

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、ヒトゲノム解析、臨床応用、肝疾患診療連携拠点病院

研究成果 :

#### 「臨床検体の解析」

昨年から、肝疾患診療連携拠点病院と共同研究関係にある厚労科研班会議の各班長（徳永 勝士 教授、坂本 直哉 教授、田尻 仁 主任部長）、北海道大学医学部消化器外科（武富 紹信 教授）、九州大学医学部消化器外科（前原 喜彦 教授）、群馬大学医学部消化器外科（調 憲 教授）、国府台病院肝臓内科（溝上 雅史 センター長、正木 尚彦 室長）らから検体の収集を行った。解析の対象としては、A) 慢性肝炎 vs. 肝癌、B) 肝癌 vs. 肝硬変、C) 慢性肝炎 vs. 肝硬変、D) 肝癌多発家系の解析（後述）があり、それらについて検体収集を継続して実施した。

その結果、探索用の検体として、313 サンプルを収集した。その 303 検体のエキソソングキャプチャーとエキソームシーケンスを終えた。収集したデータは、昨年作成した自動解析システムで1次解析を実施し、コピーナンバーバリエーション (CNV) と一塩基多型 (SNPs) 解析を行った。探索検体でのシーケンスから得られた解析結果では、健常者検体と比較して、肝炎に罹患した患者に特有と推定される CNV を二箇所発見した。探索用の全検体をシーケンスした段階で再度追加解析し、バリエーションセットで検証する。SNPs 解析は平行して進めている。

本年度では、北海道大学外科から提供を受けた肝切除検体としては、約 120 検体を解析した。癌部、非癌部での比較解析を実施しており、B型肝炎がん部に特有のインテグレーション部位を複数個検出している。昨年度、九州大学の検体から得られた結果と、本年度に得られた結果について、インテグレーションサイトを比較検討する。また、本年度では、次世代シーケンスを使わないインテグレーション領域の同定法の開発を進めた。従来は、高速シーケンサーで全ゲノムシーケンスが必要であったが、本解析法を用いることで、PCR とキャピラリーシーケンスをベースにヒトとウイルスの融合遺伝子を分離同定できることを確認した。

ヒトゲノム因子と併せて、ウイルス因子の解析を進めた。論文発表している E-PAS 法によって、現在保有している検体のウイルスゲノム抽出と HBV 遺伝子型/亜型を決定した。続いて、HBV 抗原となりえる HBs 蛋白領域のシーケンスを実施した。最終的には、ヒトゲノム因子とウイルス因子を組み合わせで解析し、精度の高いリスク分類を目指す。

D) 肝癌多発家系の解析：家族検体の収集が必要であることから、親子での来院が期待できる小児科での収集と住民コホートでの収集を進めた。また、北海道大学でも家族検体の収集が可能ということで、その収集を依頼している。現在のところ、2家系について住民コホートで収集可能となっており、準備を進めた。高速シーケンサーを使った家族解析をすることで少ない検体で、精度の高いリスク遺伝子の抽出ができるようになる。

#### 「肝臓内免疫機構の解析」

昨年の *in vitro* での条件検討に従って、マウスでの *in vivo* イメージングを実施した。マウスに肝障害を誘導した部位にマクロファージが遊走し、集合する様子を捉えることが出来た。好中球の遊走についても捉えることができた。

昨年に得た 1 細胞でのトランスクリプトーム解析について、肝細胞に絞ったうえでのデータ解析を進めた。HBV 感染受容体として NTCP 遺伝子が報告されていたが、NTCP 遺伝子が発現していても感染が起きていない細胞が多数発見された。このことは、NTCP 遺伝子以外にも感染に関わる遺伝子が存在していることを意味している。その後の解析で、NTCP 遺伝子が発現しつつも、HBV 感染していない細胞で発現が低下している遺伝子を抽出した。特に、細胞表面に発現している遺伝子を抽出したところ、4つの遺伝子に絞りこむことが出来た。それらについて、感染受容体としての可能性を確認するために、CRISPR/Cas9 系でのノックアウト細胞を作成し、感染実験によって検証を行っている。

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 :

[Analysis of clinical samples]

