

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591002

研究課題名(和文) 2種類の次世代高速シーケンサーを用いたB型肝炎慢性化阻止法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for the prevention of the chronicity of hepatitis B virus infection using two types of next generation sequencer

研究代表者

伊藤 清顕 (Ito, Kiyooki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50551420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Genotype A による成人のB型肝炎は、他のgenotype では慢性化率1%以下と低率なのに対して、7-8%が慢性化することを明らかにした(Ito K et al. Hepatology, 2014)。このように他のgenotype と比較して慢性化しやすいgenotype A の増加は、成人感染後の肝硬変、肝癌の難治性疾患の増加を引き起こすため対策が重要である。本研究では、次世代シーケンサーを用いたウイルス側と宿主側の双方からのアプローチにより、genotype A による急性肝炎の慢性化成立機序に関わる新しい知見を発見し、今後の治療法開発の基礎とした。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the chronicity rate after acute hepatitis B (AHB) with genotype A is 7-8%. On the other hand, the chronicity rate of AHB with non-A genotypes was less than 1% (Ito K et al. Hepatology, 2014). It is important to find the method for preventing chronicity after AHB, otherwise they would be at risk for progression to severe liver diseases such as liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. In this research, we have found that the new insights by approaching both from the host factors and from viral factors using next generation sequencer. As a host factor, one of the HLA-DPB locus was associated with the chronicity after AHB. The temporal emergence of the specific mutation, as a viral factor, was associated with chronicity after AHB by the result of long read type next generation sequencer. Our findings should be becoming the basis for the future treatment against hepatitis B virus infection.

研究分野：肝臓病学

キーワード：B型肝炎 急性肝炎 慢性化 次世代シーケンサー HLA 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

我々は全国調査の結果、本邦の B 型急性肝炎において欧米型である genotype A の占める割合が急速に増加していることを報告してきた。また、Genotype A による成人の B 型急性肝炎においては、HIV との共感染なしで他の genotype では慢性化率 1%以下と低率なのに対して、7-8%が慢性化することを明らかにした (Ito K et al. Hepatology 2014)。続いて行った B 型慢性肝炎の全国調査の結果によると、B 型慢性肝炎における genotype A の割合が、2000~2001 年の調査では 1.7%、2005~2006 年には 3.5%であったのに対して、2010 年~2011 年には 4.1%に増加していた。このように他の genotype と比較して慢性化しやすい genotype A の増加は、成人後に感染した症例においても肝硬変や肝癌といった難治性肝疾患の増加を引き起こすことになるため、その対策が非常に重要である。

我々は、これまでに HBV の遺伝子変異が臨床像の違いに関連することを解明し報告してきた (Ito K, et al. Clin Infect Dis 2006) (Ito K, et al. J Gastroenterol 2007) (Ito K, et al. J Virol 2010)。これらの手法を駆使して uPA-SCID キメラマウスを用いた実験により、genotype A は genotype C と比較してウイルスの増殖速度が有意に遅いということを明らかにした (Sugiyama M, Ito K et al. Hepatology 2006)。ウイルスの増殖速度は、ウイルス排除に重要な役割を果たす cytotoxic T lymphocyte (CTL) の反応に大きく関係する (J Virol 2004) ため、ウイルスの増殖が遅いことにより十分な CTL の反応が誘導されず、慢性化に関与するものと考えられた。さらに、genotype A においては HBe 抗原 (HBeAg) 前駆体の C 末端領域における cleavage site に 6 塩基の insertion を認めることを発見し、それが HBeAg の表現形に影響を及ぼし、他の

genotype においては単一の分子である HBeAg が genotype A においては複数 (2-3 種類) の分子として産生され、その結果免疫反応に影響を与える可能性を報告してきた (Ito K, et al. J Virol 2009)。HBeAg は免疫寛容、感染成立に関与していると考えられる (Hepatology 2003)、genotype A における HBeAg の表現形の違いが急性感染からの慢性化に関与している可能性が推定される。以上のように、慢性化機序に関するウイルス側の要因に関しては、かなりの部分で解明することができた。しかし、これまで感染患者中の HBV の多様性 (quasispecies) に対応した解析を行うことができず、十分な解析とはいえなかった。現在使用可能な次世代高速シーケンサーには、short read と long read type の 2 種類があり、ウイルス側および宿主側の双方に対してそれぞれの次世代高速シーケンサーの特性を生かした詳細な解析を行うことが可能である。Long read の次世代高速シーケンサーは、read 数は稼げないものの short read と比較して minor clone の検出に優れており、ウイルスの quasispecies に対応した解析が可能である。

