定するIL28B遺伝子多型がHBVにおいても治療効果と関連するかを検討するため、B型慢性肝炎に対するPeg-interferon治療例におけるIL28B遺伝子と治療反応性との関連の検討を行なった。Peg-interferonを投与した26例を対象として、IL28B遺伝子SNP rs8099917をタイピングした。GG minor typeは3.8%、TG hetero typeは15.4%、TT major typeは80.8%であった。肝線維化進行例（F3-4）の頻度はIL28Bと関連しなかった。Peg-interferon治療による12週時点で、HBV DNAの減衰はTG/GGの+0.2 Logに対しTTでは-2.2 Log、コア関連抗原の減衰は、TG/GGでは-0.15 Logに対しTTでは-0.24 Log、HBs抗原量の減衰は、TG/GGの-0.01 Logに対しTTでは-0.24 Logであり、0.5 Log以上のHBs抗原量の減少が得られた4例は全例がTTであり、B型慢性肝炎においても、IL28B遺伝子多型がPeg-interferon治療効果と関連する可能性が示唆された。

一方、C型慢性肝炎において線維化進行と関連するSNPがGWASにより同定されたが、B型慢性肝炎の線維化との関連は不明である。これらのSNPとB型慢性肝炎の病態との関連性をB型慢性肝炎138例を対象として検討したところ、MERTK(rs4374383)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、さらに肝硬変では17%、慢性肝炎では8%、非活動性キャリアでは7%であり、病期の進行とも関連する傾向を認めた。一方、GLT8D2(rs2629751)およびTULP1(rs9380516)のgenotypeと肝線維化とは関連を認めなかった。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス持続感染者の病態は、HBe セロコンバージョンに伴い肝炎が鎮静化し臨床的治癒状態となる非活動性キャリアから、慢性肝炎が持続し肝硬変、肝細胞癌に進展する症例まで極めて多彩であり、このような病態を規定する要因については専らウイルス遺伝子変異から検討されてきたが、病態を規定する宿主要因は不明である。また、抗ウイルス治療である核酸アナログは 90%以上の症例で HBVDNA が陰性化するため治療効果に個人差はないと想定されてきたが、HBVDNA が陰性化した症例

の中でも長期継続治療により HBs 抗原が消失する症例は 10 年で 10%であり、その規定要因は明らかではない。インターフェロン治療により HBe セロコンバージョンが得られる症例は 30%だが、HCV に対するインターフェロン治療効果を規定する IL28B 遺伝子多型が HBV においても治療効果と関連するかは、検討課題である。

また最近 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、C 型慢性肝炎で病態との関

連性が証明された宿主因子が、B 型慢性肝炎に置いてインパクトを有するかを検討した。

## B. 研究方法

B 型慢性肝炎に対して Peg-interferon を投与した 26 例を対象として、IL28B 遺伝子 SNP rs8099917 を Taqman 法でタイピングし、臨床像との関連性を検討した。

また 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、個人情報を実に保護している。

## C. 研究結果

Peg-interferon を投与した 26 例中 GG minor type は 1 例 3.8%、TG hetero type は 4 例 15.4%、TT major type は 21 例 80.8%であった。肝線維化進行例 (F3-4) の頻度は、TG/GG では 40%、TT では 9.5%、Core Promoter 遺伝子変異は TG/GG では 60%、TT では 76%であった。

HBe 抗原陽性例における HBe 抗原量の減衰は、12 週時点で TG/GG では -0.32 Log、TT では -0.30 Log と同等であった。-0.5 Log 以上の減少は、TG/GG では 25%、TT では 22%に得られ、差が見られなかった。

HBV DNA の減衰は、12 週時点で TG/GG では +0.2 Log であったのに対し、TT では -2.2 Log であり、2.0 Log 以上の減少が得られた 9 例は全例が TT であった。

コア関連抗原の減衰は、12 週時点で TG/GG では -0.15 Log であったのに対し、TT では -0.24 Log であり、1.0 Log 以上の減少が得られた 2 例は両者とも TT であった。

HBs 抗原量の減衰は、12 週時点で TG/GG

では -0.01 Log であったのに対し、TT では -0.24 Log であり、0.5 Log 以上の HBs 抗原量の減少が得られた 4 例は全例が TT であった。

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

Peg-interferon 治療の 12 週時点における治療反応性をウイルス量の変化から解析すると、HBV DNA、コア関連抗原、HBs 抗原量のいずれも TT において TG/GG よりも高度の減衰が得られていたことから、IL28B 遺伝子多型が Peg-interferon 治療効果と関連する可能性がある。

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

## E. 結論

C 型肝炎で抗ウイルス療法や線維化進行と関連する SNP は、B 型肝炎においてもある程度の関連性はあるが大きなインパクトはない。よって B 型慢性肝炎を対象とした独自のゲノムワイド解析を行い、疾患関連

遺伝子を追及する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 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; 13:47.
- (2) 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:e39175.

- (3) **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

- (1) 第48回 肝臓学会総会 シンポジウム 1 「B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法のHBs抗原と発癌に対する効果」
- (2) JDDW2012 パネルディスカッション 「東アジアにおけるB型肝炎発癌予測モデルの有用性：日本人に基づくデータマイニング・モデルの国外コホート検証、および国外発癌予測スコアの日本人コホートによる検証」

## 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：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：

- (1) 研究分担者として平成24年度より本研究班に参加した。2012年7月9日に「B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主遺伝因子の探索研究」について、当院倫理委員会での承認を得た（「B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主遺伝因子の探索研究」）。上記に対する研究対象として当院では現在までに、HBV感染者70例の同意書を得た上で登録をしている。
- (2) B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主遺伝因子の探索研究」の分担研究として、「小班3 .HBワクチン応答性に関する宿主の遺伝子研究」のため当院倫理委員会の承認を受け、血液検体収集を行った。

A. 研究目的

「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」のための血液検体ならびに臨床データを収集する。

B. 研究方法

当院倫理委員会での承認を得たうえで HBV 感染者 70 例に対し文書で同意取得後、血液検体を収集した。

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。

(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。

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。当院の検体内訳はワクチン反応者が 185 名、ワクチン不応者が 25 名であった。

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

B 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。

## 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.
- (9) **Keisuke Hino**, Sohji Nishina, Yuichi Hara Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: insights from recent evidence. *Clin J Gastroenterol* 2012;5:251-6.
- (10) 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;13:47 10.1186/1471-2350-13-47.
- (11) Matsui M, Motoki Y, Inomoto T, Miura D, Kato Y, Suenaga H, **Hino K**, Nojima J. Temperature-related effects of adenosine triphosphatase-activated microglia on pro-inflammatory factors. *Neurocrit Care* 2012;17:293-300.

