

・委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：GWAS 等による、持続感染、繊維化進展、癌化に起因する遺伝要因の探索
癌化

担当責任者：松田 浩一 東京大学医科学研究所 准教授

研究要旨：HBV陽性肝癌発症に関わる遺伝因子を同定する目的で、HBV陽性肝癌患者237名、非癌コントロール15060名を用いて、全ゲノム関連解析を行なった。その結果、HLA-DP,HLA-DQ領域に有意な関連を認めた ($P=3.5 \times 10^{-12}$)。またHLA領域以外にも、10-6位の強い関連を示す6領域が明らかとなった。またこれまでB型肝炎、HBV肝癌以外の悪性腫瘍との関連が報告されている288SNPについて、HBV肝癌との関連を検討した。その結果、CDKN2AやPHLDB1が $P<0.01$ と有意な関連を示すことが明らかとなった。今後これらの領域を中心に、独立したサンプルでの検討を進める予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス感染や発癌に関わる宿主因子の解析を通して、疾患の発症リスク予測や発癌メカニズムの解明を行う。

B. 研究方法

HBV陽性肝癌患者237名、非癌コントロール15060名を用いてイルミナ Human Hap610 BeadsChipにより、約60万箇所のSNPのタイピングを行なった。解析にあたり、年齢性別を交絡因子とした。

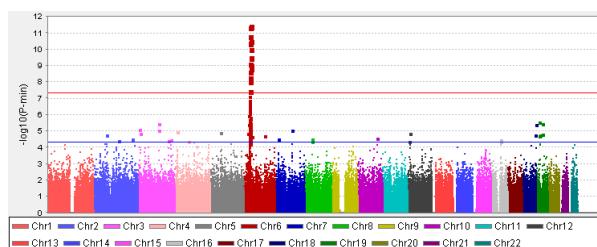
また、既報の文献のreviewを行い、癌の発症と関連が報告されている483SNPを抽出した。これらのSNPについて、GWASの結果を用いて、発がんリスクとの関連を確認した。

(倫理面への配慮)

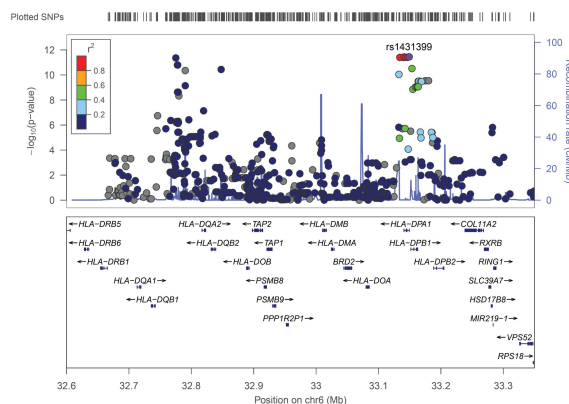
本解析に用いた症例は全て、インフォームドコンセントを取得済みで、また各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

全ゲノム関連解析の結果、480702 SNP についてのデータ取得された。



もっと強い関連を示したのは、HLA-DP領域であった ($P=3.5 \times 10^{-12}$)。この領域は、慢性B型肝炎との関連が既に報告済みであることから、このSNPは癌化ではなく、HBV感染の慢性化に関与すると考えられた。



また HLA 領域以外では、ITPR1, LOC389141, KIAA0319, ZNF804B, FCHO1, POP4 の 6 領域が 10-6 位の強い関連を示した。

表. HLA 以外の領域の解析結果

SNP	Chrpos.	OR	P	gene	location	
rs4147738	1	38.557047	1.62	7.08E-05	ABG4F	0
rs2728440	1	38.558090	1.63	6.83E-05	ABG4F	0
rs2546024	2	65778278	1.60	6.18E-05	LOC647712	3826
rs2688857	2	70271843	0.62	1.70E-05	ChnR2	-188
rs2706768	2	70310090	0.65	8.36E-05	TAF1	0
rs1262467	2	70396090	0.64	6.35E-05	FAM135A	-14185
rs4606068	2	123382154	1.55	3.60E-05	LOC732247	713248
rs2747870	2	135146238	2.30	3.78E-05	TME47B3	0
rs10832584	2	212116083	1.56	2.38E-05	CELSF4	0
rs16865758	2	223049043	1.68	7.36E-05	SERP2	0
rs17641368	3	4769880	2.13	3.68E-06	ITPR1	0
rs2600174	3	32644066	1.56	1.46E-05	SIRGA3	0
rs4374120	3	68136033	1.68	3.67E-05	ENIG2	0
rs4374176	3	68136647	1.68	3.67E-05	ENIG2	0
rs1462507	3	11789458	1.62	3.61E-06	LOC333747	-88766
rs10834067	3	11789083	1.58	3.62E-06	LOC151756	102614
rs458505	3	16315708	1.67	4.04E-05	LOC108732654	-58256
rs443428	3	176562182	0.62	6.68E-05	TCEKRF	0
rs2611082	3	17656228	0.61	3.57E-05	TCEKRF	0
rs1167831	4	15481883	1.68	1.17E-05	LOC337636	-86005
rs1268248	4	71026223	1.53	4.62E-05	GDF15	4687
rs12643054	4	102116088	0.65	6.34E-05	PPP3CA	47811
rs4324412	4	122160348	1.56	3.00E-05	G6pc3	10883
rs4585062	4	181549504	1.52	6.85E-05	LOC728837	876752
rs2685386	4	181550666	1.64	3.40E-05	LOC728837	871686
rs16882401	5	25542888	1.60	1.30E-05	ARL15	0
rs3869067	5	110100000	2.58	6.88E-05	SLC28A6	-2080
rs1202816	6	22473741	0.58	1.46E-05	PHL	-68632
rs2769676	6	28438823	2.78	1.18E-06	DKFZ	0
rs2760181	6	28498540	2.54	4.24E-06	KIAA8378	0
rs2826412	6	43624306	2.33	8.18E-05	SPDS	0
rs7764616	6	45653953	1.81	2.19E-05	RUNX2	27156
rs7773293	6	114070787	1.54	2.10E-05	LOC728590	60880
rs2301677	7	17292583	0.63	3.30E-05	LOC100131512	0
rs1557917	7	88388864	1.67	9.39E-06	ZNF804B	0
rs2158499	7	88396705	1.58	6.02E-05	ZNF804B	0
rs1009182	8	40482035	2.30	3.22E-05	ZMAT4	25235
rs7018220	8	40502000	2.30	4.21E-05	ZMAT4	5270
rs1249744	9	116083173	0.64	8.57E-05	COL27A1	0
rs4917418	10	106285577	1.55	7.00E-05	CCDC147	80739
rs1028918	10	106291065	1.55	6.80E-05	CCDC147	86227
rs12252509	10	106291589	1.55	6.90E-05	CCDC147	86751
rs11192121	10	106313791	1.58	2.64E-05	SORCS3	-77058
rs6487679	12	9262599	1.74	4.51E-05	PZP	-10366
rs12229800	12	13697499	2.10	6.80E-05	GRIN2B	0
rs7301344	12	15186200	1.60	1.47E-05	RERG	0
rs12889177	14	22561169	2.24	9.90E-05	PSMB5	3731
rs3112614	16	51190534	1.51	6.91E-05	LOC643714	0
rs12697685	16	51195281	0.65	4.35E-05	LOC643714	0
rs3104811	16	51221448	1.53	3.62E-05	LOC643714	-23050
rs4940181	18	48264629	2.30	7.48E-05	DCC	0
rs8095066	18	72016459	1.67	1.74E-05	ZNF516	184148
rs2927261	18	74731402	1.83	3.96E-06	LOC645321	107937
rs265555	19	17756874	3.28	2.83E-06	FCHO1	0
rs265552	19	17761158	2.77	1.92E-05	FCHO1	792
rs8112048	19	19678749	1.49	7.31E-05	ZNF14	3532
rs7246866	19	19683049	1.50	6.12E-05	ZNF14	0
rs8110890	19	19709485	1.50	5.98E-05	ZNF14	-4564
rs7256487	19	19716654	1.54	1.86E-05	LOC100130292	-5772
rs12978630	19	34784968	1.91	1.62E-05	POP4	-4073
rs7247377	19	34788403	1.91	1.66E-05	POP4	-638
rs12983160	19	34804197	1.98	3.64E-06	POP4	5650
rs4239875	22	33668995	2.14	7.31E-05	ISX	-123135

また様々な悪性腫瘍の罹患性と関連が知られている 483SNP について、HBV 肝癌との関連を検討した。この内、288SNP について感連が検討可能であった。その結果、CDKN2A や PHLDB1 が 0.01 以下の強い関連を示した。しかしながら多重検定の補正後も有意な関連を示す SNP は同定されなかった。

D. 考察

今回の解析では、既報の領域以外には強い関連を示す領域は同定されなかった。しかしながら、CDKN2A は様々な疾患との関連が知られている事から、HBV 肝癌のマーカーとして有望と考えられる。今後は独立した検体での再現性の確認に加え、サンプル数を増やした解析や、慢性 B 型肝炎をコントロールとした解析などが必要になると考えられる。

E. 結論

HBV 陽性肝癌の疾患関連遺伝子を網羅的に解析した結果、HLA 領域が強い関連を示した。また他にも複数の候補領域が同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) T. Kashiya, K. Oda, Y. Ikeda, Y. Shiose, Y. Hirota, K. Inaba, C. Makii, R. Kurikawa, A. Miyasaka, T. Koso, T. Fukuda, M. Tanikawa, K. Shoji, K. Sone, T. Arimoto, O. Wada-Hiraike, K. Kawana, S. Nakagawa, **K. Matsuda**, F. McCormick, H. Aburatani, T. Yano, Y. Osuga, T. Fujii, Antitumor Activity and Induction of TP53-Dependent Apoptosis toward Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423, PloS one, 9 (2014) e87220.
- (2) J. Lin, Z. Deng, C. Tanikawa, T. Shuin, T. Miki, **K. Matsuda**, Y. Nakamura, Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation, Int J Oncol, 44 (2014) 1490-1498.
- (3) Y. Yamamoto, M. Miyamoto, D. Tatsuda, M. Kubo, H. Nakagama, Y. Nakamura, H. Satoh, **K. Matsuda**, T. Watanabe, T. Ohta, A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability, Cancer Res, 74 (2014) 3707-3715.
- (4) B. Zhang, W.H. Jia, **K. Matsuda**, S.S. Kweon, K. Matsuo, Y.B. Xiang, A. Shin, S.H. Jee, D.H. Kim, Q. Cai, J. Long, J. Shi, W. Wen, G. Yang, Y. Zhang, C. Li, B. Li, Y.

- Guo, Z. Ren, B.T. Ji, Z.Z. Pan, A. Takahashi, M.H. Shin, F. Matsuda, Y.T. Gao, J.H. Oh, S. Kim, Y.O. Ahn, A.T. Chan, J. Chang-Claude, M.L. Slattery, S.B. Gruber, F.R. Schumacher, S.L. Stenzel, G. Casey, H.R. Kim, J.Y. Jeong, J.W. Park, H.L. Li, S. Hosono, S.H. Cho, M. Kubo, X.O. Shu, Y.X. Zeng, W. Zheng, Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk, *Nat Genet*, 46 (2014) 533-542.
- (5) T. Fujitomo, Y. Daigo, **K. Matsuda**, K. Ueda, Y. Nakamura, Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis, *Int J Oncol*, 45 (2014) 147-156.
- (6) Q. Cai, B. Zhang, H. Sung, S.K. Low, S.S. Kweon, W. Lu, J. Shi, J. Long, W. Wen, J.Y. Choi, D.Y. Noh, C.Y. Shen, K. Matsuo, S.H. Teo, M.K. Kim, U.S. Khoo, M. Iwasaki, M. Hartman, A. Takahashi, K. Ashikawa, **K. Matsuda**, M.H. Shin, M.H. Park, Y. Zheng, Y.B. Xiang, B.T. Ji, S.K. Park, P.E. Wu, C.N. Hsiung, H. Ito, Y. Kasuga, P. Kang, S. Mariapun, S.H. Ahn, H.S. Kang, K.Y. Chan, E.P. Man, H. Iwata, S. Tsugane, H. Miao, J. Liao, Y. Nakamura, M. Kubo, R.J. Delahanty, Y. Zhang, B. Li, C. Li, Y.T. Gao, X.O. Shu, D. Kang, W. Zheng, Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1, *Nat Genet*, 46 (2014) 886-890.
- (7) Z. Deng, **K. Matsuda**, C. Tanikawa, J. Lin, Y. Furukawa, R. Hamamoto, Y. Nakamura, Late Cornified Envelope Group I, a Novel Target of p53, Regulates PRMT5 Activity, *Neoplasia*, 16 (2014) 656-664.
- (8) **K. Matsuda**, A. Takahashi, C.D. Middlebrooks, W. Obara, Y. Nasu, K. Inoue, K. Tamura, I. Yamasaki, Y. Naya, C. Tanikawa, R. Cui, J.D. Figueroa, D.T. Silverman, N. Rothman, M. Namiki, Y. Tomita, H. Nishiyama, K. Kohri, T. Deguchi, M. Nakagawa, M. Yokoyama, T. Miki, H. Kumon, T. Fujioka, L. Prokunina-Olsson, M. Kubo, Y. Nakamura, T. Shuin, Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population, *Hum Mol Genet*, (2014).
- (9) P.H. Lo, C. Tanikawa, T. Katagiri, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Identification of novel epigenetically inactivated gene PAMR1 in breast carcinoma, *Oncol Rep*, 33 (2015) 267-273.
2. 学会発表
- (1) 2014.4.9 AACR annual meeting (San Diego, USA) PSCA as a potential therapeutic and prognostic biomarker for common cancer.
- (2) 2014.4.25. 第103回 日本病理学会(広島) バイオバンクジャパンについて
- (3) 2014.6.8. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis.
- (4) 2014.8.29. 泌尿器科ゲノム研究会(横浜) 膀胱癌 GWAS の進捗について
- (5) 2014.9.25 日本癌学会(横浜) BioBank Japan Project for personalize medicine
- (6) 2014.12.20 がんゲノム・エピゲノム、数理統計解析についての勉強会(別府) 遺伝子多型解析による疾患感受性遺伝子探索
- 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：GWAS 等による、持続感染、繊維化進展、癌化に起因する遺伝要因の探索
HLA 多型解析
担当責任者：西田 奈央 国立国際医療研究センター 上級研究員