一方、Human genome project の成功により、ヒトゲノムは個人差として約 300 塩基に一個の遺伝子変異 (SNPs) が存在し、この SNPs が様々な疾患や個々の薬剤反応性の強弱や副作用に大きく関与することが明らかとなってきた。近年、genome-wide に配置された 100 万箇所の SNPs を一括タイピングすることが可能になり、病態進展に多因子が関与すると想定されてきた 2 型糖尿病、脳血管障害などにおいて疾患感受性遺伝子の同定が矢継ぎ早に報告されている。B 型肝炎に関しても、これまでの genome-wide association study (GWAS) の結果、HLA-DP locus (Kamatani Y, et al. Nat Genet 2009) や HLA-DQ

locus(Mbarek H, et al. Hum Mol Genet 2011) に存在する SNPs が B 型慢性肝炎に關与することが報告されている。我々の解析でも同 SNPs が慢性 B 型肝炎に關連することを独自に解析してきた。

2 . 研究の目的

B 型急性肝炎後の慢性化機序に關与するウイルス側因子に關しては、long read type の次世代高速シーケンサーを用いた quasispecies に対応した詳細な解析を行い、宿主側因子としては、HLA-DP および DQ locus に存在する既報の SNPs や high throughput を特性とする short read type の次世代高速シーケンサーにより解析を行った。これらのウイルスゲノム情報とヒトゲノム情報の双方を組み合わせるにより、急性肝炎の慢性化を予測し、ハイリスク群には嚴重なフォローアップ、早期の治療介入等の対策をとり、個別化医療への応用へ向けた基礎データとした。また、次世代高速シーケンサーを有効に活用することにより、慢性化機序を明らかにし分子標的治療薬等の新規治療薬開発の基礎とした。

3 . 研究の方法

全国からの急性 B 型肝炎症例(前向きおよび後ろ向き調査)を収集し、その中で慢性化率を調査する。急性 B 型肝炎症例中で慢性化群と非慢性化群とを群別し、HBV の genotype、遺伝子変異等のウイルス側のファクターを解析した。また両群間で、これまでに GWAS により判明した既報の慢性 B 型肝炎關連 SNPs の關与および新規 SNPs の關連の有無を調査した。これらのウイルス側および宿主側の両側面から解析することにより急性 B 型肝炎の慢性化の予測を試みた。さらには、慢性化の危険群に關しては早期治療介入等の措

置をとり、慢性化阻止を目指したテーラーメイド医療の実践を目指した。後期には GWAS により判明した SNPs の周辺を次世代高速シーケンサーで解析することにより慢性化の機序を研究し、慢性化阻止の方法探索および新規治療薬の開発を目指した。次世代高速シーケンサーは、現在のところ short read と long read の 2 種類に大別され、それぞれ長所と短所を持つ。Long read は read 数を稼ぐことはできないが、minor clone の認識が可能であり多様性を持つウイルスや細菌といった全長の短い DNA および RNA の解析が得意である。一方で、short read type は、それぞれの read 長が短いため minor clone の認識は不得手であるが、ヒトゲノムのような既知で長大な DNA 配列の解析に適している。我々は、これら 2 種類の次世代高速シーケンサーの特長を生かした解析を行った。

4 . 研究成果

本研究において、ウイルス側と宿主側の双方のファクターを解析することにより、genotype A による急性肝炎の慢性化に關わる因子を明らかにした。これまでに全国の共同研究施設より、成人の B 型肝炎症例 1088 例(1988 年~2011 年)の収集を終了した。また、B 型肝炎に關しても 4,000 例程度の症例の収集を終了した。また、宿主側要因に關しては genotype A による B 型肝炎の genome81 例に關して HLA の解析を終了した。Genotype A による B 型肝炎症例に關しては、genome 80 例までの収集を終了した。

宿主側のファクターとしては、既報の B 型肝炎に關わる HLA-DP locus (Kamatani Y. et al., Nat Genet, 2009) および HLA-DQ locus (Mbarek H, et al. Hum Mol Genet 2011) に存在する SNPs を用いることにより、成人における genotype A による急性肝炎の慢性化との

関連を調査した。既報の HLA-DPA1 および HLA-DPB1 に関連する SNPs である rs3077 および rs9277535 を我々の開発した Invader 法により測定した。具体的には同じ genotype A の HBV に感染していながら急性肝炎の一過性感染で終息した 56 症例、また慢性肝炎の診断で genotype を測定したところ genotype A であった症例 66 例との間で HLA との関連に関して調査を行った。その結果、DPB に関連する SNP と慢性化との関連を認めた。

ウイルス側の要因として、B 型急性肝炎発症後の HBs 抗原陽性期から HBs 抗原陰性期にかけてのシリーズ血清を用いて long read type の次世代高速シーケンサーにより解析を行った。その結果、時期により一時的に特徴的な変異の出現を認め慢性化への関与が疑われた。具体的には、HBs 抗原消失の時期に preS1 region に遺伝子変異を認め preS1 の途中で stop codon となる変異が major clone となる特徴的な現象を認めた。PreS1 が stop codon になることにより HBsAg の分泌が低下することがこれまでの基礎実験から知られており、この特徴的な現象が B 型急性肝炎の経過中の HBsAg 消失に関与した可能性が示唆された。

