

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坂本 直哉

平成27(2015)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. NS5Aの構造およびHCV耐性へのHLA型の効果解析 -----	9
遠藤俊徳	
3. 宿主ゲノムの高速シーケンス解析 -----	12
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 -----	17
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 -----	21
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 -----	24
巽 智秀	
7. GWASより得られた肝疾患関連SNPにおける臨床的意義の検討 ---	28
前川伸哉	
8. 次世代シーケンス技術を用いた肝発がん・予後に関する 遺伝子の網羅的解析 -----	31
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 -----	36
上野義之	

10. C型肝炎治療時の脂質代謝制御に関する研究 -----	39
中牟田誠	
11. NASH発癌症例における肝組織糖・脂質代謝変化および 肝脂肪化による鉄代謝関連遺伝子発現変化に関する NGS を用いた トランスクリプトーム研究 -----	41
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 -----	43
宮西浩嗣	
13. 肝発癌に関わるゲノム・エピゲノム情報の解析 -----	54
中馬 誠	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	74

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)
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)
中馬 誠	(横浜市立大学・准教授)

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排

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
ソフトウエア整備、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
合わせて、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) 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、検体・臨床情報を収集し
た。

(2) 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。

(3) Telaprevir 併用 interferon 治療の副作用予
測に血清 granulysin が有用であることを報
告した。

(4) 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(今西 規)

(1) 大規模ヒトゲノム・エキソーム解析のた
めの並列計算機(32CPU, 256コア)の整備
と解析パイプラインの構築を行い、エキソ

ーム配列を並列で解析できるように整備した。

(2) 公共データベースからゲノム配列情報、多型データを収集した。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。

・研究分担者(杉山 真也)

(1) 次世代シーケンサーによるエキソーム解析試薬の最適化を行った。Ampliseq、SureSelectに加え、カスタムプローブを合成することで遺伝子領域の広範をカバーするに至った。

・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大きな構造変化によってウイルス複製阻害が起こることが示唆された。

・研究分担者(前川伸哉)

(1) C型慢性肝炎において、MIC_A は既存因子とは独立して、また DEPDC5 は高齢者において肝発癌に関連し、PNPLA3 は肝発癌には直接関連しないが、線維化を進展する因子であることを示した。

・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時には、治療早期より血中総コレステロール (TC) と LDL コレステロール (LDL-C) 値が有意に上昇した。

・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 の血中濃度が HCV 患者群で有意に高値であり、HCV 増殖系と PBMC の共により、Gal-9 と免疫担当細胞との crosstalk が持続感染に寄与すると考えられた。

・研究分担者(高後 裕)

(1) 宿主因子としての鉄代謝関連遺伝子の関与を探索するために、肝癌細胞株の鉄代謝関連遺伝子に関してエクソームを解析した。64 遺伝子中に 24 の missense mutation と 3 つの indel mutation があり、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を同定した。

・研究分担者(宮西 浩嗣)

(1) C型慢性肝炎からの肝発癌に関わる酸化的 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。

・研究分担者(上野義之)

(1) Ion Torrent シーケンサーを用いて、既存のデータとの整合性を調整した。HCV の代表的な薬剤耐性である Y93 と L31 の頻度を従来型の direct sequencing 法、cycle probe 法などで検討し、deep sequencer 法による方法との比較のための基礎データを作成した。

・研究分担者(中馬誠)

(1) 肝癌切除時の血清分泌型 microRNA より、早期再発例で高発現している 5 つの miRNA を同定し、これらが肝癌早期再発診断のバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

・研究分担者(朝比奈靖浩)

(1) 肝細胞癌症例の癌部・非癌部の解析により、TERT プロモーター、TP53, CTNNB1 いずれかの遺伝子変異を認める症例は全症例の 88% を占めた。TERT プロモーター変異は HCV 起因性肝癌に多かった。

