

201320017A(1/2)

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

次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた
C型肝炎治療に伴う肝病態進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坂本 直哉

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた C 型肝炎治療に伴う
肝病態進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析 ----- 1
坂本直哉

II. 分担研究報告

1. 全ゲノム配列解析による肝がんリスク因子探索 ----- 6
今西 規
2. HCVタンパク質NS5Aの分子動力学的手法による
構造・機能解析 ----- 9
遠藤俊徳
3. 宿主DNAの高速シーケンス解析 ----- 11
杉山真也
4. C型肝炎を発生母地とする HCC 肝切除後の再発に関わる次世代
シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた宿主因子の解析 --- 14
武富紹信
5. ウィルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響 ----- 17
夏井坂光輝
6. C型慢性肝炎における免疫遺伝子多型とNK細胞解析 ----- 19
巽 智秀

7. C型慢性肝炎の病態進展に対する MICA、DEPDC5、IL28B 遺伝子多型の意義の検討 -----	23
前川伸哉	
8. 次世代シーケンサーを用いた肝細胞癌の病態に関連する遺伝子変異の解析 -----	26
朝比奈靖浩	
9. Yamagata Study(住民検診基盤でのコホート研究)を用いた病変進展・肝発癌の分子機構の解析 -----	32
上野義之	
10. Peg-IFN + RBV + TVR 三剤療法治療とコレステロール代謝に関する研究 -----	37
中牟田誠	
11. エクソームシーケンシングによる肝癌由来細胞株の鉄代謝関連遺伝子の網羅的変異解析 鉄負荷マウスにおける肝組織糖・脂質代謝変化に関する トラスクリプトーム解析 -----	40
高後 裕	
12. 酸化ストレスによる肝発癌に関わるゲノム情報の解析 -----	50
宮西浩嗣	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	65

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた C 型肝炎治療に伴う肝
病態進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析

研究代表者 坂本 直哉
北海道大学大学院医学研究科・消化器内科学分野・教授

研究要旨

我々は、HCV 感染の組織学的進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析を行うことにより、新規診断マーカーを探索し、肝病態の軽快を促進する新たな分子標的治療法の創出を目指す事を目的として研究を遂行し、今年度以下の結果を得た。(1) エキソーム解析を行うことで肝癌に関連するヒトゲノム変異の探索を行う倫理審査、機器の整備に加え、シーケンスデータ解析に備えたデータの授受方法やファイル形式、解析手法について打合せた。(2) C 型肝炎の肝病態進展軽快に関わる宿主遺伝要因の解析のため、申請者らの施設でそれぞれ遂行している肝炎診療に関する多施設共同研究で、ヒト遺伝子解析の追加プロトコル倫理審査を終了し、検体・臨床情報収集を開始した。本研究の遂行により、今後迎える経口抗ウイルス薬による全例治癒の時代に備え、ウイルス排除後の肝発癌、生命予後などの自然経過とそれに関連する遺伝要因を明らかとすることができる。来年度は本年度の準備状況を踏まえ引き続き研究を遂行する。

研究分担者

今西 規	(東海大学・教授)
遠藤 俊徳	(北海道大学・教授)
五條堀 孝	(国立遺伝学研究所・教授)
杉山 真也	(国立国際医療センター・上級研究員)
武富 紹信	(北海道大学・教授)
夏井坂 光輝	(北海道大学・助教)
巽 智秀	(大阪大学・助教)
前川伸哉	(山梨大学・特任講師)
朝比奈 靖浩	(東京医科歯科大学・教授)
上野 義之	(山形大学・教授)
中牟田 誠	(九州医療センター・部長)
高後 裕	(旭川医科大学・教授)
宮西 浩嗣	(札幌医科大学・講師)

排除による肝発癌、生命予後改善効果を含めた医療経済学的な検討が必要となる。我々はこれまで多施設共同研究による大規模治療コホートの解析により、治療効果に関連する IL28、ITPA 等の宿主遺伝子探索を共同して遂行してきた (Nature Genet 2009)。

本研究で我々は、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法を用いて HCV 感染の組織学的進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析を行うことにより、新規診断マーカーを探索し、肝病態の軽快を促進する新たな分子標的治療法の創出を目指す。従来の DNA chip を用いた GWAS に留まらず、次世代シーケンサーを用いたオミックス解析 (エキソームによる体細胞変異、DNA メチル化領域、ヒストンアセチル化領域、および CNV (コピー数変異)) を行う。その解析から疾患関連因子を抽出し、診断や治療に役立てる。

A. 研究目的

C 型肝炎治療は今後経口抗ウイルス薬が主体となり、全例に投与できウイルスのほぼ完全排除が可能となる。しかし治療後も依然肝発癌のリスクとなる肝病態の進展軽快に関わる遺伝要因を含む宿主因子の探索が必要である。また新規治療の高齢者、肝硬変例への適応拡大にあたってはウイルス

B. 研究方法

(1) DNA 検体、臨床情報の集積：

申請者らの施設はそれぞれ多施設共同研究を遂行しており、それらの症例の診療情報、DNA 検体を集積する。抗ウイルス療法症例：坂本 (NORTE Study)、朝比奈 (OCLC)、前川 (YPERS)、巽 (OLF)、杉山 (国立国

