

課題番号 : 26指108
研究課題名 : 肝疾患診療拠点病院と連携したB型肝炎の病態進展に関連するウイルスと宿主要因の解析
主任研究者名 : 杉山真也
キーワード : B型肝炎ウイルス、肝臓内免疫、発癌、1細胞解析、次世代シーケンサー
研究成果 :

「臨床検体の解析」

本課題の初年度の計画にそって、次世代シーケンス解析に利用するための検体収集を行った。探索用と検証用で独立した2群の検体を準備するために、共同研究関係にある東京大学の徳永勝士教授、北海道大学の坂本直哉教授、大阪府立急性期総合医療センターの田尻仁主任部長、北海道大学の武富紹信教授、九州大学の前原喜彦教授、国府台病院肝臓内科の溝上雅史センター長らを中心に調整を行った。研究対象として、A) 慢性肝炎と肝癌、B) 肝癌と肝硬変、C) 慢性肝炎と肝硬変、D) 家族で肝癌の多発した家系、を計画している。A-C) については、各共同研究先の外来・入院診療で収集を行い、癌部と非癌部でそれぞれ100検体、それらの末梢血由来ゲノムを100検体、慢性肝炎由来の末梢血由来ゲノムを200例について、収集した。一方で、D)は家族例での収集となるため、親子での来院が多い、小児科での収集を小児肝炎の研究班長を勤めている田尻先生に依頼した。小児肝炎班の班員から症例の提示を受けて、検体の精査を行っているところである。

検体収集と平行して、病態進行に関連するヒトゲノム要因の探索をするために、エキソーム解析を計画している。エキソーム解析では、アジレント社から発売されている最新のエキソーム解析用キットが最もカバー率が高いとされているが、そのキットを用いた検証試験では、エキソームのカバー率バラつきと不足領域が観察された。そこで、より優れたエキソーム解析用のプローブが必要と考え、東京大学新領域創成科学研究科の鈴木穰教授と共同で、より精密な解析ができるプローブの設計を行った。合成したプローブセットを用いた解析の結果、エキソームの高密度解析ができ、既存のキットで約90%であったカバー率を97%まで向上させた。また、スタートのゲノム量を3分の1量で解析可能とし、1検体あたりの価格を5%ほど削減した。

一方で、得られた大量のシーケンスデータを解析するシステムの構築を進めた。これを作ることで、今後大量検体を処理するとき、自動化して初期段階のデータ処理を行うことができ、時間を節約できる。また、臨床データとヒトゲノムデータを統合解析できるように、データサーバーの機能を追加した。具体的には、ランデータのFastq変換、複数検体を混合して解析したシーケンスデータを個々の検体に分離する過程までを自動化し、臨床データを決まったフォーマットで取り込む仕組みを加えた。

「肝臓内免疫機構の解析」

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染過程とそのときの肝臓内の可視化について条件検討を進めた。マウスでの感染実験に先立って、ヒトの初代培養肝細胞とヒト肝細胞置換キメラマウス由来肝細胞を利用した感染実験を行った。HBVゲノムにレポーター遺伝子を挿入した改変ウイルスを作成し、超遠心でウイルス粒子の精製を行った。その感染粒子分画を肝細胞培養系に投与した。また、HBVのエンベロープ部分を蛍光化したウイルスを作成し、同様に感染の可視化を確認した。その結果、改変HBV粒子では、感染後に細胞の蛍光や発光を確認した。来年度では、マウス実験に移る予定であり、現在、使用予定のマウスシステムを提供してくれる共同研究先と調整中である。予定しているマウスでの感染実験に取り掛かれる予定ではあるが、共同研究先の施設内での事務的調整が遅れるようであれば、共同研究先の施設を借りて実験を進める予定であり、その了承も得ている(名古屋市立大学医学部)。

平行して、1細胞のRNA-seq解析系の樹立を行った。本解析系を用いることで、従来集団として解析されてきた細胞を個々に性質をすることができ、未知の細胞系譜や僅かな違いをもつ重要な細胞を同定できると期待できる。本年度では、HBV感染したヒト肝細胞置換キメラマウスの肝臓を1細胞分離した後に、mRNAの発現を次世代シーケンス解析により比較した。遺伝子発現パターンの違いについての各種条件(HBV感染の有無、HBV複製効率の高低など)で比較解析を実施し、HBV感染受容体が発現している細胞でもHBV感染が成立しないものがあることを見出した。このことから未知の受容体がまだ存在している可能性が推察された。