### 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

特許第5070552号

名称:C型慢性肝炎治療効果予測のための検査方法及び検査用キット

特許権者：国立大学法人 岡山大学、学校法人 川崎学園

発明者：加藤宣之、池田正徳、是永匡紹、

**日野啓輔**

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：夏井坂 光輝 北海道大学病院消化器内科 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。

被験者各人に説明文を用いて書面と口頭で説明し、文書による同意を得る。

#### 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) Ohashi S\*, **Natsuizaka M\***, Naganuma S\*, Kagawa S, Kimura S, Itoh H, Kalman RA, Nakagawa M, Darling DS, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Herlyn M, Nakagawa H. (\* co-first authors); A Notch3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res.* 2011 Nov 1;71(21):6836-47.
- (2) Kalabis J, Wong GS, Vega ME, **Natsuizaka M**, Robertson ES, Herlyn M, Nakagawa H, Rustgi AK. Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc.* 2012 Jan 12;7(2):235-46.
- (3) **Natsuizaka M**, Naganuma S, Kagawa S, Ohashi S, Ahmadi A, Subramanian H, Chang S, Nakagawa K, Ji X, Liebhaber SA, Klein-Szanto AJ, Nakagawa H. Hypoxia induces IGFBP3 expression in esophageal squamous cancer cells through polysome-enriched HIF-1 $\alpha$  mediated mRNA transcription and continuous protein synthesis. *FASEB J.* 2012 Jun;26(6):2620-30.
- (4) Naganuma S, Whelan KA, **Natsuizaka M**, Kagawa S, Kinugasa H, Chang S, Subramanian H, Rhoades B, Ohashi S, Itoh

H, Herlyn M, Diehl JA, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Nakagawa H. Genetic Notch inhibition reveals cyclin D1 and Wnt signaling in invasive esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2012. 2012;2(4):459-75.

- (5) Nakagawa K, Uehata Y, **Natsuizaka M**, Kohara T, Darmanin S, Asaka M, Takeda H, Kobayashi M. The nuclear protein Artemis promotes AMPK activation by stabilizing the LKB1-AMPK complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Nov 2;427(4):790-5.
- (6) 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  $\kappa$ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis.* 2014 Feb;35(2):272-81.
- (7) **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**, Ohashi S, Naganuma S, Kalman RA, Ohshima A, Rhoades B, Vega ME, Stairs, DB, Klein-Szanto AJ, J. Diehl A, Basu D, Herlyn M, Pear WS and Nakagawa H: Notch regulates squamous differentiation, cell plasticity and tumor heterogeneity in esophageal carcinoma. The 102th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orlando, FL, April 2-6, 2011. May 7-10, 2011.
- (2) **Natsuizaka M**, Ohashi S, Ahmadi A, Chang S, Nakagawa K, Wong GS, Miyamoto N, Grugan KD, Klein-Szanto AJ, Herlyn M, Diehl JA, Nakagawa H. IGFBP3 suppresses reactive oxygen

species and cellular senescence response to facilitate TGF- $\beta$ -mediated EMT. Digestive Disease Week and the 112th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, IL, May 7-10, 2011.

- (3) **Natsuizaka M**, Naganuma S, Kagawa S, Ohashi S, Whelan KA, Chang S, Rhim AD, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Herlyn M and Nakagawa H: A functional interplay between TGF- $\beta$  and Notch signaling determines esophageal cancer cell fates. Digestive Disease Week and the 113th annual meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, May 19-22, 2012.
- (4) **Natsuizaka M**, Chang S, Kagawa S, Naganuma S, Ohashi S, Whelan KA, Wong GS, Vega ME, Yang Y, Gimotty PA, Diehl JA, Herlyn M and Nakagawa H: CD44 defines highly plastic esophageal squamous cancer cells with tumor initiating capabilities. Digestive Disease Week and the 113th annual meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, May 19-22, 2012.
- (5) **Natsuizaka M**, Nakagawa K, Naganuma S, Kinugasa H, Subramanian H, Ji X, Klein-Szanto AJ, Lieber SA, Diehl JA, Rustgi AK and Nakagawa H: Hypoxia induces IGFBP3 by HIF-1 $\alpha$ -dependent

transcription through a novel hypoxia-response element and privileged mRNA translation in the polysomes. Digestive Disease Week and the 113th annual meeting of the American Gastroenterological Association, San Diego, May 19-22, 2012.

- (6) **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.

#### 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：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。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て遺伝子解析用の検体および臨床情報収集を検討した。

平成24年8月より分担研究者として参加し、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施設にアンケート調査（回答率94%）を行い、94例のde novo B型肝炎発症例を把握し、うち57例（60.6%）でヒト遺伝子研究への同意取得可能見込みであった。

全国68施設のメンバー（主に血液内科）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

平成 24 年 8 月より、徳永班 HBV 再活性化担当として参加し、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の立ち上げのためのアンケート調査を行った。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）

アンケート調査項目において患者の特定されない内容に限定した。

C. 研究結果

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施設にアンケート調査（回答率94%）を行い、94例のde novo B型肝炎発症例を把握し、うち57例（60.6%）でヒト遺伝子研究への同意取得可能見込みであった。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、プロトコル（平成 25 年 11 月、第 1 版）を作成した。

D. 考察

アンケート調査により、ヒト遺伝子解析研究を行うための同意取得困難な理由として、

リンパ腫再発による原病死、転院、および劇症肝炎による死亡が挙げられた。また、同プロジェクト参加への主な問題点として、

1) ヒト遺伝子研究審査に時間がかかる、審査機関がない。2) 再活性化症例がない、少数例であることが挙げられた。

また、全国 68 施設のメンバー（主に血液内科）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 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：調 憲 九州大学消化器 総合外科 准教授  
研究協力者：吉住 朋晴 九州大学消化器 総合外科 講師  
前原 喜彦 九州大学消化器 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 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：MICA 多型及び分泌型 MICA の HBV 陽性肝癌の発症リスクや予後に与える影響について検討した。その結果、HBV 陽性肝癌の発症リスクと相関する事、また MICA の遺伝子多型と分泌型 MICA 値が有意な相関を示すことを明らかとした。また MICA のプロモータ領域の解析の結果、機能的 SNP を同定した。SNPrs2596542 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。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。  
さらに分泌型 MICA の予後との関連について検討した結果、分泌型 MICA 陽性肝癌症例では、予後が不良であった。以上の結果より MICA が予後マーカーであるだけでなく、治療標的としても有望であることが示された。  
またこれまでに HBV 陽性肝癌 230 症例、HBV 陽性肝硬変 140 症例、慢性 B 型肝炎 2000 症例の収集を行い、これらのサンプルを用いて新規の発症感受性遺伝子の探索を進めている。慢性 B 型肝炎 458 症例、健常人 2056 名を用いた全ゲノム関連解析を行い、新規の慢性 B 型肝炎疾患感受性遺伝子として HLA-DQ を同定した。以前に報告した HLA-DP 遺伝子の多型と組み合わせると、遺伝子の違いによって慢性 B 型肝炎の発症リスクが 5 倍以上異なることが示された。