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療の時代に備え、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. Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, Sakamoto N, Korenaga M, Mochizuki H, Nakane K, Enomoto H, Ikeda F, Yanase M, Toyoda H, Genda T, Umemura T, Yatsunami H, Ide T, Toda N, Nirei K, Ueno Y, Nishigaki Y, Betular J, Gao B, Ishizaki A, Omote M, Mo H, Garrison K, Pang PS, Knox SJ, Symonds WT, McHutchison JG, Izumi N, Omata M: Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naive and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomised, phase 3 trial.. *Lancet Infect Dis* 2015; Epub ahead of print.
2. Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N, Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuizaka M, Takeda H, Sakamoto N: Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats.. *Cell Transplant* 2015; Epub ahead of print.
3. Yoshimura A, Ohnishi S, Orito C, Kawahara Y, Takasaki H, Takeda H, Sakamoto N, Hashino S: Association of peripheral total and differential leukocyte counts with obesity-related complications in young adults.. *Obes Facts* 2015;8 (1):1-16.
4. Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Saito K, Nakamura M, Wu S, Haga Y, Sasaki R, Sakamoto N, Shirasawa H, Okamoto H, Yokosuka O: The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells.. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;458 (4):908-12.
5. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kusano-Kitazume A, Watanabe T, Kawai-Kitahata F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M: Impaired induction of IL28B and expression of IFN λ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C.. *J Gastroenterol Hepatol* 2015; Epub ahead of print.
6. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsunami H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y: Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C.. *Hum Genet* 2015;134 (3):279-89.
7. Kubota Y, Kawakami H, Natsuizaka M, Kawakubo K, Marukawa K, Kudo T, Abe

- Y, Kubo K, Kuwatani M, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Matsuno Y, Sakamoto N: CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing.. J Gastroenterol 2015;50 (2):203-10.
8. Chuma M, Terashita K, Sakamoto N: New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions.. Hepatol Res 2014; Epub ahead of print.
 9. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N: Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions.. Hepatol Res 2015; Epub ahead of print.
 10. Omata M, Nishiguchi S, Ueno Y, Mochizuki H, Izumi N, Ikeda F, Toyoda H, Yokosuka O, Nirei K, Genda T, Umemura T, Takehara T, Sakamoto N, Nishigaki Y, Nakane K, Toda N, Ide T, Yanase M, Hino K, Gao B, Garrison KL, Dvory-Sobol H, Ishizaki A, Omote M, Brainard D, Knox S, Symonds WT, McHutchison JG, Yatsushashi H, Mizokami M: Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial.. J Viral Hepat 2014;21 (11):762-8.
 11. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH: The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy.. Viral Immunol 2014;27 (6):285-94.
 12. Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M: ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type.. J Viral Hepat 2014;21 (7):466-74.
 13. 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;35 (2):272-81.

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 26 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 特定研究員
研究協力者 世良 美穂 東海大学医学部 研究技術員

研究要旨

本年度は、ゲノムワイド関連解析のための計算機ソフトウェアのうち特に並列解析パイプラインの整備を進め、16 サンプルのデータを1日で解析できる体制を整えた。また、エキソーム解析手法の性能比較を他班と共同で行い、手法を決定した。2015年2月23日現在で36サンプルのエキソームシーケンスデータの解析を完了した。サンプルごとに平均50万のゲノム変異（SNVやindel）を見出したが、その多くが日本人で既知の変異と一致したため、解析が正しく行われていることを確認できた。加えて、解析実務者のためのサンプル情報管理システムを構築した。

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、ゲノムワイド関連解析（GWAS）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などのゲノム変異の特定、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ゲノム変異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について、エキソン由来のDNA塩基配列を次世代シーケンサーにより大規模に解読する（図1）。

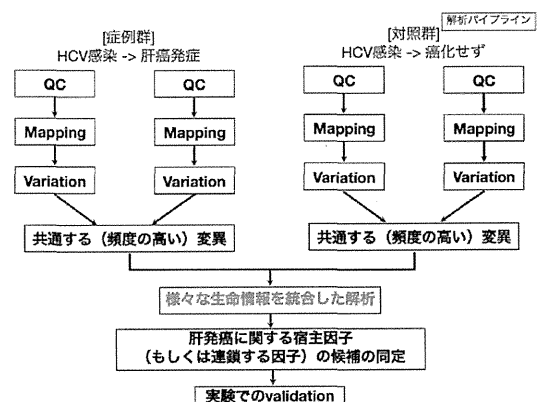


図1 本研究の解析パイプライン

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にマッピングし、SNVやCNVなどのゲノム変異を同定する。そのようにして同定したゲ