Subject No. : 26shi108

Title : Analyses of viral and human genome factor associated with the disease progression of hepatitis B using the clinical samples from nation-wide core hospitals of hepatic diseases

Researchers : Masaya Sugiyama

Key word : Hepatitis B virus, Immunity in liver, Carcinogenesis, Single cell analysis, next-generation sequencer

Abstract : Along the study plan, we have advanced the sample collection for an analysis in next-generation sequencing (NGS). We have collected a specimen independent two groups for screening and verification studies by several collaborators belonging to core hospitals of hepatic diseases. Research subjects are below, A) chronic hepatitis vs. liver cancer, B) liver cancer vs. liver cirrhosis, C) chronic hepatitis vs. liver cirrhosis, D) family cases containing multiple patients of HCC. We have collected 100 paired-samples of cancer and non-cancerous part, 100 specimens of their peripheral blood monocyte cells (PBMC)-derived genome, 200 samples of PBMC-derived genomes from chronic hepatitis B. The family samples of Group D were obtained from pediatrics hospital.

Exome sequencing using NGS and these data analysis pipeline were developed to reveal the factors of human and viral genome associated with disease progression. The latest commercial kit for exome sequencing provided by Agilent Technologies showed higher cover-ratio than the other kits. However, the areas of low or loss coverage were observed in our analysis. Therefore, we developed in house exome kit for NGS sequencing in collaboration with Prof. Yutaka Suzuki, University of Tokyo. The coverage rate of in house kit reached up to 97%, whereas that of the commercial kit was approximately 90%. The total amount of genome required for the preparation in our kit was 1 out of 3 against the commercial kit, and the price per specimen was reduced about 5%.

We optimized experimental conditions for visualization of the HBV infection process in the living liver. Human primary hepatocytes and human liver separated from chimeric mice with human hepatocytes were used for infection experiments in culture system. A modified HBV genome inserting the reporter or fluorescent gene was used to produce infectious virion, and viral particles were purified in ultracentrifugation. The infectious particles fraction was administered into cultured primary hepatocytes. Fluorescence or luminescence was observed in the cells after infection. These virion are planned to apply into a mouse model to observe infection dynamics in the living liver.

RNA-seq analysis system based on single cell was established to identify novel lineage cells with unique gene expression. The hepatocytes of HBV-infected chimeric mice were separated into single cell to analyze the gene expression by NGS. In the part of data analysis, several filters for data selection were applied to detect the characteristics of cells with the potential of HBV infection. Then, unknown infection receptor would be existence in addition of NTCP.

「臨床検体の解析」

エキソーム解析用カスタムプローブ設計

Custom Probe (HG19_ExV5Regu_EZ_HX1)

サンプル量比較

| Features | Data |
|----------------------------------|--------|
| Consolidated/Padded Regions | 334820 |
| Target Bases | 114Mb |
| Target bases covered | 111Mb |
| Percent target bases covered | 97% |
| Target bases not covered | 3Mb |
| Percent target bases not covered | 3% |

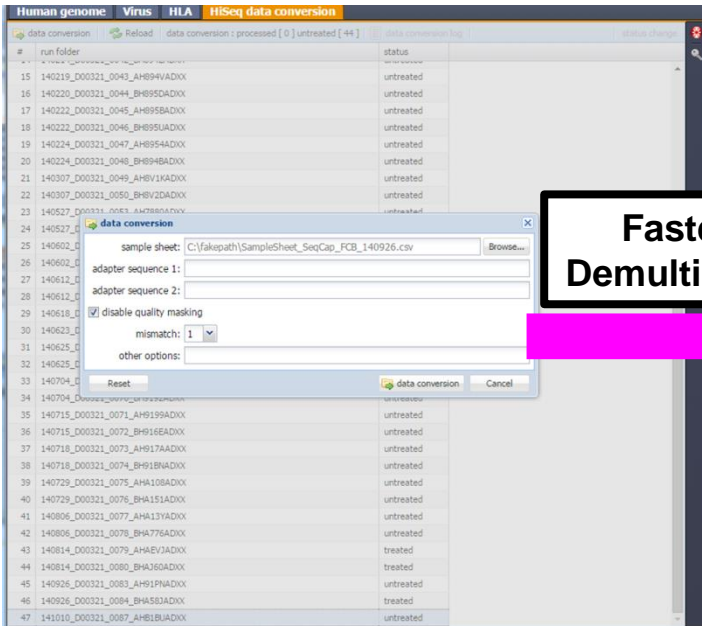
| | SureSelect | Custom |
|---------------|------------|-----------|
| DNA for start | 200ng-3ug | 100ng-1ug |
| Target region | 114Mb | 114Mb |