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症メカニズムの解明を行う。

B. 研究方法

MICA 多型及び分泌型 MICA の HBV 陽性肝癌の発症リスクや予後に与える影響について検討した。解析に用いた症例は、HBV 陽性肝癌症例 407 例、慢性 B 型肝炎症例 699 例、健常人コントロール 5679 症例である。SNP rs2596542 のタイピングは、イルミナ GeneCHIP、インベダー法、タックマン法にて行った。統計解析には、Cochran-Armitage trend test を用いた。

また 111 名の HBV 陽性肝癌患者血清を用いて血清中の sMICA を ELISA 法にて測定した。sMICA と遺伝子多型及び予後との関連

解析には Kruskal-Wallis test, log-rank test を用いた。

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領域について機能的な SNP の探索を行なった。また HBV 陽性肝癌症例 230 例、HBV 陽性肝硬変症例 140 例、慢性 B 型肝炎症例 699 例、健常人 5000 例を用いて新規の予後関連遺伝子の探索を進めている。

（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

上記の解析によって、rs2596542 が HBV

陽性肝癌の発症リスクと関連を示すことが明らかとなった。さらに rs2596542 と sMICA 値も関連を示した。また sMICA が高値の肝癌症例では予後が不良であった。

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。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高くなることから、MICA が肝癌発症に対して促進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。この結果は HCV 陽性肝癌とでは逆の結果となった。

また新規の慢性 B 型肝炎疾患感受性遺伝子として HLA-DQ を同定した。これらに加え、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 と sMICA については HCV 陽性肝癌と同様の結果であり、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。一方、HCV 陽性肝癌と HBV 陽性肝癌とではリスクアレルが逆転しており、この原因としては、MICA の存在状態が関与すると推測される。膜型では NK 細胞を活性化することによって癌抑制遺伝子として機能するのに対し、分泌型は decoy receptor と機能することで、NK 細胞の活性を抑制することが報告されており、癌化を促進すると考えられる。HBV 陽性肝癌では様々な MMP が活性化しており、その結果分泌がの寄与が高くなるため、リスクアレルが逆転する結果になったと考えられる。

#### E. 結論

本解析の結果、MICA 多型及び分泌型 MICA

が慢性 B 型肝炎及び HBV 陽性肝癌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。上記の結果より、MICA に対する抗体が HBV 陽性肝癌の治療標的となりうる事が示唆された。また慢性 B 型肝炎 458 症例、健常者 2056 名を用いた全ゲノム関連解析を行い、新規の慢性 B 型肝炎疾患感受性遺伝子として HLA-DQ を同定した。既報の HLA-DP と組み合わせると、遺伝子の違いによって慢性 B 型肝炎の発症リスクが 5 倍以上差が生じることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) J.C. Chambers, W. Zhang, J. Sehmi, X. Li, M.N. Wass, P. Van der Harst, H. Holm, S. Sanna, M. Kavousi, S.E. Baumeister, L.J. Coin, G. Deng, C. Gieger, N.L. Heard-Costa, J.J. Hottenga, B. Kuhnel, V. Kumar, V. Lagou, L. Liang, J. Luan, P.M. Vidal, I. Mateo Leach, P.F. O'Reilly, J.F. Peden, N. Rahmioglu, P. Soininen, E.K. Speliotes, X. Yuan, G. Thorleifsson, B.Z. Alizadeh, L.D. Atwood, I.B. Borecki, M.J. Brown, P. Charoen, F. Cucca, D. Das, E.J. de Geus, A.L. Dixon, A. Doring, G. Ehret, G.I. Eyjolfsson, M. Farrall, N.G. Forouhi, N. Friedrich, W. Goessling, D.F. Gudbjartsson, T.B. Harris, A.L. Hartikainen, S. Heath, G.M. Hirschfield, A. Hofman, G. Homuth, E. Hypponen, H.L. Janssen, T. Johnson, A.J. Kangas, I.P. Kema, J.P. Kuhn, S. Lai, M. Lathrop, M.M. Lerch, Y. Li, T.J. Liang, J.P. Lin, R.J. Loos, N.G. Martin, M.F. Moffatt, G.W. Montgomery, P.B. Munroe, K. Musunuru, Y. Nakamura, C.J. O'Donnell, I. Olafsson, B.W. Penninx, A. Pouta, B.P. Prins, I. Prokopenko, R. Puls, A. Ruukonen, M.J. Savolainen, D. Schlessinger, J.N. Schouten, U. Seedorf, S. Sen-Chowdhry, K.A. Siminovitch, J.H. Smit, T.D. Spector, W. Tan, T.M. Teslovich, T. Tukiainen, A.G. Uitterlinden, M.M. Van der Klauw, R.S. Vasan, C. Wallace, H. Wallaschofski, H.E. Wichmann, G. Willemsen, P. Wurtz, C. Xu, L.M. Yerges-Armstrong, G.R. Abecasis, K.R. Ahmadi, D.I. Boomsma, M. Caulfield, W.O. Cookson, C.M. van Duijn, P. Froguel,

- K. Matsuda**, M.I. McCarthy, C. Meisinger, V. Mooser, K.H. Pietilainen, G. Schumann, H. Snieder, M.J. Sternberg, R.P. Stolk, H.C. Thomas, U. Thorsteinsdottir, M. Uda, G. Waeber, N.J. Wareham, D.M. Waterworth, H. Watkins, J.B. Whitfield, J.C. Witteman, B.H. Wolffenbuttel, C.S. Fox, M. Ala-Korpela, K. Stefansson, P. Vollenweider, H. Volzke, E.E. Schadt, J. Scott, M.R. Jarvelin, P. Elliott, J.S. Kooner, Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nature genetics* 43 (2011) 1131-1138.
- (2) J. Li, D. Yang, Y. He, M. Wang, Z. Wen, L. Liu, J. Yao, **K. Matsuda**, Y. Nakamura, J. Yu, X. Jiang, S. Sun, Q. Liu, Q. Song, M. Chen, H. Yang, F. Tang, X. Hu, J. Wang, Y. Chang, X. He, Y. Chen, J. Lin, Associations of HLA-DP variants with hepatitis B virus infection in southern and northern Han Chinese populations: a multicenter case-control study. *PLoS one* 6 (2011) e24221.
- (3) Y.J. Kim, M.J. Go, C. Hu, C.B. Hong, Y.K. Kim, J.Y. Lee, J.Y. Hwang, J.H. Oh, D.J. Kim, N.H. Kim, S. Kim, E.J. Hong, J.H. Kim, H. Min, Y. Kim, R. Zhang, W. Jia, Y. Okada, A. Takahashi, M. Kubo, T. Tanaka, N. Kamatani, **K. Matsuda**, T. Park, B. Oh, K. Kimm, D. Kang, C. Shin, N.H. Cho, H.L. Kim, B.G. Han, Y.S. Cho, Large-scale genome-wide association studies in east Asians identify new genetic loci influencing metabolic traits. *Nature genetics* 43 (2011) 990-995.
- (4) V. Kumar, N. Kato, Y. Urabe, A. Takahashi, R. Muroyama, N. Hosono, M. Otsuka, R. Tateishi, M. Omata, H. Nakagawa, K. Koike, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nature genetics* 43 (2011) 455-458.
- (5) H. Mbarek, H. Ochi, Y. Urabe, V. Kumar, M. Kubo, N. Hosono, A. Takahashi, Y. Kamatani, D. Miki, H. Abe, T. Tsunoda, N. Kamatani, K. Chayama, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Human molecular genetics*. 20 (2011) 3884-3892.
- (6) Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. 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**. *PLoS One*. 2012;7(9):e44743. Epub 2012 Sep 14.
- (7) 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 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.