以上のように宿主側とウイルス側で遺伝子要因を次世代シーケンサーを用いて解析したことにより双方から有意義な結果が得られた。これらのデータを組み合わせることにより今後は慢性化のハイリスク群を囲い込むことにより、より徹底したフォローアップもしくは早期に核酸アナログ製剤を投与する等の対策を考えることができる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ito K, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, Yatsuhashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito t, AraseY, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T,

Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Tanaka Y, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Meshiro T, Tanuma J, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Koike K, **Mizokami M**; Japanese AHB and CHB Study Group.

Geographic distribution and characteristics of genotype A hepatitis B virus infection in acute and chronic hepatitis B patients in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. In press (査読有り)

Takahashi H, Ikeda M, Kumada T, Osaki Y, Kondo S, Kusumoto S, Ohkawa K, Nadano S, Furuse J, Kudo M, **Ito K**, Yokoyama M, Okusaka T, Shimoyama M, **Mizokami M**. Multicenter cooperative case survey of Hepatitis B virus reactivation by chemotherapeutic agents. *Hepatol Res*. 2015 Jan 27 [Epub ahead of print] (査読有り)

Masaki N, Shrestha PK, Nishimura S, **Ito K**, Sugiyama M, **Mizokami M**. Use of nucleotide analogs in patients with chronic hepatitis B in Nepal: A prospective cohort study in a single hospital. *Hepatol Res*. 2015 Jan 12 [Epub ahead of print] (査読有り)

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

Yotsuyanagi H, **Ito K**, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, **Mizokami M**, Miyakawa Y, Koike K. High Levels of Hepatitis B Virus After the Onset of Disease Lead to Chronic Infection in Patients With Acute Hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 2013 Oct;57(7):935-42. (査読有り)

Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, **Ito K**, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tokunaga K.

No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.
BMC Med Genet. 2012 Jun 19;13:47.
(査読有り)

〔学会発表〕(計6件)

Ito K, Yoneda M, Angata K, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H.
Development of New Anti-Viral Agent Targeting Sugar Chain Synthesis System Associated with Life cycle of Hepatitis B Virus.
2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,
Los Angeles, USA, September, 2014.

伊藤清顕、四柳宏、溝上雅史
B型急性肝炎の慢性化に関する検討
全国調査の結果から
第40回日本肝臓学会西部会、岐阜、2013年12月

Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Krino 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, Meshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group.
Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults.
The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.
Washington DC, USA, November, 2013.

伊藤清顕、溝上雅史
HBV ジェノタイプの最近の動向と病態との関連 ワークショップ
第99回日本消化器病学会総会、鹿児島、2013年3月

伊藤清顕、溝上雅史
B型慢性肝炎に関する全国調査結果
第20回日本消化器関連学会週間JDDW 2012, シンポジウム、神戸、2012年10月

Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takigawa H, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M, and the Japanese AHB Study Group.
Risk factors for long-term persistence of serum HBsAg following acute hepatitis B virus infection in Japan.

The 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver.
Taipei, Taiwan, February, 2012.

〔図書〕(計5件)

伊藤清顕
肝炎ウイルスマーカーの読み方
<特集> B型・C型肝炎治療における臨床検査の役割
ウイルス肝炎の診断・治療のための臨床検査
MEDICAL TECHNOLOGY 2014;42(4):347-353

鈴木一幸、滝川康裕、遠藤龍人、宮坂昭生、宮本康弘、小野寺美緒、小山富子、岡本宏明、**伊藤清顕**、溝上雅史
B型急性肝炎および慢性肝疾患におけるHBVゲノタイプAの頻度と感染経路の検討
第29回 犬山シンポジウム記録集
2013:23-28.

伊藤清顕、溝上雅史
全国調査からみたB型慢性肝炎の病態
コホート研究からみたウイルス性肝炎の解明 2013:152-160

伊藤清顕、溝上雅史
Genotype AによるB型急性肝炎の拡大とその特徴
B型肝炎 最新治療コンセンサス 2012
医学のあゆみ 2012;242(5):389-394

伊藤清顕、溝上雅史
ウイルス肝炎のすべて
III 血液感染するウイルス肝炎 1. B型肝炎
(2) HBV 遺伝子型とB型急性肝炎
化学療法の領域 2012(28, S-1):104-1051

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)
○取得状況(計0件)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
伊藤 清顕 (ITO KIYOAKI)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50551420
- (2) 研究分担者
溝上 雅史 (MIZOKAMI MASASHI)
独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他
研究者番号: 40166038

杉山 真也 (SUGIYAMA MASASYA)
独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他
研究者番号: 20612427