コスト比較

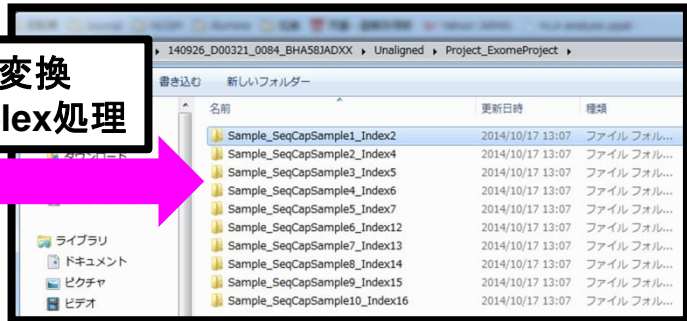
| Capture | Sequencer | Cost/sample |
|------------|-----------|-------------|
| SureSelect | Hiseq | ¥124,110 |
| Custom | Hiseq | ¥118,399 |

カスタムデザインを工夫することで、実験精度の向上と低価格化を実現した。

次世代シーケンス用データサーバー 自動解析システムの確立



Fastq変換
Demultiplex処理



シーケンスデータ 自動解析の流れ

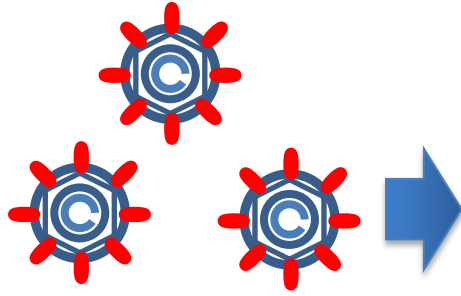
次世代シーケンサー→解析サーバー→Fastq変換→demultiplex処理
(以下構築中 →ヒトゲノムへのアライメント→ベースコール→関連解析)

