

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659186

研究課題名（和文）次世代大規模シーケンシング技術による慢性ウイルス性肝疾患の病態解明

研究課題名（英文）Analysis of chronic viral hepatitis by the large-scale next generation sequencing

研究代表者

榎本 信幸（ENOMOTO NOBUYUKI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：20251530

研究成果の概要（和文）：

次世代高速シーケンサーであるRoche Genome Sequencer Junior (GSJ) を用いて患者体内の肝炎ウイルス遺伝子の大規模高速塩基配列解析方法を開発、C型肝炎ウイルス (HCV) のコア遺伝子、NS3遺伝子、NS5A遺伝子、およびB型肝炎ウイルス (HBV) のpreS遺伝子のdeep sequencingによる解析を行い、治療、耐性化、病変進展、発癌などに伴い変異体の構成が動的に変化することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We developed the analytical method of rapid and large scale sequencing of hepatitis virus genome in the patients with the next generation sequencer Roche Genome Sequencer Junior (GSJ), and revealed the dynamic changes of viral quasispecies constitution during the treatment and disease progression by the analysis of HCV core, NS3, NS5A genes and HBV pre S gene through deep sequencing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

研究分野：医歯薬学

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：HCV, HBV, 次世代シーケンス、deep sequencing

1. 研究開始当初の背景

(1) B型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus, HBV) およびC型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus, HCV) は日本国内だけでも 300-400 万人の感染者が存在し、慢性ウイルス性肝疾患すなわち慢性肝炎から肝硬変・肝癌を引き起こす。肝癌による死亡者数は年間 3 万人を超え、慢性肝炎の対策は急務となっている。近年、HBV に

対する核酸アナログ治療、HCV に対する Peginterferon /Ribavirin 治療の導入により肝炎ウイルス感染の制御が部分的に可能となりつつあるが、抗ウイルス治療不応例の存在、長期投与の必要性、耐性変異の出現、発癌など克服すべき問題が山積している。

(2) 慢性ウイルス性肝疾患の病態形成にお

いては、変異体 (quasispecies) が重要である。肝炎ウイルスは慢性期においても患者体内で急速に増殖しており、常に多数の変異体が出現し続けている。これらの変異体はさまざまな機能的変異を持ち、その構成は経時的に変化して、免疫からの逃避による持続感染、肝炎活動性、薬剤抵抗性、発癌などの病態に関与していると考えられる。

- (3) これまで宿主内の変異体の包括的な全貌は全く明らかとなっていない。しかし、2006年以降、数十塩基の短いDNA断片を同時並行的に大量にシーケンスし、短時間に数百万から数千万塩基におよぶ塩基配列決定を行うことが可能な、驚くべき次世代大規模シーケンシング技術が出現した。
- (4) 本研究においてはこの次世代大規模シーケンシング技術を慢性ウイルス性肝疾患解析に応用して、これまでとはまったく異なる次元での遺伝子解析による病態解明を行うものである。

2. 研究の目的

本研究では、次世代大規模シーケンシング技術を用いて、B型およびC型肝炎ウイルスゲノムの宿主内での変異体の多様性をこれまでになくレベルで、その全貌を解析してその生物学的、臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 本研究では、Genome Sequencer システムを用いて、患者血中の肝炎ウイルスゲノムを解析する。これらの技術はビーズまたはガラス上に固定した数万から数百万のDNA断片を可逆化ターミネーター法シーケンス化学反応を用いることで、大量のDNA断片を同時並行シーケンシングし、塩基配列を決定することが可能な次世代高速シーケンシングを可能としており、1回のrunで数百万から数千万塩基の解析が可能である。
- (2) HBV感染について慢性肝炎・肝硬変進展症例について変異体解析を行い、病変進展に関わる変異体の役割を明らかにする。
- (3) HCV感染状態にもかかわらず長期無症候性キャリア症例および、慢性肝炎・肝硬変・肝癌進展症例について変異体解析を行い、病変進展に関わる変異体の役割を明らかにする。また Peginterferon

