

課題番号 : 26指108

研究課題名 : 肝臓内免疫機構拠点と連携した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

分担研究者名 : 該当なし

キーワード : B型肝炎、肝臓、ライブイメージング、ゲノム解析、臨床検体

研究成果 :

「臨床検体の解析」

各年度で次世代シーケンス解析に利用するための検体収集と解析を行った。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厚労科研究班もしくはAMED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）、国府台病院肝臓内科（溝上 雅史 医師、正木 尚彦 医長）を中心に検体の収集を進めた。解析対象としては、A) 慢性肝炎と肝臓癌、B) 肝臓癌と肝硬変、C) 慢性肝炎と肝硬変、D) 一家族で肝臓癌の多発したことが明らかな家族サンプル、の4つである。その中で、D) は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アプローチが適当であると考え、小児肝炎の専門である田尻班の研究テーマで検体収集した。これらの検体を用いて、病態進展に関連する遺伝的要因の探索をするためのエキソーム解析を実施した。市販のエキソーム解析用キットよりも高性能なキット開発を、東京大学新領域創成科学研究科の鈴木穰教授と共同で行い、高密度解析ができ、かつ低価格での解析を可能とした（表1、図1、2）。さらに改良することで、少ないゲノム量でエキソーム解析を行えるようになった。実際のエキソーム解析の結果で代表的な検体のデータを図3に示した。

これらの解析を通して、B型肝炎由来の肝臓癌の発症に関わる因子として、HLA型の違いを発見し、報告した（Nishida N, Sugiyama M et al. PLoS ONE 2014. Nishida N, Sugiyama M et al. Sci Rep 2016）。特に、HLA-DPB1*02:01を保有する患者は、B型肝炎由来の肝臓癌になりやすい傾向にあることを報告している（表2-4）。全検体を使った解析では、HLA-DPB1*02:01がB型肝炎慢性肝炎（CHB）や肝臓癌（HCC）になりやすい因子として有意であったが、CHB患者だけで解析した場合には、HLA-DPB1*02:01は有意ではなかった。このことから、HLA-DPB1*02:01は、HCC発症に関連しており、CHBとは関係ないことが明らかとなった。しかしながら、HLA-DPB1*02:01だけで肝臓癌の発症を十分に予測できるものではなく、HLA-DPB1*02:01を保有していても発がんする患者は存在する。

そこで、HBV因子を解析することで、HLA-DPB1*02:01の予測を補強する因子の探索を新たに行った（表5）。HLA-DPB1*02:01をホモで保有しているB型肝炎患者を対象とし、その中で肝臓癌を発症した症例（ケース）、発症しなかった慢性肝炎患者（コントロール）のウイルス因子の解析を実施した。ケースとコントロールの間では、年齢と性別を一致させた。HBVゲノム配列に注目して、今回の検討では、抗原性の高いHBs抗原をつくるHBs遺伝子を対象とした。解析領域を3つにわけて、PCRによる遺伝子増幅を実施した。これらの産物は、高速シーケンサーで遺伝子配列の取得を行った。得られた遺伝子配列は、参照配列となるHBV遺伝子配列に対してアライメント解析を実施し、アライメントされた配列情報を元に、HBs抗原のオープンリーディングフレームにあわせてアミノ酸に変換した。核酸情報をORFにそってアミノ酸に変換する解析パイプラインの構築を行った。各群で各アミノ酸位置のバリエーションとそれらの頻度情報を得て、ケースとコントロールで比較を行った。

全HBs抗原のアミノ酸部位で、166、236、251、275、310番について有意な差が認められた（表5、図6）。いずれの変異についても新規の変異であった。慢性肝炎患者では、これら5つの領域では様々なアミノ酸型を有するウイルスが保有されていることがわかった。一方で、肝臓癌患者では、それらのバリエーションが認められず、特定のアミノ酸型に収束していることが明らかとなった（図6）。慢性肝炎患者では、166番目のアミノ酸は、頻度の多い順にS、L、Nが混在していたが、肝臓癌患者では、Lに集約されていた（表5）。慢性肝炎患者では、236番目のアミノ酸は、P、Q、Lが混在していたが、肝臓癌患者では、大半がQであり、Pが僅かに認められた。慢性肝炎患者では、251番目のアミノ酸は、L、Rが混在していたが、肝臓癌患者では、大半がRであり、Lが僅かに認められるという、