際医療研究センター)。肝癌、肝移植症例：武富、住民健診コホート：上野。

次世代シーケンサーは共同研究施設である国立国際医療研究センター、北海道大学消化器内科、および山梨大学第1内科に導入されている。

(2) バイオインフォマティクス解析：

GWAS解析に必要な大規模計算機解析とソフトウェア整備、さらに大量ゲノム配列データのデータベース構築を行う。特に、次世代シーケンサーによる大量ゲノム配列のマッピング解析、SNVやCNVの特定、各種モデルによるGWASの遺伝統計学的解析を実施する。また、今西らが開発した最も情報豊富なヒト遺伝子統合データベースH-InvDB(Imanishi, PLoS Biol 2004; Takeda, NAR 2012)とともに、Encodeや1000人ゲノムPJなどの国内外の研究成果を活用し、肝発癌に関わる疾患パスイェイ探索などのデータマイニング解析を実行する。さらに、独自の疾患候補遺伝子の選定解析法(Taniya, Genomics 2011)を改良し、多数の候補中から疾患原因SNVを選定するための新しい統計解析法を開発・導入する。

(3) C型肝炎の肝病態進展軽快に関わる宿主遺伝要因の解析：

住民検診、自然経過観察症例を用いて感染と病勢進展に関与する因子の絞り込みを解析し、病態進展に関連する候補遺伝子を見いだす。さまざまな慢性肝疾患患者の末梢血および肝組織DNAのメチル化修飾を網羅的に探索する。これらの情報と各種臨床パラメータとの関連を検討することにより、候補遺伝子の機能を明らかにする。

(4) 抗ウイルス治療効果・副作用に関わる宿主遺伝子の探索：

テラプレビル併用抗ウイルス療法約400例を対象に高密度マイクロアレイによるSNPs解析を実施し関連するSNPsを抽出する。同時にDNAメチル化領域やヒストンアセチル化領域を抗体等で回収し高速シーケンサーで解読する。それらのデータを組み合わせ、候補遺伝子の機能分類を行う。

肝炎および健常群より末梢血単核球を採取し、細胞傷害活性、サイトカイン産生能やNK細胞活性化レセプター、抑制性レセプターの発現を検討し、IL28BやMICAの遺伝子多型との関連を解析する。in vitroで末梢血単核球にIFNを添加し、遺伝子多型によるSTATシグナル伝達経路の反応性の違いに

ついて検討する。

(5) 肝発癌、癌幹細胞機能に関わるゲノム・エピゲノム情報の解析：

臨床的に分化度および予後が判明している担癌患者の体細胞ゲノム、エピゲノム情報を用いて、発癌、進行度、予後に関連する候補遺伝子を解析する。HCV感染が癌幹細胞に及ぼす影響を抗CD44抗体、抗CD133抗体を用いてFACSで解析する。

臨床的に予後および薬物治療効果が判明している、肝癌・非癌部組織を用いて、癌遺伝子変異プロファイルcancer panel chipを用いて解析する。さらに流血中の低分子RNAを解析し、診断・予後関わるアルゴリズム作成と治療標的候補の基盤情報を得る。

肝移植症例、移植後再発C型肝炎症例を対象に、病態進展に関わるゲノム、エピゲノム情報を得る。

(倫理面への配慮)

本研究では、対象者の血清や便を測定するが、投薬や健康指導などの介入は行わない。疫学研究に関する倫理指針に沿って、血清データの提供について北海道大学の倫理委員会の承認を取得した(臨床研究番号：自010-0168 H22年10月28日)。また、各施設の倫理委員会による承認の手続きを行った。検体の提供を依頼する対象者には、研究の目的等を十分インフォームした上で、文書による同意を得て実施した。

C. 研究結果

(1) エキソーム解析を行うことで肝癌に関連するヒトゲノム変異の探索を行う倫理審査、機器の整備に加え、シーケンサーデータ解析に備えたデータの授受方法やファイル形式、解析手法について打合せた(坂本)。

(2) C型肝炎の肝病態進展軽快に関わる宿主遺伝要因の解析のため、申請者らの施設でそれぞれ遂行している肝炎診療に関する多施設共同研究で、ヒト遺伝子解析の追加プロトコル倫理審査を終了し、検体・臨床情報収集を開始した。

(3) 2000年から2010年までに当院で施行されたC型肝炎を背景とする肝細胞癌切除例を選定し、臨床情報データベースの整備を行った。

(1) 大規模ヒトゲノム・エキソーム解析のためのブレード型計算機を整備し、さらにデータ解析パイプラインの構築を行った。

(2) 公共のデータベースから多くのヒトゲノム情報や遺伝子多型情報を収集し、特に近年急速に研究が進む日本人特有の遺伝子多型情報を抽出して、本研究に使用できるように整備した。

(3) 先行研究の論文調査により、肝がん発症に関連する遺伝子多型の情報を収集し、整備を行った。

・研究分担者(遠藤 俊徳)

(1) 分子動力学シミュレーションにより、NS5A 阻害剤 Daclatasvir の結合部位および作用機構の解析を行い、薬剤結合の有無により NS5A 蛋白の大きな構造変化が予想された。

・研究分担者(杉山 真也)

(1) シークエンス装置として Ion Torrent2 台と Hiseq1 台、Miseq1 台を導入して稼働準備を整えた。現在、健常サンプルを用いてエキソーム解析の基礎データの取得を行っている。

・研究分担者(前川伸哉)

(1) MICA、DEPDC5 の SNP と肝癌・肝病態の進展について検討し、両遺伝子のリスクアレルは肝発癌と関連し、肝線維化を含めた従来の肝癌関連因子と独立した因子であることを明らかとした。

・研究分担者(中牟田 誠)