/Ribavirin 治療前後の変異体構成を解析し変異体と治療効果の関連を明らかにする。

4. 研究成果

次世代高速シーケンサーである Roche Genome Sequencer Junior (GSJ) を用いて患者体内の肝炎ウイルス遺伝子の解析方法を開発、HCVのコア遺伝子、NS3遺伝子、NS5A遺伝子、HBVのpreS遺伝子のdeep sequencing解析を開始した。コア蛋白遺伝子に関しては70番アミノ酸がdirect sequencingでは均一と考えられた症例においても変異が低い頻度で存在し混在状態となっていること、この混在状態が病変進展あるいは肝発癌の過程において動的に変化していることを明らかにした。NS5A遺伝子についてはISDRを中心にインターフェロン治療中のquasispeciesの混在状態の変化をdeep sequencingにより解析することを可能とした。また、NS3プロテアーゼ遺伝子についてはすでにプロテアーゼ阻害剤治療前から、36番、54番などの耐性化アミノ酸部位に低い頻度で耐性変異をもつHCV変異体が存在することをdeep sequencingにより明らかにした。しかし、耐性変異が認められる症例でもプロテアーゼ阻害剤治療によりウイルス排除が得られたことからこれらの個々のアミノ酸変異だけではなくNS3蛋白全体のアミノ酸変異の組み合わせ解析することが治療反応の予測をする上で重要と考えられた。B型肝炎に関してはpreSのdeep sequencing解析を開発、病変の進展に伴ってpreS deletion変異体が増加することを明らかにした。

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12件)

①Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N.

Correlation between Pretreatment Viral Sequences and the Emergence of Lamivudine Resistance in Hepatitis B Virus Infection.

J Med Virol. 2012 in press. (査読あり)

②Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N.

Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response.

Hepatology. 2012 Jan;55(1):20-9. doi: 10.1002/hep.24623. Epub 2011 Nov 29. PubMed PMID: 21898478. (査読あり)

③Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M.

Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors.

J Hepatol. 2011 Mar;54(3):439-48. (査読あり)

④Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N.

Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2 infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy.

Hepatology Int. 2011 Sep;5(3):789-99. Epub 2011 Mar 20. (査読あり)

⑤Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N.

Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin.

Antivir Ther. 2011;16(5):685-94. (査読あり)

⑥Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N.

Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy.

PLoS One. 2011;6(9):e24514. Epub 2011 Sep 15. (査読あり)

⑦Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N.

Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.

Hepatology Int. 2011 Aug 18. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22020822. (査読あり)

⑧Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N.

Analysis of viral amino acid sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C.

Hepatology Int. 2011 Aug 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22020823. (査読あり)

⑨Enomoto N, Maekawa S.

HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy.

Intervirology. 2010;53(1):66-9. Epub 2010 Jan 5. PubMed PMID: 20068344. (査読あり)

⑩ Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N.

A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis.

Hepatology Res. 2010 Mar 1;40(3):251-60. Epub 2010 Jan 11. PubMed PMID: 20070391. (査読あり)

⑪ Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M.

Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection.

J Gastroenterol. 2010 Jun;45(6):656-65. Epub 2010 Jan 30. PubMed PMID: 20112032. (査読あり)

⑫ Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsunami H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Honda M, Ito K, Mizokami M, Watanabe M. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C.

Hepatology Res. 2010 Nov;40(11):1063-1071. PubMed PMID: 20977565. (査読あり)

〔学会発表〕（計 6 件）

① Maekawa S, Enomoto N, et al. Analysis of the early response and the final outcome to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2010.9.10-14 Yokohama

② Kazuki Komase, Maekawa S, Enomoto N, et al. Extensive analysis of serum cytokines associated to the response in the PEG-IFN+RBV combination therapy in genotype 1b HCV infection. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2010.9.10-14 Yokohama

③ Mika Miura, Maekawa S, Enomoto N, et al. Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2010.9.10-14 Yokohama

④ Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, et al. Characterization of protease inhibitor resistance mutations in untreated patients infected with genotype 1b HCV. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.15

⑤ Maekawa S, Enomoto N, et al. Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.16

⑥ Maekawa S, Enomoto N, et al. Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
教授
研究者番号：20251530

(2) 研究分担者

前川 伸哉 (MAEKAWA SHINYA)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
講師
研究者番号：70397298

(3) 連携研究者

なし