

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2012
課題番号：24659368
研究課題名（和文） ヒト肝細胞キメラマウスと次世代シーケンサーによる肝障害誘起性新規病原体の探索
研究課題名（英文） Analysis of unknown pathogen using human hepatocyte chimeric mouse and massive parallel sequencing
研究代表者 茶山 一彰 (CHAYAMA KAZUAKI) 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授 研究者番号：00211376

研究成果の概要（和文）：

新規ウイルスのRNAを同定するために、Illumina Genome Analyzer IIxを使用してSubtraction massive parallel sequencingによる新規病原体の探索を試みた。原因不明の発疹、肝障害を発症した症例の血清を用いてDNA、RNAのそれぞれからnon-humanの核酸の同定を試みたところ、cytomegalovirusのDNAが検出された。現在残りの配列のassemblyを行っている。

研究成果の概要（英文）：

We attempted to identify unknown pathogen from a patient with eruption and liver disorder with massive parallel sequencing. We found DNA sequences of cytomegalovirus from this patient. Further assembly of remaining non-human sequence is now going on.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：

ウイルス、ゲノム、細胞・組織、肝細胞キメラマウス

1. 研究開始当初の背景

肝障害、中でも生命の危機にしばしば直結する劇症肝炎を引き起こす原因は不明の場合が多く、未知のウイルス感染が想定されている。

2. 研究の目的

本研究は肝炎ウイルスが感染することが出来るヒト肝細胞キメラマウスを使用して病原体の感染実験を行い、感染が成立したことを想定して、血清と肝組織からRNAを抽出、cDNAを合成し次世代シーケンサーを用いて subtraction massive parallel sequencing

を行い、未知の病原ウイルスのRNAを検出するものである。未知の病原体の発見は原因不明の肝障害の治療と予防に資する重要な研究となり、国民の健康増進に大きく寄与するものである。

3. 研究の方法

新規ウイルスのRNAを同定するために、Subtraction massive parallel sequencingによる新規病原体の探索を行う。すなわち、Illumina Genome Analyzer IIxを使用して患者血清接種前、および接種後に血清中に存在

するRNAを網羅的に解析する。接種前と接種後の血清中RNAを比較することにより、接種後にのみ検出されるRNAを未知の病原体ウイルスの可能性のあるものとして次のステップの候補とする。血清中のRNAが微量過ぎて解析できない場合には10週目にsacrificeしたマウスの肝臓の組織を用いて同様にSubtraction massive parallel sequencingによる未知の病原体の探索を行う候補RNA分子が同定されたなら、まずマウスの感染実験の経時的な保存血清を用いて感染を確認し、さらに非A、非B、非C型肝炎の患者、NASHの症例、自己免疫性肝炎の保存血清を使用して候補RNAが原体由来のものであるかどうかを確認する。このため、5' race、3' race等により病原体ゲノムの全体像を明らかにしていくとともに、適切な範囲にpolymerase chain reactionによる検出用のプライマーをデザインし、簡易にウイルス断片を増幅できる検出系を構築する。検出された病原体由来と考えられるサンプルに対して、逆転写反応を行う、行わないの2種類について検出を行い、とらえられた病原体がDNAウイルスか、RNAウイルスかを決定する。感染が成立したと考えられるマウスの血清サンプルを使用して、検出されたウイルス配列が接種前には存在せず、接種後に出現していることを確認する。これで陽性であることが確認されたら、多数保存されている非A、非B、非C型劇症肝炎症例の血清、非A、非B、非C型急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変の症例の血清から核酸を抽出し、上記検出法による検出を行い、検出系の特異性などについて検討を加える。

4. 研究成果

新規ウイルスのRNAを同定するために、Subtraction massive parallel sequencingによる新規病原体の探索を試みた。すなわち、Illumina Genome Analyzer IIxを使用して患

者血清接種前、および接種後に血清中に存在するRNAを網羅的に解析した。接種前と接種後の血清中RNAを比較することにより、接種後にのみ検出されるRNAを未知の病原体ウイルスの可能性のあるものとして次のステップの候補とすることとした。血清中のRNAが微量過ぎて解析できない場合には10週目にsacrificeしたマウスの肝臓の組織を用いて同様にSubtraction massive parallel sequencingによる未知の病原体の探索を行う候補RNA分子を探索した。今年度は機器の都合上、Illumina Myseqを使用して検討を行った。原因不明の発疹、肝障害を発症した症例の血清を用いてDNA、RNAのそれぞれからnon-humanの核酸の同定を試みた。この症例からはcytomegalovirusのDNAが検出された。現在残りの配列のassemblyを行っている。このことにより、方法論の妥当性が証明されたと考え、今後多数保存されている非A、非B、非C型劇症肝炎症例の血清、非A、非B、非C型急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変の症例の血清から核酸を抽出し、上記検出法による検出を行い、検出系の特異性などについて検討を加える予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

1. Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, et al. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. PLoS One. 2012;7: e47490 . 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0047490
2. Nagaoki Y, Aikata H, Kobayashi T, Fukuhara T, Masaki K, Tanaka M, et al. Risk factors for the exacerbation of esophageal varices or portosystemic

- encephalopathy after sustained virological response with IFN therapy for HCV-related compensated cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2012 . 査読有 doi: 10.1007/s00535-012-0679-8
3. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwarra E, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFNalpha-2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol.* 2012;48: 382-390 . 査読有 doi:10.1007/s00535-012-0641-9
 4. Hayes CN, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Genetics of IL28B and HCV--response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9: 406-417 . 査読有 doi: 10.1038/nrgastro.2012.101
 5. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet.* 2012;44: 760-764 . 査読有 doi: 10.1038/ng.2291
 6. Nakahara T, Hyogo H, Kimura Y, Ishitobi T, Arihiro K, Aikata H, et al. Efficacy of rosuvastatin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with dyslipidemia: An open-label, pilot study. *Hepatol Res.* 2012;42: 1065-1072 . 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01034.x
 7. Chayama K, Hayes CN, Imamura M. Impact of interleukin-28B genotype on in vitro and in vivo systems of hepatitis C virus replication. *Hepatol Res.* 2012 ;42: 841-853 . 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01002.x
 8. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Association of two polymorphisms of the IL28B gene with viral factors and treatment response in 1,518 patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2012;47: 596-605 . 査読有 doi: 10.1007/s00535-012-0531-1
 9. Kawaoka T, Takahashi S, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, et al. Interleukin-28B single nucleotide polymorphism of donors and recipients can predict viral response to pegylated interferon/ribavirin therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27: 1467-1472 . 査読有 doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07129.x
 10. Matsuo J, Mizui M, Okita H, Katayama K, Aimitsu S, Sakata T, et al. Follow up of the 987 blood donors found with hepatitis C virus infection over 9-18 years. *Hepatol Res.* 2012;42: 637-647 . 査読有 doi:10.1111/j.1872-034X.2012.00966.x
 11. Ohnishi M, Tsuge M, Kohno T, Zhang Y, Abe H, Hyogo H, et al. IL28B polymorphism is associated with fatty change in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2012;47: 834-844 . 査読有 doi 10.1007/s00535-012-0550-y
 12. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Aikata H, Chayama K. Hepatocellular carcinoma: towards personalized medicine. *Cancer Sci.*

- 2012;103: 846-850 . 査読有doi:
10.1111/j.1349-7006.2012.02242.x
13. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, et al. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012;56: 555-566 . 査読有 doi: 10.1002/hep.25651
 14. Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*. 2012;47: 586-595 . 査読有 doi: 10.1007/s00535-012-0533-z
 15. Hyogo H, Yamagishi SI, Maeda S, Kimura Y, Ishitobi T, Chayama K. Atorvastatin improves disease activity of nonalcoholic steatohepatitis partly through its tumour necrosis factor- α -lowering property. *Dig Liver Dis*. 2012; 44: 492-496 . 査読有 doi: 10.1016/j.dld.2011.12.013
 16. Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M, et al. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2012;19: e126-133 . 査読有 doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01516.x
 17. Hayashi N, Okanoue T, Tsubouchi H, Toyota J, Chayama K, Kumada H. Efficacy and safety of telaprevir, a new protease inhibitor, for difficult-to-treat patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2012;19: e134-142 . 査読有 doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01528.x
 18. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*. 2012;18: 281-285 . 査読有 doi: 10.1038/nm.2581
 19. Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, et al. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:2 . 査読有 doi: 10.1186/1471-230X-12-2
 20. Ohishi W, Chayama K. Treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogues. *Hepatol Res*. 2012;42: 219-225 . 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00921.x
 21. Murakami E, Aikata H, Miyaki D, Nagaoki Y, Katamura Y, Kawaoka T, et al. Hepatic arterial infusion chemotherapy using 5-fluorouracil and systemic interferon- α for advanced hepatocellular carcinoma in combination with or without three-dimensional conformal radiotherapy to venous tumor thrombosis in hepatic vein or inferior vena cava. *Hepatol Res*. 2012;42: 442-453 . 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00943.x
 22. Nagaoki Y, Hyogo H, Aikata H, Tanaka M, Naeshiro N, Nakahara T, et al. Hepatol Res. Recent trend of clinical features in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*.