ノム変異について、日本人標準ゲノムと比較し、またパスウェイ解析などを行い疾患と関連するもののみを選択する。

(倫理面への配慮)

各個人情報に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っている。

C. 研究結果

1. エキソーム手法の考察

シーケンス担当の溝上・杉山班らと共同で本研究に用いるエキソーム手法について比較検討した。最終的に Roche 社の SeqCap をカスタマイズしたエンリッチメント手法で増幅したエキソン領域の配列を HiSeq2500 でシーケンスする手法を取り入れた。

2. エキソームデータ解析

2015年2月23日現在で36サンプルの計算機解析が終了した。各サンプルには平均50万のゲノム変異(SNVやindel)が存在し、本研究で発見されたRSIDをもつゲノム変異の約半数は東北メディカルメガバンクでも報告された変異であったため、日本人特有のゲノム変異の可能性がある。引き続きシーケンスデータを解析し、最終的にGWASを行う。

3. サンプル管理システムの構築・運用

北大の坂本班、シーケンス担当の溝上・杉山班、データ解析担当の今西班でDNAサンプルの管理システムを構築し運用した。ここでは各班の研究進捗などの情報を共有するのみで、解析データや個人情報やゲノ

ム多型情報などは一切含まれていない。

4. 計算機整備・データ解析パイプラインの構築・アップデート

エキソームシーケンスを並列計算機で解析できるパイプラインを構築した。同一の解析内容ならば原理的に16サンプルのデータを1日間で解析可能である。

D. 考察

一般的なエキソーム解析が行えるソフトウェア環境を整備した。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。

今後は引き続きシーケンスデータの解析を行う。同定した塩基変異の validation と annotation を強化していく予定である。Depth と variant call のパラメータ調整を行う。CNVや大きなindelなどにも着目する。

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

なし

学会発表

1. Kryukov Kirill、今西規
Homology Search Management Tool
第3回生命医薬情報連合大会、仙台、10/2-4, 2014 (**IIBMP2014 Best Presentation Award** 受賞)
2. Kryukov Kirill、中川草、今西規
High resolution HLA genotyping software for exome and whole genome sequencing data
The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, 10/18-22, 2014

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 26 年度）

NS5A の構造および HCV 耐性への HLA 型の効果解析

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、須田剛生

研究要旨

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った。NS5A は細胞内膜結合分子のため、水溶液中とは挙動が異なる可能性があったため、計算時間が飛躍的に増大するものの、膜結合状態でのシミュレーションを行った。その結果、薬剤結合の有無により大きな構造変化が予想された。NS5A はウイルスゲノム複製酵素 NS5B と結合して機能すると考えられており、大きな構造変化によってウイルス複製阻害が起こることが示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎は患者数が多く重症化すると肝硬変や肝癌に結びつく重篤な感染性疾患だが、潜伏期間が長いこと、ウイルス感染・増殖・発症・重症化の機構の詳細がはっきりしておらず、対策が急務となっている。重症化には個人差があると考えられており、パーソナルゲノム解読の実用化が目前となった今、体質の差を生み出す遺伝的要因を知り得る可能性が開けてきた。こうした情報は治療計画に当たっても予防および治療に重要な判断材料となることが期待される。しかしながらウイルスの遺伝子・タンパク質およびそれらの変異可能性、そして宿主因子との関係を実験的に網羅することは難しい。分子シミュレーションや機械学習等の情報科学的技術を用いることで、予測を行い、既存知識の提供をおこなうことで実験量を減量化し、効率的な知見獲得を可能にし得る。

B. 研究方法

コンピュータシミュレーションを用いウイルスタンパク質の動態解析を行う

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

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った。NS5A は細胞内膜結合分子のため、水溶液中とは挙動が異なる可能性があったため、計算時間が飛躍的に増大するものの、膜結合状態でのシミュレーションを行った。その結果、薬剤結合の有無により大きな構造変化が予想された。NS5A はウイルスゲノム複製酵素 NS5B と結合して機能すると考えられており、大きな構造変化によってウイルス複製阻害が起こることが示唆された。解析では多数の