(1) ペグインターフェロン + リバビリン + テラプレビル併用療法にピタバスタチン + エイコサペンタエン酸を併用する事により、約 60% と従来治療より高率にウイルス学的著効を得られることを見いだした。

・研究分担者(巽 智秀)

(1) NK 細胞上の Tim-3 のリガンドである Galectin-9 の血清中濃度が HCV 患者群で有意に高値であった。

(2) HCV 感染増殖系とヒト末梢血単核球を共培養したところ、Gal-9 と免疫担当細胞との間に crosstalk があることが示され、HCV の持続感染に寄与することが示唆された。

・研究分担者(高後 裕)

(1) 肝癌細胞株の鉄代謝関連遺伝子のシークエンスを NGS を用いたエクソーム解析を行い、蛋白質機能や発現に影響を与える新たな機能欠失/亢進型バリエーションの候補遺伝子が同定された。

(2) 鉄負荷マウスにおける肝組織の糖・脂質代謝変化を NGS を用いたトラスクリプ

トーム解析を行った。慢性肝疾患で高頻度に認められる肝内鉄過剰がコレステロール合成・プレニル化 ras 関連酵素、脂肪酸β酸化酵素、糖代謝関連酵素等の発現を変化させることを確認した。

・研究分担者(武富 紹信)

(1) C 型肝癌切除後例のうち選定された対象 124 例 (全血 82 例、非癌部 42 例) の臨床情報の整理を行った。

・研究分担者(朝比奈 靖浩)

(1) 次世代シークエンシング技術を用いて、網羅的に癌遺伝子プロファイルを解析した。

・研究分担者(夏井坂 光輝)

(1) 肝細胞癌におけるがん幹細胞のマーカーとして CD44、CD133 による二重染色が有用であることを複数の肝細胞癌細胞株を用いて確認した。

・研究分担者(宮西 浩嗣)

(1) C 型慢性肝炎ならびに脂肪性肝炎からの肝発癌予測に肝 8-OHdG 量の定量が有効である可能性を示した。

(2) C 型慢性肝炎からの肝発癌に関わる酸化 DNA 傷害修復遺伝子の個体差検討するため次世代シークエンサーで解析したところ、MUTYH 遺伝子の SNP3 種類が発癌危険因子の候補となった。

D. 考察

本研究の遂行により、今後迎える経口抗ウイルス薬による全例治癒の時代に備え、ウイルス排除後の肝発癌、生命予後などの自然経過とそれに関連する遺伝要因を明らかとすることができる。さらに新規治療薬の治療適応検討にあたり、従来非適応であった高齢者、肝硬変例のウイルス排除療法の予後改善効果とその関連因子を明らかとすることにより、医療経済学的検討のための科学的根拠が得られる。

本研究の成果により疾患進展や発がんに関する高危険群を見いだすことが可能となり、積極的な医療介入が必要な患者群を割り出すことに貢献することが期待される。この研究により、適切な治療対象が絞り込まれ、より効率的な医療介入が期待され国民の福祉向上とともに適切な医療費管理などが見込まれる。本研究の成果で予後および薬物治療効果に関わる宿主遺伝子プロファイルが明らかとなることにより、C 型肝炎研究は推進され患者の予後を改善す

るのみならず、個別化医療の実現により治療の効率化が図れ、医療経済学的な効果に繋がり、社会の福祉に寄与することができる。

今後の癌治療において癌幹細胞を標的とした治療法の開発は非常に重要である。肝細胞癌の癌幹細胞を次世代シーケンサー等の新たな研究手法により詳細に検討することで、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が期待される。

E. 結論

来年度は本年度の準備状況を踏まえ引き続き下記のごとく研究を遂行する。

- (1) 申請者, 分担者の施設で遂行しているそれぞれの多施設共同研究のデータ集積と、収集検体のヒト遺伝子解析を進める。
- (2) エキソームの解析手法の確立を行い、データ取得から解析までのパイプラインを完成させる。
- (3) Gal-9 が NK 細胞、及び HCV 感染に与える影響を Ex Vivo の系にて評価する。また肝癌細胞への免疫学的影響についても検討する。
- (4) C 型慢性肝炎患者における DEPDC5、MICA、PD-1、Tim-3 の遺伝子多型と発癌との関連を検討する。
- (5) 慢性肝炎患において、糖・脂質・鉄代謝等に関連する SNPs 解析のための詳細なカスタムパネルをデザインし、網羅的 SNPs 解析を行う。
- (6) 次世代シーケンシングで得られた癌遺伝子プロファイル情報を基に、予後および薬物治療効果との関連について明らかとする。
- (7) HCV 感染系 (JFH1、J6) を用いて、HCV 感染および駆除が CD44、CD133 陽性細胞に与える影響を解析し、HCV 感染が癌幹細胞に与える影響のメカニズム、HCV の責任領域を同定する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Masato Nakai, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto, Kunitada Shimotohno, Naoya Sakamoto, and Hussein H Aly: The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B cells with low replication

efficacy. *Viral Immunology* 2014; in press.

2. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatakaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S: Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*; 2014; 35(2):272-81. doi: 10.1093/carcin/bgt343
3. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, and Moriishi K: Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivatives on Replication of Hepatitis C Virus. *Plos One* 2013; 8(12):e82299. doi: 10.1371/journal.pone.0082299.
4. Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H: Hypoxia-inducible Factors Activate CD133 Promoter through ETS Family Transcription Factors. *Plos One* 2013;8(6):e66255. doi: 10.1371/journal.pone.0066255.
5. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, and Watanabe M. Wnt5a Signaling Mediates Biliary Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells. *Hepatology* 2013;57(6):2502-2513. doi: 10.1002/hep.26293.
6. Sakamoto N: NX-PVKA assay, a conventional but refined prognostic biomarker for Hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterol and Hepatol* 2013;28(5):755-756. doi: 10.1111/jgh.12138.
7. Huang JT, Tseng CP, Liao MH, Lu SC, Yeh WZ, Sakamoto N, Chen CM, Cheng JC: Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of non-structural protein NS5B and fatty acid

- synthase. *Journal of Virology* 2013;87(9):4994-5004.
doi: 10.1128/JVI.02526-12
8. Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Akuta N, Sakamoto N, Itoh Y, Izumi N, Nomura H, Hayashi N, Takehara T: A multi-center survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res* 2013; 43(1):35-43.
doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01056.x.
9. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N: A model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(3):449-458.
doi: 10.1002/jmv.23497.
10. Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, Sakamoto N, Tanaka Y, Nakamuta M. Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(2):250-260.
doi: 10.1002/jmv.23464.
11. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57(1):46-58.
doi: 10.1002/hep.26017
12. 坂本直哉: 肝炎ウイルス学 近年の進歩. 診断と治療 2013;101(9): 1283-1286.
13. 坂本直哉: C型肝炎の近未来治療. 化学療法の領域 2012; 28(S-1):1134-1140.
14. 坂本直哉: C型肝炎治療薬 テラプレビル. 薬局 2012; 63 (1): 123-128.
15. 新田沙由梨, 坂本直哉: NCV-NS4B蛋白とIFN発現計シグナル分子との分子間相
- 相互作用の解析. 消化器と免疫 2011; 48: 174-177.
- 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

全ゲノム配列解析による肝がんリスク因子探索

研究分担者 今西 規 東海大学医学部 教授
研究協力者 中川 草 東海大学医学部 助教
研究協力者 クリュコフ キリル 東海大学医学部 博士研究員

研究要旨

本年度はゲノムワイド関連解析（GWAS）を行うための大規模ヒトゲノム・エキソーム解析のための中型計算機の整備と解析パイプラインの構築を行った。公共のデータベースから多くのヒトゲノム情報や遺伝子多型情報などの収集し、特に近年急速に研究が進む日本人特有の遺伝子多型情報を抽出し、本解析に使用できるように整備した。肝がん発症に関連する先行研究から関連する遺伝子多型を収集し、整備を行った。解析実務者のための研究情報共有システムを構築した。東海大学医学部 医の倫理委員会に本研究を申請し、承認を得た。

A. 研究目的

本研究におけるバイオインフォマティクス解析担当班として、GWAS 解析に必要な大規模計算機解析とソフトウェア整備、さらに大量ゲノム配列データのデータベース構築を行う。特に、次世代シーケンサーによる大量ゲノム配列のマッピング解析、SNV や CNV の特定、各種モデルによる GWAS の遺伝統計学的解析、肝発癌に関わる疾患パスウェイ探索などのデータマイニング解析などを実施する。ここでは、今西らが開発したヒト遺伝子統合データベース H-InvDB を使用し、独自の疾患候補遺伝子の選定解析法を改良し、多数の候補中から疾患原因 SNV を選定するための新しい統計解析法を使用する。

B. 研究方法

HCVのクリアランスにも関わらず、肝がん発症に至った症例群と、肝発癌しなかった対照群のエキソン由来のDNA配列を次世代シーケンサーにより大規模解読する（図1）。

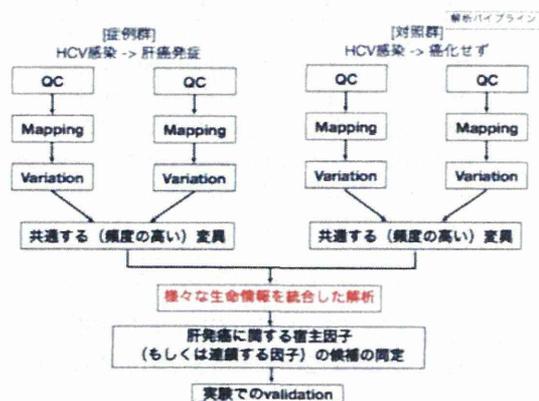


図1 本研究の解析パイプライン
本研究班では、その結果得られた大規模

エキソーム配列を標準ヒトゲノム、もしくは日本人の標準ヒトゲノム（独自に作成予定）にマッピングし、SNVを同定する。また、日本人特有のSNPを反映した日本人標準ゲノムを作成するなど、SNVの同定精度を高める。

（倫理面への配慮）

各個人情報情報は研究統括班で二重匿名化され、本研究機関で統合することはできない。加えてエキソーム解析を行うサーバーは外部インターネット接続から遮断して解析を行う予定である。

C. 研究結果

1. 計算機整備・データ解析パイプラインの構築

大規模ヒトゲノム・エキソーム解析のための中型並列計算機の整備と解析パイプラインの構築を行った。具体的には 8 コアをもつ CPU を 32 個、合計 256 コアを並列で使用できる環境を整えた。また、データの解析・保存用に 250TB もの容量を備えたストレージも整備した（図 2）。

