

課題番号 : 25指202
研究課題名 : 肝炎の海外連携等に係る研究
主任研究者名 : 溝上雅史
分担研究者名 : 是永匡紹
キーワード : 肝がん、FFPE サンプル、ゲノムワイド関連解析 (GWAS)、超並列シーケンス、データベース

研究成果 1 (海外施設との連携) :

国立国際医療研究センター・国際医療協力部と連携して、世界各国 (インドネシア、タイ、アルゼンチン、ミャンマー、ウズベキスタン、モンゴル、キルギスタン、台湾、香港、韓国) における HBV 研究の拠点施設と共同研究体制 (MOU の作成) を整えた。うち、6 か国 (インドネシア、タイ、ミャンマー、ウズベキスタン、モンゴル、台湾) の 7 施設との MOU 作成を完了した。

海外施設の研究担当者とはメールでの打ち合わせを行い、検体の収集および臨床情報の収集を開始している。海外サンプル (ゲノム DNA、血清) の収集に向けて、肝炎・免疫研究センター内に設置した検体・臨床情報管理システムの英語版データシートを作成した。

台湾の共同研究施設から B 型肝炎関連肝発癌患者 400 名および慢性肝炎患者 400 名のゲノム DNA を受領して、検体・臨床管理システムへの登録を完了した。

研究成果 2 (国内施設との連携) :

国内の研究協力施設で採血した B 型肝炎患者のゲノム DNA、血清サンプルを SRL 経由で国立国際医療研究センター・国府台病院に収集・保管する検体・臨床情報収集システムを構築した。今年度はこのシステムを利用して 959 例を収集し、合計 1,163 検体のゲノム DNA と血清を収集した (SRL 経由 : 763 検体、施設直送 : 400 検体)。収集したゲノム DNA すべての濃度測定を実施し、均一濃度への調整を実施した。

簡易版データシートを用いた臨床情報の収集を進め、SRL 経由で収集した 763 検体のうち 700 検体、および施設直送 400 検体のすべてについての臨床情報を収集した。また、詳細版データシートを用いた臨床情報の収集も並行して進め、SRL 経由で収集した 763 検体のうち 181 検体、施設直送 400 検体のうち 162 検体についての臨床情報を収集した。

研究成果 3 (肝発癌研究) :

台湾 GWAS (B 型肝炎関連肝発癌患者と慢性肝炎患者の比較) で検出された疾患感受性候補 SNP を対象として、日本人サンプルを用いた Replication 解析を実施した。また、台湾の共同研究施設から受領した B 型肝炎関連肝発癌患者 400 名および慢性肝炎患者 400 名のゲノム DNA を用いて、日本人を対象とした GWAS (B 型肝炎関連肝発癌患者と慢性肝炎患者の比較) で検出された疾患感受性候補 SNP の Replication 解析を実施している。

Subject No. : 25SHI202
Title : Global initiatives for hepatitis researches
Researchers : Masaaki Korenaga
Key word : Hepatocellular carcinoma, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded samples,
Genome-wide association studies, next generation sequencer, database

Abstract :

Result1 (Collaboration with foreign countries)

We prepared a memorandum of understanding (MOU) for collaboration of HBV researches, with foreign universities / institutes / hospitals from Indonesia, Thai, Argentina, Myanmar, Uzbekistan, Mongolia, Kyrgyzstan, Taiwan, Hong Kong and Korea. We have already completed the document for seven institutes from six countries, including Indonesia, Thai, Myanmar, Uzbekistan, Mongolia, and Taiwan.

We had meetings to make study design via e-mail, and have already started to collect samples (genomic DNA and serum) and clinical information from HBV patients and healthy controls. To collect clinical information of HBV patients, we prepared an English version of clinical information form as a template.

A total of 800 Taiwanese genomic DNA samples from HBV patients have already collected with simplified clinical information.