研究要旨：平成26年度は、国内の検体収集協力16施設から、合計2,301例のHBV患者群および健常対照群を収集した。全2,301例のうち2,036例を対象としてHLA-DPBIタイピングを実施した結果、B型慢性肝炎およびHBV関連肝発癌とHLA-DPBI遺伝子の関連はより確かなものとなった。また、B型慢性肝炎に対して進行性および抵抗性の関連を示すDPBIアリルをヘテロで有する症例を検討した結果、抵抗性および進行性のいずれにおいてもヘテロで有する方がより関連が強くなることが明らかとなった。

A. 研究目的

B 型肝炎慢性化および肝発癌に関連することが明らかとなっている HLA-DP 遺伝子について、各種病態への関連を明らかにする。

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 サンプルを用いて、国際医療研究センターにおいて HLA タイピングを実施する。

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。

(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払う。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

研究成果を以下にまとめる。

- (1) 国内の研究協力 16 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。これまでに HBV 患者群および健常対照群の合計 2,301 例を収集し、そのうちの 1,488 例に対する臨床情報（簡易版）633 例に対する臨床情報（詳細版）の収集が完了した。
- (2) 日本人 HBV 患者群および健常対照群の合計 2,036 検体を対象として、*HLA-DPBI* タイピングを実施し、*HLA-DPBI* アリルを決定した。
- (3) 日本人において B 型肝炎慢性化に対する抵抗性の関連を示す *HLA-DPBI**02:01、*04:01、*04:02、および進行性の関連を示す *HLA-DPBI**05:01、*09:01 の関連はより確かになることを確認した。
- (4) 日本人において肝発癌に対して抵抗性の関連を示す *HLA-DPBI**02:01 の関連がより確かになることを確認した。
- (5) *HLA-DPBI* の個別 Genotype での関連解析の結果、上記 3) の抵抗性 *DPBI* アリルをヘテロで有する症例（0201/0401）は抵抗性 *DPBI* アリルをホモで有する症例（0201/0201）よりも有意な抵抗性の関連を示すことを明らかにした。
- (6) *HLA-DPBI* の個別 Genotype での関連解析の結果、上記 3) の進行性 *DPBI* アリルをヘテロで有する症例（0501/0901）は抵抗性 *DPBI* アリルをホモで有する症例（0501/0501）よりも有意な抵抗性の関連を示すことを明らかにした。
- (7) *HLA-DP* 遺伝子領域（約 60Kb）を高速シーケンサー（Illumina MiSeq）により塩基配列決定するためのライブラリー調整用プライマーのデザイン、実験条件の検討を行った。

D. 考察

HLA-DPBI 遺伝子の特定のアリルが B 型

肝炎慢性化および肝発癌に関連することがより確かとなった。加えて、B 型肝炎慢性化に対して、抵抗性および進行性の *DPBI* アリルをヘテロで有する症例において、より関連が強くなることが明らかとなった。

E. 結論

B 型肝炎慢性化および肝発癌に関連する *HLA-DPBI* アリルで層別化した GWAS を実施することにより、*HLA-DP* 遺伝子以外の新たな疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tomoharu Yoshizumi, M.D.; Ken Shirabe, M.D.; Hiromi Sawai; Yohei Mano; **Nao Nishida**; Tatsuya Kanto; Masaaki Korenaga; Toru Ikegami; Katsushi Tokunaga; Masashi Mizokami; Yoshihiko Maehara, Variants in the HLA-DP locus are associated with the efficacy of HBV vaccination after living donor liver transplantation, Transplantation (submitted)
- (2) **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, Shuheji 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 9(3): e86449, 2014

2. 学会発表

- (1) **Nao Nishida**, Hiromi Sawai, Koichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Ken Yamamoto, Takehiko Sasazuki, 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, Minae Kawashima, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2014, Boston, 2014
- (2) **Nao Nishida**, Hiromi Sawai, Kouich Kashiwase, Masaya Sugiyama, Yoriko

Mawatari, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Association of HLA-DPB1 alleles with CHB infection and HBV related HCC in Asia. 62th Annual ASHG Meeting, California, 2014

- (3) **西田奈央**, 澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、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 アリルの横断的解析、第 50 回 日本肝臓学会総会、東京、2014
- (4) **西田奈央**, 徳永勝士、溝上雅史、B型肝炎慢性化および癌化に関連する HLA-DP 遺伝子のアジア人集団における横断的解析、第 50 回 日本肝癌研究会、京都、2014

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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施（持続感染等）

担当責任者：横須賀収 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

研究要旨：B型肝炎の慢性持続感染に影響を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、背景因子データを収集した。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。収集した血液検体は国立国際医療研究センター国府台病院等でGenome-wide association study (GWAS)等を行い、その宿主規定因子を探索検討する。可能であれば今後、本研究班により集められた血液サンプルでGenome-wide association study (GWAS)等を行なっていたいただきその宿主規定因子を探索検討していただく予定である。

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 B 型肝炎の慢性持続感染に影響を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 GWAS を用いて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)等を行なっていたいただきその宿主規定因子を探索検討する。本年度は平成 23 年 9 月 12 日千葉大学生命倫理委員会で承認が得られた研究プロトコル[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、収集を継続している。

(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

昨年度に引き続き B 型肝炎患者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。また昨年度、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、背景因子の収集を行なった。

D. 考察

上記研究プロトコ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

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

なし

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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施（繊維化進展等）
B 型慢性肝炎における線維化進展と PNPLA3 遺伝子との関連
担当責任者：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨：HBV持続感染にもかかわらず線維化が進行しない非活動性キャリアと線維化が進行し肝硬変、肝がんに進展する症例の宿主側の要因は差異は不明である。PNPLA3 遺伝子多型は非アルコール性脂肪肝炎の病態進展と関連する宿主因子であり、C型肝炎においても肝線維化の進展に関連する。今回、同遺伝子とB型肝炎の線維化進展と発がんとの関連をB型肝炎195例で検討した。PNPLA3 (rs738409) genotypeはCCが30%、CGが50%、GGが20%で、C型肝炎と同様であった。CCはF3-4では43%に対してF0-2では43%、CG F3-4では35%に対してF0-2では36%、GGはF3-4では29%に対してF0-2では29%であり、肝線維化との関連を認めなかった。PNPLA3 (rs738409) genotypeは、肝硬変で、慢性肝炎、非活動性キャリアなどの病期進行と関連せず、累積発がん率とも関連しなかった。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎の病態は多彩であり、HBV 持続感染にもかかわらず線維化が進行しない非活動性キャリアから、線維化が進行し肝硬変、肝がんに進展する症例も存在するが、病期進展の宿主側の要因は不明である。PNPLA3 遺伝子多型は非アルコール性脂肪肝炎の病態進展と関連する宿主因子であり、我々は、C 型肝炎において PNPLA3 遺伝子多型が、肝線維化の進展に関連することを見出した。今回、同遺伝子と B 型肝炎の線維化進展あるいは発がんとの関連を検討した。

B. 研究方法

B 型肝炎 195 例から DNA を抽出し、Taqman Probe を用いて PNPLA3 (rs738409) のタイピングを行ない、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、個人情報を実際に保護している。

C. 研究結果

PNPLA3 (rs738409) の Genotype 分布は CC が 30.3%、CG が 49.7%、GG が 20.0% であった。この頻度は C 型肝炎と同様であった。CC は F3-4 では 43% に対して F0-2 では 43%、CG F3-4 では 35% に対して F0-2 では 36%、GG は F3-4 では 29% に対して F0-2 では 29% であり、肝線維化との関連を認めなかった。PNPLA3 (rs738409) の CG/GG は、肝硬変では 61.6%、慢性肝炎では 75.4%、非活動性キャリアでは 56.4 % であり、病期の進行と明らかな関連はなかった。累積の発がん率も、PNPLA3 (rs738409) の Genotype とは関連しなかった。

D. 考察

非アルコール性脂肪肝炎、C 型肝炎で線

維化進行と関連する PNPLA3 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

非アルコール性脂肪肝炎、C 型肝炎で線維化進行と関連する PNPLA3 は、B 型肝炎においては大きなインパクトはない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **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) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsuhashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, **Kurosaki M**, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N & Mizokami M. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 2014; 59:89-97.
- (3) 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:e86449.

- (4) Orito E, Hasebe C, **Kurosaki M**, Osaki Y, Jyoko K, Watanabe H, Kimura H, Nishijima N, Kusakabe A & Izumi N. Risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic HBV patients during nucleot(s)ide analogues therapy. *Hepatol Res* in press

2. 学会発表

- (1) Genetic polymorphism in PNPLA3 gene impacts fibrosis progression and hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C but not in hepatitis B Masayuki Kurosaki, Kaoru Tsuchiya, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori Hosokawa, Shoko Suzuki, Jun Itakura, Namiki Izumi AASLD 2014

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施（癌化等）
担当責任者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域 教授

研究要旨：これまでのB型慢性肝炎（CH-B）、B型肝炎癌（HCC-B）、C型慢性肝炎(CH-C)、C型肝炎癌(HCC-C)の肝組織に加え、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の非癌部及び癌部（NASH-HCC）の遺伝子発現を解析した。解析サンプル数はCH-B：21、HCC-B：21、CH-C：33、HCC-C：33、NASH:19、NASH-HCC：19であり、Affymetrix gene chip U133Plus 2.0を用いて解析した。非癌部及び癌部の遺伝子発現はそれぞれの成因別に特徴的な発現パターンを示した。肝癌の予後と関連する共通した遺伝子発現として、クロマチン修飾、細胞周期、DNA修復関連遺伝子の発現上昇が有意にPFS (progression free survival)低下と関連していた。また、NK細胞、IFNシグナル、抗原提示、TCRシグナリングの発現低下が有意にPFS低下と関連していた。このように腫瘍側因子に加え、腫瘍免疫の動態が肝癌の再発、予後と密接に関連していた。今後、腫瘍浸潤リンパ球の遺伝子発現の違いや、それを誘導する腫瘍側因子の同定を行う。

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

今年度は、これまでの B 型慢性肝炎（CH-B）、B型肝炎癌（HCC-B）、C型慢性肝炎(CH-C)、C型肝炎癌(HCC-C)の肝組織に加え、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の非癌部及び癌部（NASH-HCC）の遺伝子発現を解析した。解析サンプル数は CH-B：21、HCC-B：21、CH-C：33、HCC-C：33、NASH:：19、NASH-HCC：19 であり、

Affymetrix gene chip U133Plus 2.0 を用いて解析した。

（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

非癌部及び癌部の遺伝子発現はそれぞれの成因別に特徴的な発現パターンを示した。肝癌の予後と関連する遺伝子発現としてクロマチン修飾、細胞周期、DNA 修復関連遺伝子の発現上昇は有意に PFS (progression

free survival)低下と関連した。また、NK細胞、IFNシグナル、抗原提示、TCRシグナリングの発現低下が有意にPFS低下と関連した。このように肝癌細胞内の腫瘍浸潤リンパ球の動態と肝癌の再発、予後と密接に関連していることが明らかとなった。今後、腫瘍浸潤リンパ球の遺伝子発現の違いや、それを誘導する腫瘍側因子の同定を行う。

D. 考察

これまでに 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にした。今回、NASH 肝癌を加えた 73 の肝癌組織及び非癌部の遺伝子発現を Affymetrix gene chip U133Plus 2.0 にて行った。非癌部及び癌部の遺伝子発現はそれぞれの成因別に特徴的な発現パターンを示したが、肝癌の予後と関連する遺伝子発現として共通してクロマチン修飾、細胞周期、DNA 修復関連遺伝子の発現上昇が PFS (progression free survival)低下と関連していた。また、興味深いことに、NK細胞、IFNシグナル、抗原提示、TCRシグナリングといった免疫応答分子の発現低下が有意にPFS低下と関連した。このように、腫瘍内浸潤リンパ球の動態が肝癌の予後と密接に関連していることが示唆された。今後の検討として

- (1) 予後良好群と不良群の腫瘍浸潤リンパ球の遺伝子発現を比較し、腫瘍免疫の低下と関連する遺伝子発現を明らかにする。
- (2) 浸潤リンパ球の機能低下を誘導する腫瘍因子の同定を行う。

E. 結論

各種肝癌の遺伝子発現と予後データの解析から、腫瘍側因子に加え、腫瘍免疫低下が肝癌の予後と密接に関わることが示唆された。今後、腫瘍免疫を攪乱する腫瘍側の責任分子を同定することによって、腫瘍制御と腫瘍免疫の活性化を誘導する分子を同定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. Selitsky SR, Baran-Gale J, **Honda M**, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. *Sci Rep*. 2015 Jan 8;5:7675. doi: 10.1038/srep07675.
- (2) Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. 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. 2014 Dec 17. [Epub ahead of print]
- (3) Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatol Res*. 2014 Oct 16. doi:10.1111/hepr.12436. [Epub ahead of print]
- (4) Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. *Hepatology*. 2014. Nov;60(5):1519-30. doi: 10.1002/hep.27277.
- (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*. 2014 Nov;44(12):1179-85. doi: 10.1111/hepr.12266.
- (6) Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Hashimoto E, **Honda M**, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Harada K, Arai K, Miyake Y, Abe M, Taniai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. *Hepatol Res*. 2014 Sep 14. doi: 10.1111/hepr.12423. [Epub ahead of print]
- (7) Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int*. 2014 Sep 15. doi: 10.1111/liv.12685. [Epub ahead of print]
- (8) 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*. 2014 May;57(5):878-90. doi: 10.1007/s00125-013-3149-9.
- (9) P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, **Honda M**, Kaneko S. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 May;63(5):479-89. doi: 10.1007/s00262-014-1529-8.
- (10) The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, **Honda M**, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4:4688. doi: 10.1038/srep04688.
- (11) 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 and Kaneko S. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-38. doi: 10.1002/hep.26788.
- (12) Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi M, **Honda M**, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1674-85. doi: 10.1002/hep.27093.
- (13) New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. 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. *PLoS One*. 2014 Feb 10;9(2):e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.
- (14) 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*. 2014 Jan;60(1):127-34. doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.024.