耐性変異部位と薬剤結合部位が異なることも示唆されており、その関係についてさらなる解析を進めている。

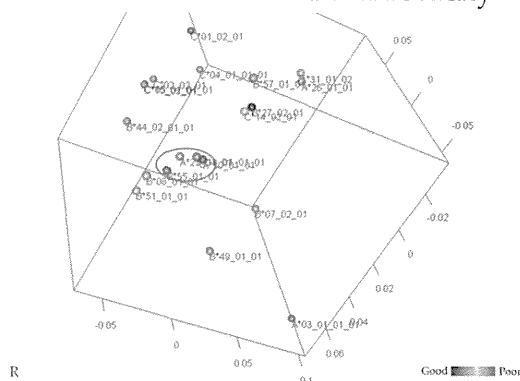
D. 考察

分子系統解析の結果からは、感染維持に関する多型情報の抽出ができなかったが、主座標解析の結果からは効果的な分類ができることが示唆された。さらなる例数を用いた解析により投薬効果予測への貢献が期待される。

E. 結論

NS5A の立体構造を分子動力学シミュレーションし、その動態と NS5A 阻害剤 Daclatasvir の結合部位と耐性変位との関係を解析した。その結果、エネルギー最小となる阻害剤の結合の予測部位と耐性変異の位置は離れており、アロステリックな効果によって阻害剤耐性が得られていることが示唆された。このことから予測薬剤結合部位周辺領域がウイルスの複製能に直接関与しており、わずかな変異が複製能を大きく損なわせるために、この部分には変異がはいらず、代わりに膜結合部位付近のリンカー領域の変異によって、薬剤結合能低下を導いている可能性が考えられる。代替構造の予測から、薬剤結合部位は複製されたウイルスゲノム RNA の結合部位にも相当すると期待され、この点からも変異が入りにくいものと考えられる。変異に伴って複製効率が低下することが実験によって示唆されているが、定常状態の肝細胞は複製周期が遅いため、阻害剤存在下における複製効率の低下は受容範囲であるものと考えられる。

Class I MHC and HCV chronicity



Class I MHC and HCV chronicity

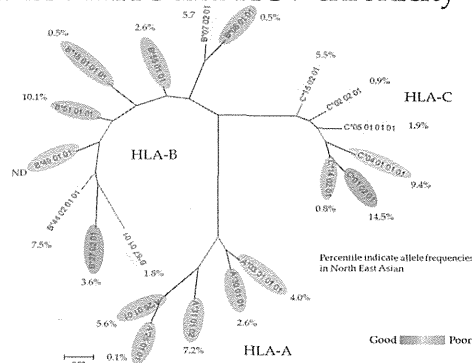


Fig 2 MHC class I の分子系統解析

F. 健康危険情報

G. 研究発表

論文発表

1. Alberto Stolfi, Yasunori Sasakura, Domitille Chalopin, Yutaka Satou, Lionel Christiaen, Christelle Dantec, Toshinori Endo, Magali Naville, Hiroki Nishida, Billie J. Swalla, Jean-Nicolas Volff, Ayelet Voskoboynik, Delphine Dauga, and Patrick Lemaire. Guidelines for the nomenclature of genetic elements in tunicate genomes. *Genesis*. 53(1), 1-14, 2015.

2. Yutaka Satou, Kazuko Hirayama, Kaoru Mita, Manabu Fujie, Shota Chiba, Reiko Yoshida, Toshinori Endo, Yasunori Sasakura, Kazuo Inaba and Nori Satoh. Sustained heterozygosity across a self-incompatibility locus in an inbred ascidian. *Molecular Biology and Evolution*. 32(1), 81-90, 2015.

