

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12日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790765
 研究課題名（和文） 原発性胆汁性肝硬変の新規ウイルス感染の可能性とアネロウイルス属の疾患関連性の検討
 研究課題名（英文） The possibility of unknown viral infection with primary biliary cirrhosis and the disease association with anellovirus infection.
 研究代表者
 二宮 匡史（NINOMIYA MASASHI）
 東北大学・病院・医員
 研究者番号：70583938

研究成果の概要（和文）：

NOD. c3c4マウス、PBCの患者血清よりRDV法にて未知のウイルス遺伝子の同定を試みる前に、慢性C型肝炎患者血清から、HCVの遺伝子を同様の方法で検出可能かどうか試みたが、困難なため、次世代シーケンサーを用いてウイルス遺伝子検出可能かどうか試みた。

8583 reads がリファレンスに mapping された。約 0.1% の read が HCV ゲノム由来であった。Coverage は 99.8%、平均 depth は 69.5X を示した。NS3 領域では、アミノ酸塩基 5 カ所の variants を認めた。

研究成果の概要（英文）： We tried to sequence hepatitis C virus (HCV) genome with RDV method, before conducting RDV method with serum in PBC patients or NOD. c3c4 mice. But this method seemed to be impossible to detect unknown viral sequence. Therefore, we tried to use deep sequencing technology.

Result: The reads of HCV origin mapped 8583 reads on the reference HCV genome. The reads of HCV origin were detectable in about 0.10% of the total reads. Surprisingly, the coverage showed 98.8% and read depth indicated 69.5x. In NS3, the position of 5 amino acid bases showed mixed variants.

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 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

急性肝炎・慢性肝炎など肝疾患の原因となるウイルスとしてA型からE型の存在が認められ、サイトメガロウイルス、EBウイルス、単純ヘルペスウイルス、パルボウイルスなども報告されている。現在まで種々の可能性ある

ウイルスが報告されているが、依然原因不明の肝疾患・肝硬変が5%前後存在する。現在までの種々の検討から、原因不明肝疾患の病態形成に未知のウイルス感染関与の可能性があり、とりわけ自己免疫関連の肝疾患にはウイルス感染が関連している可能性がある。

これまで、我々の教室はPBCの病態解析をPBCの動物モデルNOD. c3c4 miceを用いて行ってきた。胆管病変の解析を進めていくうち、特徴的な胆管嚢胞形成を認め、これらは、ヒトPBCでは認めない所見であることから、Caroli病の動物モデルになりうると考えた(Nakagome et al. J Autoimmun. 2007)。だが、遺伝子型の変化はないが、この特徴的な胆管嚢胞を示さないマウスの個体もあり、原因としてウイルス感染が背景にあるのではと考えている。新規ウイルスの同定をRDA法を用いて検討した。

2. 研究の目的

- (1) 胆汁うっ滞症のモデルであるNOD. c3c4 miceの胆管病変に関連するウイルス感染の有無について調べる。
- (2) 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病態形成とウイルス感染の有無について調べる。
- (3) 原因不明肝障害と肝癌患者の保存血清、肝組織から原因ウイルス感染の有無について検討する。
- (4) Anellovirus感染と肝疾患の関連性について検討する。

当初はこのような目的で研究を進めていたが、NOD. c3c4マウス、原発性胆汁性肝硬変の患者血清よりRDV法にて未知のウイルス遺伝子の同定を試みる前に、慢性C型肝炎患者血清から、HCVウイルスの遺伝子を同様の方法で検出可能かどうか試みた。Nested PCR法を工夫することで、HCVゲノムの数十塩基1フレームのみ検出されたが、他サンプルの検討に用いるレベルではないと判断した。