Result2 (Collaboration with institutions in Japan)

We constructed the “sample and clinical information collecting system” in our own host server. Using the system, a total of 1,163 Japanese samples from HBV patients and healthy controls were collected with simplified (n=1,100) and detailed (n=343) clinical information. The concentration of all genomic DNA samples was measured using spectrophotometer and all the samples were arranged to have a uniform concentration.

Result3 (Collaboration with institutions in Japan)

We performed a replication study for candidate SNPs which were identified in Taiwan GWAS (in comparison between patients with HBV-related hepatocellular carcinoma and patients with chronic hepatitis B), using Japanese samples. We also performed a replication study for candidate SNPs, which were identified in Japanese GWAS, using Taiwan samples.

研究のマイルストーン

検体・臨床情報

【平成25年度】

検体・臨床情報の収集

研究協力施設とMOU作成

肝発癌因子の探索

HLA-DPアレルタイピング

FFPEのゲノム解析

FFPEサンプルの収集

Omni expressの評価

【平成26、27年度】

検体・臨床情報の収集

国内外から新規検体の収集

肝発癌因子の探索

HLA層別化GWASの実施

FFPEのゲノム解析

FFPEサンプルでのGWASパイプライン構築

HBV由来HCCを対象としたGWAS・Replication解析の実施

1. 検体・臨床情報の収集

国内外の研究協力施設からB型肝炎・C型肝炎由来肝がん患者群、非B非C型肝炎患者群、慢性肝炎患者群、肝硬変患者群のサンプルを収集し、合わせて詳細な臨床情報を収集してデータベースに蓄積する。なお、肝がん患者群については、肝細胞がん組織のFFPEサンプルも収集する。



検体収集の概要図

2. 肝発癌因子の探索

肝細胞がん組織から抽出したゲノムDNAやトータルRNAを用いて、高速シーケンスによるWhole transcriptome解析やエピゲノム解析などを実施する。癌組織におけるゲノム構造異常(コピー数異常、転座、逆位など)、後天的ゲノム修飾情報、遺伝子発現変化などのゲノム情報を、患者の詳細な臨床情報と共にデータベースに蓄積する。臨床情報と共に、様々なゲノム情報を統合的に解析することで、癌化や病態進展に関わる関連遺伝子の同定やその遺伝子機能の解明を目指す。

3. FFPEのゲノム解析

FFPEサンプルから抽出したゲノムDNAやトータルRNAを用いたゲノムワイドSNP解析や高速シーケンスの実用性を検証し、ゲノムワイド関連解析(GWAS)やエピゲノム解析、トランスクリプトーム解析といった様々なゲノム解析のパイプラインを構築する。ゲノム解析のパイプラインが構築されることで、本研究のみならず様々な疾患を対象とした臨床ゲノム研究において有用となる。

H25年度成果

国際医療協力部と連携して、国外のHBV研究の拠点施設と国際医療研究センターの間でMOUの作成を実施した(図1)。台湾の共同研究施設からB型肝炎関連肝発癌患者400名および慢性肝炎患者400名のゲノムDNAを受領し、検体・臨床管理システムへの登録を完了した。

既収集検体に加えて、新たに国内から収集したB型肝炎患者サンプルを対象としてHLA-DPB1タイピングを実施し、関連解析を実施した(図2)。関連解析の結果、B型肝炎慢性化および肝発癌に関連するDPB1アレルが同定された。

新規収集検体: 1,430例		既収集検体: 3,183例	
SRL経由	999例	日本人	1,292例
施設直送	431例	香港人	661例
		タイ人	629例
		韓国人	601例
HLA-DPB1 タイピング	1,239例		3,183例
AXIOM	844例		464例
NGS (HLA-DP)	192例		96例
NGS (HBV-DNA)	49例		0例

図1. 検体集およびデータ取得状況(2014.4.22集計)