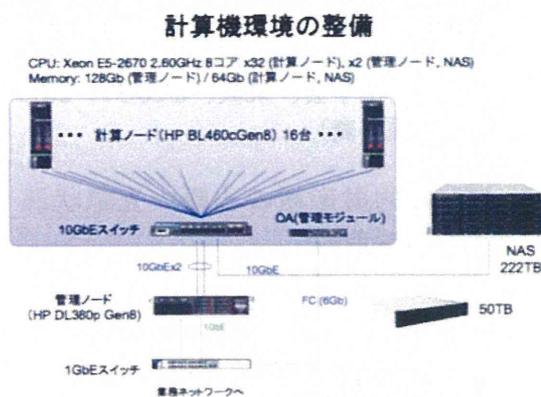


図 2 計算機環境の整備

そして次世代シーケンス解析における標準的なソフトウェアをインストールし、並列演算が行えるように整備した（図 3）。

ソフトウェア環境の整備 -標準的なNGS解析用のソフトのインストールは完了-

- Beagle 4.1.128 - manual install, jar - java -jar /usr/local/bio/beagle/LATEST/beagle.jar
- Beagle Utilities - manual install (including pseudomarker and cluster2haps, also conform-gt) - java -jar /usr/local/bio/beagle/utilities/vcl2beagle.jar
- BFAST 0.7.0a - manual install, from source - bfast
- BLAST - 2.2.28 - manual install, binary - blastn -help
- Bowtie 1.0.0 - manual install, binary - bowtie-build, bowtie-inspect, bowtie
- Bowtie 2.2.1 - manual install, binary - bowtie2-build, bowtie2-inspect, bowtie2
- BWA 0.7.5 - manual install, from source - bwa
- FastQC 0.10.1 - manual install, distribution - fastqc --help
- GATK 2.7-4 - manual install, distribution - java -jar /usr/local/bio/gatk/LATEST/GenomeAnalysisTK.jar --help
- LAST 362 - manual install, from source - lastdb, lastal, lastex
- MAFFT 7 - manual install, binary - mafft -version
- Muscle 3.8.31 - manual install, binary - muscle -version
- Picard Tools 1.1105 - manual install, from source - picard tools
- SAM Tools 0.1.19 - manual install, from source - samtools
- SOAPaligner 2.21, manual install, binary - soap
- TopHat 2.0.10, manual install, binary - tophat2
- Velvet 1.2.10 - manual install, from source - velvet, velvetg
- VCFtools 0.1.11 - manual install, from source - /usr/local/bio/vcftools_0.1.11/bin

図 3 整備した NGS ソフトウェア

2. 公共データベースからのデータ収集

標準ヒトゲノム（GRCh38 と GRCh37）、1000 Genome Project などのゲノム配列情報に加えて、HapMap、Human gene catalog、dbSNP、JSNP などの多型データを収集した。加えて日本人の多型情報を基に、SNP を置換した日本人標準ゲノムを作成した（図 4）。

日本人標準ゲノムの構築 ~1000genomesの89名の日本人ゲノムデータを活用-

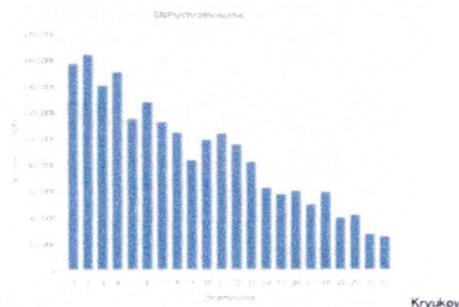


図 4 日本人標準ゲノムの SNP 数

また、われわれは DNA 配列のマルチプリアライメントのためのソフトウェア開発を行った。本ソフトウェアは、個人ごとのエキソーム配列データの解析に応用可能であり、対立遺伝子の判別や重複遺伝子の識別などの目的に極めて有効と考えている。

3. 解析実務者のための研究情報共有システム

本研究に関係する一般的な情報（個人の遺伝情報などは含まない）を Web 上でまとめ、各研究者で共有できるシステムを構築した（図5）。セキュリティにより登録した ID とパスワードを用いなければ情報を閲覧・修正することはできない。



図5 情報共有サイトの構築

4. 倫理委員会

本研究計画について東海大学医学部における「医の倫理委員会」に申請を行い、2013年10月21日付けで承認を得た。これにより、東海大学医学部では匿名化されたゲノム配列データを利用した研究を行う準備が整った。

D. 考察

一般的なエクソーム解析が行える環境整備を整えた。一方で次世代シーケンサー関連の技術革新は著しく、そのソフトウェア群の進歩も非常に早い。そのため、関連する学会やセミナー等に積極的に参加し情報収集に今後も努めるようにして、常に最新技術による解析が行えるように、ソフトウェアやデータベースの更新を続ける。

来年度には国立国際医療研究センターの杉山研究班が次世代シーケンサーを用

いて解読したヒトエクソーム配列を用いて多型解析を行う予定である。

E. 結論

本年度の研究成果により、本研究プロジェクトの目標である HCV による肝がんに関連する宿主因子の同定に向けたデータ解析準備が整った。今後は共同研究者との間でさらに密接な連携を行い、バイオインフォマティクス解析を通して本研究の推進を加速していきたい。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

論文発表

無し

学会発表

1. 中川草、今西規、溝上雅史、坂本直哉
C 型肝炎治療に伴う肝病態の進展に関わる宿主因子の解析
NGS 現場の会、神戸、9/4-5、2013
(ポスター発表)
2. Kryukov Kirill
Methods for molecular evolutionary studies in special reference to massive data
日本進化学会、筑波、8/28-31、2013
(口頭発表)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究者報告書（平成 25 年度）