学会発表

「肝炎慢性化に関わる HCV と MHC の因子解析」

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
第 1 回班会議プログラム、平成 26 年 8 月 1 日、北海道大学「エンレイソウ」2F 第一会議室

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

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 26 年度）

宿主ゲノム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 主任研究員

研究要旨：これまでのいくつかの報告では、ゲノムワイドな SNPs 解析を実施することで、C 型慢性肝炎由来の肝発癌に関連する因子が報告されている。しかしながら、臨床応用に足るほどの有用な因子は見つかっていない。肝発癌に強く関連する因子、さらには、発症を予測できるようなマーカー因子が明らかとなれば、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、医療費全体の大幅な抑制につながる。本研究班では、ヒトゲノム解析を基盤として、肝癌関連因子を同定することを目的としている。本分担課題では、ヒトゲノムのエクソンに注目して、次世代シーケンサー（NGS）を用いたエクソーム解析を実施する。本年度では、昨年度から続けてきた各エクソームキットの比較を進め、本研究課題に最適なキットの選定を実施した。その結果、市販のキットでは、エクソンのカバー率に不足があることが判明し、独自にプローブの選定から進めることとした。In house のキットは、既成品でもっともよい結果を示した SureSelect が約 75% のカバー率であったのに対し、in house キットでは、約 97% であった。これを受けて、この in house キットを利用した実検体のデータ取得を開始した。300 検体弱の試験を予定しており、3 月末までにはエクソームデータの取得を終える予定である。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎は、長期間を経て、肝線維化、肝硬変から肝癌へと至る。これまでも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。

市販の商品では、様々なエクソン領域の収集用キットが存在している。また、プロトコルの最適が必要である。本研究課題では、ヒトゲノム解析を 200 検体程度処理するため、適切なキットを使用することが、その後の解析において重要である。そこで、各キットがどのような性質を持っており、どれが本研究課題にあっていないかを判断するために、昨年に加えて、データの取得を実施した。

その結果を受けて、実検体の測定を開始した。

B. 研究方法

昨年のデータから、NGSとしては、HiSeq2500最も良質なデータを算出することが明らかとなったため、その機種を中心としてエキソーム解析に必要なプロトコルの策定を進めた。

昨年から検討を進めてきた既存のエキソーム解析用キット (AmpliSeq, SureSelect, SeqCap) 以外に、カスタムでのエキソームキットを作成した。予備検討用の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。

データ解析拠点は、東海大学であるために大規模データを転送するために、Fastqファイルまでを自動で生成できるパイプラインを構築した。

(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

昨年までのエキソーム解析用の結果から、既存のサンプル調整キットで最も良好な結果を示したのは、SureSelectであったが、解析を進めていくうちに、十分なカバー率を得られていない個所が多数あることが判明した。その中でもクロモソ-

ム11番では、エキソン領域の約50%のカバー率であった。そこで、独自にプローブを設計する必要があると判断し、プロモーターから3'UTR領域までを全ゲノムにわたって抽出した。それを元にプローブの設計を行い、in houseのキットを作成した。それをを用いて、同一検体で解析すると、例えば、クロモソーム11番のカバー率は79%まで上昇した。ゲノム全域にわたって解析を進めると、in houseキットでは、約90%程度のカバー率を示したのに対し、SureSelectでは、70%程度であった。これらの結果から、今後の実検体での解析では、in houseキットでのサンプル調製とHiSeq2500でのシーケンスを利用することとした。

健常検体で、10検体プールでのエキソン回収を行い、一検体あたりのデータ量を確認したところ、10G前後であり、10検体プールでも良好な結果が出るものと判断した。

実検体で、20ラン以上あるため、サンプル調製とシーケンスをスケジュールし、週に2-3回のシーケンスランが実施できるようにした。2月末現在までのところ、12ランを完了している。

シーケンスデータについては、GUIでFastqファイルにまで変換できるパイプラインを構築した。データサイズを小さくした後に、記憶媒体で転送することにした。

D. 考察

各エキソームキットの比較により、市販品では、十分なカバー率を得ることが出来ないと判断した。今回、in houseで作成したプローブセットを利用することで、全ゲノムにわたって、良好なカバー率を

得ることが出来た。これに関連して、従来のキットでは、何らかの問題で設計図通りにプローブを設計できない領域、もしくは、設計をしていない領域があることが判明した。それらに領域に対しても、厚みのあるデータ（30 リード以上）を得ることが出来た。