Allele	Japanese					
	HBV (2n=2,760)		Healthy (2n=2,470)		X ²	OR* (95% CI)
	count	%	count	%		
HLA-DPB1						
01:01	1	0.0	1	0.0	0.9374	0.89 (0.06-14.31)
02:01	514	18.6	602	24.4	4.05E-07	0.71 (0.62-0.81)
02:02	77	2.8	88	3.6	0.1136	0.78 (0.57-1.06)
03:01	126	4.6	108	4.4	0.7364	1.05 (0.80-1.36)
04:01	63	2.3	138	5.6	5.43E-10	0.39 (0.29-0.53)
04:02	129	4.7	224	9.1	2.54E-10	0.49 (0.39-0.61)
05:01	1294	46.9	948	38.4	5.52E-10	1.42 (1.27-1.58)
06:01	10	0.4	13	0.5	0.3709	0.69 (0.30-1.57)
09:01	401	14.5	241	9.8	1.52E-07	1.57 (1.33-1.86)
13:01	61	2.2	39	1.6	0.0961	1.41 (0.94-2.11)
14:01	47	1.7	42	1.7	0.9944	1.00 (0.66-1.52)
17:01	8	0.3	0	0.0	0.0074	0.89 (0.43-1.88)
19:01	14	0.5	14	0.6	0.7683	0.45 (0.04-4.93)
21:01	1	0.0	0	0.0	0.3441	0.22 (0.03-2.00)
29:01	1	0.0	2	0.1	0.4999	1.49 (0.54-4.11)
36:01	2	0.1	0	0.0	0.1809	
38:01	1	0.0	4	0.2	0.1419	
41:01	10	0.4	6	0.2	0.4350	

a) HBV patients (n=1,380) vs. Healthy control (n=1,235)

HLA-DPB1 Allele	Japanese					
	HCC (2n=1,148)		IC + CH (2n=1,356)		X ²	OR* (95% CI)
	count	%	count	%		
01:01	0	0.0	1	0.1	0.3574	0.64 (0.52-0.79)
02:01	171	14.9	291	21.5	2.45E-05	1.09 (0.38-1.75)
02:02	34	3.0	37	2.7	0.7263	1.13 (0.78-1.63)
03:01	58	5.1	61	4.5	0.5164	1.70 (1.00-2.87)
04:01	34	3.0	24	1.8	0.0482	0.99 (0.68-1.44)
04:02	52	4.5	62	4.6	0.9593	1.20 (1.02-1.40)
05:01	571	49.7	614	45.3	0.0260	0.79 (0.22-2.79)
06:01	4	0.3	6	0.4	0.7100	1.03 (0.82-1.28)
09:01	169	14.7	195	14.4	0.8095	1.33 (0.78-2.26)
13:01	29	2.5	26	1.9	0.3004	1.08 (0.58-1.98)
14:01	20	1.7	22	1.6	0.8162	2.37 (0.43-12.94)
17:01	4	0.3	2	0.1	0.3055	1.66 (0.52-5.24)
19:01	7	0.6	5	0.4	0.3842	
21:01	1	0.1	0	0.0	0.2770	
29:01	1	0.1	0	0.0	0.2770	
36:01	0	0.0	2	0.1	0.1930	
38:01	1	0.1	0	0.0	0.2770	
41:01	2	0.2	8	0.6	0.1003	0.29 (0.06-1.39)

b) HCC (n=574) vs. IC + CH (n=678)

図2. HLA関連解析結果
a) B型肝炎慢性化とHLA-DPB1の関連
b) 肝発癌とHLA-DPB1の関連

課題番号 : 25指202
研究課題名 : 代謝異常と肝発癌に関する研究
主任研究者名 : 溝上雅史
分担研究者名 : 是永匡紹

キーワード :

研究成果 : 肝細胞癌は高齢者、肥満・糖尿病患者に圧倒的に多いという臨床的事実は長く認識されていながら、どのように発癌機構に影響するのかわからないままであった。この原因としては、肝細胞癌の原因として約70%がHCV感染しており、これまでに研究はHCVを排除することに費やされてきたと推測している。近年、HCVに対しては新薬の開発が進み、2-3年以内にHCVを高率かつ副作用なく、排除可能になる。ポスト肝炎ウイルス時代の肝発癌は、前述した加齢と代謝異常のクロストークを解明することが必要不可欠である。