- (11) 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) Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma. ISVHLD 2012 25th June 2012 (Invited speaker).
- (2) 遺伝子から分かる癌になりやすい体質とは 山梨県立中央病院 がん拠点病院勉強会 26th July 2012
- (3) Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma KSLM 16th Oct 2012 (Invited speaker).
- (4) ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索ー病気になりやすい体質とは？ー第2回 Diabetes and endocrinology Forum 29th Nov 2012 (招待講演)
- (5) 発癌関連遺伝子解析 10年のあゆみ「オーダーメイド医療実現化プロジェクト 10年間の歩みと未来への一歩」28th Jan 2013 (Invited)
- (6) GWAS revealed the roles of

gene-environmental interaction in carcinogenesis JCA-AACR joint symposium 25th Feb 2013 (Invited)

- (7) MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 2012
- (8) GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis. JCA -AACR joint symposium. 2013.2.25 Maui, Hawaii, U.S.A. (Invited speaker).
- (9) 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).
- (10) 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).
- (11) 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
- (12) 「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 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：西田 奈央 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター  
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：B型肝炎ウイルス由来肝炎に関連するホスト側遺伝要因としてGWASにより同定したHLA-DP遺伝子の詳細な解析を実施した。その結果、B型肝炎慢性化に対して、進行性の関連を示すHLA-DPB1アリルを2種類、抵抗性の関連を示すアリルを3種類同定することができた。また、B型肝炎慢性化に対して抵抗性を示すHLA-DPB1\*02:01は、肝発癌への病態進展に対しても抵抗性の関連を示すことを世界に先駆けて同定し、論文報告した。B型肝炎ウイルス由来肝発癌に対する関連遺伝子として中国人で同定されたKIF1B遺伝子は、アジア人集団で関連が再現できなかったことから、現段階では唯一のHBV由来肝発癌の関連遺伝子と言える。本研究に関連して、6報の論文報告、15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

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

連肝発癌、(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はらう。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

以下に3年間の研究結果をまとめる。

(1) 日本人健常群 420 検体を対象として、約 240 万種の SNP を搭載した Illumina Human OMNI2.5-8 BeadChip を用いたゲノムワイド SNP タイピングを実施した。同一の 420 検体について、約 90 万種の SNP を搭載した Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 によるゲノムワイド SNP タイピングも完了した。昨年度にデータ取得を終えた Affymetrix AXIOM ASI array (約 60 万種の SNP を搭載) によるゲノムワイド SNP 解析データと合わせて、日本人集団のゲノム構造を解析するために必要となるデータ取得を完了した。

(2) ゲノムワイド関連解析による B 型慢性肝炎患者群、健常対照群および B 型肝炎ウイルス排除群(HBsAg 陰性、HBc 抗体陽性)の比較から、*HLA-DPA1/HLA-DPBI* 遺伝子が B 型肝炎の慢性化および B 型肝炎ウイルスの排除に寄与することを論文報告した(論文(1)参照)。

(3) HBV 関連肝がんに関連すると報告された *KIF1B* 遺伝子が日本人、韓国人、香港人では関連が再現されないことを明らかにした。また、この成果を論文報告した(論文(2)参照)。

(4) 日本人健常群 420 検体について、*HLA* タイピング(*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-DRB1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DPBI*) を実施した。日本人健常群 420 検体の Affymetrix AXIOM ASI array の SNP データおよび *HLA* タイピングデータを用いて分子進化的解析を実施したところ、日本人集団において *HLA-DPBI\*04:01* が強い Positive selection を受けたことを明らかにした。また、この成果を論文で報告した(論文(3)参照)。

(5) GWAS 後の Replication 解析に適した DigiTag2 法の技術改良を実施した。解析結果を得るまでに 13 時間を要していたが、技術改良により 7 時間で解析結果が得られるようになった。また、この成果を論文で報告した(論文(4)参照)。

(6) 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* アリルタイピングを実施し、*HLA-DPA1* アリルおよび *HLA-DPBI* アリルを決定した。その結果、日本人において 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、また抵抗性の関連を示す *HLA-DP* アリルを 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。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* アリルを 1 種類同定した(論文(5)参照)。

### D. 考察

アジア人集団において B 型慢性肝炎患者が多く存在することが知られているが、本研究において *HLA-DP* 遺伝子が B 型肝炎ウイルスの排除に重要な役割を果たすことを明らかにした。加えて、特定の *HLA-DP* ア

リルが B 型肝炎ウイルスの排除に対して抵抗性・感受性の関連を示すことが明らかとなったことから、*HLA-DP* 抵抗性アリルを有する肝癌進展患者を対象としてウイルス解析を実施することで、HBV 由来肝発癌に関連する新たなウイルス因子を同定することが可能となることが示唆される。

#### E. 結論

*HLA-DP* 遺伝子による B 型肝炎ウイルス排除の機序を解明することにより、肝発癌への進行を阻害する治療薬の開発につながると期待される。また、*HLA* 遺伝子は B 型肝炎のみでなく、多くの疾患関連遺伝子として報告されているが、複雑な遺伝子構造であるため *HLA* と疾患の関わりについて十分な研究がなされていない。本研究が *HLA* 解析のパイロットスタディーとなるものと期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) **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
- (2) 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
- (3) Kawashima M, Ohashi J, **Nishida N**, Tokunaga K. Evolutionary Analysis of Classical *HLA* Class I and II Genes Suggests That Recent Positive Selection Acted on *DPB1\*04:01* in Japanese Population. *PLoS One*. 2012;7(10):e46806
  - (4) **Nishida N**, Mawatari Y, Sageshima M, Tokunaga K. Highly parallel and short-acting amplification with locus-specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by the DigiTag2 assay. *PLoS One*. 2012;7(1):e29967
  - (5) **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) **Nishida N**, Sawai N, Sugiyama M, Matsuura K, Han K-H, Koike A, Ahn SH, Tokunaga K, Tanaka Y, Mizokami M, The association of *HLA-DP* locus with chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean, Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2012, Taiwan, 2012.
- (2) **Nishida N**, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Koike A, Matsuura K,

- Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Mizokami M, Tokunaga K, A genome-wide association study identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, International Congress of Human Genetics 2011, Montreal, 2011.
- (3) **Nishida N**, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Tokunaga K, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2011, San Francisco, 2011.
- (4) 澤井裕美、**西田奈央**、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上 雅史、徳永勝士、ゲノムワイド関連解析による B 型肝炎ウイルス排除機構に関する遺伝的要因の探索、第 56 回日本人類遺伝学会、幕張、2011
- (5) 澤井裕美、**西田奈央**、田中靖人、松浦健太郎、伊藤清顕、溝上雅史、徳永勝士、B 型肝炎の慢性化・ウイルス排除機構と HLA-DP との関連、日本組織適合学会第 20 回大会、三島、2011
- (6) **西田 奈央**、ウイルス性肝炎にみる宿主因子とウイルス因子、日本人類遺伝学会 第 57 回大会、京王プラザホテル、2012
- (7) **西田奈央**、田中靖人、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、徳永勝士、溝上雅史、日本人および韓国人における B 型肝炎慢性化、B 型肝炎ウイルス排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定、第 16 回日本肝臓学会大会、神戸、2012
- (8) **Nao Nishida**, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Asako Koike, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, The associations of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance are widely replicated in East-Asian populations, 61th Annual ASHG Meeting, San Fransisco, 2012
- (9) **Nao Nishida**, Yasuhito Tanaka, Hiromi Sawai, Yoriko Mawatari, Megumi Yamaoka, Kentaro Matsuura, Masaya Sugiyama, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Naohiko Masaski, Kwang-Hyub Han, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Meta-analysis identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in East-Asian populations, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2012, Boston, 2012
- (10) **Nao Nishida**, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Investigating the novel host genetic factors associated with treatment response for HCV patients, The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", KEIO Plaza Hotel, 2012
- (11) 馬渡頼子、**西田奈央**、中伊津美、徳永勝士、溝上雅史、DigiTag2 法における PCR プライマー設計パラメータの検証、第 35 回日本分子生物学会年、福岡、2012
- (12) **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 Medecine Siriraj Hospital, Bangkok, 2013.6.24-28
- (13) **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

- (14) **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
- (15) **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：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型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染の罹患率には世界的に大きな地域差があり、日本を含む東アジア地域では顕著に高い。日本人を含む東アジア人集団を対象とした関連解析により、*HLA-DPA1*、*DPB1* 遺伝子領域内の多型がB型肝炎慢性化と非常に強く関連することが近年、報告された。このことは*HLA-DP* アリル特異的なHBV由来のペプチド断片提示がB型肝炎慢性化に強く関与していることを示唆する。本研究は、慢性B型肝炎感受性・抵抗性に関わる*HLA-DP* アリル産物の機能、および抵抗性アリルを介して提示されるHBs抗原領域を同定することを目的として、HLA-ペプチド相互作用解析を行った。

#### A. 研究目的

B型肝炎慢性化と最も強く関連する遺伝子多型が*HLA-DPA1*、*DPB1* 遺伝子座位とその周辺領域内にあることが近年、報告された（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する。一方、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。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結合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

と関連する HLA-DP アリル、および、関連を示さない中立性アリル(*HLA-DPA1*\*01:03、\*02:01、\*02:02、*HLA-DPB1*\*02:01、\*03:01、\*04:01、\*05:01、\*09:01) cDNA を HLA 標準細胞株よりクローニングし、組換え HLA-DP タンパク質をバキュロウイルス発現系、昆虫細胞安定発現系、哺乳類繊維芽細胞株で発現した。HBs 抗原の数カ所の領域について 10-15mer の合成ペプチドを製作し、HLA-DP との結合を測定した。HLA タンパク質をマイクロプレート上に固相化し、ビオチン標識ペプチドの HLA への結合を同定した。

(倫理面への配慮)  
該当なし

#### C. 研究結果

HLA-DP タンパク質の発現系を構築し、解析対象のすべてのアリルについて細胞表面発現を確認した。次に、先行研究がより多い HLA-DR タンパク質を用いて、ペプチド-HLA タンパク質相互作用測定系を構築した。具体的には、HLA タンパク質βサブユニット C 末端に His タグを付加し、哺乳類繊維芽細胞株を用いて発現した。安定発

現株を培養し、界面活性剤可溶性分画を 96well NTA-Ni コートプレート上でインキュベートし、HLA タンパク質を His タグを介してプレート上に固定した。ビオチン化ペプチドの HLA への結合を複数の陽性コントロールペプチドを用いて検証し、反応条件、検出システムを最適化した。この系を用いて、10-20 種類の HBs ペプチドと、HLA-DP アリル産物 (6 種類) との相互作用解析を行った (data not shown)。

#### D. 考察

本研究ではまず、複数の HLA アリル産物について、ペプチド結合能を網羅的にスクリーニングするための測定系を構築した。先行研究において、HLA クラス II タンパク質とペプチドとの相互作用解析は、多くの場合、精製 HLA タンパク質を用いて行われている。最も一般的に行われる方法は、精製 HLA タンパク質を 96 穴プレート上に抗 HLA 抗体を介して固定し、標識ペプチドの HLA タンパク質への結合を、ペプチド末端の蛍光標識、HRP 酵素反応等で検出する方法である。この方法は解析対象とする HLA アリルタンパク質の種類が一種類もしくは少数である場合は有効であるが、複数の HLA アリルタンパク質を解析対象とする場合、各アリル産物に対して抗 HLA 抗体を選択する必要がある、実験作業の煩雑さ、固定化出来る HLA タンパク質量のアリル間の差異などの問題点がある。本研究では解析対象とする 6 アリル産物について、ペプチドとの結合を同一プレート上で測定することが可能な系を構築した。今後は HBs 抗原に加え、HBc, HBe 抗原ペプチドについても解析対象を広げ、HLA-DP 結合ペプチドを網羅的に探索する。

#### E. 結論

慢性 B 型肝炎感受性及び抵抗性に関連する HLA-DP アリルの組換えタンパク質安定発現株を作成した。また、HLA-ペプチド結合測定系を構築し、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) 高柳彩、**宮寺浩子**、徳永勝士  
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析  
第 20 回日本組織適合性学会大会  
2011 年 8 月 29 日 静岡
- (2) 高柳彩、**宮寺浩子**、徳永勝士  
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析  
第 34 回日本分子生物学会大会  
2011 年 12 月 14 日 横浜
- (3) 高柳彩、**宮寺浩子**、徳永勝士  
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析  
第 40 回日本免疫学会学術集会  
2011 年 11 月 27 日 千葉
- (4) 高柳彩、**宮寺浩子**、徳永勝士  
Peptide binding studies on HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B in East Asian population  
第 16 回国際 HLA ワークショップ、第 26 回欧州組織適合性学会合同大会  
2012 年 6 月 1 日 英国・リバプール
- (5) 高柳彩、**宮寺浩子**、徳永勝士  
慢性 B 型肝炎感受性・抵抗性に関連する HLA-DP の機能解析  
第 21 回日本組織適合性学会大会  
2012 年 9 月 15 日 東京
- (6) 高柳彩、**宮寺浩子**、徳永勝士  
Functional analysis of HLA-DP, associated with susceptibility to chronic hepatitis B  
第 41 回日本免疫学会学術集会  
2012 年 12 月 7 日 神戸
- (7) 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