We have continued to collect clinical samples, such as genomic DNA and serum, from regional core centers for the treatment of liver disease since last year. The collaborator of the sample collection was a group leader directing their research teams of Health Labour Sciences Research Grant. Main members are Prof. Katsushi Tokunaga of University of Tokyo, Prof. Naoya Sakamoto of Hokkaido University, Prof. Hitoshi Tajiri of Osaka General Medical Center, Prof. Akinobu Taketomi of Hokkaido University, Prof. Yoshihiko Maehara of Kyushu University, Prof. Ken Takebe of Gunma University, and Prof. Masashi Mizokami of Kohnodai Hospital. 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. Total 313 samples were collected in 2015 from the above hospitals for screening assay. After the quality control of genomic DNA, the 303 samples were prepared with the exome analysis using exon capture followed by next generation sequencing (NGS). These huge data of genomic sequence were stocked in our database after the base call and the alignment using our analysis pipeline for NGS. Four candidate SNPs relating with HCC development were determined in comparison between chronic and HCC patients. For the validation study, independent samples are collected in this and next year.

Next, we have analyzed 120 genomic DNA from the graft of HCC. Our in house assay to detect HBV integration sites is PCR-based method but not NGS. We have detected fusion genes consisting of human and HBV. These integration positions are consistent with NGS data. This method was applied into HIV and HTLV1 infection cells. Therefore, we have developed novel method for the detection of viral integration site such as HBV, HIV, and HTLV1.

Using serum samples, viral sequences of HBV genomic DNA was collected and registered into our database to analyze the correlation between human and viral factors. As we have reported that a HLA genotype was related with chronic infection and HCC development, the viral peptides binding to a HLA genotype were screened using NGS analysis. Two candidate sequence of amino acid were determined by HLA-peptide binding assay (collaboration with Dr. Miyadera of Tsukuba University).