HCV タンパク質 NS5A の分子動力学的手法による構造・機能解析

研究分担者 遠藤俊徳 北海道大学大学院情報科学研究科 教授

研究協力者 山崎和思

研究要旨

C 型肝炎ウイルスの NS5A タンパク質はウイルス増殖に重要な役割を果たしていると考えられており、NS5A はウイルスゲノム複製効率や粒子形成に重大な影響を与えていると考えられているが、その機構は明らかでない。治験中のウイルス増殖阻害薬 Daclatasvir はこのウイルスタンパク質を標的として設計され著効が示されているが、耐性変異出現の問題がある。そこで、NS5A の分子動力学解析を行い、分子の挙動と阻害剤結合部位の予測を行った。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスの増殖・に重要な役割を果たすウイルスタンパク質 NS5A について、特に阻害剤に対する耐性獲得を中心に分子機能を解明する。

B. 研究方法

実験的手法に比べ、時間・費用の観点から省コストが期待されるコンピュータシミュレーションを用いて、NS5A の分子機構と薬剤耐性獲得機構を分子動力学的に解析する。

（倫理面への配慮）

個人情報等を含まない分子データをコンピュータ上で扱うことから、倫理的問題は生じない。

C. 研究結果

NS5Aは細胞内膜（小胞体膜）結合分子であることが知られており、水溶液中とは挙動が異なる可能性がある。そこで、まず膜結合状態での分子の挙動について、分子動力学シミュレーションを行い、膜結合状態の分子配向と分子フォールディングを確認した。続いてNS5Aに対する阻害剤Daclatasvirの結合部位の推定を行った。NS5Aタンパク質はウイルスゲノム複製酵素NS5Bと結合して、RNA複製補助に機能すると考えられているほか、ウイルス粒子形成にも関与していると考えられている。大きく形の異なる2種類の結晶構造が決定済みで、耐性変異部位付近に阻害剤が結合することが予想されていたが、シミュレーションの結果は阻害剤結合部位はいずれの構造であっても、変異部位

から遠いことを示した。このことは、変異によって阻害剤の結合強度が直接変化するというよりも、アロステリックな構造変化が阻害剤への結合強度が弱めている可能性を示す。

D. 考察

NS5A のウイルス複製における役割は解明されていない。本研究では分子動力学シミュレーションによって、NS5A が実際に膜表面を浮遊するような挙動をしていること、阻害剤の耐性変異部位と結合部位が異なるであろうことを見出した。また、結晶解析の結果から NS5A は二種類のフォームを取り得ることが示されていたが、そのいずれの形でも阻害剤結合部位と耐性変異部位は一致しなかった。2 種類の構造が実際に生体内でも取り得る構造であるかどうかははっきりしないが、RNA 複製時に RNA 複製酵素として働く NS5B と結合するときの構造と、多量体として小胞体膜を巻き込みながらウイルス粒子を形成するときの構造とが違っている可能性も残されており、今後、さらなるシミュレーションや実験による解明が必要である。これらの努力によって、耐性変異を回避する薬剤設計への指針を与え得るようになるかもしれない。

E. 結論

C 型肝炎ウイルスのタンパク質 NS5A はウイルス複製に必須であり、複製効率にも影響を与えていることが知られているものの、ゲノム RNA 複製に直接関与する分子ではなく、その構造や機能は不明な点が多い。ウイルス阻害剤である Daclatasvir は NS5A を標的として設計された分子だが、実際の作用機序は不明な

点が多く、知られている複数の耐性変異についてもどのような仕組みで耐性が得られるかがわかっていなかった。本解析によって耐性変異部位と薬剤結合部位が異なっていることが示唆され、変異が直接に薬剤結合強度に影響を与えるのではなく、構造変化によって影響している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

コンピュータ・シミュレーションによって示された本解析結果は、治験の結果と総合して評価することにより、より信頼性の高い情報として活用され得ると考えている。本結果単独での活用は考えられていない。

G. 研究発表

論文発表
なし

学会発表

1. 山崎和思, 須田剛生, 遠藤俊徳, 坂本直哉「C型肝炎ウイルス NS5A タンパクの機能と薬剤耐性獲得メカニズムの解明に向けて」肝炎等克服緊急対策研究事業合同班会議 (国立感染症研究所 2015 年 1 月 14-15 日)

H. 知的財産権の出願・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

宿主 DNA の高速シーケンス解析

研究分担者 杉山 真也 国立国際医療研究センター 上級研究員

研究要旨：現在のところ、C 型慢性肝炎由来の肝発癌を予測する有用な因子は見つかっていない。肝発癌を予測できれば、予防策の策定と治療薬の開発に寄与できるだけでなく、肝癌の予防は医療費の大幅な抑制につながる。本研究では、C 型肝癌の予測因子の探索を行うことを目的とする。分担研究内容としては、その原因となるヒト側因子の同定を行うために、次世代シーケンサー（NGS）を用いて、エクソーム解析を中心に肝発癌に関連する変異情報を収集する。本年度では、ヒトゲノム解析に関する倫理申請を行い、承認を得た。エクソーム解析のサンプル調整キットと NGS の組み合わせを検証して、得られるデータの質を検証した。サンプル調整キットとしては、AmpliSeq、SureSelect、SeqCap を使用した。シーケンス装置として Ion Proton と HiSeq、Miseq を利用してデータの取得を進めた。現在、健常サンプルを用いてエクソーム解析の基礎データの取得と比較解析を行っている。データ解析担当者らと得られたシーケンスデータ解析に備えて、データの授受方法やファイル形式、解析手法について打合せた。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎は、肝線維化、肝硬変を経て肝癌へと至る。様々な解析が進められてきたが、肝発癌を予測する有用な因子はまだ見つかっていない。肝発癌を予測できれば、その予防策の策定と治療薬の開発に寄与できるだけでなく、肝癌の予防は医療費の大幅な抑制につながる。