(8) 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 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：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：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。また、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 型慢性肝炎（CH-B）、B 型肝炎癌（HCC-B）および C 型慢性肝炎（CH-C）、C 型肝炎癌（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った。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た。非癌部における遺伝子変化は肝癌発症と関連していると考えられた。

また、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/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。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

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 クラスター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辿った症例に於いて、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/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。

#### D. 考察

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となった。今後の、SNP 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。また、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) The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. 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. *J Hepatol.* 60(1):127-134. 2014.
- (2) 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. 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. *PLoS One.* 2014. in press.
- (3) The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. 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. *Diabetologia.* DOI; 10.1007/s00125-013-3149-9. 2014. in press.
- (4) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **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. *Hepatology.* DOI; 10.1002/hep.26788. 2013. in press.
- (5) Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatol Res.* DOI; 10.1111/hepr.12266. 2013. in press.
- (6) MicroRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. Spaniel C, **Honda M**, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. *PLoS One.* DOI; 10.1371/journal.pone.0076867. 2013. in press.
- (7) Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. **Honda M**, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. *BMC Cancer.* DOI; 10.1186/1471-2407-13-191. 2013. in press.
- (8) Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. 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. *Br J Cancer.* 109(8):2072-2078. 2013.
- (9) Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. 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. *Eur J Immunol.* 43(11):2956-2968. 2013.
- (10) Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. 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. *Hepatology*. 58(3):1133-1142. 2013.
- (11) ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. Komura T, Sakai Y, **Honda M**, Takamura T, Wada T, Kaneko S. *Cell Immunol*. 282(1):44-52. 2013.
- (12) MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. 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. *J Virol*. 87(9):5270-5286. 2013.
- (13) Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. 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. *Clin Cancer Res*. 19(7):1827-1837. 2013.
- (14) Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. 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. *Hepatology*. 57(4):1484-1497. 2013.
- (15) Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Ueda T, **Honda M**, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai S, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. *Genomics*. 101(4):238-48. 2013.
- (16) Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Sakai Y, Tatsumi I, Higashimoto M, Seki A, Nasti A, Yoshida K, Kawaguchi K, Wada T, **Honda M**, Komura T, Kaneko S. *Biochem Biophys Res Commun*. 428(1):36-43. 2012.
- (17) Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamuta M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, **Honda M**, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Tani M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsuhashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. *Am J Hum Genet*. 91(4):721-728. 2012.
- (18) Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int*. 32(10):1516-26. 2012.
- (19) Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. 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. *PLoS One*. 7(6). e39175. 2012.
- (20) No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. 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. *BMC Med Genet.* 13: 47. 2012.
- (21) Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Okada H, **Honda M**, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. *Cancer Res.* 72(17):4459-71. 2012.
- (22) Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, **Honda M**, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. *Hepatol Res.* 42(6):523-542. 2012.
- (23) Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Metabolism.* 61(10):1388-94. 2012.
- (24) Coexpression network analysis in chronic hepatitis B and C hepatic lesions reveals distinct patterns of disease progression to hepatocellular carcinoma. He D, Liu ZP, **Honda M**, Kaneko S, Chen L. *J Mol Cell Biol.* 4(3):140-52. 2012.
- (25) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. Mizuno H, **Honda M**, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Liver Int.* 32(7):1146-55. 2012.
- (26) Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, Asahina Y, Izumi N, **Honda M**, Kaneko S, Enomoto N. *Hepatol Int.* 6(2):482-490. 2012.
- (27) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, **Honda M**, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol.* 167(3):532-42. 2012.
- (28) Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood. Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, **Honda M**, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K. *Biochem Biophys Res Commun.* 418(2):313-8. 2012.
- (29) A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. Okusaka T, Kasugai H, Ishii H, Kudo M, Sata M, Tanaka K, Shioyama Y, Chayama K, Kumada H, Yoshikawa M, Seki T, Saito H, Hayashi N, Shiratori K, Okita K, Sakaida I, **Honda M**, Kusumoto Y, Tsutsumi T, Sakata K. *Invest New Drugs.* 30(5):2015-25. 2012.
- (30) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, **Honda M**, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol.* 167(3):532-42. 2012.
- (31) Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, **Honda M**, Kaneko S. *Oncology.* 81(5-6):281-290. 2011.

- (32) Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, **Honda M**, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Hum Mol Genet. 20(17):3507-16. 2011.
- (33) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. Hepatology. 53(4):1206-16. 2011.
- (34) Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. **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. Gastroenterology. 141(1):128-40. 2011.
- (35) Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. J Gastroenterol Hepatol. 26(6):960-4. 2011.
- (36) Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, **Honda M**, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. J Hepatol. 54(3):439-48. 2011.
- (37) Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Sunagozaka H, **Honda M**, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Int J Cancer. 129(7):1576-85. 2011.
2. 学会発表
- (1) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. (口演 32242) 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2013). ムルボルン 2013.
- (2) Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. (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.
- (3) Impaired Infiltration of Immune Regulatory Cells into Liver Lobules of Chronic Hepatitis C Patients with Interferon-Resistant IL28B Genotype. **Honda M**, Sakai A, Shirasaki T, Nakamura M, Yamashita T, Arai K, Shimakami T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. AASLD2012(63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012). ポストン 2012.
- 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：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（平成24-25年度）  
山田 隆行 統計数理研究所 特任助教（平成23年度）

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：最近のGWASでは、多くの臨床情報と非常に多数の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。本研究は、主にこの状況におけるデータ解析の方法論の検討と開発に取り組んだ。平成23年度は、解析手法の確立を目的とした。具体的には、既存のデータによって、変量選択、グラフィカルモデルについて実装し、有効性を確認した。平成24年度は、変量選択に関する一層の検討と、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。Elastic net + stability selectionによる変量選択をGWASのデータサイズに耐える仕様で実装し、不完全浸透や表型模写があったとしても症例対照研究が著しく偽陽性を減らすことを示した。平成25年度は、残った問題である、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。提供されたデータを解析し、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関与することを示し、従来のIL28のSNPのみによる奏功予測を有意に改善することを示した。

#### A. 研究目的

ゲノム情報に基づく疾患研究においては、個体レベルの大量のデータを扱う必要がある。ここでは、従来の推測統計学の前提であった、少数のパラメタ、大きい標本、という状況に依拠できない。本研究は、現代的な統計解析手法の導入の試みである。

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、最近では、L1正則化回帰を用いることが標準的である。

平成23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が、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ので、平成24年度は、変量選択に関する一層の検討と、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上に、遺伝子間の交互作用に比較すれば検定の数が多いので、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、平成 25 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