比率の逆転が起きた。慢性肝炎患者では、275 番目のアミノ酸は、Q、L が混在していたが、肝がん患者では、大半が L であり、Q が僅かに認められるという、比率の逆転が認められた。慢性肝炎患者では、310 番目のアミノ酸は、T、E、S が混在していたが、肝がん患者では、大半が S であり、T と E が僅かに認められた。

続いて、上記の 5 つの部位の変異が、別々のウイルスゲノム上に位置しているか、それとも同一のゲノム上に位置しているかを検討した。図 6 上段のコンセンサス配列は、NCBI に登録されているデータを元に作成したものである。上記の 5 つのアミノ酸部位におけるコンセンサス配列を示している。このデータは、HBV 遺伝子型ごとにデータを収集して解析したが、HBV 遺伝子型 A (HBV/A) では、166 番目が A である点で他の遺伝子型と異なるが、それ以外のアミノ酸部位は遺伝子型による差は認めなかった。つまり、SPLQS (HBV/A は APLQS) という並びが標準配列であると言える。それに対して、今回の解析で得たデータを再解析し、同一のゲノム配列上で、これらの変異がどのように位置しているかを確認した。その結果、図 6 で示した 5 つの変異は、166L 変異が単独で導入されることが明らかとなり、その割合は、肝がん患者群のウイルスの約 11%認められた (表 6)。さらには、5 つの変異が同時に導入された配列は、肝がん患者群のウイルスの約 84%で観察された。

以上より、同一の HLA 型を有数する患者において、臨床経過の異なる原因をウイルス因子で解析したことで、特定の 5 部位に顕著な違いを認めた。肝がん患者に特有であったアミノ酸型を有する場合は、肝がんへと至るリスクが高いと考えられる。一方で、肝がん患者に特有の変異を持たなかった場合には、HLA-DPBI*02:01 保有者は、発がんリスクが低いことがわかっているため、ウイルス因子と組み合わせることで、よりリスクの低い患者を囲い込むことが出来るといえる。しかしながら、後方視的な検討での結果であるため、これらのアミノ酸変異パターンが実際にどの程度の影響力を持って、疾患発症に関連するかは前方視的な研究が必要である。現在、上記で見つけたウイルス変異について、それらの変異を有したウイルスクローンを作成し、*in vitro* と *in vivo* での解析を進めている。

ヒトゲノム解析によって得られた成果として、肝がん部位と背景肝部位、肝硬変部位について、高速シーケンシング解析によって、がん部に特有に観察される HBV 組み込み配列を取得した。挿入部位は、国際がんコンソーシアムで報告された B 型肝炎由来肝がんでの結果と類似したもの (テロメア、MLL) があつたが、新規の挿入部位として二箇所の集積部位を確認した (データ未発表)。この部位への挿入がある検体は、全体の 5%程度あり、肝発がんとの関連が示唆された。このデータを元に HBV-ヒトゲノムの融合遺伝子を作成し、その機能解析の準備を進めた。クローン化した融合遺伝子を正常ヒト肝細胞へ導入し、増殖能、転移、浸潤能について評価した。その結果、融合遺伝子を導入した細胞では、増殖能、転移、浸潤能を獲得し、この融合遺伝子がトランスフォーメーション機能を有していることが示唆された。

宿主因子、ウイルス因子の解析では、臨床検体で発見したことを基礎研究で確認するところまでを予定していたが、当初予定していたよりも検体収集や解析に時間を要した。しかしながら、宿主因子については、融合遺伝子の機能解析を進めて、期間内に基礎検討の結果を得た。ウイルス因子の解析については、変異ウイルスの作成を終えて、特異変異を持った HBV の *in vitro* でのウイルス機能解析の結果を得た。連鎖解析用の家族検体の解析では、検体収集が遅れているが、引き続き、小児科領域と共同して、必要な家族検体セットの収集を進める。