そこで、本研究では C 型肝癌の予測因子の探索を行うことを目的とする。分担研究内容としては、その原因となるヒト側因子の同定を行うために、次世代シーケンサー（NGS）を用いて、エクソーム解析を中心に肝発癌に関連する変異情報を収集する。

B. 研究方法

様々なエクソーム解析用キットと NGS が存在しており、良質なデータを得られる組み合わせがどういったものか不明のままである。そこで、エクソーム解析を進める上で、最適な解析手法を決めるために、既存のエクソーム解析用キットである AmpliSeq、SureSelect、SeqCap を使用してサンプル調製した。また、NGS としては Ion Proton、HiSeq2500、Miseq を使用してデータの取得を行った。サンプルは健常者のゲノムを用いた。これらのサンプルは、イルミナ OmniExpress でタイピング技術による SNP 情報を取得し、これを標準データとした。各サンプル調整キットと NGS データの組み合わせから得られたデータとタイピ

ングデータを比較してデータの精度を検証した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療研究センターでヒトゲノム解析に関する倫理申請を行って承認を得た。

C. 研究結果

エキソーム解析用のサンプル調整キットをそれぞれ使用して健常ゲノムを解析した。AmpliSeqのカバーエリアはおよそ58Mbpであり、SureSelectとSeqCapはおよそ115Mbpであった。エキソーム解析に対しては、Ion Protonでは1ランで2サンプル、Hiseq2500では1ランで5サンプルが算出データとしては適当であると推定された。

AmpliSeqとIon Protonでのシーケンス結果では、自験例で20倍以上のカバレッジを得られた領域が96.7%であった。このことから、NGS解析は順調に行えたと考えられた。一方で、カバレッジが5以下となった領域で、それが各サンプルに共通していたのが5%程度存在していた。それらの領域では変異データを得られないと考えられた。SureSelectとSeqCapによるサンプル取得とNGS解析については現在実施中である。

D. 考察

各メーカーから出されているデータは、理想的なサンプル条件で行われていることが多く、また、データの詳細部分は知ることが出来ないため自験例での検証が必要となる。今回の実験では、健常者ゲノムを用いて行ったが、AmpliSeqにおいてはカタログスペックと同等の結果を得

ることが出来た。しかしながら、正確に増幅できていない領域が、各サンプルに共通して認められたために、そのような領域のデータは信頼性が低いと考えられた。

今後も引き続いて、各キットのデータ精度を検証し、最適な実験条件を得られるように条件検討を進める。

E. 結論

AmpliSeqでのエキソーム解析では、一部に増幅が不十分な領域が認められたが、他社キットについても検証を行い、患者サンプルでの大規模解析に備えてデータの精度管理を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Mizokami M. Ex vivo induction of IFN- λ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2013 Apr 17.
2. Sunbul M, Khan A, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M. Tracing the spread of hepatitis C virus in Turkey: a phylogenetic analysis. *Intervirology.* 2013;56(3):201-5.

3. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2013 May;57(5):1705-15.
4. Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat*. 2013, 20:27-36.
5. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2013 Sep;62(9):1340-6.

学会発表

3. 「B型肝炎ウイルス複製に関連する脂質分子の同定とその効果」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第49回日本肝臓学会総会

シンポジウム 京王プラザホテル 2013年6月7日

国際学会

4. 「Polymorphisms consisting of (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene could improve the predictive value for HCV spontaneous clearance with IL28B SNPs.」 Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramine, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Jun Hayashi, and Masashi Mizokami The 64th Annual Meeting of the AASLD P-1426 Nov 4th 2013 Washington DC
5. 「Prediction improvement on the effect of interferon-based therapy and spontaneous clearance of hepatitis C using rs72258881 near IL-28B following rs8099917」 Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2013: 48th Annual Meeting of EASL in Amsterdam, P-26th April 2013

H. 知的財産権の出願・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

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

C 型肝炎を発生母地とする HCC 肝切除後の再発に関わる次世代
シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた宿主因子の解析

研究分担者 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 I 教授

研究要旨

C 型肝炎を背景とする肝細胞癌は肝切除後に肝内転移のみならず多中心性発生再発が多いという特徴をもっており再発高危険群を割り出すことで予後向上に寄与する治療戦略をたてることが出来る。今回、我々は肝細胞癌切除症例を対象に次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析（GWAS）を用いた宿主因子の解析を行うことで再発に関わる宿主側遺伝子を明らかにする。

A. 研究目的

C 型肝炎を背景とする肝細胞癌は多中心性発生再発が多いという特徴を持っている。今回、我々は肝細胞癌切除症例を対象に次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析（GWAS）を用いた宿主因子の解析を行い再発に関わる宿主側遺伝子を明らかにすることで再発高危険群を割り出し、テーラーメイド医療や新規治療への応用を可能にすることを目的とする。

B. 研究方法

2000年1月～2012年12月までの当科におけるC型肝炎を背景とした肝細胞癌切除178例中、DNA抽出可能なサンプルのある113例を対象としてGWAS解析を行い再発に関わる宿主側因子を明らかにする。

（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、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

る。

C. 研究結果

113 例の DNA 抽出は終えており、これから次世代シーケンシングを用いた GWAS 解析を行う予定である。

D. 考察

従来の臨床の宿主側因子では ICG20% 以上で有意に再発率が高く肝線維化と再発は関連しているものと考えられるため、GWAS 解析においても線維化と関連する遺伝子が候補となる可能性がある。

E. 結論

今後の解析結果が待たれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1.Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.