- 2012;42: 368-375 . 査読有 doi:
10.1111/j.1872-034X.2011.00929.x
23. Ochi H, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Uchiyama T, Kamatani N, et al. Toward the establishment of a prediction system for the personalized treatment of chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 2012;205: 204-210 . 査読有 doi:
10.1093/infdis/jir726
24. Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, et al. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 2012;42: 139-149 . 査読有 doi:
10.1111/j.1872-034X.2011.00910.x
25. Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, et al. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology.* 2012; 55: 742-748 . 査読有 doi: 10.1002/hep.24724
26. Kawaoka T, Hiraga N, Takahashi S, Takaki S, Tsuge M, Nagaoki Y, et al. Achievement of sustained viral response after switching treatment from pegylated interferon alpha-2b to alpha-2a and ribavirin in patients with recurrence of hepatitis C virus genotype 1 infection after liver transplantation: a case report. *Intervirology.* 2012;55: 306-310 . 査読有 doi: 10.1159/000328661
27. Kumada H, Toyota J, Okanoue T, Chayama K, Tsubouchi H, Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naïve patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol.* 2012;56: 78-84 . 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2011.07.016
28. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2012;55: 231-241 . 査読有 doi: 10.1159/000328327
29. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, et al. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol.* 2012;19: 418-425 . 査読有 doi:
10.1245/s10434-011-1866-1
30. Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayama K, et al. Dual Oral Therapy with Daclatasvir and Asunaprevir for Patients with HCV Genotype 1b Infection and Limited Treatment Options. *J Hepatol.* 2012;58: 655-662 . 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2012.09.037
31. Kohno T, Tsuge M, Hayes CN, Hatakeyama T, Ohnishi M, Abe H, et al. Identification of novel HCV deletion mutants in chronic hepatitis C patients. *Antivir Ther.* 2012;17: 1551-1561 . 査読有 doi: 10.3851/IMP2265

32. Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, et al. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. J Hepatol. 2012;58: 648-645 . 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2012.11.012
33. Hyogo H, Yamagishi S, Maeda S, Kimura Y, Ishitobi T, Chayama K. Atorvastatin improves disease activity of nonalcoholic steatohepatitis partly through its tumour necrosis factor-alpha-lowering property. Dig Liver Dis. 2012;44: 492-496 . 査読有 doi: 10.1016/j.dld.2011.12.013
34. Chayama K, Hayes CN, Ohishi W, Kawakami Y. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in Japan: update on therapy and guidelines. J Gastroenterol. 2012;48:1-12 . 査読有 doi: 10.1007/s00535-012-0714-9

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 9 件)

1. 茶山一彰、日本メディカルセンター、特集 非 B 非 C 型肝炎—最新の知見 わが国における非 B 非 C 型肝炎の実態 (8) 非 B 非 C 型肝炎のリスクの因子、2012. 7 (6)
2. 茶山一彰、BIO Clinica、1. 総論：ウイルス肝炎・肝臓に関する最新状況 2012. 2 (1)
3. 茶山一彰、広島市内科医会報、B 型肝炎に関する最近の話題、2012. 4 (4)
4. 大石和佳、医歯薬出版、B 型肝炎に対する新薬開発の最新情報、2012. 5 (5)
5. 茶山一彰、文光堂、[2] 人体への影響 [B] 後障害 d. 肝がん、2012. 8 (8)

6. 茶山一彰、日本メディカルセンター、特集 C 型肝炎治療の最前線 5. テラプレビル耐性変異、2012. 7 (7)
7. 大石和佳、アークメディア、特集 B 型肝炎治療：克服へのロードマップ、2012. 8 (8)
8. 田中榮司、肝臓、核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針 2012、2012. 6 (6)
9. 茶山一彰、MEDICAMENT NEWS、特集消化器疾患の話題 B 型肝炎、2012. 2 (1)
[その他]
ホームページ等
http://home.hiroshima-u.ac.jp/naikal/research_profile/liver_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茶山 一彰 (CHAYAMA KAZUAKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：00211376

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：