2. 学会発表
なし

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施

（薬剤応答性等（PEG-IFN・核酸アナログ））

担当責任者：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：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

研究要旨：当院における B 型慢性肝疾患長期観察例の肝発癌に関わる因子の臨床的検討をおこなった。対象は 1980 年～2000 年の間に当センターに入院した初診時肝細胞癌合併がなく 5 年以上経過観察した B 型慢性肝疾患症例 392 例（観察期間：14 年）である。1) 392 例での肝発癌に関連する因子に関して COX 比例ハザードモデルを用いて多変量解析をおこなった。2) HBsAg 消失例における発癌例に関して検討をおこなった。経過中に発癌を認めた症例は 92 例（1.68%/年）、HBsAg 消失を確認したのは 50 例（HBsAg 消失率 0.91%/年）であった。1) 肝発癌に関連する独立因子は初診時年齢 40 歳以上（relative risk: 3.7, $p < 0.001$ ）であった。2. 当院の HBsAg 消失例における肝発癌例は 392 例中 2 例（0.5%）であった。経過中 HBsAg が消失した HCC 症例は根治的治療が行われ（7/8 例）、治療後再発はみられていない。

A. 研究目的

当院における B 型慢性肝疾患長期観察例の肝発癌に関わる因子の臨床的検討をおこなった。

（倫理面への配慮）

患者に対しては血液検体の保存、研究使用に関する説明をおこない、紙面にて同意を取得した。

B. 研究方法

対象は 1980 年～2000 年の間に当センターに入院した初診時肝細胞癌合併のない HBsAg 陽性例 1029 例のうち 5 年以上経過観察した 392 例（観察期間中央値：14 年）である。初診時年齢（中央値）：39 歳、男性：278 例（71%）、初診時 HBeAg 陽性例：287 例（73%）、初診時 ALT 値（中央値）：53 IU/L、初診時 HBV-DNA 量（中央値）：6.3 logcopies/ml、初診時 HBsAg 量（中央値）：3.6 logIU/ml、初診時肝硬変合併例：111 例（28%）、インターフェロン治療例：83 例（21%）（表 1）。1) 392 例での肝発癌に関連する因子に関して COX 比例ハザードモデルを用いて多変量解析をおこなった。2) HBsAg 消失例における発癌例に関して検討をおこなった。

C. 研究結果

経過中に発癌を認めた症例は 92 例（1.68%/年）、HBsAg 消失を確認したのは 50 例（HBsAg 消失率 0.91%/年）であった（図 1）
1) 肝発癌に関連する独立因子は初診時年齢 40 歳以上（relative risk: 3.7, $p < 0.001$ ）であった（表 2）。2) HBsAg 消失例において経過中、肝発癌を認めたのは 8 例であった。発癌例、未発癌例の間に臨床背景において有意な因子は認めなかった（表 3）。HBsAg 消失後に発癌した症例は 2 例であった。ほとんどの症例（7/8 例）は根治的治療が施行され予後は良好であった（図 2）。

D. 考察

今回の検討では年齢が HBV 関連肝癌に関連する独立因子として抽出されたが、Alb、

AFP 値など肝線維化に関連する因子も関連する傾向がみられた。ウイルスマーカーが因子として抽出されなかったのは検討対象が住民コホートではなく病院ベースであったためと考える。

表 1. B型肝炎長期観察例の臨床背景 (n=392)

	全症例 (n=392)	経過発癌あり (n=92)	経過発癌なし (n=300)	p 値
年齢, 歳 (平均 ±SD)	40.1 ± 12.7	46.7 ± 11.4	38.1 ± 12.4	<0.001
男性, n(%)	278 (71)	73 (79)	205 (68)	0.06
HBsAg+ve, n(%)	285 (73)	65 (70)	220 (73)	0.71
HBV genotype C/B, n/n	384/8	92/0	292/8	0.30
ALT 値 中央値 (range), IU/L	54 (8-2200)	48 (12-729)	60 (8-2200)	0.09
Alb 値, g/dL	4.2 (1.8-5.3)	4.0 (2.4-4.8)	4.2 (1.8-5.3)	<0.001
血小板数, x10 ³ /dL	15.4 (2.1-38.3)	10.0 (2.4-4.8)	16.3 (1.8-5.3)	<0.001
AFP 値, ng/mL	5.0 (1.0-1513)	12.0 (1.0-300)	4.0 (1.0-1513)	<0.001
HBsAg 量, logIU/mL	3.6 (-1.0-5.2)	3.4 (-1.0-4.9)	3.7 (0.0-5.2)	<0.001
HBV-DNA 量, logcopies/mL	7.0 (ND->9.5)	6.8 (<1.5->9.5)	7.1 (ND->9.5)	0.53
PC 変異 NW(non wild) n(%)	196 (49)	41 (45)	153 (51)	0.02
BCP 変異 NW(non wild) n(%)	326 (83)	86 (94)	240 (80)	0.02
初診時肝硬変合併 n(%)	102 (26)	40 (43)	62 (21)	<0.001
IFN 治療あり n(%)	84 (21)	15 (16)	69 (23)	0.22
HBsAg 消失 n(%)	50 (13)	8 (8.7)	42 (14)	0.25
フォロー期間, 年	14.0 (5-31)	12.5 (5-29)	14.0 (5-31)	0.20

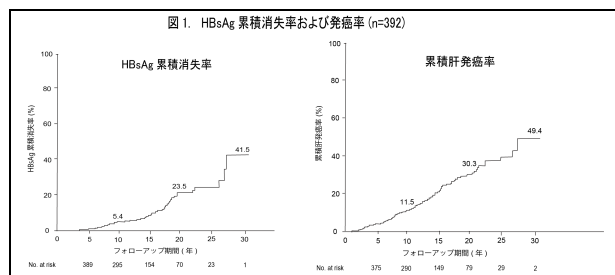
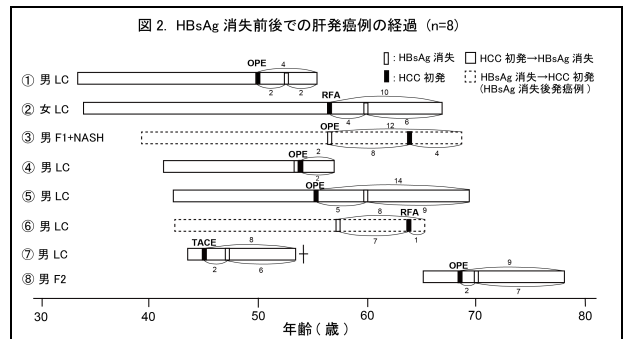


表 2. B 型肝炎患者における肝発癌に関連する因子の検討 (n=392)

	単変量解析		多変量解析	
	p value	Odds ratio (95% CI)	p value	Odds ratio (95% CI)
年齢 ≥ 40 歳	<0.001	4.87 (3.04-7.79)	<0.001	3.70 (1.82-7.50)
男性	0.22	1.37 (0.83-2.28)		
HBsAg 陽性	0.33	0.80 (0.51-1.26)		
Alb < 4.2g/dL	<0.001	3.46 (2.17-5.51)	0.09	1.79 (0.92-3.50)
AFP ≥ 5.0ng/mL	<0.001	4.00 (2.42-5.51)	0.05	2.18 (0.99-4.78)
ALT ≥ 50 IU/L	0.86	1.04 (0.68-1.59)		
HBsAg ≥ 3.6 logIU/ml	<0.001	0.42 (0.28-0.56)		
HBV DNA ≥ 7.0 logcopies/ml	0.42	0.84 (1.19-3.14)		
初診時肝硬変あり	<0.001	2.93 (1.93-4.44)	0.98	1.01 (0.54-1.89)
PC 変異あり	0.15	1.51 (0.86-2.66)		
BCP 変異あり	0.04	3.33 (1.04-10.7)	0.14	2.56 (0.69-12.6)
血小板数 < 15 万 / μL	<0.001	4.23 (2.58-7.62)	0.38	1.44 (0.64-3.20)
HBsAg 消失あり	0.02	0.43 (0.21-0.89)		

表 3. HBsAg 消失例の臨床背景 (n=50)

	経過発癌あり (n=8)	経過発癌なし (n=42)	p 値
年齢, 歳 (平均 ±SD)	41.5 ± 9.8	38.9 ± 11.2	0.42
男性, n(%)	7 (88)	34 (81)	0.41
HBsAg+ve, n(%)	3 (38)	27 (64)	0.31
ALT 値 中央値 (range), IU/L	32.0 (15-263)	35.5 (13-2200)	0.92
Alb 値, g/dL	4.1 (2.7-4.8)	4.2 (3.4-4.9)	0.95
血小板数, x10 ³ /dL	11.0 (6.5-24.4)	15.8 (5.8-31.0)	0.29
AFP 値, ng/mL	4.0 (1-90)	3.0 (1.0-850)	0.93
HBsAg 量, logIU/mL	3.1 (1.1-4.1)	3.3 (0.7-4.9)	0.23
HBV-DNA 量, logcopies/mL	4.0 (<1.5-8.8)	6.2 (ND-8.8)	0.14
初診時肝硬変合併 n(%)	5 (63)	17 (40)	0.45
IFN 治療あり n(%)	2 (25)	10 (24)	1.00
HBsAg 消失時年齢, 歳	57.0 ± 6.8	52.3 ± 8.6	0.13
50 歳未満での HBsAg 消失 n(%)	1 (13)	14 (33)	0.45



E. 結論

1. B 型慢性肝疾患長期観察例の肝発癌に関わる因子は初診時年齢 40 歳以上であった。
2. 当院の HBsAg 消失例における肝発癌例は 392 例中 2 例(0.5%)であった。経過中 HBsAg が消失した HCC 症例は根治的治療が行われ(7/8 例)、治療後再発はみられていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Bae SK, Yatsuhashi H, Takahara I, Tamada Y, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Ishibashi H. Sequential occurrence of acute hepatitis B among members of a high school Sumo wrestling club. Hepatol Res. 2014 Oct;44(10):E267-72.

2. 学会発表 なし

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施（薬剤応答性等）

経口抗ウイルス剤耐性に関与するウイルス因子の探索

担当責任者：松本 晶博 信州大学医学部附属病院肝炎診療相談センター 准教授

研究協力者：上條のぞみ 信州大学医学部内科学第二教室 卒後研究員

研究要旨：B型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療では、長期投与により耐性株が生じ、薬剤の効果が低下ないし消失し、肝炎の再燃が起こることが報告されている。今回我々は、耐性変異を生じた例について、治療開始時のHBV全遺伝子配列を比較検討した。現在主流に使用されているentecavir(ETV)では治療中に再燃してくるBreakthrough群と最初から不応である non response群が見られる。Breakthrough群では既報の耐性変異を全例で観察できたが、non response群では既報の耐性変異は見られ無かった。今後、non response群における、耐性に宿主の因子が関連するかどうか検討する必要がある。

A. 研究目的

核酸アナログへの耐性獲得を治療前に予測する有効な方法はない。これまでの解析では、NA 治療開始 6 ヶ月目の HBV DNA 量およびコア関連抗原量が耐性株の出現と関連していた。遺伝子の網羅的解析により、治療開始前に核酸アナログ薬剤耐性を予測することができる因子を抽出する。

B. 研究方法

対象は entecavir(ETV)治療を行い、投与中に耐性の生じた breakthrough 群 4 例および、投与前から不応の Non response 群 3 例で、投与開始前および耐性の生じた時点の HBV 全塩基配列を決定し、比較した。

（倫理面への配慮）

各患者について書面による検体提供の同意を得た。

C. 研究結果

Breakthrough 群において、治療前 5 ポイントと耐性時の 11 ポイントについて塩基配列を比較したところ、これまで ETV の耐

性変異と報告されている、RT204(0/5 vs 15/15, $p<0.05$)および、RT180 の変異(1/5 vs 11/15, $p<0.05$)を認め、また、RT55 番に変異(1/5 vs 12/15, $p<0.05$)を認めた。また、ポリメラーゼ領域以外では X37 領域の変異(0/5 vs 11/15, $p<0.05$)が認められた。そのほかには有意な変異は認められなかった。また、non response 群においては治療前と耐性時の配列に既報の耐性変異は無かったが、X37 領域の変異(0/5 vs 7/14, $p<0.05$)が認められた。そのほかにも有意な変異が入っている例は無かった。

D. 考察

Breakthrough 群では既報の耐性変異を全例に認めたが、non response 群では既報の耐性変異を認めなかった。これらの群においては、不応になる因子として、ウイルス側では無く、宿主側の因子強く働いている可能性がある。

E. 結論

B 型肝炎に対する核酸アナログ治療では、ウイルスの変異による耐性の獲得の

他に、宿主側の因子により耐性化する例がある可能性が示唆された。今後これら宿主側の因子について検討していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mutations of pre-core and basal core promoter before and after hepatitis B e antigen seroconversion. Kamijo N, **Matsumoto A**, Umemura T, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, Komatsu M, Tanaka E. World J Gastroenterology 2015 (inpress).

2. 学会発表

Hepatitis B Viral Load and Mutations of Pre-core and Basal Core Promoters Before and After Hepatitis B e Antigen Seroconversion.