2.Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int*. 2013 Nov;29(11):1147-52.

3.Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, Taketomi A. Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium. *World J Surg Oncol*. 2013 Oct 5;11:259.

4.Shibasaki S, Takahashi N, Toi H, Tsuda I, Nakamura T, Hase T, Minagawa N, Homma S, Kawamura H, Taketomi A. Percutaneous transhepatic gallbladder drainage followed by elective laparoscopic cholecystectomy in patients with moderate acute cholecystitis under antithrombotic therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013 Sep 11.

5.Okada T, Honda S, Miyagi H, Kubota KC, Cho K, Taketomi A. Liver fibrosis in prenatally diagnosed choledochal cysts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Aug;57(2)

6.Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2314-25

7.Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, Taketomi A, Ikegami T, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y. Human early liver regeneration after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma: special reference to age. *Scand J Surg*. 2013 Jun 1;102(2):101-5.

8.Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y. Clinical usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Hepatol Res*. 2013 May;43(5):481-7.

9.Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2013 Mar 2;11:52.

10.Taketomi A, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surg Today*. 2013 Mar;43(3):289-92

11.Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology*. 2013;80(3):146

学会発表

1.横尾 英樹, 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 若山 颯治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信、大腸癌多発肝転移に対する外科切除のタイミング 第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013

2.蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 若山 颯治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信、肝門側からの展開困難な血管合併切除を要する左葉系肝門部胆管癌に対する術式の工夫 第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013

3.若山 颯治, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 中西 一彰, 嶋村 剛, 藤堂 省, 武富 紹信、下大静脈/右心房腫瘍栓を有する肝細胞癌に対する肝切除 第25回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6月12日-14日、2013

4. 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 若山 颯治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信、当科における門脈再建法、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

5. 柿坂 達彦, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 若山 颯治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 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, 武富 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、武富 紹信、肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 の有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

8. 若山 颯治、神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、敦賀 陽介、蒲池 浩文、武富 紹信、肝尾状葉腫瘍切除における 3D 画像によるシミュレーションの有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

9. 蒲池 浩文、敦賀 陽介、若山 颯治、柿坂 達彦、横尾 英樹、山下 健一郎、神山 俊哉、武富 紹信、左葉系切除を要する高度進行胆道癌に対する Transparenchymal glissonean approach を用いた血行再建法、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

10. 神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、蒲池 浩文、若山 颯治、敦賀 陽介、三浦 信明、西村 紳一郎、藤堂 省、武富 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

11. 大畑多嘉宣、横尾 英樹、柿坂 達彦、若山 颯治、敦賀 陽介、蒲池 浩文、神山 俊哉、武富 紹信、第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、9 月 5 日-6 日、2013

12. 皆川のぞみ、崎浜秀康、小林希、小原美都、柴崎晋、若山颯治、柿坂達彦、敦賀 陽介、本間重紀、横尾 英樹、蒲池 浩文、川村秀樹、高橋典彦、神山俊哉、武富 紹信、第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、

9 月 5 日-6 日、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

分担研究課題名 ウィルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響

研究分担者 夏井坂光輝 北海道大学病院消化器内科 助教

研究要旨

がん幹細胞の存在が多くの固形癌においても同定され、再発、転移、治療抵抗性に深く関与していることが明らかとなってきた。がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発は、癌研究における最も重要な研究課題の一つである。本研究は C 型肝炎ウイルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を次世代シーケンサーを用いた新たな研究手法により明らかにすることを目的に遂行される。

A. 研究目的

HCV 感染が肝細胞癌の生物学的悪性度に関与している可能性が考えられるが、HCV 感染が癌幹細胞に与える影響は明らかとなっていない。HCV 感染系を用いて、HCV 感染および HCV 駆除が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解析し、ウィルス感染を背景とした肝細胞癌におけるがん幹細胞を標的とした新たな治療法を開発することを目的に本研究は遂行される。

B. 研究方法

HCV 感染系、肝細胞癌由来 Huh7 細胞を用いて、HCV 感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解析する。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングにより、肝細胞癌がん幹細胞における重要な候補遺伝子を絞込む。候補遺伝子の遺伝子発現に及ぼす HCV 感染の影響を、とくに転写責任領域のメチル化に関して次世代シーケンサーにより解析する。さらに臨床検体を用いたエピゲノム解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2008 年 10 月修正）」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年 2 月 8 日全部改正）」を遵守して実施する。

研究実施に係る試料等を取扱う際は、被

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

C. 研究結果

肝細胞癌においては $CD44^+/CD133^+$ 細胞が癌幹細胞の性質を有することを複数の細胞株（Huh7、HepG2）を用いて確認した。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングにより、肝細胞癌がん幹細胞において重要な機能を有する可能性のある候補遺伝子を選定した。候補遺伝子をノックダウンあるいは過剰発現することで、 $CD44^+/CD133^+$ 細胞の割合は変化し、いくつかの遺伝子発現により $CD44^+/CD133^+$ 細胞が制御されている可能性が示唆された。今後は HCV 感染系（JFH1、J6）を用いて、HCV 感染および駆除が $CD44$ 、 $CD133$ 陽性細胞に与える影響を解析する。また、臨床検体を用いた解析を開始する。

D. 考察

肝細胞癌においてもがん幹細胞は存在し、ある種の遺伝子発現によりがん幹細胞が制御されている可能性が示唆された。HCV 感