そのため、次世代シーケンサーを用いて未知のウイルス遺伝子検出可能かどうか試みる方針に変更し、C型肝炎ウイルスの全塩基配列の読みとりが可能か検討した。

3. 研究の方法

HCV患者血清2例を使用。800 μ lの血清よりMagMAX Viral RNA Isolation Kitを用いて、血清内のtotal RNAを抽出。抽出したtotal RNAを用いて、mRNA-Seq Sample Prep Kitを使用し、ライブラリ作製した。Genome Analyzer IIxを用いて76-mer single-end sequenceを行った。得られたreadからヒトgenome由来のreadを除いたあと、データベースより970株のHCV genomeにmapping解析を行った。NS3 (nt 4041-4583)、NS5A (nt 6327-7601)領域にてアミノ酸変異の解析を行った。

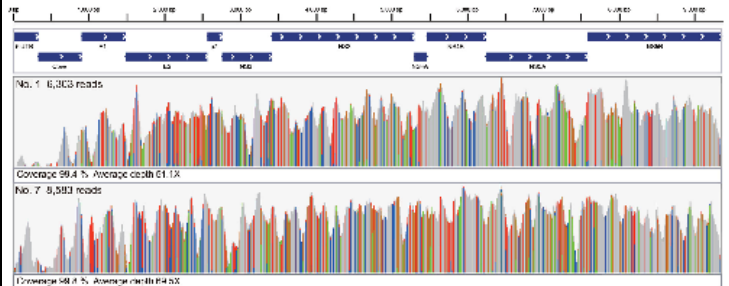
4. 研究成果

(1) マッピングの結果、症例1では、約2800万リード、症例2では、約9400万リードを得た。そこから、ヒトgenome由来のリ

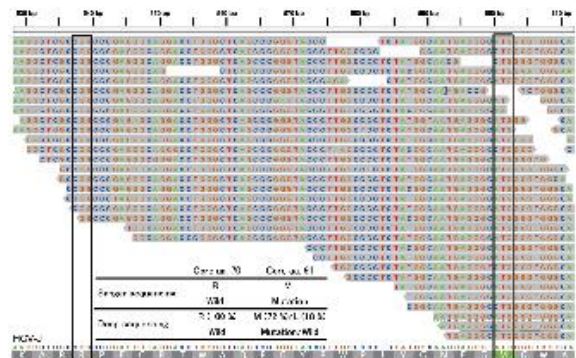
| Sample | No. (%) of reads | |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | Patient 1 (treatment naive) | Patient 7 (treatment experienced) |
| Total reads | 27,717,487 (100.00) | 94,151,356 (100.00) |
| Adaptor and primer reads | 6,502,508 (23.46) | 28,605,006 (30.38) |
| Modified total reads | 21,214,979 (76.54) | 65,546,350 (69.62) |
| Reads of human origin | 19,761,560 (71.30) | 58,446,916 (62.08) |
| Unknown reads | 1,453,419 (5.24) | 7,099,434 (7.54) |

ードを除くと症例1で140万リード、症例2では、700万リード得た。このリードを970株のC型肝炎ウイルスのreferenceにマッピングした。

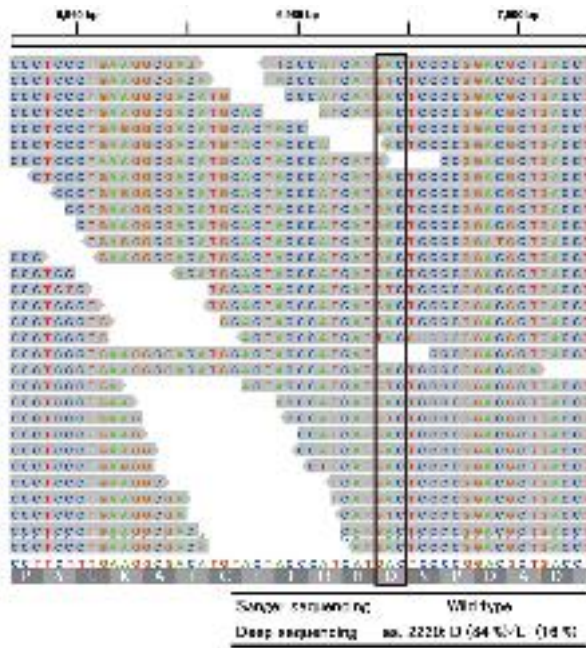
(2) マッピング解析の結果、症例1では、coverage 99.4%でリード depth 51.1x、症例2では、coverage 99.8%でリード depth 69.5xであった。