Researchers には、分担研究者を記載する。

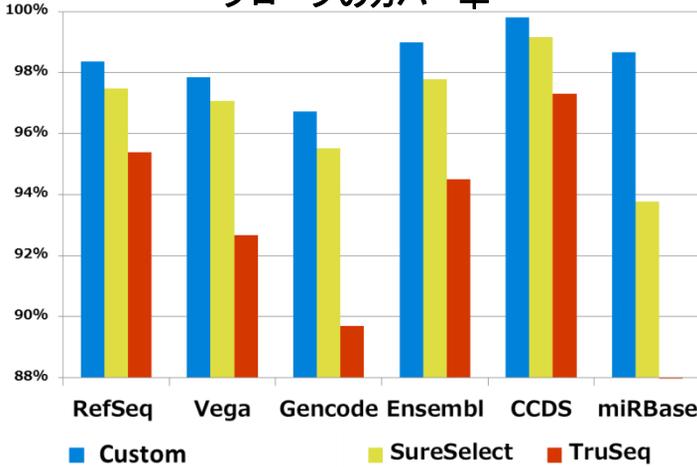
# 「臨床検体の解析」

## エキソーム解析(カスタムキット)

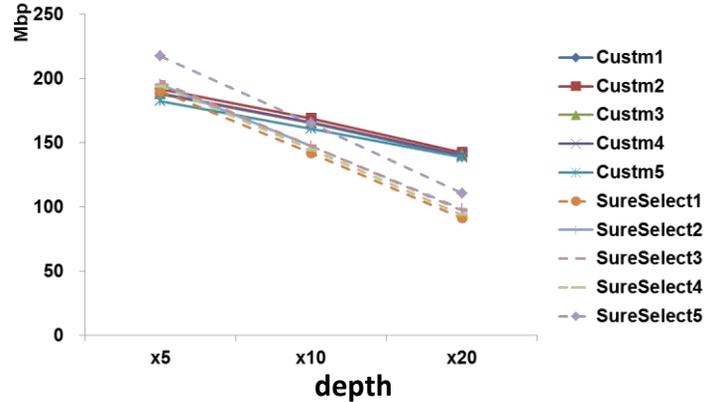
### サンプル量比較

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

### プローブのカバー率



### 各Depthを達成した領域長

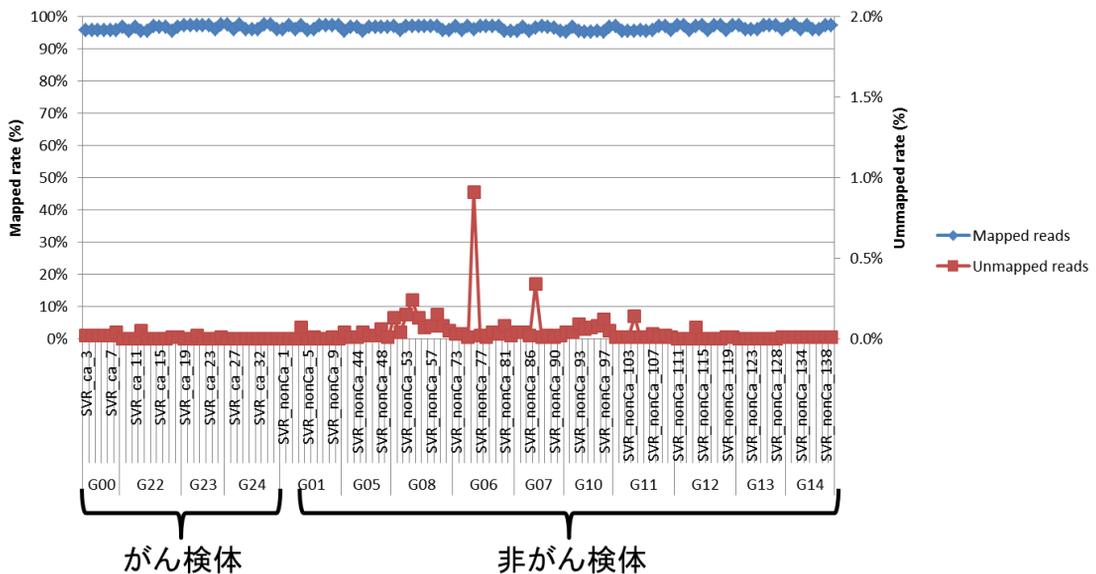


従来品とターゲット領域は同一であるが、効率的なエキソン領域の回収を可能とした。

- プローブの工夫で、少量のDNAで実施できた。
- ターゲット領域を最も広くカバーしたプローブを複数設計した。
- ハイブリ効率の向上と回収後の精製度の向上で高depth領域を1.5倍に向上させた。

## 実検体のエキソームシーケンス

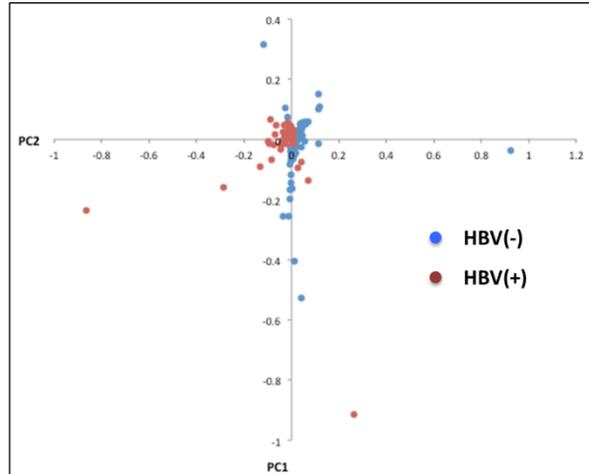
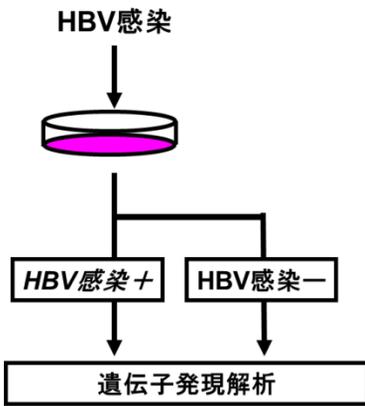
### 得られたリードのリファレンス配列へのマッピング率