Kamijo N, **Matsumoto A**, Tanaka E et al. 第11回 Single Topic Conference

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：HB 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試料収集
HB ワクチン応答性に関する宿主の遺伝子研究

担当責任者：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

田中純子 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 疫学・疾病制御学 教授

江口有一郎 佐賀大学医学部 肝疾患医療支援学講座 教授

研究要旨：本研究班の研究課題である「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」の一環としてHB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。平成24年度に引き続き平成25年度にも、川崎医科大学附属病院ならびに川崎医科大学附属川崎病院職員の血液検体ならびに臨床データを収集した。また、千葉大学および名古屋市立大学より主としてワクチン接種対象者の検体採取が進行している。今後、広島大学および佐賀大学においても倫理委員会承認後、ワクチン接種対象者の血液検体を収集する予定である。今後は、平成26年度までに収集された検体を用いて、HBワクチン応答性に関する宿主因子の遺伝子解析（GWAS）を行う予定である。

A. 研究目的

本研究班の研究課題である「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」の一環としてHB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。

B. 研究方法

平成24～平成25年度にHBワクチン接種を受けた346名（事前採血でHBs抗原陰性、HBs抗体陰性を確認された、川崎医科大学附属病院職員、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上で、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。今後も引き続き、平成26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。

また、平成25年度までに研究協力機関である千葉大学より109検体、名古屋市立大学より18検体の主としてワクチン不応者の血液検体および臨床データが収集されている。現時点で合計473検体が採取されている。

さらに、広島大学および佐賀大学も研究協力施設として参加し、現在倫理委員会へ申請中であり、倫理委員会承認後検体採取開始予定である。

今後は、平成26年度までに収集された検体を用いて、HBワクチン応答性に関する宿主因子の遺伝子解析（GWAS）を行う予定である。

（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。

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 ワクチン不応答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

HB 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) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, **Hino K**. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Am J Pathol* 2014;184:3026-39.
- (2) Korenaga M, Nishina S, Korenaga K, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Sasaki Y, Shimonaka Y, **Hino K**. Branched-chain amino acids reduce hepatic iron accumulation and oxidative stress in hepatitis C virus polyprotein-expressing mice. *Liver Int* 2014:doi 10.1111/liv.12675.
- (3) Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T **Hino K**. Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of adenosine monophosphate-activated protein kinase/proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha signaling. *Hepatol Res* 2014;44:E229-39.

- (4) **Hino K**, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatol Res* 2014;44:123-32.
- (5) Abe M, Miyake T, Huno A, Imai Y, Sawai Y, **Hino K**, Hara Y, Hige S, Sakamoto M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Narimatsu H. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2014:doi 10.1007/s00535-014-1007-2.
- (6) Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsuhashi 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* 2014:doi 10.1007/s00439-014-1520-7.
- (7) 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.
- (8) Omata M, Nishiguchi S, Ueno Y, Mochizuki H, Izumi N, Ikeda F, Toyoda H, Yokosuka O, Nirei K, Gneda 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, Yatsunami 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;doi 10.1111/jvh.12312

- (9) Nakamura M, Nakashima H, Abe T, Ensako T, Yoshida K, **Hino K**. Gemcitabine-based Adjuvant Chemotherapy for Patients with Advanced Gallbladder Cancer. Anticancer Res 2014;34:3125-9.

2. 学会発表

- (1) Nishina S, Hyogo H, Kawanaka M, Miyake T, Abe M, Yamashita S, Tobita H, Sato S, Hoasa Y, Chayama K, **Hino K**. Oral glucose tolerance test predicts hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease

patient without overt diabetes mellitus. AASLD The liver Meeting Boston 2014.

- (2) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Chayama K, **Hino K**. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. 5th World Congress on Targeting Mitochondria. Berlin 2014

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：B 型肝炎ワクチン応答性についての臨床情報および検体収集
担当責任者：須磨崎 亮 筑波大学医学医療系 小児科 教授
研究協力者：滝川 康裕 岩手医科大学内科学講座 消化器内科肝臓分野 教授

研究要旨：「若年成人の初回B型肝炎ワクチン接種後の反応性を規定する遺伝学的背景の検討」目的に筑波大学で2013年度から収集中のDNA検体の一部および臨床情報を、東京大学でのGWAS解析に用いるための同意書再取得を行った。同意の得られたNon responder 24検体およびその臨床情報を、東京大学に提出する。

A. 研究目的

健常若年成人の B 型肝炎ワクチンの応答性を規定する宿主因子を同定するために、大規模なゲノム多型・変異解析を行う。

B. 研究方法

筑波大学小児科では、2013 年度から、「若年成人の初回 B 型肝炎ワクチン接種後の反応性を規定する遺伝学的背景の検討」という研究名で、筑波大学および岩手医科大学の医療系学生を対象に、臨床情報および DNA を収集している。

両大学では、ワクチン接種前に HBs 抗原陰性であることを確認された学生を対象に、B 型肝炎ワクチン接種を行っている。初回 B 型肝炎ワクチン（ビームゲン 10 μ g/回 \times 3 回）皮下接種を行われ、遺伝情報を含む研究に同意が得られた医療系学生を対象とし、臨床情報として、初回接種時年齢、性別、3 回目の接種後 1-2 か月時点の HBs 抗体価および HBc 抗体価（Architect, Abbott）を調査している。接種タイミングは 2 施設間で異なり、筑波大学では 0.1.12 か月、岩手医科大学では 0.1.6 か月のタイミングで接種を行っている。ワクチン種類・摂取量、3 回目のワクチン接種から HBs 抗体価測定までの期間および、測定方法は両大学で上記のとおり統一した。

HBs 抗体価測定用の採血と同時に DNA 抽出用の全血 2 mL を採血し、DNA 自動抽出器を用いて、DNA を抽出した。

（倫理面への配慮）

筑波大学および岩手医科大学の倫理委員会の承認を得て 2013 年度から検体収集を開始しているが、当初「東京大学での解析」について、同意書への記載がなく、同意の再取得を行い、同意が得られた検体のみを提出する。

C. 研究結果

計 578 人の学生の DNA および臨床情報が得られた。男女比は 268 : 310、平均年齢は 21.1 歳で、HBs 抗体価 10 mIU/mL 未満（Non responder）が 27 人（4.7%）、10 以上 100 未満（Low responder）が 129 人（22.3%）、100 以上（Responder）が 422 人（73.0%）であった。同時に測定した HBc 抗体は全例陰性であった。

DNA は、全例良好に抽出可能で、Non responder 者から同意の再取得を行い、24 人から同意が得られた。

D. 考察

既報では B 型肝炎ワクチンでは、接種者の 5-10% が Non responder であるとされてい

る。今回の対象者においては、Non responder は 4.7%、Low responder は 22.3%、Responder は 73.0%であった。

また、従来も男性はワクチン不応のリスクと報告されているが、今回の対象者も、有意差をもって男性に Non responder が多くみられた (P = 0.016, OR = 2.88, 95% CI = 1.24-6.69)。

年齢については、Non responder の平均は 23.4 歳、10 mIU/mL 以上 HBs 抗体価が得られた対象者の平均は 21.0 歳であった。

E. 結論

本年度は、27 人の Non responder 中、同意が得られた 24 人の DNA および年齢、性別、HBs 抗体価を東京大学に提出する。Non

responder は 4.7%と頻度が少なく、今後も症例集積を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：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
担当責任者：楠本茂 名古屋市立大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 講師

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。今年度は、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、先行して実施してきた多施設共同前方視的研究（UMIN000001299）登録症例を中心とした、ヒト遺伝子解析プロジェクトのプロトコール作成し、平成 27 年 1 月 15 日より症例登録を開始した（UMIN000016177_C-SHOT1402）。平成 27 年 2 月 22 日時点で、試験開始 1 ヶ月が経過、参加予定の全国 49 施設中 7 施設で IRB 承認を得て、トータル 3 例の症例登録を得た。2 年間で 200 例の症例登録（うち 70 例は HBV 再活性化例）を予定している。

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

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として、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）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省・経済産業省、平成 25 年 2 月 8 日全部改正）に則り、プロトコール作成した。

C. 研究結果

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、プロトコールを作成した（UMIN000016177_C-SHOT1402）。

平成 27 年 1 月 15 日より症例登録を開始した（UMIN000016177_C-SHOT1402）。平成 27 年 2 月 22 日時点で、参加予定 49 施設 7 施設で IRB 承認を得ていて、トータル 3 例の症例登録を得ている。

D. 考察

2 年間で 200 例の症例登録（うち 70 例は HBV 再活性化例）を予定している。HBV 再活性化に関与する宿主リスク因子の同定を目指した、世界で初めてのプロジェクトである。

E. 結論

HBV 再活性化ヒト遺伝子プロジェクトのプロトコール作成および症例登録を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施（劇症化等）

わが国における B 型急性肝不全の実態

担当責任者：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

研究要旨：2010~2014年発症した急性肝不全，遅発性肝不全（LOHF）の実態調査で集計した1,061症例のうち，B型症例を対象としてその臨床像を解析した。B型は225例で全体の21.2%を占めており，急性感染127例（56.4%），キャリア90例（40.0%），判定不能8例（3.6%）に区分された。急性感染例は非昏睡型60例（47.2%），急性型53例（41.7%），亜急性型12例（9.4%），LOHF 2例（1.6%）に分類され，各病型における比率はそれぞれ11.7%，18.0%，5.3%，5.0%であった。キャリア例は非昏睡型26例（28.9%），急性型18例（20.0%），亜急性型37例（41.1%），LOHF 9例（10.0%）に分類され，各比率は5.1%，6.1%，16.4%，22.5%であった。また，HBs抗原陰性の既往感染からの再活性化が25例，HBs抗原陽性のキャリアの再活性化が26例であり，キャリア例の56.7%は免疫抑制・化学療法が原因で発症した医原病であった。非昏睡型の急性感染例は56例（93.3%），キャリア例は16例（61.5%）が内科的治療のみで救命されたが，昏睡型ではそれぞれ17例（25.4%），5例（7.8%）であった。肝性脳症を発症する重症化例を対象として，後方視的に遺伝子検査を実施するのは困難であることが明らかになった。

A. 研究目的

劇症肝炎は発症数が年間約 400 例と推計される [1]。厚生労働省研究班の全国調査では，1998~2009 年に発症した劇症肝炎と遅発性肝不全（late onset hepatic failure: LOHF）は計 1,186 例が集積されており，そのうち 462 例（39.0%）が B 型症例であった [2,3]。これら希少疾患を前方視的に集積して，その遺伝子解析を実施するのは困難である。そこで，厚労省研究班の登録例を対象として，後方視的に遺伝子解析を実施するための準備研究として，2010~2013 年に発症した B 型症例の実態を解析した。

B. 研究方法

厚生労働省の難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」

班が平成 23~26 年度に実施した「急性肝不全，LOHF の全国調査」に登録された症例を基に [4,5]，B 型症例の臨床像を解析した。急性肝不全，劇症肝炎および LOHF は 2011 年に厚生労働省研究班が発表した診断基準に準拠した [6]。

C. 研究結果

2010~2013 年に発症した急性肝不全は 1,021 例（非昏睡型 512 例，急性型 283 例，亜急性型 226 例），LOHF は 40 例で，解析対象は計 1,061 例であった。このうち B 型は 225 例で全体の 21.2%を占めていた。

（1）感染形式と病型

急性感染例が 127 例（56.4%），キャリアが 90 例（40.0%）で，8 例（3.6%）ではその区分が困難であった（図 1）。

急性感染例は非昏睡型が 60 例 (47.2%)、昏睡型が 67 例 (52.8%) で、後者は急性型 53 例 (41.7%)、亜急性型 12 例 (9.4%)、LOHF 2 例 (1.6%) に分類された。このため各病型における比率は、非昏睡型が 11.7%、急性型が 18.0%、亜急性型が 5.3%、LOHF が 5.0% であった。

キャリア例は非昏睡型が 26 例 (28.9%)、昏睡型が 64 例 (71.1%) で、急性型 18 例 (20.0%)、亜急性型 37 例 (41.1%)、LOHF 9 例 (10.0%) に分類された。各病型に占める比率は非昏睡型が 5.1%、急性型が 6.1%、亜急性型が 16.4%、LOHF が 22.5% であった。

(2) 臨床像

B 型症例全体では男が 133 例、女が 92 例で、年齢は平均 51.2 歳 (標準偏差 17.4, 13~93 歳) であった。病型別ないし感染形式別に見ても、何れも男性が多かった (表 1)。しかし、年齢は亜急性型 (61.4 ± 13.9) と LOHF (68.1 ± 14.3) は非昏睡型 (45.3 ± 17.3 歳) と急性型 (48.7 ± 15.7) に比しては、キャリア例 (61.2 ± 15.7) は急性感染例 (43.9 ± 14.7) に比して、有意に高齢であった。

キャリア例の比率は亜急性型 (71.2%) と LOHF (81.8%) が非昏睡型 (29.5%) と急性型 (24.3%) に比して有意に高率であった (表 1)。生活習慣病、悪性腫瘍、精神疾患などの基礎疾患を併発している頻度と薬物歴を有する比率は、非昏睡型と急性感染例では 34.5% と 35.5% で比較的 low 率であったが、昏睡型の各病型とキャリアは何れも 50% 以上で、特に亜急性型と LOHF で高率であった。

HBs 抗原陰性の既往感染からの再活性化が 25 例、HBs 抗原陽性のキャリアの再活性化が 26 例であり、キャリア例の 56.7% は免疫抑制・化学療法が原因で発症した医原病であった。

(3) 予後

非昏睡型は内科的治療のみで急性感染例

のうち 56 例 (93.3%)、キャリア例のうち 16 例 (61.5%) および判定不能例の 1 例が救命され (図 1)、救命率は 88.0% であった (表 1)。しかし、昏睡型ではそれぞれ 17 例 (25.4%) と 5 例 (7.8%) で救命率が低率であった。病型別では急性型が 28.3% に対して亜急性型は 8.7% と低率で、LOHF に救命例は見られなかった。また、急性感染例は内科的治療による救命率が全体で 87.6% であり、キャリア例の 25.3% より高率であった。

肝移植は 26 例 (20.6%) で実施され、その救命率は 65.4% であった。このため肝移植実施例も含む全症例での救命率は 49.3% で、病型別では非昏睡型 88.6%、急性型 31.1%、亜急性型 17.3%、LOHF 9.1%、急性感染例とキャリア例はそれぞれ 65.4% と 42.2% であった。