「肝臓内免疫機構の解析」

初年度より、HBV 感染とその肝臓内の可視化について条件検討を進めた。マウス実験に先立って、プライマリーヒト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て、感染の可視化を行った。感染に使用した HBV は、エンベロープ部分を蛍光化したウイルス等を使用した。感染後に蛍光をモニターすることで、感染過程の可視化が *in vitro* で可能であることを検証した。HBV 感染初期から持続感染の間にわたって、TLR4 分子の高発現が確認できた。肝障害が持続的に発生していることは ALT 値からも明らかであり、TLR4 を介した持続的な自然免疫系の活性化が誘導されていることが、肝障害の原因と推察された。一方で、クロドロネートもしくは asiaroGM1 抗体を用いて、マクロファージや NK 細胞の除去を行ったところ、クロドロネート処理マウスでは肝障害が改善した。このことから、マクロファージが肝障害に関連していることが示唆された。また、マクロファージは TLR4 も高発現してい

ることから、この経路が主たる経路であると推察された。臨床検体での染色では、炎症が強い肝炎では、肝臓への浸潤マクロファージで TLR4 分子の発現が確認でき、病態への関連が示唆された。

HBV 感染させ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クエンス解析により比較した (図 7)。1 度に 96 細胞のデータを取得できる検討を 2 セット実施し、およそ 160 細胞分の利用可能な個別の遺伝子発現データを取得した。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た。解析データでは、肝臓内にも HBV 感染可能な肝細胞とそうでないものが見られ、未だ明らかでない HBV 感染に必要な遺伝子群が含まれていると考えられた (図 8)。同様の手法で、肝がん辺縁部の線維芽細胞の解析を実施した。これによって、ガン関連線維芽細胞 (CAF) の性質を捕らえることができ、CAF に特有の遺伝子発現データを得るに至った (図 9)。この解析は現在進めている。

「診断マーカーの開発」

上記で発見したウイルス変異や肝臓中の融合遺伝子を血中で捉えることができれば、肝発がんの高リスク群として検出することが出来ると考えられる。そのため、血液サンプルを用いての検出系の開発を進めた。ウイルス変異については、HLA 型が重要となるため、前向き研究をするために、まずは HLA 型の検査系を確立した。並行して、このウイルス変異を捕らえるために、標的部位のみを効率的に増幅させるためのプライマーセットを準備した。変異タンパクを捕らえるための抗体作成については、変異型抗原を準備している。今後、これを用いて前向き研究に進んでいく予定である。

融合遺伝子については、血中での検出を目指して、ウイルス変異の検出系と同じく RNA の検出を PCR で実施し、並行して融合遺伝子の抗体での検出系を準備している。抗体作成のために、融合遺伝子の発現と精製を進めている。

これまでの成果を臨床検査へと還元するために、計画している検査系の確立と臨床応用へ向けた実用化を進める。本研究で発見したウイルス、宿主因子が複数あったこともあり、遺伝子や核酸の検出系は概ね完成を見ている。その発展型として、血中の標的分子を抗体で検出する系の開発を試みている。それらに使う抗体取得には時間がかかるため、今年度内に可能のところまで進める。反応性の良い抗体を得られれば、簡便なスクリーニング系になると考えられる。

「総括」

肝発がんに関わるウイルス因子の探索では、後ろ向き研究であるが、特定の HLA 型を有する患者が肝発がんへと至る場合、そのウイルス変異を検査することで、その約 90% を検出できるという結果を得ている。この結果は、後ろ向きであることや特定の HLA 型に絞った研究であるため、不十分な部分はあるが、臨床応用には有望なものであると考えられる。そのため、特許申請も済ませた。

また、一部の肝がん部位に認められた融合遺伝子についても、肝発がんの原因となることが後ろ向き検体で明らかである。そのため、この融合遺伝子については、まずは簡易検査系の確立をする。それによって、この因子が肝発がんにどの程度の関連を持っているかを別検体で検証実験を行う。

今後、特にこれらのウイルス因子、宿主因子の結果については、前向き研究することでその有用性を確かめるだけの価値があるといえる。現在、B 型肝炎では、肝発がんする患者を事前に囲い込むことは困難であるため、その一部の集団だけでも予後を予測できることは、臨床的な意義が大きい。