解析の自動化により、多数検体の処理を簡便化した
→今後のあらゆるシーケンス解析に応用可

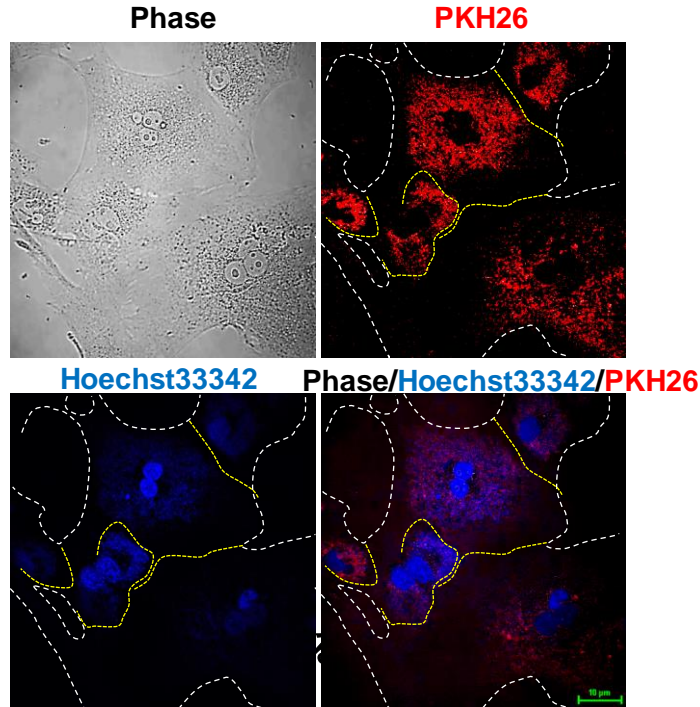
「肝臓内での感染免疫機構の解析」

感染初期過程の可視化

蛍光化HBV



プライマリー細胞系へ感染



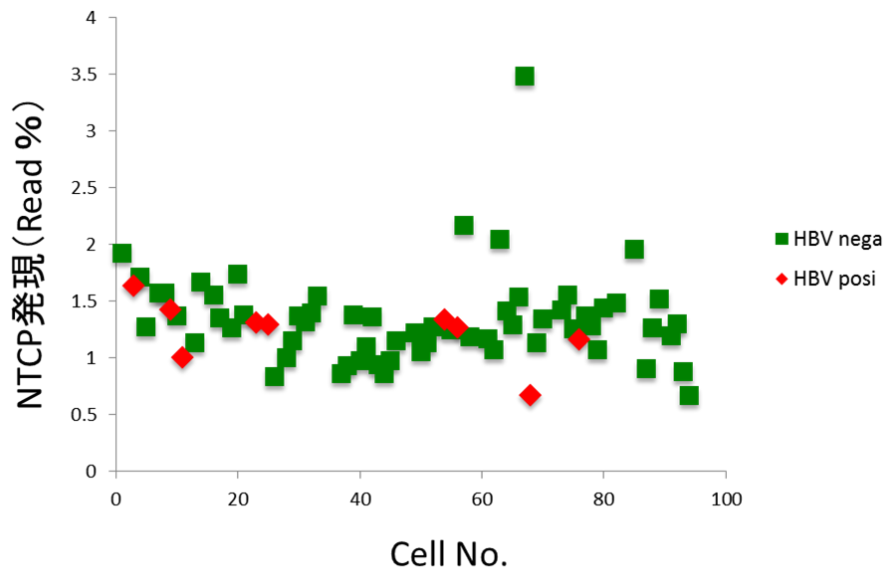
HBV粒子を蛍光物質でマーキングし、可視化した。

また、HBVゲノムに蛍光遺伝子やレポーター遺伝子を組み込んだ人工ウイルスの作成をした。

肝細胞の1細胞解析

1細胞ごとのmRNA解析
(感染感受性、感染前後の変化)

C1™ Single-Cell
AutoPrep System



- 感染受容体とされているNTCPが発現しているだけでは、HBV感染が成立しない例が多数あった。
- これらの遺伝子発現を解析して、シングルセルレベルで感染に必要な遺伝子を明らかにする。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指108

研究課題名：肝疾患診療拠点病院と連携したB型肝炎の病態進展に関連するウイルスと宿主要因の解析

主任研究者名：杉山 真也

論文発表

| 論文タイトル | 著者 | 掲載誌 | 掲載号 | 年 |
|---|--|-------------|-----|------|
| Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) expression. | Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. | J Biol Chem | 290 | 2015 |
| Kondo Y, Kimura O, Tanaka Y, Ninomiya M, Iwata T, Kogure T, Inoue J, Sugiyama M, Morosawa T, Fujisaka Y, Shimosegawa T. | Differential Expression of CX3CL1 in Hepatitis B Virus-Replicating Hepatoma Cells Can Affect the Migration Activity of CX3CR1+ Immune Cells. | J Virol. | 89 | 2015 |
| 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. | New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. | PLoS One | 9 | 2014 |

学会発表

| タイトル | 発表者 | 学会名 | 場所 | 年月 |
|--|--|--|-------|---------|
| 宿主因子を標的とした新規抗B型肝炎ウイルス製剤の開発と作用機序の解析 | 杉山真也、田中靖人、溝上雅史 | 第50回日本肝臓学会総会 | 東京 | 2014年5月 |
| Clinical Significance of Host Factors in Viral Hepatitis | Masashi Mizokami, Nao Nishida, and Masaya Sugiyama | The 2nd International Symposium of Catholic University Liver Research Center Symposium | Korea | 2014年7月 |

研究発表及び特許取得報告について

| | | | | |
|---|---|--|-------------|----------|
| Association of sphingolipid biosynthesis pathway as a novel therapeutic target for HBV replication. | Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, Masayuki Sudoh, and Masashi | International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses | LosAngels | 2014年9月 |
| Incidence of HBV infection in MSM cohort in Ulaanbaatar and new therapies for hepatitis B and C. | Masaya Sugiyama | Japan-Mongolia Collaborative Study for HIV and Hepatitis in MSM in Mongolia. | Ulaanbaatar | 2014年10月 |

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

| タイトル | 発表者 | 発表先 | 場所 | 年月日 |
|------|-----|-----|----|-----|
| | | | | |

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 |
|------|------|-----------------------|----------|-----|
| | | | | |

※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。