肥満・脂肪性肝疾患では、糖・脂質代謝異常のみならず、肝内鉄過剰状態が存在するが報告されているが、脂肪肝における鉄代謝異常の意義や臨床的な長期予後は未だに明らかにされていない。

そこで、本年度では、8週齢のC57BL/6NとC57BL/6Jに対してAIN食又は通常餌(CE2)を与える4群(6NAIN,6NCE,6JNAINe,6JCE)を設定する。飼育開始6,12ヶ月目sacrificeし肝内の脂肪化の程度、酸化ストレスの程度、肝ミトコンドリア単離し、その機能解析を行った。

C57BL/6Nでは、C57BL/6Jと比較して軽度の体重増加を認めていたが、AIN食でその差顕著化し、肝内脂肪や鉄濃度の増加を認めた。また、脾臓内での鉄濃度の低下を認め、6Nでは網内系で鉄保持が充分でなく、肝臓内へ蓄積されていると推測された。鉄吸収機構の状態を把握するため、hepcidinを測定したから、発現低下が確認され、

その原因としてIL6/STAT3やBMP6/Smad3は否定され、酸化ストレスが関与することが確認された。マイクロアレイ解析で、ミトコンドリアによる脂肪酸分解抑制、及び呼吸鎖複合体IV機能異常が抽出されたため、CPT1/2のwestern blotや複合体IV酵素活性やsubunitsをreal time PCRにて確認したところCPT1/2の発現低下によるβ酸化抑制、及び複合体IV活性低下、更に複合体IVのsubunitであるCoX7a2発現低下が確認された。

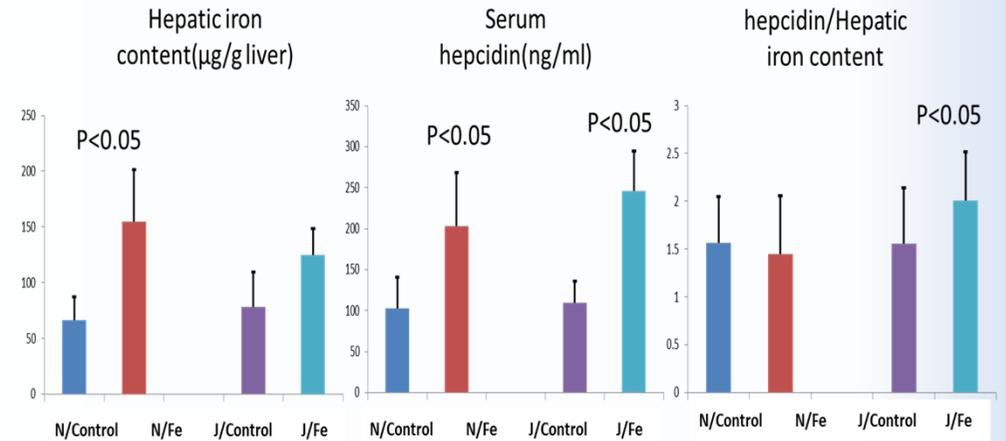
遺伝子に変化がないとされるC57BL/6JとC57BL/6Nにおいても、加齢とともに肝脂肪蓄積と脾臓内鉄に対する感受性が異なる。同量の鉄置換食にて更に肝機能が上昇したことは脾臓による鉄処理機構低下が肝脂肪肝増強の一因となることを示唆する。またCoX7aは骨格筋ではCoX7a1としてエピゲノム修飾を受け糖尿病発症に関与すると報告され、肝臓でのCox7aも加齢と鉄代謝異常により同様な変化を受ける可能性が示唆された。今後は、Cox7a2のエピゲノム解析を行うとともに、別モデルやKnock outマウスを作製し、肝発癌機構にともなうComplex IVの意義を明らかにする。今後は、Cox7a2のエピゲノム解析を行うとともに、別モデルやKnock outマウスを作製し、肝発癌機構にともなうComplex IVの意義を明らかにする。

25指202 分担研究： 代謝異常と肝発癌に関する研究

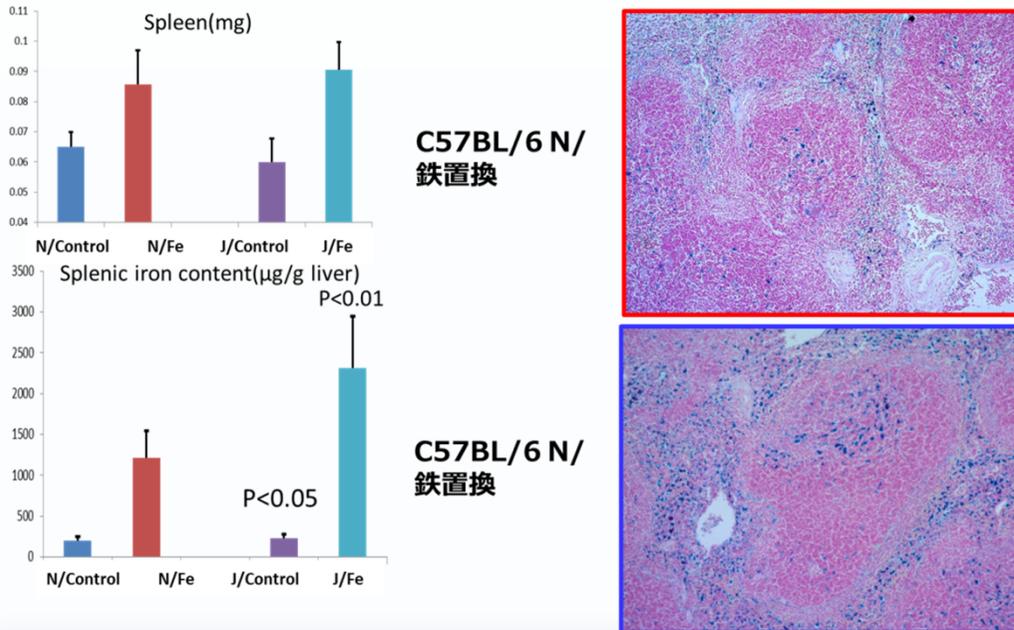


- ✓ 肝機能評価・・・体重、肝重量、ALT,AST (血清)
- ✓ 鉄代謝能・・・肝内鉄濃度(wet), hepcidin,BMP6, IL6 (mRNA), hepcidin(血清)
- ✓ 酸化ストレス・・・dROM, BAP, BAP/dROM (血清) SOD2(肝臓)
- ✓ 肝脂肪化・・・中性脂肪, FAS, CPT1/2, CHOP,
- ✓ ミトコンドリア機能・・・complex IV activity COX 7a2

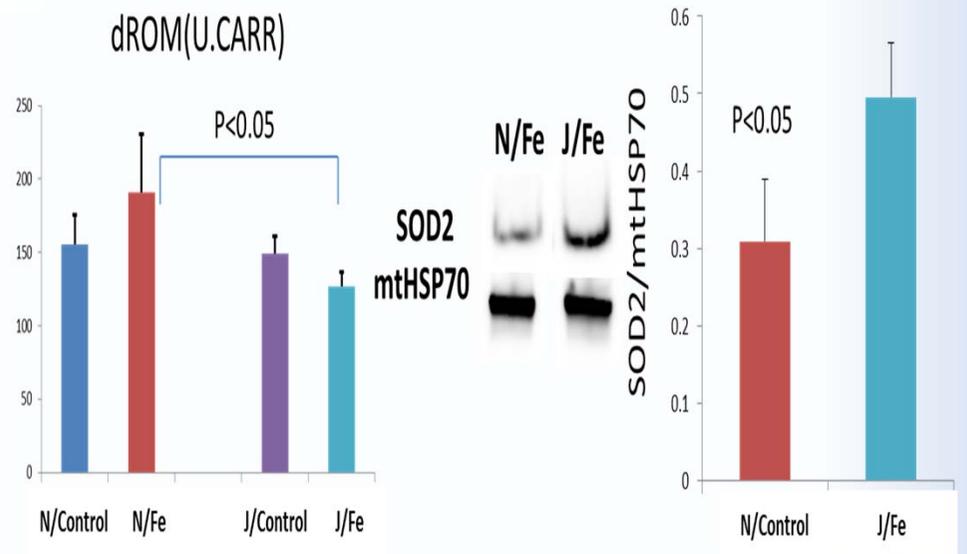
C57BL/6NはC57BL/Jと比べ、鉄に対するHepcidin発現が低下している



C57BL/JではC57BL/6Nと比べ、脾鉄濃度が高い

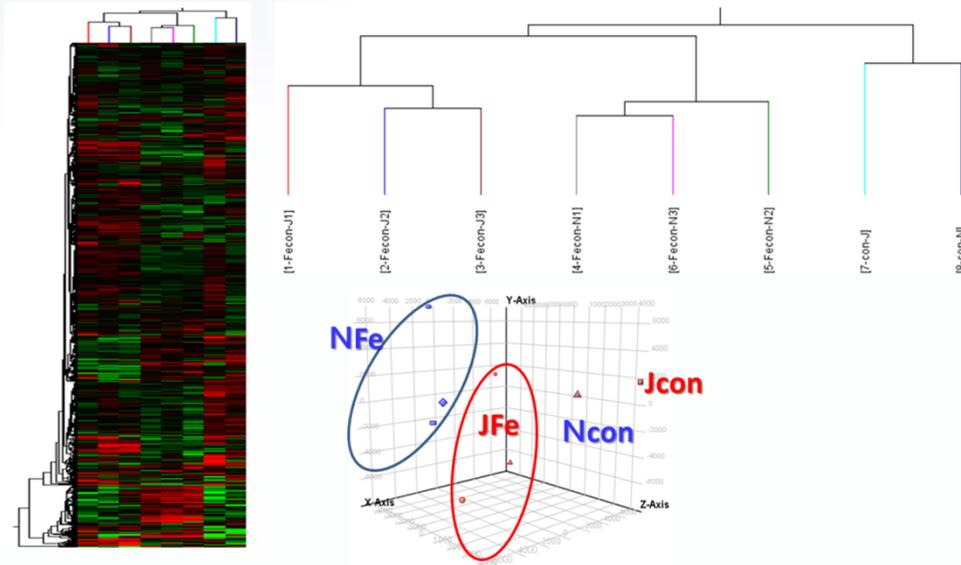


C57BL/6NはC57BL/Jと比べ、酸化ストレスが亢進する

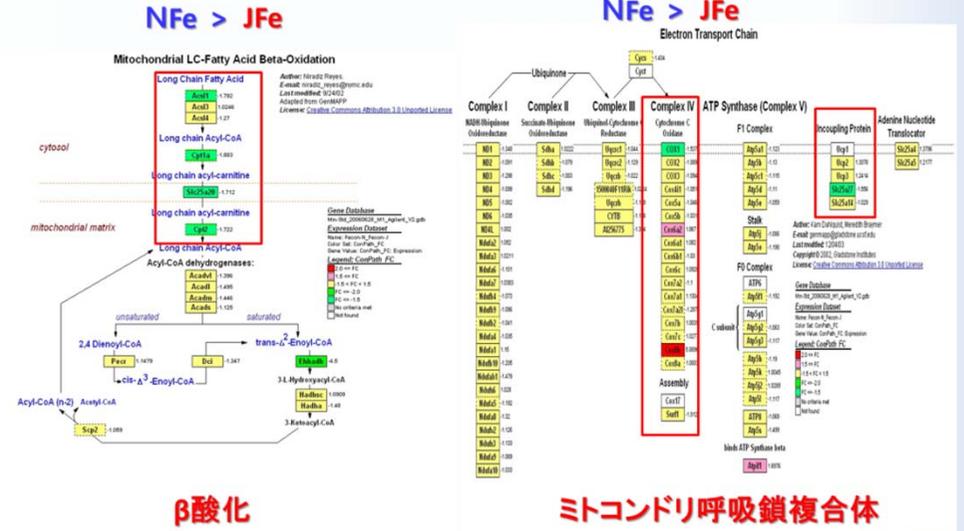


25指202 分担研究： 代謝異常と肝発癌に関する研究

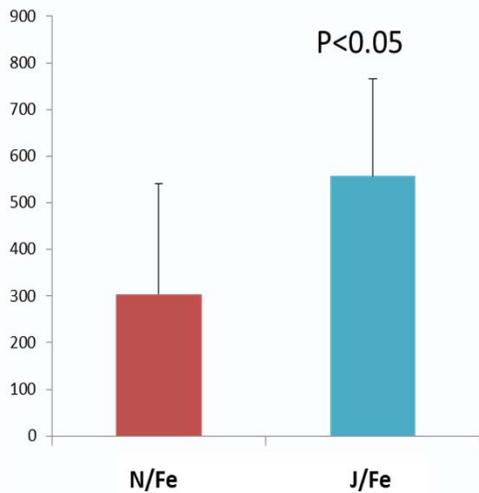
マイクロアレイでも4群は独立したクラスターを形成する



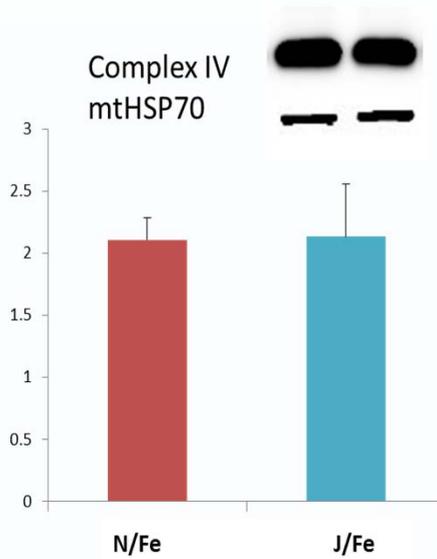
ミトコンドリアβ酸化とミトコンドリア複合体IVの機能異常が疑われる



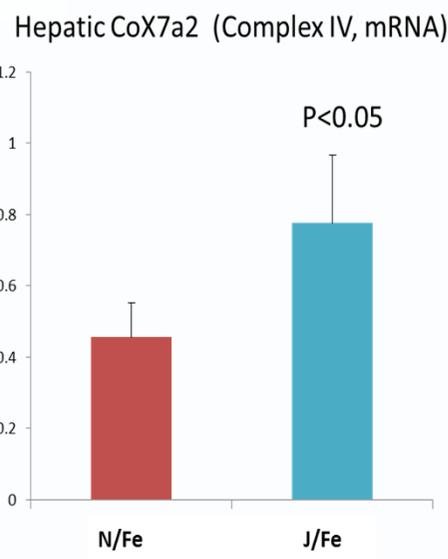
Complex IV activity



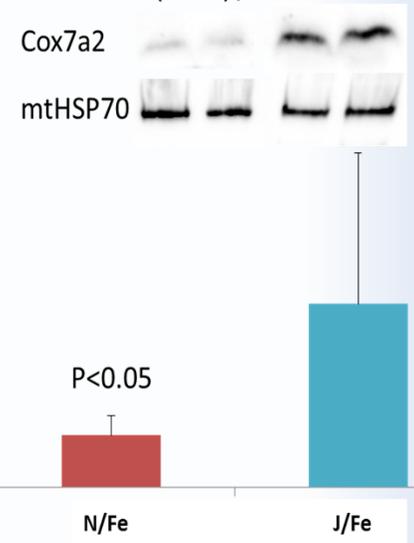
Complex IV(16kDa) / mtHSP70



CoX7a2の発現低下が確認される



CoX7a2(9kDa) / mtHSP 70



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指202

研究課題名：肝炎の海外連携等に係る研究

主任研究者名：溝上 雅史

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
IL28B polymorphisms and clinical implications for hepatitis C virus infection in Uzbekistan.	Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, Mizokami M.	PLoS One	24;9(3):e93011	2014
New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia.	Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M.	PLoS One.	10;9(2):e86449	2014
Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved HBV infection following rituximab-containing chemotherapy.	Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M , Ueda R.	Hepatology.	in press	2013
Is antiviral prophylaxis necessary to prevent hepatitis B virus (HBV) reactivation in patients with HBV-resolved infection receiving rituximab-containing chemotherapy?	Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M , Ueda R.	J Clin Oncol.	31(35):4480	2013