今後、我々は自施設と研究協力先の病院において B 型慢性肝炎患者を対象として、HLA-DPB1*02:01 を有する患者について、HBs 抗原領域のアミノ酸変異を集中的に検査することを進めている。続けて、HBV の全ゲノム配列の変異リストを取得する。また、並行して、融合遺伝子の有無を血清中の核酸もしくはタンパクから検出する。これらのウイルス変異や融合遺伝子の出現は経時的に変化することが一般的であるため、まずは半年単位での検査を実施する。高リスクと考えられる患者については、その臨床での検査頻度を増やすことも考える。ウイルス因子、宿主因子をあわせて評価するために、これらの結果と臨床データとあわせたデータベースを作成する。これらの継続したデータ取得と解析によって、ウイルス変異や融合遺伝子が肝発がんへ、どの程度の割合 (リスク) で関連しているかを明らかとし、臨床応用へつなげる。

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 collected clinical samples, such as genomic DNA and serum, from regional core centers for the treatment of liver disease since last year. The collaborators of the sample collection were 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). We have developed in house exome kit which probes were designed by us and our collaborator (Prof. Suzuki, The University of Tokyo). The exome kit showed superior to commercial kits on the coverage, cost, and capture efficiency. The latest kit we improved needs lower genome samples compared with the commercial kits. The figures show the representative data of exome analysis on our exome kit.

Using these NGS analysis, we have reported that the difference of HLA type is associated with the clinical outcome of hepatitis B and the related hepatocellular carcinomas (HCC) (Nishida N, Sugiyama M et al. PLoS ONE 2014. Nishida N, Sugiyama M et al. Sci Rep 2016). Especially, the patients with HLA-DPB1*02:01 have a potential of low risk on HBV-related HCC development. When we have analyzed CHB patients vs. healthy control, HLA-DPB1*02:01 was not related with CHB development. However, the analysis between HCC and healthy control showed the statistical significance.

Although these associations of HLA-DPB1*02:01 are significant, this factor is not useful for clinical application because of the low odds ratio. There are several HCC patients with HLA-DPB1*02:01. Then, we have determined another factor to improve the odds ratio of HLA-DPB1*02:01. Viral factors could be useful to improve the prediction value in the patients

Researchers には、分担研究者を記載する。

with HLA-DPB1*02:01. We have analyzed HBV sequences in the patients with HLA-DPB1*02:01 homozygotes. To determine the viral factor, the comparison of viral sequences between CHB and HCC were evaluated using NGS analyses. The age, sex, and HBV genotype are matched in the two groups. All samples of HBV genome DNA were amplified by PCR and the products were analyzed by NGS. The NGS data were aligned against the reference sequence of HBV genotype C retrieved from NCBN. These data were converted into amino acid (AA) data. We have developed the analysis pipeline of HBV sequence and AAs. These pipeline provide the ratio of the AA variation in each group. We compared the variation between CHB and HCC. We have detected the significant differences in 166L, 236Q, 251R, 275L, and 310S position of HBsAg AA. S310 is consensus in each genotype, but only the major AA of 310 position in CHB group with HLA-DPB1*02:01 was T followed by E and S. These mutations were not reported previously. Interestingly, these positions showed several variation of AA in CHB patients, whereas the AAs of these positions in HCC patients were convergent in a specific AA. The specific AA was not the most prevalent one in CHB. The majority of AAs was changed between CHB and HCC patients.

Next, we have determined the peptide sequence of these 5 AAs. The peptide sequences of HBsAg were retrieved from NCBI database. The peptide is S166/P236/L251/Q275/S310 (SPLQS) in HBsAg except for HBV/A (APSQS). Our data was analyzed to detect the peptide sequence in each NGS read. Then, only 2 patterns of the peptide were detected in HCC group, which were approximately 11% of LPLQS and 84% of LQRLS.

In line with the above data, we have detected the specific peptides in HCC patients with HLA-DPB1*02:01. The risk peptides were associated with HCC development in this study. The patients with these risk peptides could be high risk on HCC. To confirm the peptide data, it is necessary to prepare the prospective study. The characteristics of HBV with the above 5 mutations are going to determine using in vitro and in vivo study. In addition, the docking study between HLA-DP molecule and the specific peptides is going to prepare to confirm the antigen presentation.

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. Based on the above data, we have constructed the fusion-gene to determine the function in vitro and in vivo. A fusion-gene transfected into the primary non-cancer cells showed the cancerization potential such as cell proliferation, metastasis, and invasion.

[Analysis of immune cell in the HBV infected liver]

Researchers には、分担研究者を記載する。

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. Fluorescence or luminescence was observed in the cells after infection. TLR4 molecule was upregulated in HBV infected mice. The continuous liver damage was observed by high ALT levels. Therefore, the activation of TLR4 pathway is a key in the progression of liver injury. Next, Chlodronate liposome or asiaroGM1 antibody was administrated into the chimeric mouse to eliminate macrophage or NK cells. Chlodronate liposome administration was associated with the remission of the liver injury. These data suggested that the activated macrophage expressing TLR4 was associated with the liver injury.

RNA-seq analysis system based on single cell was established to identify novel lineage cells with unique gene expression. Liver samples were separated into single cell to analyze the gene expression by NGS. To determine the characteristics of cancer associated fibroblast (CAF) in liver, we have analyzed the fibroblast near and far from HCC. Then, the CAF specific gene expression was detected, which was associated with HBV related HCC. The functional analysis of the genes is ongoing.

[Development of diagnosis markers]

If we detect the above molecules such as HLA-DP, HBsAg mutations, or fusion-gene, we can find the high risk group of HCC. We have prepared the test set of HLA-DP genotype and virus sequence using human whole blood. The antibody specific to the above peptide with 5 mutations or fusion genes are also prepared to detect the peptide in sera. These test tools are going to use in prospective study.

[Conclusion]

Our data showed that the combination diagnosis of both HLA-DP genotype and HBsAg mutations reached approximately 90% prediction value in retrospective study. We have filed the patent application on these new findings. On a fusion-gene, the diagnosis kit is prepared in the present study. These factors should be confirmed by prospective study. The prediction of HCC development is difficult in the present diagnosis. It is highly useful even though the prediction of HCC patients is success in a certain percent.

「臨床検体の解析」

エキソーム解析(カスタムキット)

表1 サンプル量比較

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

図1 プローブのカバー率

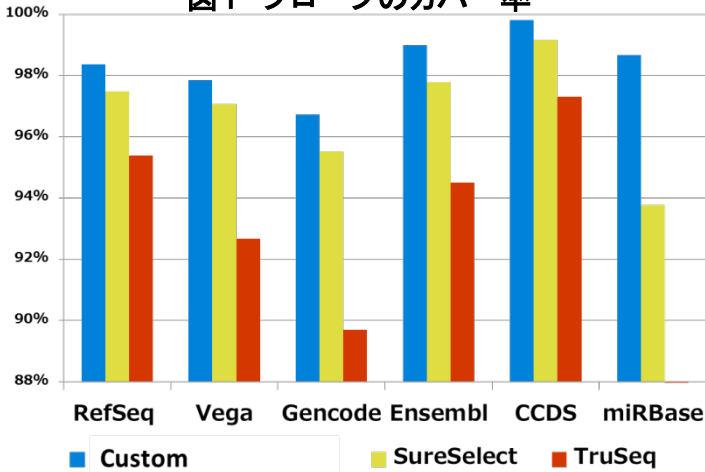
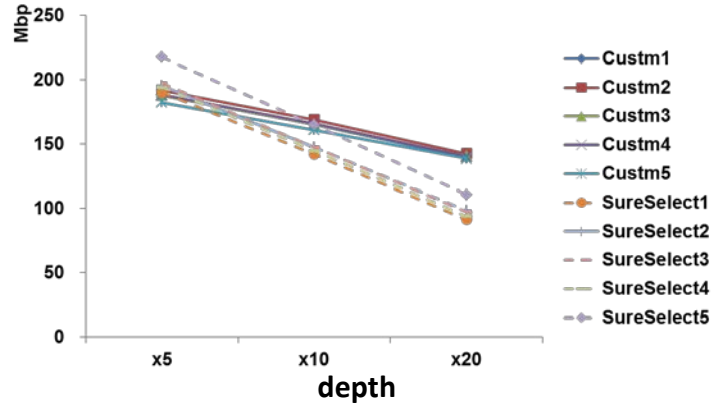


