

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ウ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ケンスを 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/亢進型パリアント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) 次世代シーケ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ケ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) 慢性肝疾患において、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, Natsuzaka 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 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. 174-177.
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, Nakamura 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互作用の解析. 消化器と免疫 2011; 48:

学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし