

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08281

研究課題名（和文）1分子シーケンサーを用いたウイルスゲノム解析によるウイルス制御後肝病態の解明

研究課題名（英文）The impact of viral sequence on the pathological status of the post-antiviral therapeutic liver analyzed by single molecular sequencing.

研究代表者

前川 伸哉（Maekawa, Shinya）

山梨大学・大学院総合研究部・特任教授

研究者番号：70397298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、一分子シーケンサーNanoporeシステムを改良することにより、従来の次世代シーケンサーではウイルスゲノム断片の集合体としてしか捉えられなかったHCVのゲノム情報を、ウイルス完全長の集合体として解析することが可能となり、ウイルスゲノム直列情報を含めた病態とウイルスの関連を明らかにすることが可能となった。本システムを用い、ウイルスゲノム上、離れた部位にあるE1/E2とNS5A領域の変異がリンクして病態を形成する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来断片的なウイルスゲノム解析以外は不可能であったウイルス変異体解析において、近年の技術革新で登場した高精度にロングリード可能な1分子シーケンシングシステムを導入し、完全長肝炎ウイルスゲノムの変異・quasispecies情報を取得することにより、ウイルス制御後の病態進展におけるウイルスゲノムの意義を嘗てないレベルで明らかにすることが可能となった。

研究成果の概要（英文）：In this study, the Nanopore system, a single molecule sequencer, has been improved to analyze the genomic information of HCV as quasispecies of the full-length viral genome, whereas conventional next-generation sequencers can only detect genomic information as quasispecies of viral fragments, making it possible to clarify the relationship between the pathogenesis and the virus. This system has made it possible to elucidate the relationship between the pathogenesis and the virus more thoroughly. Using this system, mutations in the E1/E2 and NS5A regions at distant locations on the viral genome were shown to be synchronized with each other and related to disease progression.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：肝炎ウイルス制御後 原発性肝癌 HCV 次世代シーケンサー 自然免疫 ウイルスゲノム 宿主遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス治療による肝炎ウイルス制御が可能となった今日において、肝癌症例は未だ十分な減少を認めておらず、またウイルス制御後に肝硬変が進展する症例が存在する。主たる原因であるC型肝炎ウイルス (HCV) あるいはB型肝炎ウイルス (HBV) においては、近年の抗ウイルス薬の進歩によって、大部分の症例で肝炎は沈静化されつつあるものの、本邦の肝癌死亡者は依然3万人存在し、ウイルス制御後も発癌者・再発者は必ずしも十分に減少していない。一方、非代償性肝硬変症例においては、ウイルス排除後も病態が進展する場合があることが明らかになりつつある。

肝炎ウイルス制御下においても、ウイルス変異が病態をなお修飾する可能性が示されつつある。すなわちHCVではウイルス排除後もコア70番、NS5A-Y93、NS5A-ISDR遺伝子変異症例では肝発癌と関連することが示されつつある。特に肝病態に対するウイルスゲノム変異の関連解析において、個々のHCV分子におけるコアとNS5A変異の直列変異情報の取得が強く望まれていた。宿主中でウイルスはゲノムの混在状態(=quasispecies)で存在するが、従来のショートリードシーケンスでは個々のHCV分子の解析は困難であった。またHBVは現在の核酸アナログ治療では、肝内HBV-cccDNAは消失しないため、ウイルスゲノムの肝発癌等への影響はより強く、これまでpreS/S、preCore/Core、X 遺伝子変異と肝硬変・肝癌発生との関与が示されてきたが、これらは個別に解析がなされ、ウイルスゲノム一分子ごとの直列情報を基にした解析はなされていなかった。

近年登場したロングリード可能な一分子シーケンサーNanoporeはリードエラーが高い問題があったが、rolling circle amplification (RCA)法によって、1分子をタンデムに幾度も増幅・解析することにより、エラー率を劇的に低下させ、真の変異を検出することが可能となった。一方、従来は膨大なウイルスゲノムデータを十分に活用できていない側面が否定できなかったが、近年機械学習AIが大幅に進化、大量データを用いた信頼性の高い解析が可能になってきた。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス制御時代における肝病態進展の問題について、一分子シーケンサーにより得られる大量な直列ウイルスゲノムのquasispecies情報を機械学習AIのプログラムを導入することにより迅速に処理し、precision medicineとしてのウイルスゲノムの意義について明らかとしてゆく。

3. 研究の方法

(1) C型肝炎ウイルスにおける1分子シーケンシング

経口直接抗ウイルス剤(DAA)治療前のHCV全長一分子構造のdeep sequencing解析を多数症例で行い宿主内変異体集団の全体像と経時的変化における解析を行う。一分子シーケンサーシステムを用い、多数症例のウイルスゲノムをバーコード配列で識別することにより、異なる患者間に存在するウイルスを識別しつつ大量のHCVゲノム一分子配列の取得を短時間で行う。

(2) B型肝炎ウイルスにおける1分子シーケンシング

HBV遺伝子構造の全長一分子構造のdeep sequencing解析をHCVと同様に多数症例で行

い宿主内変異体集団の全体像と経時的变化における解析を行う。

4. 研究成果

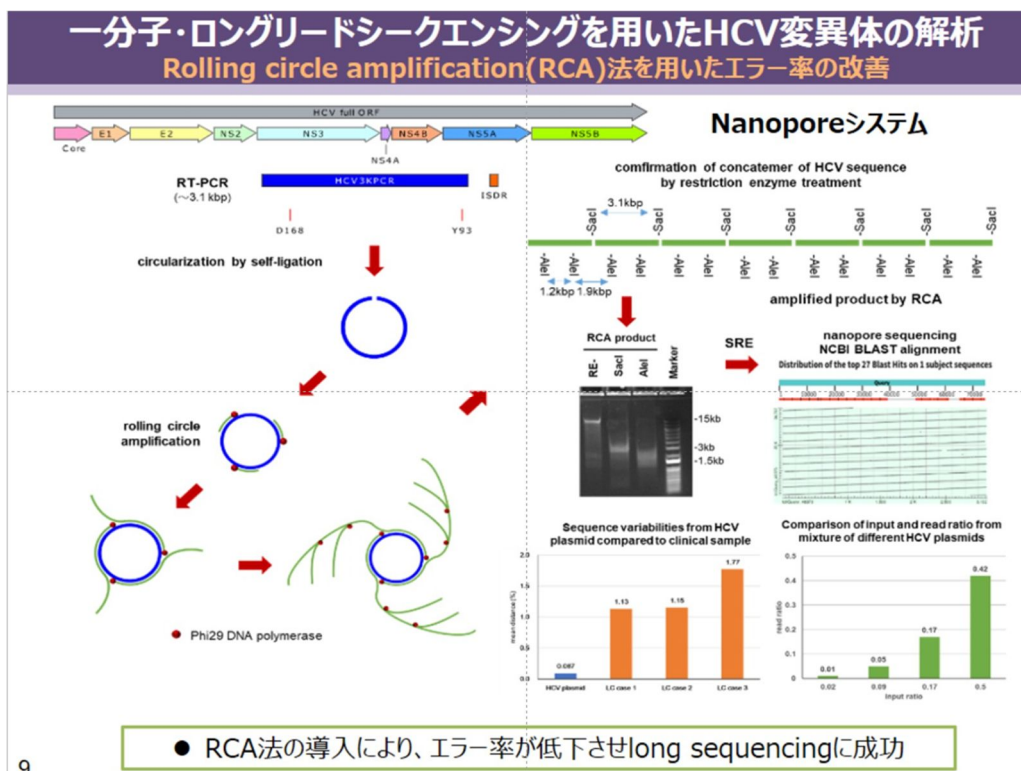
RCA法を用い、Nanoporeによる一分子シーケンスを行うことで、一人の患者に存在する多数のHCV全ゲノム配列を高精度な状態で一分子毎に連続した直列情報として得るシステムを構築した。またHCVゲノム各ウイルス領域における頻度の多い変異に着目することにより、ウイルスゲノムの型分けを行うHCVハプロタイピングシステムも構築した(図1)。

Genotype1b-HCVにおいて、直接抗ウイルス薬(DAA)治療不成功症例のウイルスゲノム動態を本システムを導入することによって解析し、ハプロタイプ、そのRASとの組み合わせが治療不成功と関連する可能性を示した(図2)。

肝疾患の進行とHCVゲノム変異との関連について検討し、病態進展につれて獲得免疫系の標的と示唆されているE1/E2領域に欠失が出現すること(図3)、またE1/E2領域に欠失が出現する症例では、自然免疫の標的とされるNS5A-ISDR領域にも変異が出現しやすいことを示した(図4)。

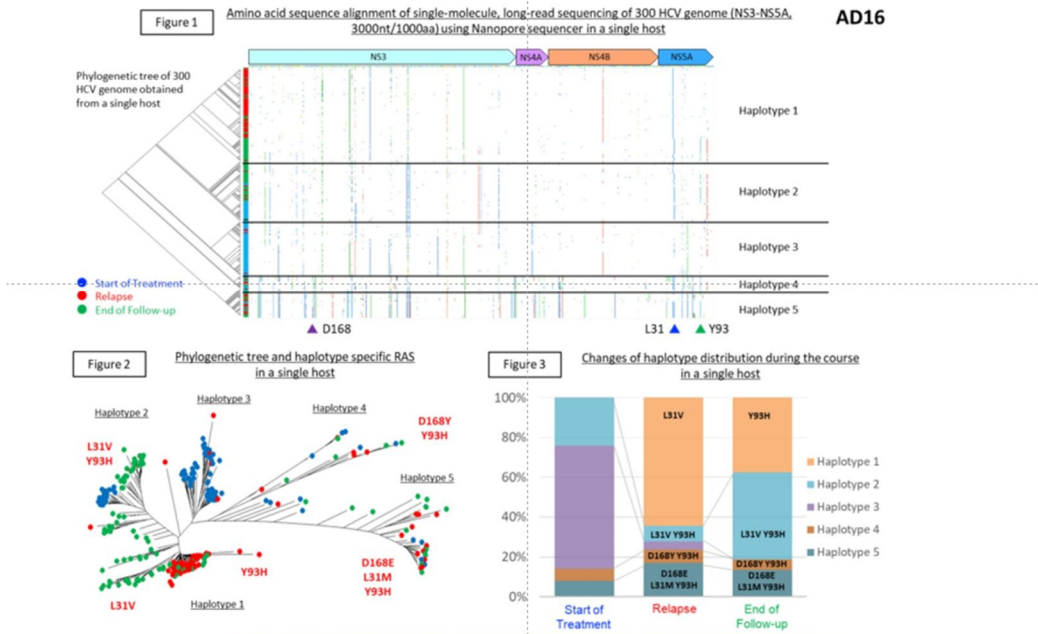
HCVのみならず、HBVにおいても、Nanoporeを用いた一分子全長シーケンス・システムを構築し得た。

(図1)



(図2)

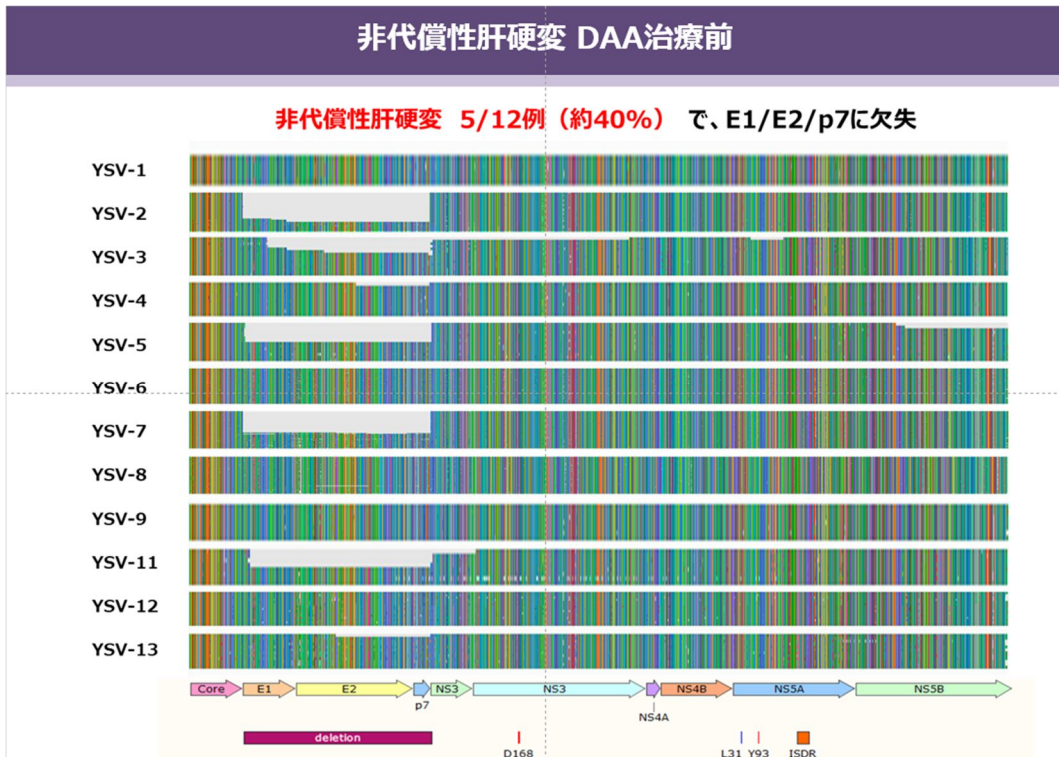
一分子・ロングリードシーケンシングを用いたHCV変異体の解析 nanoporeを用いたハプロタイピングシステムの構築



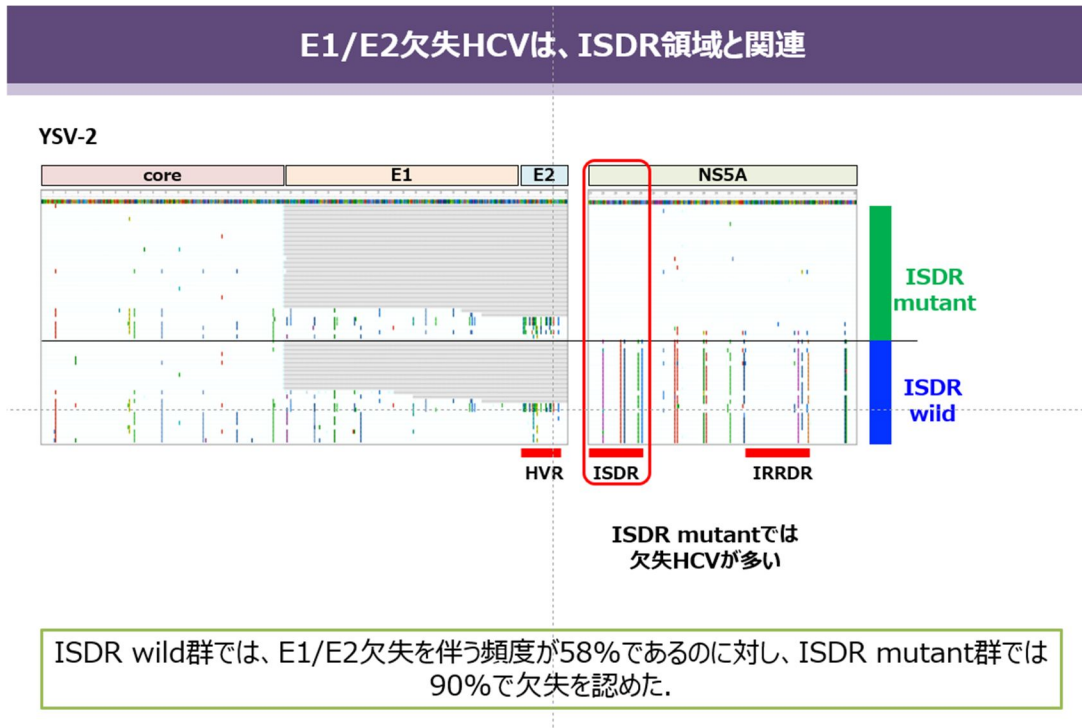
10

● HCV NS3-NS5A領域におけるハプロタイピングシステムを構築

(図3)



(図4)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamauchi K, Sato M, Osawa L, Matsuda S, Komiyama Y, Nakakuki N, Takada H, Katoh R, Muraoka M, Suzuki Y, Tatsumi A, Miura M, Takano S, Amemiya F, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Inoue T, Maekawa S, Enomoto N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Analysis of direct-acting antiviral-resistant hepatitis C virus haplotype diversity by single-molecule and long-read sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatol Commun	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1929. Online ahead of print.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Motohashi R, Yokoe H, Takahashi K, Wiriyasermkul P, Kasai H, Yamashita A, Maekawa S, Enomoto N, Ryo A, Nagamori S, Tsubuki M, Moriishi K.	4. 巻 194
2. 論文標題 Inhibitory effect of a novel thiazolidinedione derivative on hepatitis B virus entry.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antiviral Res	6. 最初と最後の頁 105165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2021.105165. Epub 2021 Aug 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takada H, Osawa L, Komiyama Y, Kato R, Nakakuki N, Muraoka M, Suzuki Y, Tatsumi A, Sato M, Takahashi E, Maekawa S, Enomoto N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Usefulness of Circulating CYFRA21-1 in Patients as a Biomarker in Patients Taking Sorafenib or Lenvatinib for Unresectable Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Muraoka M, Maekawa S, Katoh R, Komiyama Y, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Suzuki Y, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Shindo H, Takano S, Fukasawa M, Yamauchi K, Yamaguchi T, Nakayama Y, Inoue T, Enomoto N.	4. 巻 5
2. 論文標題 Usefulness of Cell-Free Human Telomerase Reverse Transcriptase Mutant DNA Quantification in Blood for Predicting Hepatocellular Carcinoma Treatment Efficacy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatol Commun	6. 最初と最後の頁 1927-1938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1762. Epub 2021 Jul 28.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori Y, Matsuda S, Sato M, Muraoka M, Suzuki Y, Tatsumi A, Nakayama Y, Inoue T, Maekawa S, Enomoto N.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 The impact of antiviral therapy for hepatitis C virus on the survival of patients after hepatocellular carcinoma treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda S, Maekawa S, Komiyama Y, Nakakuki N, Muraoka M, Suzuki Y, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Shindo H, Takano S, Fukasawa M, Yamaguchi T, Nakayama Y, Inoue T, Sato T, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.	4. 巻 51(1)
2. 論文標題 Deep sequencing analysis of serum hepatitis B virus-RNA during nucleot(s)ide analogue therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 39-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13574.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada H, Amemiya F, Yasumura T, Yoda H, Okuwaki T, Imagawa N, Shimamura N, Tanaka K, Kadokura M, Maekawa S, Enomoto N.	4. 巻 1
2. 論文標題 Relationship between presarcopenia and event occurrence in patients with primary hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67147-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muraoka M, Maekawa S, Suzuki Y, Sato M, Tatsumi A, Matsuda S, Miura M, Nakakuki N, Shindo H, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Inoue T, Sato T, Yamashita A, Moriishi K, Matsuda M, Enomoto N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cancer-related genetic changes in multistep hepatocarcinogenesis and their correlation with imaging and histological findings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 1071-1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13529.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------