図2 各Depthを達成した領域長



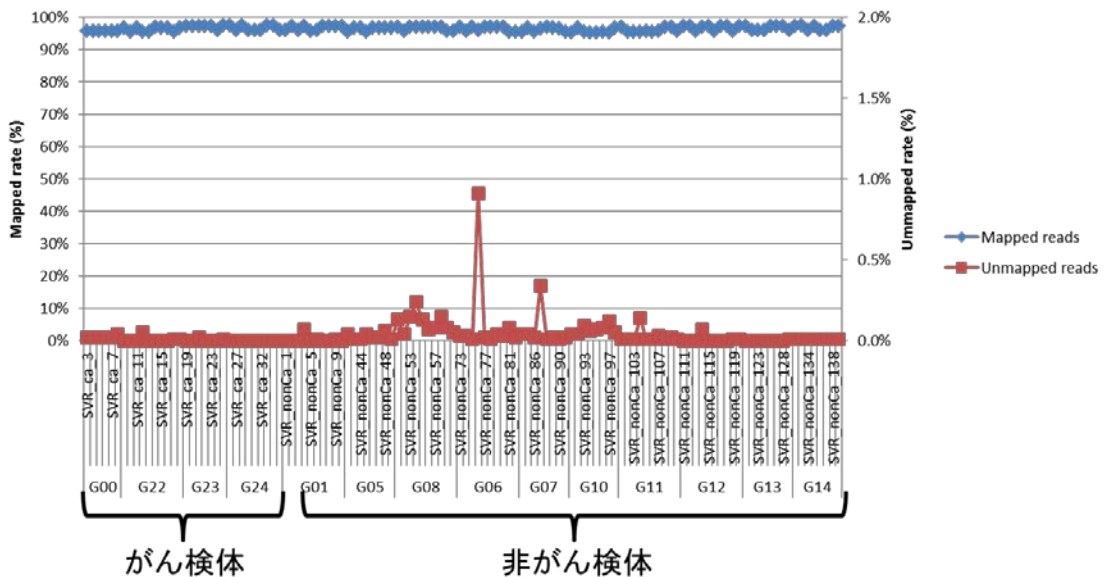
従来品とターゲット領域は同一であるが、効率的なエキソン領域の回収を可能とした。

- 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

図3

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。

肝発がんに関わるホスト因子(HLA-DPB1)

表2 全検体での解析

DPB1 Allele	CHB+HCC (2n=1,630)		健常者 (2n=4,562)		P value	OR	95% CI	
	count	%	count	%			lower	upper
02:01	301	18.5	1112	24.4	1.06E-06	0.70	0.61	0.81
04:01	36	2.2	246	5.4	1.21E-07	0.40	0.28	0.56
04:02	89	5.5	425	9.3	1.28E-06	0.56	0.44	0.71
05:01	756	46.4	1760	38.6	3.71E-08	1.38	1.23	1.54
09:01	266	16.3	454	10.0	5.85E-12	1.76	1.50	2.08
others	182	11.2	565	12.4	0.19	0.89	0.74	1.06

表3 HCC患者での解析

DPB1 Allele	HCC (2n=740)		健常者 (2n=4,562)		P value	OR	95% CI	
	count	%	count	%			lower	upper
02:01	108	14.6	1112	24.4	4.53E-09	0.53	0.43	0.66
04:01	21	2.8	246	5.4	3.20E-03	0.51	0.33	0.81
04:02	39	5.3	425	9.3	3.03E-04	0.54	0.39	0.76
05:01	362	48.9	1760	38.6	1.01E-07	1.52	1.30	1.78
09:01	123	16.6	454	10.0	6.51E-08	1.80	1.45	2.24
others	87	11.8	565	12.4	0.63	0.94	0.74	1.20