In houseプローブで安定したエキソームの回収ができた。B型肝炎に関連するヒト遺伝子領域の高密度解析で、有用な宿主因子が同定できると期待できる。

# 「肝臓内での感染免疫機構の解析」

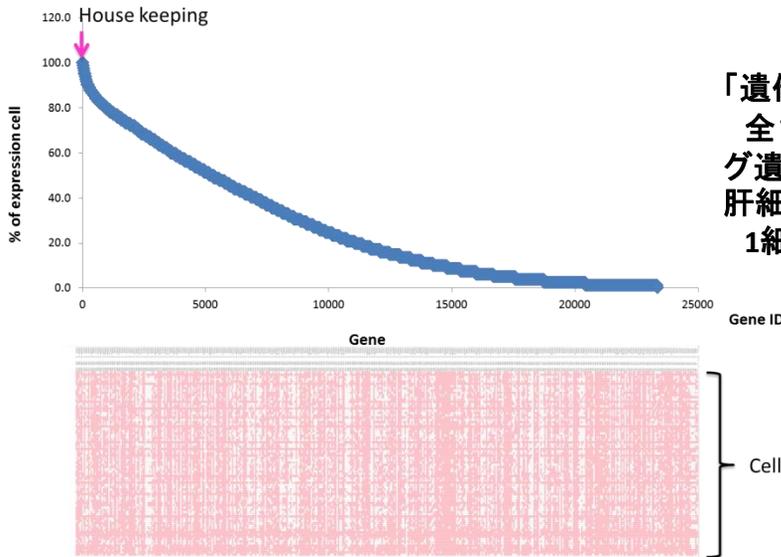
## 肝細胞の1細胞解析



「主成分分析による1細胞ごとのmRNA発現変化」

HBV感染の有無で層別化した。同じホスト由来の肝細胞であっても、HBV感染出来る細胞と出来ない細胞があることが明確になった。

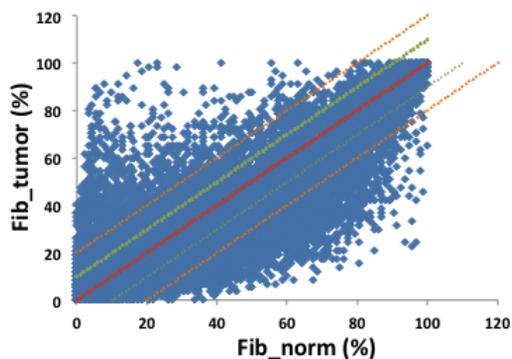
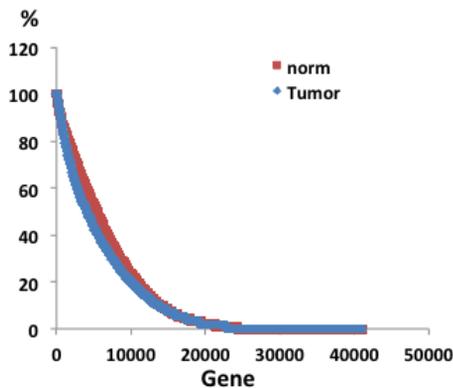
感染の有無での遺伝子発現の違いは、受容体遺伝子の探索、ウイルス複製に必要な宿主因子の探索に重要な情報である。



「遺伝子ごとでみたときのその発現細胞数(割合)」

全1細胞で発現している遺伝子はハウスキーピング遺伝子群であった。それ以外の遺伝子は、同じ肝細胞であっても、発現の有無と量が異なっていた。1細胞ごとに特有の性質があるともいえる。

### がん辺縁部 vs. 背景肝



肝がん部位に特有の遺伝子発現データをシングルセルで得た。シングルセルで解析することで、遺伝子発現パターンから、細胞種を推定でき、純化した細胞での検討と同じく、クリアなデータを得られるようになった。

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
Use of nucleoside analogs in patients with chronic hepatitis B in Nepal: A prospective cohort study in a single hospital.	Masaki N, Shrestha PK, Nishimura S, Ito K, <b>Sugiyama M</b> , Mizokami M.	Hepatol Res.	45(12):1163-9.	2015
Negative regulation of hepatitis B virus replication by forkhead box protein A in human hepatoma cells.	Okumura N, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, <b>Sugiyama M</b> , Mizokami M, Kato N.	FEBS Lett.	28:589(10):1112-8.	2015
Differential Expression of CX3CL1 in Hepatitis B Virus-Replicating Hepatoma Cells Can Affect the Migration Activity of CX3CR1+ Immune Cells.	Kondo Y, Kimura O, Tanaka Y, Ninomiya M, Iwata T, Kogure T, Inoue J, <b>Sugiyama M</b> , Morosawa T, Fujisaka Y, Shimosegawa T.	J Virol.	15:89(14):7016-27.	2015
Seroprevalence of chronic hepatitis B, as determined from dried blood spots, among children and their mothers in central Lao People's Democratic Republic: a multistage, stratified cluster sampling survey.	Komada K, <b>Sugiyama M</b> , Vongphrachanh P, Xeuatvongsa A, Khamphaphongphane B, Kitamura T, Kiyohara T, Wakita T, Oshitani H, Hachiya M.	Int J Infect Dis.	6:36:21-26.	2015
A novel reporter system to monitor early stages of the HBV life cycle.	Nishitsuji H, Ujino S, Shimizu Y, Harada K, Zhang J, <b>Sugiyama M</b> , Mizokami M, Shimotohno K.	Cancer Sci.	106(11):1616-24.	2015
Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy.	Miyakawa K, Matsunaga S, Watashi K, <b>Sugiyama M</b> , Kimura H, Yamamoto N, Mizokami M, Wakita T, Ryo A.	Oncotarget	6(26):21840-52.	2015