In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behaviour regarding its parental genotypes.	Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M , Oubiña JR	J Gen Virol.	94(Pt 12):2724-8	2013

研究発表及び特許取得報告について

Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults.	Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsunashi H, Karino 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, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M , Japanese AHB Study Group.	Hepatology.	59(1):89-97	2014
Novel point mutations and mutational complexes in the enhancer II, core promoter and precore regions of hepatitis B virus genotype D1 associated with hepatocellular carcinoma in Saudi Arabia.	Khan A, Al Balwi MA, Tanaka Y, Hajeer A, Sanai FM, Al Abdulkarim I, Al Ayyar L, Badri M, Saudi D, Tamimi W, Mizokami M , Al Knawy B.	Int J Cancer	133(12):2864-71	2013
High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B.	Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M , Miyakawa Y, Koike K.	Clin Infect Dis.	57(7):935-42	2013
Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab.	Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M , Ueda R, Utsunomiya A	Hepatol Res.	44(3):354-7	2014
高密度マイクロアレイによるゲノムワイド関連解析(GWAS)の実際	西田奈央、徳永勝士、 溝上雅史	肝胆臓	67(1): 7-14	2013

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
IL28B遺伝子によるC型肝炎の治療効果予測と、第二の関連遺伝子の探索	西田奈央、徳永勝士、 溝上雅史	第17回日本肝臓学会大会	品川	2013年10月9日-12日
B型肝炎慢性化および病態進展に関わるHLA-DP遺伝子のアジア人集団における横断的解析	西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、徳永勝士、 溝上雅史	日本人類遺伝学会第58回大会	仙台	2013年11月20日-23日