D. 考察

2010~2013 年に発症した B 型急性肝不全は 225 例で、このうち昏睡型は 137 例であった。急性肝不全 1,061 例のうち肝炎症例は 863 例 (81.3%) で、このうち従来の劇症肝炎、LOHF に相当する昏睡型症例は 462 例 (46.5%) で、これら症例における B 型症例の比率は 29.7% である。1998~2009 年の劇症肝炎、LOHF では B 型症例の比率が 39.0% であり [2,3]、その比率は 2010 年以降には減少していることが明らかになった。なお、肝炎症例における B 型の比率は、1998~2009 年は急性型が 55.4%、亜急性型が 26.7%、LOHF が 15.2% であったのに対して、2010 年以降はそれぞれ 34.1%、25.1%、28.9% であり、急性型における低下が顕著で、LOHF 症例ではむしろ上昇していた。なお、急性型における急性感染例とキャリア例の比率は 1998~2009 年では 3.9 : 1、2010 年以降では 2.9 : 1 であり、特に急性感染例の比率が低下していた。一方、2010~2013 年の B 型 LOHF 症例は 9 例であるが、そのうち 7 例は既往感染の再活性化であり、de novo B 型肝炎症例の増加が比率増加に寄与すると考えられた。

E. 結論

急性肝不全 LOHF のうち B 型の症例は、再院は特に急性型で減少していると考えられた。その一方で、免疫抑制・化学療法による HBs 抗原陰性の既往感染からの再活性化例が増加している。非昏睡型は内科的治療による予後が良好であるが、昏睡型は予後が不良であり、肝移植実施例も含めて、後方視的に遺伝子検査を実施できる重症例は少数であることが明らかになった。

F. 引用論文

- (1) 森 満, et al. 難治性肝疾患の全国疫学調査成績. 厚生労働省特定疾患対策研究事業「難治性疾患の疫学研究班」平成 17 年度報告書, 2006, pp39-42.
- (2) Fujiwara K, et al. Fulminant hepatitis and late onset hepatic failure in Japan. *Hepatology* 2008; 38: 646-657.
- (3) Oketani M, et al. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatology* 2013; 43: 97-105.
- (4) 持田 智. 劇症肝炎に関する研究. 厚生労働省科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成 23-25 年度総合研究報告書, 2014; pp29-44.
- (5) 持田 智. 急性肝不全, LOHF の全国調査 (2013 年). 厚生労働省科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成 26 年度報告書, 2015; 印刷中.
- (6) Mochida S, et al. Diagnostic Criteria of Acute Liver Failure: A Report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepatology* 2011; 41: 805-812.

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Inao M, Nakayama N, **Mochida S**. A Possible Novel Genotype HBV Strain Developing Due to Recombination between Genotypes H and B Strains

Isolated from a Japanese Patient. *Hepatology* 2014; 44: 1130-1141

- (2) **Mochida S**, Takikawa Y, Nakayama N, Oketani M, Naiki T, Yamagishi Y, Fujiwara K, Ichida T, Tsubouchi H. Classification of the etiologies of acute liver failure in Japan: A report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepatology* 2014; Feb 17. doi: 10.1111/hepr.12295. [Epub ahead of print].
- (3) Harigai M, **Mochida S**, Mimura T, Koike T, Miyasaka N. The proposal for management of rheumatic disease patients with hepatitis B virus infection receiving immunosuppressive therapy. *Modern Rheumatology* 2014; 24: 1-7.

2. 学会発表

- (1) Nakayama N, Tsubouchi H, **Mochida S**. Clinical features and outcome of acute liver failure due to HBV infection in Japan. 11th JSH Single Topic Conference, 2014 Nov, Hiroshima.
- (2) Nakao M, Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Inao M, Nakayama N, **Mochida S**. Possible mutant nucleoside sequences in the polymerase region of HBV gene responsible for multi-drug resistance against nucleoside/nucleotide analogs. 11th JSH Single Topic Conference, 2014 Nov, Hiroshima.
- (3) Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Nakao 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. 11th JSH Single Topic Conference, 2014 Nov, Hiroshima.
- (4) Nakayama N, Tsubouchi H, **Mochida S**. The etiology, clinical features and outcome of acute liver failure in Japan. The Liver Meeting, AASLD, 2014 Nov, Boston.
- (5) 中尾将光, 内田義人, 中山伸朗, **持田智**, 溝上雅史. 免疫抑制療法による HBV 再活性化: 治療が長期に亘った場合の再活性化の実態. 第 50 回日本肝臓学会総会, 2014 年 5 月, 東京.

- (6) 中山伸朗, 内田義人, 持田 智. わが国における急性肝不全の実態から見た治療戦略の展望. WS-3「急性肝不全：予後向上を目指す新規治療法の展望」JDDW2014, 2014年10月, 神戸.
- (7) 中尾将光, 内田義人, 持田 智. 核酸アナログ多剤耐性のHBV変異株：新たな遺伝子変異の可能性. PD-2「B型肝炎の新展開」第40回日本肝臓学会東部会, 2014年11月, 東京.
- (8) 中山伸朗, 持田 智. 肝移植を実施した急性肝不全例における予後予測：新ス

コアリング法と決定木法での評価. W-1「急性肝不全の内科的治療と肝移植のup to date」第40回日本肝臓学会東部会, 2014年11月, 東京.

H. 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

図1. 急性肝不全, LOHFにおけるHBV感染 (2010~2013年 : 225例)

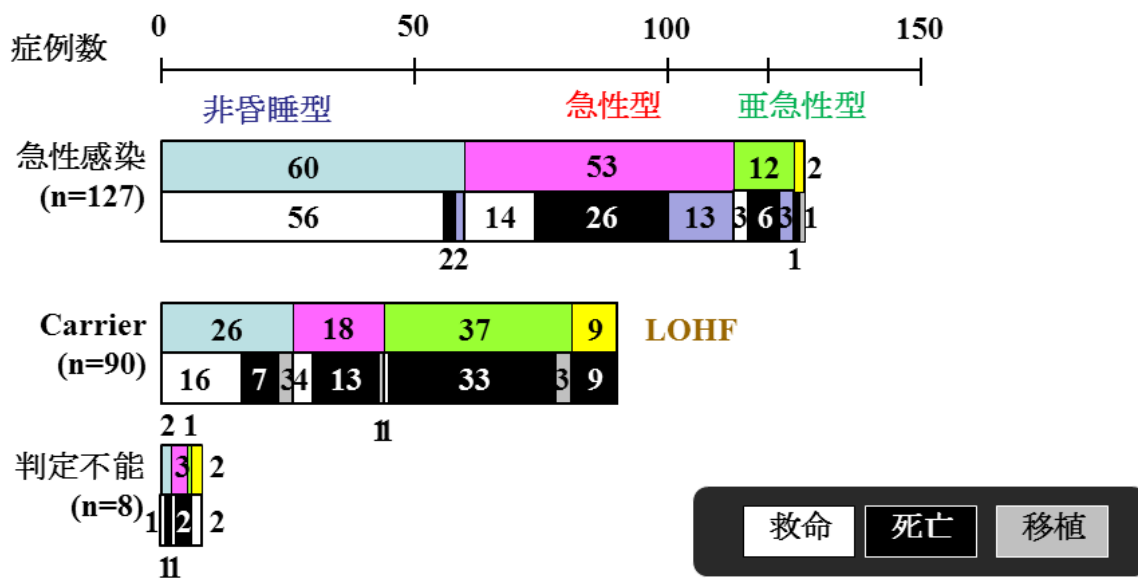


表1 B型急性肝不全, LOHF (2010~2013年 : 225例)

	病 型				感染形式	
	非昏睡型 (n=88)	急性型 (n=74)	亜急性型 (n=52)	LOHF (n=11)	急性感染 (n=127)	キャリア (n=90)
臨床像 (¹ 症例数 ² 平均 ± SD, ³ %) *p<0.05 vs 非昏睡方 & 急性型, #p<0.05 vs 急性感染						
男 : 女 ¹	48 : 40	45 : 29	30 : 22	10 : 1	71 : 56	57 : 33
年齢 ²	45.3 ± 17.3	48.7 ± 15.7	61.4 ± 13.9*	68.1 ± 14.3*	43.9 ± 14.7	61.2 ± 15.7#
キャリア ³	29.5 (26/88)	24.3 (18/74)	71.2* (37/52)	81.8* (9/11)	0 (0/127)	100 (90/90)
基礎疾患 ³	34.5† (30/87)	58.3 (42/72)	65.4* (34/52)	81.8* (9/11)	35.5 (44/124)	73.3* (66/90)
薬物歴 ³	41.2† (35/85)	51.5 (35/68)	70.8* (34/48)	70.0* (7/10)	40.8 (49/120)	66.7* (56/84)
救命率 (%)						
内科治療	88.0 (73/83)	28.3 (17/60)	8.7 (4/46)	0 (0/10)	67.6 (73/108)	37.3 (31/83)
肝移植	100 (5/5)	42.9 (6/14)	83.3 (5/6)	100 (1/1)	52.6 (10/19)	100 (7/7)
全 体	88.6 (78/88)	31.1 (23/74)	17.3 (9/52)	9.1 (1/11)	65.4 (83/127)	42.2 (38/90)

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：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
担当責任者：夏井坂 光輝 北海道大学病院 助教

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) Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, **Natsuizaka M**, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*. 2015. in press.
- (2) Vega ME, Giroux V, **Natsuizaka M**, Liu M, Klein-Szanto AJ, Stairs DB, Nakagawa H, Wang KK, Wang TC, Lynch JP, K Rustgi AK. Inhibition of Notch signaling enhances transdifferentiation of the esophageal squamous epithelium towards a Barrett's-like metaplasia via KLF4. *Cell Cycle*. 2014 Dec 15;13(24):3857-66.
- (3) Kinugasa H, Whelan KA, Tanaka K, **Natsuizaka M**, Long A, Guo A, Chang S, Kagawa S, Srinivasan S, Guha M, Yamamoto K, St. Clair DK, Avadhani NG, Diehl JA, Nakagawa H. Mitochondrial

SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*. 2014. In press.

- (4) Kagawa S*, **Natsuizaka M*** (* contributed equally), Whelan KA, Facompre N, Naganuma S, Ohashi S, Kinugasa H, Egloff AM, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Bass A, Wong K, Diehl JA, Rustgi AK, Nakagawa H. Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent oncogenic and tumor suppressor activities. *Oncogene*. 2014. In press.
 - (5) Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudou M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato G, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, **Natsuizaka M**, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N for the NORTE study group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reaction. *Hepatol Res*. 2014. In press.
 - (6) 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 EUS-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. *J Gastroenterol*. 2014. In press.
 - (7) Tsunematsu S, **Natsuizaka M**, Fujita H, Otsuka N, Terashita K, Sato F, Kobayashi T, Nakai M, Tsukuda Y, Horimoto H, Sho T, Suda G, Nakanishi M, Hashino S, Chuma M, Sakamoto N. Hepatosplenic Gamma-delta T-cell Lymphoma Associated with Epstein-Barr Virus. *Intern Med*. 2014. 2014;53(18):2079-82.
- ##### 2. 学会発表
- (1) **Natsuizaka M**, Kaimila B, Kubota Y, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Sato F, Ohnishi S, Suda G, Ohashi S, Kagawa S, Whelan K, Rustgi AK, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR

inhibitors eliminate esophageal cancer stem cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, May 3-6, 2014.

- (2) 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. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, May 3-6, 2014.
- (3) Whelan KA, Kagawa S, Guo A, **Natsuizaka M**, Kinugasa H, Ohashi S, Kita Y, Natsugoe S, Naganuma S, Klein-Szanto AJ, Amaravadi RK, Rustgi

AK, Nakagawa H. Autophagy regulates esophageal cancer stem cell phenotypic plasticity by targeting mitochondria and oxidative stress. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, May 3-6, 2014.

- (4) **Natsuizaka M**, Maehara O, Sato F, Kubota Y, Suda G, Itoh J, Tsunematsu S, Tsukuda Y, Terashita K, Nakai M, Sho T, Ogawa K, Ohnishi S, Sakamoto N. A pivotal role of KLF5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma. AASLD the LIVER meeting 2014. Boston, Nov 7-11, 2014.