検体のプールについては、5 検体が理想的ではあるが、研究費の関係から最大で 10 検体程度のプールが必要であると判断した（約 12 万円/1 検体）。若干のデータ不足は否めないが、データの不足が認められたプール検体については、フローセル 1 枚分でのランを追加するなどして、適宜対応することとした。

収集された検体が約 200 検体であるため、およそ 10 ラン（1 ランは 2 フローセル使用）で完了する見込みである。3 月末で全検体のシーケンスを完了させる予定で進めている。来年度は、追加検体の処理とデータ解析の補助を行い、東海大学のサポートを行う。

E. 結論

in house キットを作成することで、市販品よりも高品質なエキソームデータを得られるようになった。本キットを使用して、実検体のエキソーム解析を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Masaki N, Shrestha PK, Nishimura S, Ito K, Sugiyama M, Mizokami M. Use of nucleoside analogs in patients with chronic hepatitis B in Nepal: A prospective cohort study in a single hospital. *Hepatol Res.* 2015 Jan 12. In press
- (2) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Expression. *J Biol Chem.* 2015 Feb 27;290(9):5673-84.
- (3) Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Yoshio S, Kurosaki M, Hashimoto S, Yatsushashi H, Nomura H, Kang JH, Takeda T, Naito S, Kimura T, Yamagiwa Y, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Izumi N, Kage M, Mizokami M, Kanto T. Association of serum IFN- λ 3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* 2014 Dec 14. In press
- (4) Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Masaki N, Mizokami M. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C

- virus mutation at core amino acid 70. *J Virol Methods*. 2014 Oct;207:169-77.
- (5) Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, Tanaka Y, Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M. Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Dec;29(12):1996-2005.
- (6) Nishino J, Sugiyama M, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Mano S. The interaction of a single-nucleotide polymorphism with age on response to interferon- α and ribavirin therapy in female patients with hepatitis C infection. *J Med Virol*. 2014 Jul;86(7):1130-3.
- (7) Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, Mizokami M. IL28B polymorphisms and clinical implications for hepatitis C virus infection in Uzbekistan. *PLoS One*. 2014 Mar 24;9(3):e93011.
- (8) Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, Sisouk T, Phonekeo D, Sengkeopaseuth B, Som-Oulay V, Ishii K, Wakita T, Sugiyama M, Hachiya M. Chronic hepatitis B prevalence among children and mothers: results from a nationwide, population-based survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e88829.
- (9) 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 Feb 10;9(2):e86449.
- (10) 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. 2014 Jan;59(1):89-97.

2. 学会発表

- (1) 「宿主因子を標的とした新規抗 B 型肝炎ウイルス製剤の開発と作用機序の解析」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第 50 回日本肝臓学会総会 シンポジウム ホテルニューオオタニ赤坂 2014 年 5 月 30 日 SY-2-15
- (2) 「A novel genetic maker to improve the prediction of HCV spontaneous clearance: Polymorphisms consisting of (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene」Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2014: 49th Annual Meeting of EASL in London, P-722 13th April 2014
- (3) 「Clinical Significance of Host Factors in Viral Hepatitis」Masashi Mizokami, Nao Nishida, and Masaya Sugiyama The 2nd International Symposium of Catholic University Liver Research Center Symposium 26th July 2014
- (4) 「Association of sphingolipid biosynthesis pathway as a novel therapeutic target for HBV replication.」Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, Masayuki Sudoh, and Masashi Mizokami. Poster P-159, 2014

International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep 4 2014, Los Angeles

- (5) 「Incidence of HBV infection in MSM cohort in Ulaanbaatar and new therapies for hepatitis B and C.」Masaya Sugiyama Oral-4, Japan-Mongolia Collaborative Study for HIV and Hepatitis in MSM in Mongolia. October 23rd, 2014. Ulaanbaatar
- (6) 「Association between (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene and HCV spontaneous clearance.」Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramine, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Tatsuya Kanto, Jun Hayashi, David L Thomas and Masashi Mizokami. Poster P-1464 The 65th Annual Meeting of the AASLD Nov 10th 2014 Boston

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 26 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もっている。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。

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