C型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索	西田奈央、田中靖人、杉山真也、馬渡頼子、石井真由美、徳永勝士、 溝上雅史	第49回 日本肝臓学会総会	新宿	2013年6月6日-7日

研究発表及び特許取得報告について

Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection	Nao Nishida, Hiromi Sawai, Kouichi Kashiwase, Mutsuhiko Minami, Masaya Sugiyama, Wai-Kay Seto, Man-Fung Yuen, Yong Poovorawan, Sang Hoon Ahn, Kwang-Hyub Han, Kentaro Matsuura, Yasuhito Tanaka, Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Jong-Hon Kang, Shuhei Hige, Tatsuya Ide, Kazuhide Yamamoto, Isao Sakaida, Yoshikazu Murawaki, Yoshito Itoh, Akihiro Tamori, Etsuro Orito, Yoichi Hiasa, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Eiji Mita, Kazuyuki Suzuki, Keisuke Hino, Eiji Tanaka, Satoshi Mochida, Masaaki Watanabe, Yuichiro Eguchi, Masaaki Korenaga, Yoriko Mawatari, Minae Kawashima, Katsushi	American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2013	Washington DC	2013年11月1日-5日
Understanding of IL28B gene associated with treatment response for HCV patients	Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Chieko Haga, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami	61th Annual ASHG Meeting	Boston	2013年10月22日-26日
アジア人集団におけるB型肝炎患者を対象としたHLA-DP遺伝子の横断的解析	西田奈央、澤井裕美、馬渡頼子、杉山真也、川嶋実苗、大橋順、田中靖人、徳永勝士、溝上雅史	第36回日本分子生物学会年	神戸	2013年12月3日-6日

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)
該当なし

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
B型肝炎の慢性化の素因の検出方法	特願2013-179634	徳永勝士、澤井裕美、溝上雅史、西田奈央	2013年8月30日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。