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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施

担当責任者：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消化器内科 助教

研究要旨：(1) B型肝炎関連肝癌（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、問診および過去の診療記録により調査した。母親、同胞にHBV慢性感染が判明している例はそれぞれ43例（34%）、32例（26%）、HCC歴が判明している例は8例（7%）、9例（8%）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明らかではなかった。

(2) 当院当科の外来通院中の、肝細胞癌のない慢性B型肝炎患者の検体を収集中である。発癌例の検体は既に収集したため、現在は無症候性・無治療の例や、拡散アナログ製剤投与例など、比較的経過良好な例を対象としている。臨床検査値や治療内容と効果、家族歴の情報などとともに、網羅的遺伝子多型解析に提供する予定である。

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、致死的経過をたどるため、HBV関連肝疾患は今後も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。従来、HBV関連肝癌の発生には、家族歴が危険因子となることが指摘されていたが、未だ正確な実態は明らかではない。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家族歴ほかの臨床的因子や、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。また外来通院中の発癌歴のない慢性 HBV 感染患者をリストアップし、本研究への同意を得られた患者の検体を収集する。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

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 233 人の

うち、書面による同意が得られている 150 例余りの検体を抽出し、網羅的遺伝子解析に用いた。

さらに現在、外来通院中の、いわゆる無症候性キャリアや、核酸アナログ製剤内服中の比較的経過が良好である慢性 HBV 感染患者の検体を収集中であり(平成 26 年末時点で 30 検体を収集) 今後匿名化処理ののち網羅的遺伝子解析に用いる予定である。

B 型肝炎関連肝癌 (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、問診および過去の診療記録により調査した。母親、同胞に HBV 慢性感染が判明している例はそれぞれ 43 例 (34%)、32 例 (26%)、HCC 歴が判明している例は 8 例 (7%)、9 例 (8%) 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明らかではなかった。

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。

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、患者の同胞や両親の臨床情報を得るために、ほとんど患者本人の口述 (およびそれを医師が記載した過去の診療録) に頼るしかなく、正確な評価は予想以上に困難であった。基本的な問診の重要性を再認識する必要がある。

臨床において核酸アナログ製剤が広く用いられ、慢性 HBV 感染患者の肝線維化の進行や肝発癌が抑止されるようになってきた。将来、HBV 関連肝癌の病像、疫学は大きく変わる可能性が高い。その中で患者の家族歴の有無が例えば高発癌リスク例の囲い込みなどに一定の意義を持つか、今後も検討が必要である。

E. 結論

これまでの検討では家族歴の有無による発癌や生命予後への影響は明らかではなかった。

外来通院中の慢性 HBV 感染患者の検体を収集中であり、臨床情報を加え、今後の研究班における網羅的多型解析に用いる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, **Koike K.** Comparison of improved prognosis between hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2015 Jan 6. [Epub ahead of print]
- (2) Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, **Koike K.** Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014 Nov 14;9(11):e111662.
- (3) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, **Koike K.** Impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Oct;44(10):E137-44.
- (4) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, **Koike K.** Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2014 Oct;44(10):E32-7.
- (5) Fujiwara N, Tateishi R, Kondo M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Masuzaki R, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, **Koike K.** Cause-specific mortality associated with aging in patients with hepatocellular

- carcinoma undergoing percutaneous radiofrequency ablation. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Sep;26(9):1039-46.
- (6) Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, **Koike K.** Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb;30(2):379-88
- (7) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, **Koike K.** Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer*. 2014 Aug 15;135(4):871-9.
- (8) Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, **Koike K.** Slight elevation of high-sensitivity C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2014 Jul 29. [Epub ahead of print]
- (9) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, **Koike K.** Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget*. 2014 Jul 30;5(14):5581-90.
- (10) Tateishi R, Okanou T, Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, Kumada H, Hayashi N, **Koike K.** Clinical characteristics, treatment, and prognosis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a large retrospective multicenter cohort study. *J Gastroenterol*. 2014 Jun 15. [Epub ahead of print]
- (11) Kondo M, Ishizawa T, Enooku K, Tokuhara Y, Ohkawa R, Uranbileg B, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Kokudo N, **Koike K.** Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum autotaxin levels in hepatocellular carcinoma patients were caused by background liver fibrosis but not by carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2014 Jun 10;433:128-34.
- (12) Mikami S, Tateishi R, Hagiwara S, Sato M, Minami T, Uchino K, Enooku K, Sato T, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Ikeda H, Omata M, Yoshida H, **Koike K.** Tumor markers are more useful in patients undergoing surveillance for hepatocellular carcinoma with unreliable results by ultrasonography. *Hepatol Res*. 2014 May 26. [Epub ahead of print]
- (13) Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, **Koike K.** Yatomi Y, Ikeda H. Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 2014 May 22. [Epub ahead of print]
- (14) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Fushimi K, **Koike K.** Variceal hemorrhage: Analysis of 9987 cases from a Japanese nationwide database. *Hepatol Res*. 2014 May 14. [Epub ahead of print]
- (15) Nakagomi R, Tateishi R, Shiina S, Imamura J, Fujiwara N, Asaoka Y, Kondo Y, **Koike K.** Drastically reduced neoplastic seeding related to radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2014 May;109(5):774-6.
- (16) 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*. 2014 Apr;49(4):748-54.
- (17) 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. 2014 Mar;49(3):547-54.

- (18) 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. 2014 Feb;49(2):173-84.

2. 学会発表

- (1) 田中康雄, 立石敬介, 中塚拓馬, 工藤洋太郎, 浅岡良成, 伊地知秀明, 建石良介, **小池和彦** Sharpin promotes hepatocellular carcinoma invasion through transactivating Versican expression 第 7 3 回日本癌学会学術総会
- (2) 松野達哉, 島佑介, 南達也, 小田島慎也, 近藤祐嗣, 建石良介, 江頭正人, 桂正樹, 中井雄大, 大倉直樹, 赤羽正章, **小池和彦** 超音波パルスドプラ法が診断に有用であった、肝芽腫術後・放射線化学療法後に肝静脈狭窄および門脈圧亢進症をきたした症例 第 21 回日本門脈圧亢進症学会
- (3) 山敷宣代, 菅原寧彦, 田村純人, 金子順一, 富樫順一, 田中智大, 野尻佳代, 青木琢, 阪本良弘, 長谷川潔, **小池和彦**, 國土典宏 肝移植後長期における移植肝臓内科医の役割 第 50 回日本移植学会総会
- (4) 浅岡良成, 田中康雄, 建石良介, **小池和彦** 肝臓における Hippo シグナルの役割に関する検討 第 50 回日本肝臓学会
- (5) 建石良介, 岡上武, 沖田極, 清澤研道, 小俣政男, 熊田博光, **小池和彦** 本邦の非 B 非 C 肝臓における NASH/NASH 近縁疾患の実態 第 50 回日本肝臓学会
- (6) 中川勇人, 前田慎, 平田喜裕, **小池和彦** 肝臓の恒常性維持・発癌における接着因子 E-cadherin の役割 第 21 回肝細胞研究会
- (7) 内野康志, 建石良介, 南達也, 佐藤雅哉, 榎奥健一郎, 中川勇人, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一郎, **小池和彦** B モードで検出困難な肝腫瘍に対するソナゾイド造影超音波下ラジオ波焼灼術 日本超音波医学会総会第 87 回学術集会
- (8) 佐藤雅哉, 加藤直也, **小池和彦** C 型肝臓に対するラジオ波焼灼術後の再発、予後に対する MICA、DEPDC5、IL28B、PNPLA3 遺伝子多型の意義の検討 第 50 回日本肝臓学会総会
- (9) 建石良介, 四柳宏, **小池和彦** C 型肝炎に対する DAA を用いた治療戦略 C 型慢性肝炎に対するテラプレビル / PEG-IFN 2b/リバビリン 3 剤併用療法の有効性 第 50 回日本肝臓学会総会
- (10) **小池和彦**, 小西弘記, 長岐為一郎 ウイルス排除と肝発癌抑止を目指した B 型肝炎治療戦略 GSK548470(テノホビルジソプロキシルフルマール酸塩:TDF)の核酸アナログ製剤未治療の代償性 B 型慢性肝疾患(CHB)に対する第 III 相臨床試験(48 週中間集計) 第 50 回日本肝臓学会総会
- (11) 近藤祐嗣, 近藤真由子, 中込良, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 内野康志, 榎奥健一郎, 中川勇人, 浅岡良成, 建石良介, 椎名秀一郎, **小池和彦** 肝臓に対する局所療法成績向上のための工夫(技術認定を含めて) 経皮的ラジオ波焼灼術の成績向上のための技術的工夫 第 50 回日本肝臓学会総会
- (12) 大塚基之, 大野元子, **小池和彦** 肝炎ウイルスに対する創薬研究 抗ウイルス補助療法としての臨床応用を見ずえたフラボノイドによる microRNA の成熟阻害を利用した C 型肝炎ウイルス増殖抑制効果について 第 50 回日本肝臓学会総会
- (13) 中川勇人, 前田慎, 平田喜裕, **小池和彦** 自己免疫性肝臓の病態と治療をめぐる問題点 肝臓、特に胆管上皮細胞における E-cadherin 欠失は、硬化性胆管炎を惹起する 第 50 回日本肝臓学会総会

- (14) 佐藤雅哉, 近藤真由子, 建石良介, 加藤直也, 吉田晴彦, **小池和彦** C型肝炎における肝線維化進展をどう評価し治療するか IL28B SNPがC型慢性肝炎患者における肝線維化・炎症・脂肪化に与える影響 メタアナリシスによる検討 第50回日本肝臓学会総会
- (15) 内野康志, 建石良介, 中川勇人, 中込良, 近藤真由子, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 榎奥健一郎, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 吉田晴彦, 椎名秀一朗, 柴原純二, **小池和彦** 肝障害における金属元素の役割 肝細胞癌に対するラジオ波焼灼術後再発危険因子としての血清フェリチン値 第50回日本肝臓学会総会
- (16) 室山良介, 後藤覚, 松田浩一, 田中靖人, 茶山一彰, 溝上雅史, 小俣政男, **小池和彦**, 加藤直也 肝疾患における自然免疫の役割 最新知見と今後の展開 腫瘍自然免疫を司るMICAのB型およびC型肝炎における役割 第50回日本肝臓学会総会
- (17) 四柳宏, 渡邊嘉行, 山本博幸, 平石哲也, 及川律子, 山田典栄, 森屋恭爾, 伊東文生, **小池和彦** B型肝炎細胞癌における組み込みの意味 第50回日本肝臓学会総会
- (18) 鈴木義之, 小西弘記, 長岐為一郎, **小池和彦**, 熊田博光 GSK548470(テノホビルジソプロキシルフマル酸塩:TDF)の他剤効果不良の代償性B型慢性肝疾患(CHB)に対する第III相臨床試験(48週中間集計) 第50回日本肝臓学会総会
- (19) 建石良介, 岡上武, **小池和彦** 非B非C肝癌の背景としてのアルコール性肝障害/NASHの実態 第50回日本肝臓学会総会
- (20) 藤原直人, 建石良介, **小池和彦** 血清酸化ストレスマーカーd-ROMsはNAFLD患者における肝炎マーカーになりうる 第100回日本消化器病学会総会
- (21) 佐藤雅哉, 建石良介, **小池和彦** 肝細胞癌のラジオ波焼灼術後の再発・予後を予測するノモグラムの開発 第40回日本肝臓学会東部会
- (22) 藤原直人, 建石良介, **小池和彦** C型慢性肝炎患者の発癌予測においてファイブプロスキャンは血小板数、APRI、FIB-4よりも優れたマーカーである 第40回日本肝臓学会東部会
- (23) 榎奥健一郎, 奥新和也, 藤永秀剛, 堤武也, 森屋恭爾, 四柳宏, **小池和彦** 糖尿病患者での肝線維化進展症例スクリーニング 第29回日本糖尿病合併症学会
- (24) 佐藤雅哉, 建石良介, 康永秀生, 吉田晴彦, **小池和彦** 診断群分類包括評価(Diagnosis Procedure Combination;DPC)データベースから見た我が国における肝硬変患者に対する外科的治療後の院内死亡率に関わる因子の検討 第22回日本消化器関連学会週間
- (25) 大野元子, 大塚基之, **小池和彦** NAFLD/NASHの病態解析と新規治療 アピゲニン摂取によるmiRNA103の発現低下を介したNASHの病態改善効果 第22回日本消化器関連学会週間
- (26) 内野康志, 建石良介, 中川勇人, 近藤真由子, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 榎奥健一郎, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一朗, 柴原純二, **小池和彦** 肝細胞癌に対するラジオ波焼灼術後再発危険因子としての血清フェリチン値 第22回日本消化器関連学会週間
- (27) 高田朱弥, 大塚基之, **小池和彦** 肝癌の予防・制御をめざすB型肝炎の治療戦略 HBs抗原に依存した肝発癌機序の解明と発癌予防法の開発 第22回日本消化器関連学会週間
- (28) 南達也, 建石良介, **小池和彦** 明日の肝癌診療のためのバイオマーカーの探索 C型肝炎ウイルス駆除後の発癌サーベイランスにおけるAFPの有用性の検討 第22回日本消化器関連学会週間
- (29) 建石良介, 岡上武, **小池和彦** NBNC肝がんの諸問題 糖尿病治療内容が非B非C肝癌発癌年齢に与える影響 第22回日本消化器関連学会週間
- (30) 浅岡良成, 御子柴直子, **小池和彦** 進行

肝癌の集学的治療 予後とQOLの観点から ソラフェニブ長期投与が可能であった肝細胞癌症例のQOLに関する検討 第22回日本消化器関連学会週間

(31) 藤原直人, 建石良介, 小池和彦 高齢者肝疾患の最適医療 個別化医療の工夫 肝細胞癌患者においてサルコペニアは年齢よりもより強い予後予測因子である 第22回日本消化器関連学会週間

(32) 近藤真由子, 建石良介, 中込良, 藤原直人, 佐藤雅哉, 南達也, 内野康志, 榎奥健一郎, 中川勇人, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一郎, 小池和彦 AFP10ng/mL未満かつL3分画高値を呈する肝細胞癌の特徴 第22回日本消化器関連学会週間

(33) 中込良, 建石良介, 三神信太郎, 近藤真由子, 藤原直人, 佐藤雅哉, 南達也, 内野康志, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一郎, 小池和彦 経皮的ラジオ波焼灼術における予防的抗菌薬投与に関する前向き試験 第22回日本消化器関連学会週間

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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発

業務項目：大規模な検体および臨床情報収集とヒト肝由来初代培養細胞ストックの作成
担当責任者：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

研究要旨：HBV感染肝細胞癌（HCC）の予後決定因子を探索するためには診療情報と組織、血液のセットが必要である。われわれが蓄積した試料と臨床応報はHCC切除801例（43例）、転移性肝腫瘍214例（21例）、良性疾患13例（1例）であり（括弧内は26年4月から27年2月に追加された症例数）。HCC初回切除症例の肝炎ウイルス感染の状況は、HBV(+)361例、HBV/HCV両方(+)15例、HBV/HCV両方(-)215例であり、ゲノム網羅的解析に使用可能な検体が順調に集積された。

肝細胞におけるHBV感染の病態を増悪させる因子を同定するためには、種々の遺伝子多型、遺伝子修飾を内包するヒト肝細胞リソースが必要である。ラット細断肝組織を用いて初代培養の条件を検討し、ヒト切除肝組織からの初代培養が可能となった。実際にHBV感染症例で初代培養が可能であった。生細胞の回収率は術中の温阻血時間に依存するため、虚血時間が短い外側区切除が良い適応と考えられた。また、組織片を新規臓器修復・保存液に浸漬し、低温～室温で酸素化し、修復した後に培養することで、生細胞の回収率が改善できる可能性が示唆された。