(3) 症例2について、HCV core領域の配列とインターフェロン治療に關与する、70番目と91番目の核酸配列を検討した。91番目はダイレクトシーケンスでは、アミノ酸がメチオニンを示したが、deep-sequenceの解析では、メチオニン(72%)、シスチン(18%)の混在であることが分かった。



(4) さらに症例2についてNS5A-ISDR (aa2209-2248)の領域を検討した。ダイレクトシーケンスではアミノ酸変異は見いだせないが、deep-sequenceではaa2220にminor variantロイシン(D2220D/L)が18%含まれていることが、検出された。



(5) 症例2において、NS3 (nt 4041-4583) 領域では、アミノ酸塩基 5 カ所の variants を認め、K213K/R (18.26%/52.74%)、G237G/S (41.46%/49.54%)、P264P/S/A (20.42%/19.40%/9.19%)、S297S/A (63.81%/15.19%)、A358A/T (20.21%/75.79%)であった。

症例1では、アミノ酸塩基 3 カ所の variants を認め、L14L/F/V (67.89%/6.8%/2.3%)、S61S/A (48.71%/20.29%)、I586I/T (4.12%/30.88%)であった。

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 3件)

① Ninomiya M, Ueno Y, Shimosegawa T
PBC: animal models of cholangiopathies and possible endogenous viral infections. *International Journal of Hepatology*. 2012
doi:10.1155/2012/649290 査読有

② Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T
Use of Illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *Journal of Clinical Microbiology* 50(3) 2012.
doi: 10.1128/JCM.05715-11. 査読有

③ Ninomiya M, Kondo H, Shimosegawa T

Murine Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis.
ISRN Hepatology 2013 1-7.
doi:10.1155/2013/237870 査読有

[学会発表] (計 7件)

① 二宮匡史 次世代シーケンサーを用いたC型肝炎ウイルスの解析
JDDW 2011 2011.10.20-10.23 福岡

② Ninomiya M Efficiency of detecting hepatitis C virus using deep sequencing technology: high faculty to differentiate the viral variants compared with Sanger sequencing
AASLD 2011.11.4-11.8 San Francisco, USA

③ 二宮匡史 次世代シーケンサーを用いたC型肝炎ウイルスのアミノ酸配列解析と従来のSanger法シーケンスとの比較
第48回 肝臓学会総会 2012.6.7-6.8 金沢

④ 二宮匡史 次世代シーケンサーを用いて慢性B型肝炎患者血清内の特異的なmiRNAのプロファイリングを行い、新規miRNAの候補を見いだした
JDDW2012 2012.10.10-10.11 神戸

⑤ Ninomiya M Characterization of circulating microRNAs in patients with primary biliary cirrhosis by Illumina deep sequencing.
AASLD 2012.11.9-11.13 Boston, USA

⑥ Ninomiya M Circulating microRNAs in some patients with viral hepatitis by deep sequencing showed characteristic expression.
AASLD 2012.11.9-11.13 Boston, USA

⑦ 二宮匡史 次世代シーケンサーを用いた、C型肝炎ウイルスゲノム解析と血清内miRNAのプロファイリング
第39回日本肝臓学会東部会 2012.12.6-12.7 東京

[図書] (計 1件)

二宮匡史、福島耕二、上野義之、下瀬川徹
ウイルス感染とPBC
アークメディア 肝胆膵 2011 665-669

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 匡史 (NINOMIYA MASASHI)

東北大学・病院・医員

研究者番号：70583938

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者