1) 変数の選択に関する検討(平成 23-24 年度)。Lasso や Elastic Net などの正則化回帰を用いることが基本である。さらに、グラフィカルモデルにより、多型と臨床情報をグラフ表示することで、推論に供することができる。正則化回帰は、回帰係数にペナルティ項をつけ、回帰係数が小さくなる偏りを導入することで、推定量の分散を抑えて誤差の削減を図る手法である。0 にする傾向の強い L1 正則化 (LASSO) に合わせて古典的な L2 正則化を用いる elastic net 正則化を実施した。さらに、選択される SNP の再現性を検証するための手法として、リサンプリング標本に対して変量選択を繰り返し行い、そのコンセンサスを検証する stability selection を実施した。

2) 全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価(平成 24 年度)。理論的検討を容易にするために、メンデル性の疾患について、配列データが得られている状況を想定した。標本における変異型の頻度のヒストグラムを「頻度スペクトラム」とよぶ。この性質は測度値拡散過程によるモデリングによりよく知られている。そこで、頻度スペクトラムを前提とし、GWAS において想定される非血縁の患者、健常者の二標本が得られたとき、疾患に関連が検出される SNP の数の期待値を考察した。

3) 交互作用を網羅的に検出するための手続きの検討(平成25年度)。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。

(倫理面への配慮) 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

1) 変数の選択に関する検討。まず、データのクリーニングの手続きを確立した。続いて、Lasso や elastic Net を実装した。ある箇所の SNP が elastic net によって選択されたものの、性別で層別化すると有意な関連は観察できず、実際、stability selection によると、安定して選択されることはなかった。ただし、関連が強いものは複数あるため、アルゴリズムに一層の工夫が必要と考えられた。そこで 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株式会社 BITS と共同で開発した。

2) 全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価。非血縁患者のみの場合から始めて、非血縁健常者、同胞、不完全浸透や表型模写などについて、網羅的に検討した。統計学的に興味深い点は、分割表の検定と同型の問題であることであった。結果として、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が分かった。結果を専門国際誌に出版した。

3) 交互作用を網羅的に検出するための手続きの検討。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、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ところ、前者のROC曲線の下面積が0.839であるのに対し、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

本研究は方法論の検討と開発を目的としたものであり、変数の選択、偽陽性の評価、交互作用の検出、という、ゲノム情報を用いた疾患研究の現場で必要度の高い3つの課題を考察した。それぞれの課題について、現代的な統計解析手法をある程度は導入することができたと考えている。具体的な医学的発見としても、がんのための分子標的薬の標的遺伝子を発見し、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などの成果を得ることができた。

#### E. 結論

1) 変数選択に関する検討。Elastic net + stability selection による変数選択について、GWAS のデータサイズに耐える仕様で実装した。

2) 全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価。症例対照研究は非常に偽陽性を減らす効果がある。その期待値を計算

する手続きを与えた。

3) 交互作用を網羅的に検出するための手続きの検討。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いる。周辺効果の存在を仮定しない交互作用の網羅的検出の手続きを考案し、実際のデータにおいて機能することを示した。

#### 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

- (1) 山田隆行, 溝上雅史, **岡野修平**「全ゲノム交互作用解析により見つかったC型肝炎のインターフェロン・リバビリン併用治療における年齢と薬剤奏功の交互作用」日本人類遺伝学会第56回大会.

#### 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：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  
小林 良正 浜松医科大学内科学第二講座 講師

分担研究課題：1) 肝癌発症に関連する HBV 遺伝子の解析  
2) 宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響の解析  
3) オカルト HBV が疑われた核酸アナログ投与症例の HBV 遺伝子解析

研究要旨：

1) 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。

2) 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クローン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。

3) ラミブジンの長期間投与に伴ってHBs抗原が検出限界以下となったもののHBV DNA陽性が持続する慢性B型肝炎患者について、オカルトHBVと薬剤耐性変異の可能性を考え、HBs抗原領域及びポリメラーゼ領域のHBV遺伝子配列を解析した。その結果、HBs抗原に2カ所の変異：A194V及びI195Mを見出した。また、HBVポリメラーゼのL526MとM550Vの変異を検出した。

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が期待される。

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「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」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、個人情報情報を厳格に管理、保存した。

### C. 研究結果

#### 1) 肝癌発症に関連する HBV 遺伝子の解析

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、肝細胞がん発症例群と慢性肝炎+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 の変異頻度が肝癌発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。

#### 3) オカルト HBV が疑われた核酸アナログ投与症例の HBV 遺伝子解析

浜松医大病院にてラミブジン等を行った慢性 B 型肝炎患者の中でオカルト HBV が疑われた症例における HBV 遺伝子の解析を行なった。当該患者は、治療開始前、HBs 抗原 35497 IU/mL, HBV DNA 8.8 以上 (log copies/mL) と高値を示し、投与開始後、6 ヶ月で HBs 抗原 493 IU/mL, HBV DNA 2.7 log copies/mL まで低下した。その後、HBs 抗原は陰性化を認めたものの、HBV DNA は  $10^2 \sim 10^3$  copies/mL を推移した。このことから、ラミブジン長期間投与に伴って HBs 抗原検出系に低感受性/非感受性の HBV 変異が生じた可能性を考えた。そこで、ラミブジン投与前及び投与 72 ヶ月後の患者血清中の HBV について PreS1/PreS2/S 領域とそれに対応するポリメラーゼ領域の遺伝子配列を決定した。その結果、図 1 のように HBs 抗原のアミノ酸 194,195 番の Ala, Ile (投与前) がそれぞれ Val, Met (投与後) に置換する変異(A194V, I195M)が見出された。また、ポリメラーゼのアミノ酸 526 番 Leu が Met へ(L526M)、550 番 Met が Val へ(M550V)の置換変異が認められた。

### D. 考察

1) 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。

2) 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。

3) HBs 抗原検出試薬に対する反応性の低下に寄与する HBs 抗原変異としては、アミノ酸 116, 120, 126, 129, 130, 133, 145, 159, 183 番目等の変異がこれまで報告されている。オカルト HBV の要因となりうる新たな HBs 抗原変異として今回 A194V 及び I195M が見出された。A194V 及び I195M を持つ組換え HBs 抗原を作製し、検出試薬に対する感受性への影響を調べることにより本変異の意義が明らかとなる。一方、HBV ポリメラーゼの L526M (B-domain) と M550V (YMDD motif)はラミブジン耐性変異として報告されている (Bock et al,

Gastroenterol (2002)) ものと同じであった。

#### 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。

3) ラミブジン長期間投与 B 型肝炎症例における HBV 遺伝子解析の結果、オカルト HBV に関与する可能性のある新たな HBs 抗原変異を同定した。

#### 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 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：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。また、C1653T変異も肝がん患者において高い傾向が認められた。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。