ラット、ヒト、何れにおいても成熟肝細胞を3か月以上維持し得た。また、線維芽細胞をフィーダーとして増殖する幼若細胞を見出した。現時点では完全な細胞同定には至っていないが、肝細胞への分化誘導が期待される、肝芽細胞、小肝細胞、組織幹細胞である可能性もあり、今後も解析を継続する。この細胞と線維芽細胞は凍結融解、再培養が可能であり、ほぼ無限に増殖可能であることが示された。線維芽細胞から直接肝細胞を誘導するprotocolも報告されており（i-Hep）、小肝細胞、肝芽細胞からの肝細胞誘導の可能性も考慮すると、HBV感染肝細胞を必要な時に必要なだけ供給できる系を確立するための、基礎的な知見が得られたと言える。

A. 研究目的

1. HBV 感染肝細胞癌の予後決定因子を探索するために必要な検体および臨床情報のデータセットを確立し、他の肝炎ウイルス感染あるいは肝炎ウイルス非感染例との臨床像の相異を明らかにする。また、HBV 感染における線維化、癌化のリスク因子となる宿主因子、あるいは、ウイルス因子を探索するために、ゲノム網羅的解析に使用可能な検体の収集状況を明らかにする。

2. 肝細胞における HBV の感染、増殖、炎症、

線維化、癌化の病態を増悪させる因子を同定し、新規治療を開発することを目指し、種々の遺伝子多型、遺伝子修飾を内包するヒト肝細胞リソースを構築する。

B. 研究方法

1. 組織バンク登録症例のチェック

北海道大学消化器外科 では患者に書面で同意を得たうえで、切除組織を癌部、非癌部に分けて、凍結組織、OCT 包埋凍結組織、ホルマリン固定パラフィン包埋組織、血清、臨床情報（予後；生存・再発）を保管

してきた。

登録症例総数、肝疾患症例数、疾患別症例数、肝細胞癌の内訳（ウイルス感染）、H26年4月から27年2月までに追加された症例数、を検証した。

2. 切除肝組織からの初代培養

A) ラット肝を用いた検討

常法の如く門脈から脱血、コラゲナーゼ灌流後に、低速遠心、比重遠心、磁気ビーズ抗体による positive selectionなどを併用して肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、星細胞を分取、培養した。次にラット切除肝組織からの初代培養を模倣した操作を行った。

非脱血細断組織を自作の冷蔵臓器保存液で洗浄し、可及的に脱血後、コラゲナーゼ、プロナーゼ、DNaseIの混合液で消化、分散し、以下は同様に処理した。

B) ヒト肝切除症例における初代培養

肝炎ウイルス非感染症例を中心に初代培養のシステムを構築した。

インフォームドコンセントの下、肝切除直後に非癌部肝組織を3mm角程度に切り出した。直ちに自作の冷蔵臓器保存液で洗浄、脱血後、コラゲナーゼ、プロナーゼ、DNaseIの混合液でラット肝組織の処理と同様に消化、分散した。

数種類の培養液、培養条件を組み合わせ、磁気ビーズ抗体による線維芽細胞の除去、等を行い、線維芽細胞が少ない条件下で増加する細胞選別し、最長5か月にわたって継代培養し、細胞の同定を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究の全ての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2008年10月修正）」、「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針）」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（厚生科学審議会答申、平成10年12月16日）、に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会の承認の下に実施

した。

書面による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、個人情報等を厳格に管理した。

なお、今後の研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成26年11月25日、一部改正、厚生労働省）、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成26年12月22日、文部科学省、厚生労働省）、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ガイダンス（平成27年2月9日、文部科学省、厚生労働省）に準拠して研究を遂行する。

C. 研究結果

1. 組織バンク登録症例のチェック

これらの登録症例総数は4707例であった。そのうち、肝切除症例は1199例（79例）であり、内訳は肝細胞癌切除801例（43例）、胆道癌171例（14例）、転移性肝腫瘍214例（21例）、良性疾患（肝エキノコックス症、血管腫など）13例（1例）、であった（括弧内は26年4月から27年2月までに追加された症例数）。

肝細胞癌初回切除症例の肝炎ウイルス感染の状況は、HBV(+)361例 [B]、HCV(+)210例 [C]、HBV/HCV両方(+)15例 [BC]、HBV/HCV両方(-)215例 [NBNC]であった。

2. 切除肝組織からの初代培養

A) ラット肝を用いた検討

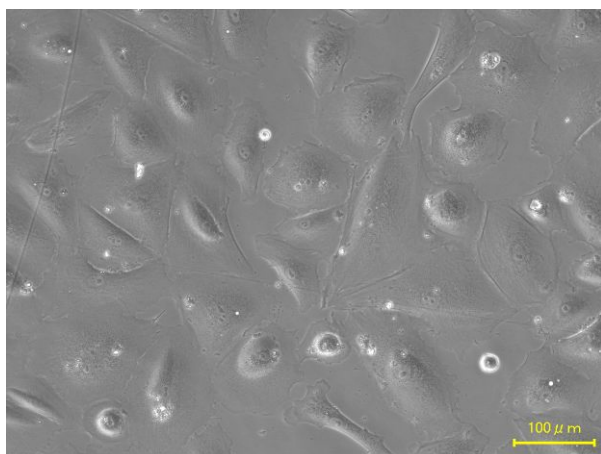
何れの方法でも4種類の肝構成細胞と線維芽細胞の培養が可能であった。培養の経過中に血清濃度、DMSO、添加因子を変えることによって、小型で旺盛に増殖する細胞コロニーを選択的に増やすことが可能であった。この小型の増殖細胞は添加因子や線維芽細胞の除去によって増殖が減速し、様々な大きさとなり、不均一な細胞集団を形成した。

B) ヒト肝切除症例における初代培養

温阻血が2時間を超えた症例では生細胞は回収できなかった。成熟肝細胞の回収率は背景肝の障害の程度と血流遮断時間に規

定されると考えられた。HBV 感染肝からの初代培養も可能であった。また、ラットでの知見と同様に、培養の経過中に血清濃度、DMSO、添加因子を変えることによって、細胞が小型化し、旺盛に増殖する条件を見出した（写真上）。

小型細胞のコロニーの中心を擦過して細胞を除去すると、24-48 時間で元の細胞よりも大型の細胞で埋め尽くされた（写真下）。これらの結果から、ヒト肝の初代培養系においても、ほぼ無限に増殖させることができる細胞集団が得られる条件があり、その細胞が培養条件によって異なる細胞形態に分化することが確認できた。肝芽細胞、小肝細胞から種々の成熟度の肝細胞への分化を観察したものと推測している。



D. 考察

組織バンク登録症例のチェック

肝細胞癌患者におけるウイルス感染の有無、種類による病理所見、予後、あるいは、背景肝組織の病態進展等を解析するに資する試料が既に収集されており、本年度も順調に症例を蓄積している。新規に集積された症例は観察期間が短いので、早期再発した症例のみが本研究に使用されることになる。

集積された試料は、本研究の主な解析対象である HBV 感染肝細胞癌はもとより、種々の比較が可能である。具体的には、a) 感染ウイルスによる相異、b) ウイルス非感染肝細胞癌症例との比較、c) 大腸癌肝転移症例との比較、d) 良性肝疾患との比較、により、各群における癌部、非癌部肝組織、血球由来 genomic DNA を比較することが可能である。さらには、他臓器の癌と肝細胞癌におけるゲノム修飾の相異も比較可能である。これらの網羅的比較解析と臨床情報（病理、予後、治療、抗癌剤耐性等）を多変量解析することにより、新たな予後因子、治療標的分子を同定し、新規治療法の開発に結実することが大いに期待される。今後さらに肝切除症例の組織、血清検体収集、予後追跡を行う予定である（登録症例の追加と予後調査期間の延長）。

切除肝組織からの初代培養を目指した検討

ラット肝組織片、ヒト切除肝組織からの初代培養が可能であった。ヒト切除肝組織は血流遮断による温阻血障害と引き続く低温・低酸素、培養手技における復温、プロテアーゼ消化、遠心、再酸素化等のストレスが累積されるため、温阻血時間が比較的短い外側区切除が第一選択と考えられた。しかし、温阻血障害の程度は温阻血時間と肝臓の状態（ウイルス感染、線維化、脂肪化）の程度が大きく影響するので、温阻血時間が短くても障害が強い場合もあり、症例の選択は難しい。

われわれはまず、ラットの細断肝組織片で条件を検討し、続いてウイルス非感染症例のヒト切除肝組織で検討した。組織片を

新規臓器修復・保存液に浸漬し、低温～室温で酸素化し、修復した後に培養することで、生細胞の回収率が増加する傾向があった（厳密な数的な比較はしていない）。

ラット、ヒト、何れにおいても、成熟肝細胞を単離培養は可能であり、3か月以上細胞を維持し得たが、殆ど増殖しなかった。一方、培養後3-4週間から急速に増殖する小型細胞が存在し、線維芽細胞をフィーダーとして増殖する幼若細胞と推測された。肝芽細胞、小肝細胞、Oval cellなどと称される細胞と推測されるが、現時点では完全な細胞同定には至っていない。

切除肝組織から肝細胞、肝芽細胞（小肝細胞）を初代培養し凍結細胞ストックを作成するための基礎的検討を引き続き行う。HBV感染肝細胞を必要な時に必要なだけ供給できる系を確立するための重要な知見が得られたと考えている。

E. 結論

1. HBV感染肝細胞癌の予後決定因子を探索するために必要な検体およびデータセットがほぼ確立され、ゲノム網羅的解析に使用可能な検体が順調に集積されている。

2. ヒト切除肝組織からの初代培養が可能となり、肝細胞源となることが期待される幼弱細胞の増殖が可能になった。

F. 研究発表

1. 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) Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Orimo T, Wakayama K, Kamachi H, Tsuruga Y, Yamashita K, Shimamura T, Todo S, **Taketomi A**. Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by

vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatol Res*. 2014 Nov 10.

- (3) Alam MT, Nagao-Kitamoto H, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, **Taketomi A**, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*. 2014 Oct 5. doi: 10.1111/cas.12549.
 - (4) Sakai H, Kado S, **Taketomi A**, Sakane F. Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels. *J Biol Chem*. 2014 Sep 19;289(38):26607-17. doi: 10.1074/jbc.M114.590950. Epub 2014 Aug 11.
 - (5) 若山 顕治, 神山 俊哉, **武富 紹信**.【最新の消化器癌術前術後化学療法】肝細胞癌 消化器外科 (0387-2645)37巻4号 Page447-455(2014.04)
- ### 2. 学会発表
- (1) Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, **Akinobu Taketomi**. Fatty Acid Binding Protein 5 Indicates Poor Prognosis Through Epithelial-Mesenchymal Transition In Hepatocellular Carcinoma International Liver Cancer Association 8th Annual Conference, Kyoto Japan, September 5-7, 2014
 - (2) Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, **Akinobu Taketomi**. Clinical significance of Fatty Acid Binding Protein 5 in hepatocellular carcinoma The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, September 25-27, 2014
 - (3) Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, **Akinobu Taketomi**. Fatty Acid Binding Protein 5 promotes

tumor progression through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma AASLD2014, Boston USA, November7-11, 2014

- (4) **武富紹信**：「肝癌に対するこれからの外科治療」。東北肝疾患研究会、2014年2月18日、福島、特別講演（第一三共）
- (5) **武富紹信**：「肝細胞癌に対する分子標的治療～外科医はどう使いこなすか～」。第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、京都、ランチョンセミナー（バイエル薬品）。
- (6) 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、**武富紹信**「肝細胞癌におけるFABP5の新規バイオマーカーとしての有用性」第114回日本外科学会定期学術集会、京都4月3-5日、2014
- (7) **武富紹信**：「HCCに対する肝移植後管理」。第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月11日、和歌山、教育セミナー。
- (8) **武富紹信**：「データベース報告：NCDデータに基づいた肝切除術におけるリスク評価」。第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山、パネルディスカッション。

- (9) **武富紹信**：「肝胆膵がん」。第52回日本癌治療学会総会、2014年8月28日、横浜、Meet in PAL。
- (10) **武富紹信**：「肝胆膵癌の標準治療」。第52回日本癌治療学会総会、2014年8月29日、横浜、教育セッション。
- (11) **武富紹信**：「急性肝不全に対する肝移植の適応とタイミング」。第52回日本人工臓器学会大会、2014年10月19日、札幌、教育講演。
- (12) 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、**武富紹信**「FABP5はEMTを介し肝細胞癌の進展を促進する」第25回日本消化器癌発生学会総会/第8回国際消化器癌発生会議、福岡11月13-14日、2014

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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：ウイルス因子の解析

担当責任者：脇田隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

研究協力者：杉山真也 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 主任研究員

研究協力者：新井 理 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 客員研究員

研究要旨：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、全国規模で収集した詳細な臨床情報を伴う検体を用いて、大規模なゲノム多型・変異解析を実施する。また HLA-DP について大規模な関連解析を実施すると共に、HLA 分子および新規標的分子に対して、機能解析とともに、大規模化合物ライブラリーを用いた創薬シーズの探索を実施する。更にウイルスゲノムの解析を実施し、宿主遺伝要因とウイルス因子間の相互作用についても解析する。このなかでウイルス因子の解析を実施する。

A. 研究目的

HBV 感染による病態の進展には、ある特定の HLA-DP 型が関連していることが明らかとなっている。複数の施設から、慢性肝炎の発症や肝発癌との関連が報告されているが、そのオッズ比は 2 倍前後であるため、臨床応用には至っていない。

そこで、特定の HLA-DP 型が認識する相手である HBV 側の抗原配列を同定し、HLA 型と抗原配列の組み合わせを考えることによって、病態発症や進展の予測精度を向上させることを最終的な目的とする。

病態発症機序は様々な仮説をたてることができるが、HLA に結合するペプチド配列が、体内でメジャーな集団を形成するウイルス配列を認識する、もしくは認識できないことで病態発症する可能性が考えられる。また、マイナー集団を形成するウイルス配列であっても、HLA が認識もしくは、非認識となることで病態発症へと至る可能性がある。