研究発表及び特許取得報告について

<p>Seroepidemiological study of hepatitis B virus markers in Japan.</p>	<p>Kiyohara T, Ishii K, Mizokami M, <b><u>Sugiyama M</u></b>, Wakita T.</p>	<p>Vaccine</p>	<p>33(45):6037-42.</p>	<p>2015</p>
<p>A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide.</p>	<p>Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M, Kawai F, Ohashi H, Tsukuda S, Shimura S, Suzuki R, Aizaki H, <b><u>Sugiyama M</u></b>, Park SY, Ito T, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T.</p>	<p>J Virol.</p>	<p>89(23):11945-53.</p>	<p>2015</p>
<p>The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly.</p>	<p>Dansako H, Ueda Y, Okumura N, Satoh S, <b><u>Sugiyama M</u></b>, Mizokami M, Ikeda M, Kato N.</p>	<p>FEBS J.</p>	<p>283(1):144-56.</p>	<p>2016</p>
<p>Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B.</p>	<p>Yoshio S, <b><u>Sugiyama M</u></b>, Shoji H, Mano Y, Mita E, Okamoto T, Matsuura Y, Okuno A, Takikawa O, Mizokami M, Kanto T.</p>	<p>Hepatology</p>	<p>63(1):83-94.</p>	<p>2016</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>Geographic Distribution and Characteristics of Genotype A Hepatitis B Virus Infection in Acute and Chronic Hepatitis B Patients in Japan.</p>	<p>Ito K, Yotsuyanagi H, <b>Sugiyama M</b>, Yatsuhashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Tanaka Y, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Koike K, Mizokami M, and the Japanese AHB and CHB Study Group.</p>	<p>J Gastroenterol Hepatol</p>	<p>31(1):180-9.</p>	<p>2016</p>
<p>Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx.</p>	<p>Kouwaki T, Okamoto T, Ito A, Sugiyama Y, Yamashita K, Suzuki T, Kusakabe S, Hirano J, Fukuhara T, Yamashita A, Saito K, Okuzaki D, Watashi K, <b>Sugiyama M</b>, Yoshio S, Standley DM, Kanto T, Mizokami M, Moriishi K, Matsuura Y.</p>	<p>J Virol.</p>	<p>90(7):3530-42.</p>	<p>2016</p>

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
<p>B型肝炎の抗原・抗体測定キット間の比較と新規測定系の開発</p>	<p><b>杉山真也</b>、考藤達哉、溝上雅史</p>	<p>第51回日本肝臓学会総会</p>	<p>熊本</p>	<p>2015年5月</p>
<p>Effect of toll-like receptor 4 signaling on liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus</p>	<p><b>Masaya Sugiyama</b>, Tatsuya Kanto, Masashi Mizokami</p>	<p>2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses</p>	<p>Bad Nauheim</p>	<p>2015年10月</p>

研究発表及び特許取得報告について

TLR4 signaling mediate liver fibrosis in chimeric mice persistently infected with HBV	<b>Masaya Sugiyama,</b> Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami.	The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology	福岡	2015年11月
Impact of toll-like receptor 4 signaling on liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus	<b>Masaya Sugiyama,</b> Tatsuya Kanto, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, and Masashi Mizokami	The Liver Meeting 2015: The 66th Annual Meeting of AASLD	San Francisco	2015年11月
A Survey of Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis B Virus Infection in a Men who have Sex with Men Cohort in Ulaanbaatar	<b>Masaya Sugiyama,</b> Masashi Mizokami, and Shinichi Oka	第29回日本エイズ学会学術集会・総会	東京	2015年11月
日本人におけるB型慢性肝炎とHLA-DPB1遺伝子型の関連	西田 奈央、大橋 順、 <b>杉山 真也</b> 、 土浦 貴代、石井 真由美、山本 健、 笹月 健彦、徳永 勝士、溝上 雅史	第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会	神戸	2015年12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。