研究期間を通じて、肝がん 273 例、年齢を一致させた非肝がん(無症候性キャリア、慢性肝炎を含む) 262 例のゲノム DNA、血清、検体付帯情報を収集した。この中で、ゲノムワイド関連解析を施行し、ゲノム情報を有する肝がん 238 例と、非肝がん 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 例と、非肝がん患者 138 例検体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( $p<0.05$ )。また、C1653T 変異も肝がん患者において高い傾向が認められた。

#### 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、加えてエンハンサー II に存在する C1653T 変異も発がんに関連する傾向が認められた。また、肝がん患者に genotype C の割合が高いことが示された。

収集した検体の中には、核酸アナログ投与による治療で HBV-DNA 量が 2.0 log copy/ml 未満の検体もあった。これらは宿主側因子の解析には問題がなかったものの、ウイルス遺伝子解析を行うには十分なウイルス量ではなく、そのため全ての検体について解析することができなかった。今後は、宿主因子とウイルス因子の相関について検討することを前提として、可能な限りウイルス量の高い治療前の検体も併せて収集する等の改善が必要とされる。

#### E. 結論

本研究で検体を収集した日本人集団において、HBV 感染に起因する肝がんに関連したウイルス因子が同定された。さらに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。

#### 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) Sakamoto T, **Tanaka Y**, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Fuminaka S, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. J Viral Hepat., 20(4): e27-36, 2013.
- (5) 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.
- (6) Du D, Zhu X, Kuno A, Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, **Tanaka Y**, Zhang X, Narimatsu H. Comparison of LecT-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels. Clin Chim Acta., 413 (21-22): 1796-9, 2012.
- (7) 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.*, 7 (6): e39175, 2012.

- (8) 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.*, 13: 47, 2012.
- (9) 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.
- (10) Ragheb M, Elkady A, **Tanaka Y**, Murakami S, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.* 84 (4): 587-95, 2012.
- (11) 新海登, **田中靖人**, 杉山真也, 溝上雅史. 【B型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性】核酸アナログ耐性変異パターン解析とその対策. *消化器内科.* 2012; 54 (5): 582-585.
- (12) Sa-Nguanmoo P, **Tanaka Y**, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res.*, 2011; 158 (1-2): 209-15.
- (13) Matsuura K, **Tanaka Y**, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M.

Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. *Hepato Res.*, 2011; 41 (6): 505-511.

- (14) 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. *Hepato Res.* 2012; 42 (2): 139-149.

## 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 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.
- (3) 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 .
- (4) 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 .
- (5) Sugiyama M, **Tanaka Y**, Nakanishi M, Mizokami M. The influence of specific mutations observed in core promoter region of HBV genotype D1 on viral replication. 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sept., 22-25, 2012. Oxford, England.
- (6) Iio E, Watanabe T, **Tanaka Y**, Matsuura K, Shinkai N, Nojiri S, Joh T. Characteristics of anti-HBs titers by gender and age in HBV-resolved patients. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases., Nov. 9-13, 2012. Boston, USA.
- (7) Nishida N, Mawatari Y, Sugiyama M, Murata K, Korenaga M, Masaki N, Tokunaga K, Mizokami M, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, **Tanaka Y**, Matsuura K, Han K. Meta-analysis identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in East-Asian populations. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases., Nov. 9-13, 2012. Boston, USA.
- (8) 新海登, **田中靖人**, 松浦健太郎, 溝上雅史 . B 型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討 ~ 中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて ~ . 第 48 回日本肝臓学会総会 . 平成 24 年 6 月 7 日 ~ 8 日 . 石川 .
- (9) 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 . HBV 陽性肝炎における感受性候補 SNP の東アジア集団での検証 . 第 21 回日本組織適合性学会大会 . 平成 24 年 9 月 15 日 ~ 17 日 . 東京 .
- (10) 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 B 型肝炎由来肝癌感受性 SNP の東アジア集団での検証 . 第 16 回日本肝臓学会大会 . 平成 24 年 10 月 10 日 ~ 11 日 . 神戸 .
- (11) 西田奈央, **田中靖人**, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 徳永勝士, 溝上雅史 . 日本人および韓国人における B 型肝炎慢性化、B 型肝炎ウイルス排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定 . 第 16 回日本肝臓学会大会 . 平成 24 年 10 月 10 日 ~ 11 日 . 神戸 .
- (12) 飯尾悦子, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 城卓志, **田中靖人** . B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差 . 第 16 回日本肝臓学会大会 . 平成 24 年 10 月 10 日 ~ 11 日 . 神戸 .
- (13) 杉山真也, 田中靖人, 中西真, 溝上雅史 . HBV 遺伝子型 D1 型に特異的なコアプロモーター変異 ( G1757A/ G1764T/ C1766G ) の機能解析 . 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 24 年 11 月 13 日 ~ 15 日 . 大阪 .
- (14) **Tanaka Y**. Progress in technology for diagnosis and treatment monitoring. The 17th Annual Meeting of the Korean Association for the Study of the Liver. Changing Concepts of Chronic Hepatitis B., June 9-11, 2011. Seoul, Korea.
- (15) Sugauchi F, **Tanaka Y**, Matsuura K, Watanabe T, Tajiri K, Kishi H, Masashi M. Cross-genotype protection of hbs and a role of hbs antigen mutation in immunity escape in vitro and in vivo model using upa/scid mice with human hepatocytes. the 62nd annual meeting of the american association for the study of liver diseases., Nov 4-8, 2011. San Francisco, USA.
- (16) Sugiyama M, **Tanaka Y**, Nakanishi M, Sudoh M, Mizokami M. Host sphingolipid biosynthesis as a therapeutic target for hepatitis b virus replication the 62nd annual meeting of the american association for the study of liver diseases., Nov 4-8, 2011. San Francisco, USA.
- (17) 新海登, **田中靖人**, 日下部篤宣, 松浦

健太郎，溝上雅史．分子診断を含めた抗原・抗体検査による消化器がん検診のありかた B 型肝炎関連肝癌の囲い込み ウイルス変異及び HBV 関連マーカーを用いて．日本消化器がん検診学会．平成 23 年 5 月 20 日～22 日．東京．

(18)木村達治、小林万利子、**田中靖人**、溝上雅史、熊田博光．「イムニス HBV ゲノタイプ EIA」の臨床性能．第 47 回日本肝臓学会総会．2011 年 6 月 2 日～3 日．東京．

(19)今関文夫，呉 霜，神田達郎，**田中靖人**，横須賀收．HBe 抗原・抗体と B 型肝炎ウイルス遺伝子変異の検討．第 47 回日本肝臓学会総会．2011 年 6 月 2 日

～3 日．東京．

(20)田尻和人，河合健吾，時光善温，峯村正実，安村 敏，高原照美，杉山敏郎，岸 裕幸，村口 篤，**田中靖人**．エスケープミュータントに対する HB ワクチンの作用機序の検討．第 47 回日本肝臓学会総会．2011 年 6 月 2 日～3 日．東京．

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