これらの機序を検討するために、まずは各病態に特有なアミノ酸変異もしくは、ペ

プチド配列を明らかとする必要がある。それにより、HLA とアミノ酸変異を組み合わせることで、より精度の高い予後予測を目指す。

B. 研究方法

HLA-DPB1*02:01 をホモで持つ患者検体を抽出し、それらを慢性肝炎群（CH）と肝癌群（HCC）に分類した。各群について 11 例で、年齢を中央値で有意差がない二群を取り出した。HBV のシーケンスのために、PreS1, S2, S をカバーするプライマーセットで PCR 増幅を行った。その後、得られた産物を GS Jr. でディープシーケンスを実施した。シーケンスデータについては、アライメントまでを BWA-mem で実施し、その後のアミノ酸変換は、in house の解析システムの構築を行った。得られた多数のアミノ酸配列について、ケース（HCC）とコントロール（CH）でそれぞれにデータを一つに集約した上で、比較解析を行い、各病態に特有のアミノ酸を抽出した。

(倫理面への配慮)

使用した血清は、いずれも各施設で倫理承認済みの同意書を用いて同意を得られたものである。検体収集時に連結可能匿名化され、保管されている。解析に際しては、患者の個人情報研究者らに知られることはない。

C. 研究結果

解析手法の確立を行った。次世代シーケンサーにより得られた配列を、HBVのリファレンス配列に従ってアライメントし、その状態を保持したまま、HBVの持つ遺伝子のコドン単位に従って、アミノ酸に変換するシステムの構築を行った。それによって、GSJr で得られた合計数十万リードを対象にアミノ酸変異を抽出できるようにした。

解析基準については、シーケンス結果を元に、各サンプルで各サイトの depth が 100 以上の場合とした。アミノ酸のバリエーションについては、出現頻度が 5%以上のものを採用した。解析に際しては、ケースとコントロールの各群に属する 11 検体を一つにまとめたリードファイルを作成して、アミノ酸のバリエーションを算出した。

アミノ酸で観察した際に、そのコドンサイトの最頻出アミノ酸がケースコントロール間で異なる場合は、メジャー変異と定義した。また、最頻出アミノ酸がケースとコントロールで同じであるが、マイナーな存在のアミノ酸に違いがある場合は、そのコドンサイトにマイナー変異があるものと定義した。その結果、ケースとコントロールを比較した場合に、HBs 抗原のアミノ酸領域の 1-400 番まででは、観察されたほとんどのアミノ酸位置はマイナー変異を有していた (92 箇所)。一方で、5 箇所では、メジャー型の変異があった。401 番以降については、現在解析を進めているところである。

D. 考察

今回の解析で、HBs 抗原領域のアミノ酸変異のバリエーションとその病態ごとの違いについて明らかとした。一方で、宮寺班

員が HLA-DPB1 へ結合する代表的な HBs 抗原のペプチド配列の探索を行っており、HLA-DPB1*02:01 へ結合するペプチド配列を幾つか同定しつつある。それらのデータとあわせることで、今回ターゲットとしている HLA-DPB1*02:01 に結合する HBV のペプチド配列を明らかにできる。また、その配列中にあるアミノ酸の変異が HLA との結合に与える影響と実際の臨床的な病態と関連することを示せる可能性があるため、来年度以降では、共同して解析を進めていく。

E. 結論

HBs 抗原領域のアミノ酸配列のバリエーションと病態間で違いのあるアミノ酸変異を抽出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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 NTCP Expression. *J Biol Chem*. 2014 Dec 30. pii: jbc.M114.602540. [Epub ahead of print]
- (2) Ogura N, Watashi K, Noguchi T, **Wakita T**. Formation of covalently closed circular DNA in Hep3B-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 26;452(3):315-21.
- (3) 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*. 2014 May;59(5):1726-37. PMID:24375637.

2. 学会発表

- (1) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokamai M, **Wakita T**. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and ITS application to drug development. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- (2) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, **Wakita T**. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- (3) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, **Wakita T**. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- (4) **Wakita T**, Ogura N, Hussein A, Watashi K. Novel target molecules for HBV drug development. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014
- (5) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, **Wakita T**. Retinoic acid receptor plays an important role in mediating hepatitis B virus infection through regulation of NTCP expression. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014
- (6) Aly H, Chayama K, **Wakita T**. SKIV2L helicase suppress HBV replication in interferon independent manner. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014
- (7) **Wakita T**. HBV entry inhibitors, 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Taipei(Taiwan), Jan, 2015
- (8) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、**脇田隆字**。HBV 感染受容体 NTCP の発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗 HBV 効果。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- (9) 渡士幸一、相崎英樹、**脇田隆字**。培養系を用いた抗 B 型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- (10) 岩本将士、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、**脇田隆字**。効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- (11) Hussein Aly、渡士幸一、茶山一彰、**脇田隆字**。The identification of a new interferon -independent host mechanism suppressing Hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- (12) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、杉山真也、田中靖人、溝上雅史、**脇田隆字**。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- (13) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本 徹、松浦善治、黒田俊一、**脇田隆字**。遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- (14) 渡士幸一、Sluder Ann、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、

鈴木亮介、相崎英樹、Borrito-Esoda
Katyna、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、
溝上雅史、**脇田隆字**。B 型肝炎ウイルス (HBV) large S タンパク質と NTCP
の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。
第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横
浜、2014 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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：HLA 等機能解析

担当責任者：宮寺浩子 国立国際医療研究センター 上級研究員

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染者の約10%は慢性B型肝炎を発症するが、その発症機序は不明である。近年、ヒト白血球抗原(HLA)クラスIIのHLA-DPとB型肝炎慢性化との強い関連が報告された。この知見はHLA-DPを介したヘルパーT細胞(Th細胞)応答がB型肝炎慢性化進行・抑制に関与することを示唆するが、HLA-DPが提示するHBV抗原ペプチドは不明である。本分担研究では、B型肝炎慢性化におけるHLA-DPタンパク質の機能を明らかにすることを目的として、HLA-DPに結合するHBV抗原ペプチドを探索した。

A. 研究目的

近年、HLA-DP (HLA クラス II)と B 型肝炎慢性化・ウイルス排除との強い関連が日本・韓国・香港・タイ・中国人集団で報告された(Kamatani et al. 2009 Nat Genet) (Nishida et al. 2013, 2014; Chang et al. 2014; Posuwan et al. 2014; Miki et al. 2014 全て PlosOne)。慢性化抑制アレル DP0402 はワクチン応答性とも強く関連する(Wu et al. 2013 Hum Genet)。慢性化進行アレル DP0501、DP0901 は HBV 罹患率が高い東アジア地域で高頻度に存在する(日本人の半数以上が DP0501 又は DP0901 を持つ)。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。本研究では、B 型肝炎ウイルス(HBV)感染防御・慢性化における HLA-DP の機能を明らかにするため、HLA-DP に提示される HBV 抗原ペプチドを in vitro MHC-ペプチド結合測定系により探索した。

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 アレル、および、関連を示さない中立性アレル(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、哺乳類繊維芽細胞株で発現した。HLA タンパク質 サブユニット C 末端に His タグを付加し、安定発現株の界面活性剤可溶性分画を NTA-Ni コートプレート上でインキュベートし、HLA タンパク質をプレート上に固定した。HBs 抗原、HBc 抗原全長についてビオチン標識ペプチドライブラリーを作製し、HLA-DP に結合するウイルス抗原ペプチドを探索した。

(倫理面への配慮)

該当なし(本研究に使用したヒト由来のサンプル(HLA-DP cDNA)は細胞株に由来するものであるため)。

C. 研究結果

これまでに主要 HLA-DP アレルの組換えタンパク質発現系を構築し、HLA-ペプチド結合測定系(Chen, et al. 未発表)を確立した。今年度は、この測定系を用いて HBV 表面抗原(HBs)、コア抗原(HBc)のペプチドライブラリー(ペプチド 63 種類)について HLA-ペプチド結合解析を行った。その結果、慢性化抑制アレル DP0402 に特異的に結合

する高親和性ペプチド3種、慢性化進行ア
リル DP0901、中立アリル DP0301 に弱く結
合する低親和性ペプチド1種類を見出した
(いずれも未発表)。

D. 考察

慢性 B 型肝炎抵抗性と関連を示す
HLA-DP0402 が特異的に結合する HBs, HBc
抗原領域が、HBs, HBc 抗原タンパク質中に
複数同定された。これらの抗原ペプチド領
域は、DP0402 を介したウイルス排除、中和
抗体産生などの獲得免疫応答に実際に関与
する可能性がある。来年度以降は、この点
を明らかにすることを目標としてさらに研
究を進める。

E. 結論

慢性 B 型肝炎感受性及び抵抗性に関連す
る HLA-DP アリルを対象として、HLA-DP
結合抗原ペプチドを HBs, HBc 抗原ペプチ
ドライブラリーから探索した。その結果、
慢性 B 型肝炎抵抗性 HLA-DP アリル特異的
に結合するウイルス抗原領域を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- (1) 岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、**宮寺
浩子**、徳永勝士、溝上雅 HLA-DP 提示
B 型肝炎ウイルス抗原の網羅的探索 日
本組織適合性学会第 23 回大会 2014 年
9 月 14 日 長崎
- (2) **宮寺浩子**、岡部由紀、Cindy Chia-Jung
Chen、徳永勝士、溝上雅史 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 59 回日本人類遺伝学会
第 21 回日本遺伝子診療学会 合同大会
2014 年 11 月 22 日 東京
- (3) 岡部由紀、Cindy Chia-Jung Chen、**宮寺浩
子**、徳永勝士 Screening and identification
of HBV antigens that can be presented to
HLA-DP 第 43 回日本免疫学会学術集会
2014 年 12 月 11 日 京都

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

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：HLA 等機能解析

担当責任者：北海道大学薬学研究院 教授 前仲 勝実

研究要旨：GWAS解析により肝炎ウイルス持続感染・癌化との有意な関連が報告された遺伝子産物について、組換えタンパク質を用いて、関連多型による機能・構造変化を解析するとともに、化合物スクリーニングによる機能制御可能な候補分子の同定を行うことを目的とする。今年度は、HLAを含む新規創薬候補遺伝子産物に対して、化合物スクリーニングを行う上で有効と想定される示差走査蛍光測定法および示差走査熱量分析法を用いた評価系について検討した。現在遺伝的解析により有意な関連が検出されているHLAをまずは対象として、化合物スクリーニング系の検討を進めた。その結果、HLAクラスI組換えタンパク質はいずれの手法でも分子の変性点が複数あるものの、測定条件の最適化を行えば、スクリーニングの系として用いることが可能であることがわかった。今後はこれらの系の最適化および新規候補遺伝子について同様に解析を進める予定である。

A. 研究目的

HLA を含む GWAS 解析により肝炎ウイルス持続感染・癌化との有意な関連が報告された遺伝子産物について、組換えタンパク質を調製し、関連多型による機能・構造変化を解析するとともに、化合物スクリーニングによる機能制御可能な候補分子の同定を行う。

B. 研究方法

遺伝的解析から関連が検出された HLA を含む新規創薬候補遺伝子産物に対して、化合物スクリーニングを行う上で有効と想定される複数のスクリーニング手法の確立を試みた。具体的には、当研究室において多用している表面プラズモン共鳴法に加え、示差走査熱量分析法、示差走査蛍光測定法を用いた評価系について検討した。

（倫理面への配慮）

ヒト検体を用いる研究は行わないため、該当しない。

C. 研究結果

現在遺伝的解析により有意な関連が検出されている HLA は、クラス II、クラス I である。これらはともに組換えタンパク質として調製する場合、ペプチドを含むヘテロ三量体として調製する必要がある。このように、複雑な分子形態をとる HLA タンパク質をまずは対象として、化合物スクリーニング系の検討を進めた。スクリーニング手法として簡便で、大規模ハイスループットスクリーニングに適している示差走査蛍光測定法、およびより詳細なメディアムスループットの解析に向く示差走査熱量分析法を検討した。

研究室で既に調製法の確立している HLA クラス I タンパク質を用いて、上記 2 種の手法でタンパク質の分析を行った。その結果、HLA クラス I 分子 (HLA-G) はいずれの手法でも分子の変性点が 2 点あるものの、測定条件の最適化を行えば、スクリーニングの系として用いることが可能であ

ると予想された。

また、初期データとして遺伝的関連が検出されている HLA 以外の受容体タンパク質について、大腸菌等を用いた組換えタンパク質の調製法を検討中である。

D. 考察

示差走査熱量分析法はタンパク質変性時に起こる熱量変化を、示差走査蛍光測定法は変性時に起こるタンパク質内部の疎水面の露出を検出する方法である。ヘテロ三量体である HLA 分子は多段階で変性が起こると予想されるため、タンパク質変性点を確定できないことが予想されたが、複数の変性点が存在するものの、条件最適化により、化合物の結合の有無をスクリーニングする手法としては用いることができると考えられた。

HLA 分子については、抗原ペプチドが結合した状態に結合する低分子化合物の同定を目指す、抗原ペプチドが結合するペプチド溝をターゲットとした場合、実際に提示されるペプチドのレパートリーが変化することによって起こる薬害が複数報告されていることから、分子上のどの部分をターゲットにして創薬スクリーニングを行うか検討を重ねていく。低分子を用いたデザインが困難であれば、高分子医薬も検討する。

また、HLA 以外の関連遺伝子について、関連と原因多型部位が明らかになれば、そのタンパク質調製法の確立を開始するために、当研究室既存の大腸菌、ヒト培養細胞、

昆虫細胞、カイコ個体、分裂酵母の発現系に加え、メタノール資化酵母、プレビバチルスの発現系を構築し、タンパク調製、機能解析、創薬スクリーニングへとスムーズに行う準備ができていると考えている。

E. 結論

HLA クラス I 組換えタンパク質を用いて、化合物スクリーニングを行う上で有効と想定される示差走査蛍光測定法および示差走査熱量分析法を用いた評価系を検証した結果、変性点が複数あるものの、測定条件の最適化を行えば、スクリーニング系として利用できることが明らかとなった。今後はこれらの評価系の条件検討および新規候補遺伝子についての解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

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