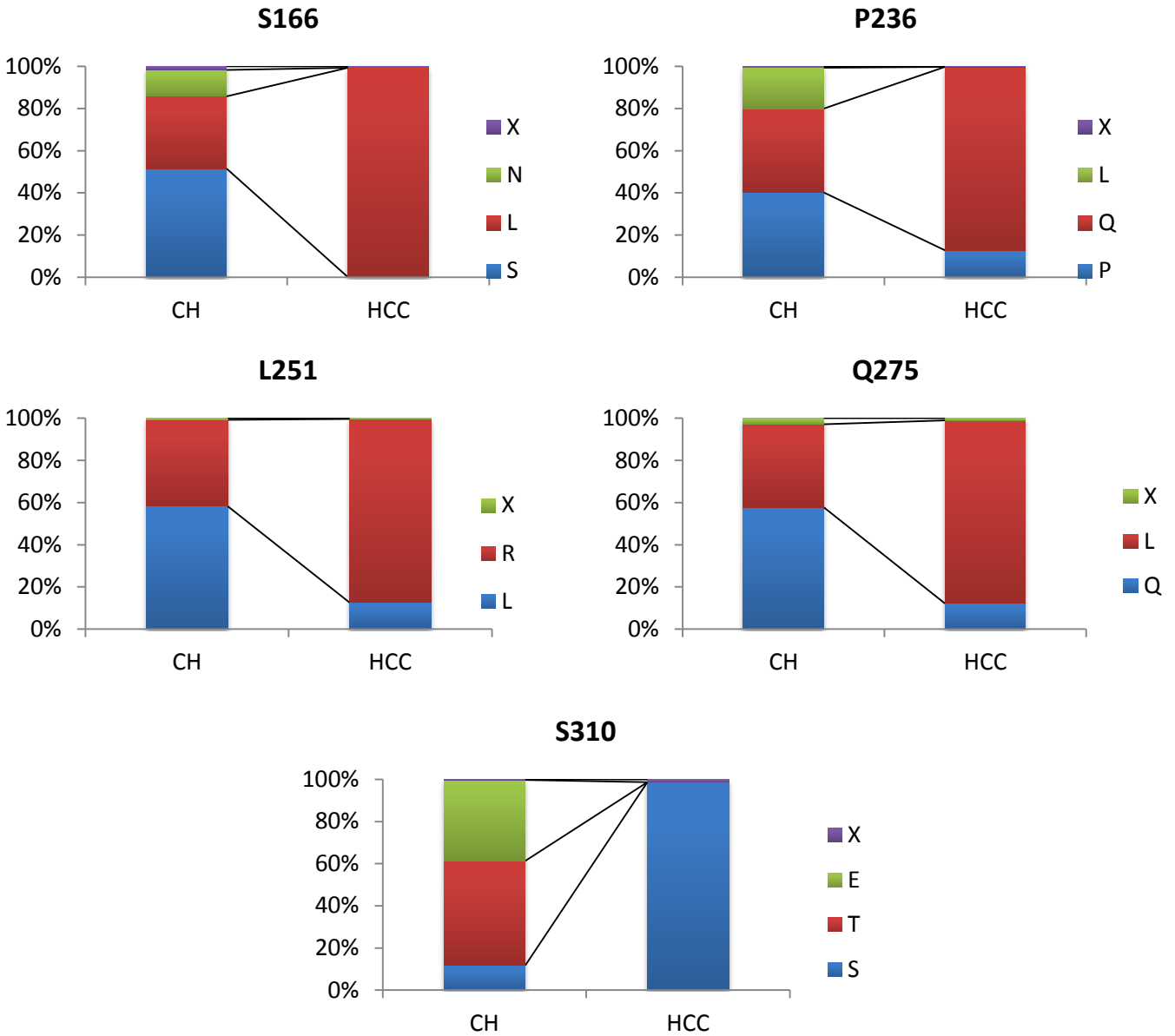
表4 CHB患者での解析

DPB1 Allele	CHB (2n=816)		健常者 (2n=4,562)		P value	OR	95% CI	
	count	%	count	%			lower	upper
02:01	179	21.9	1112	24.4	1.33E-01	0.87	0.73	1.04
04:01	14	1.7	246	5.4	6.49E-06	0.31	0.18	0.53
04:02	40	4.9	425	9.3	3.59E-05	0.50	0.36	0.70
05:01	364	44.6	1760	38.6	1.18E-03	1.28	1.10	1.49
09:01	131	16.1	454	10.0	2.52E-07	1.73	1.40	2.14
others	88	5.4	565	12.4	0.54	1.10	0.80	1.51

表5 最頻出アミノ酸が異なる位置

AA Position	Ref_AA	CH		HCC		Status
		Depth	AA	Depth	AA	
166	S	7365	S, L, N	119167	L	Major
236	P	9298	P, Q, L	123318	Q, P	Major
251	L	9099	L, R	122487	R, L	Major
275	Q	9005	Q, L	120860	L, Q	Major
310	S	26210	T, E, S	13543	S, T, E	Major

図6 最頻出アミノ酸が異なる位置



X=5%以下の頻度であったアミノ酸を合算したものの

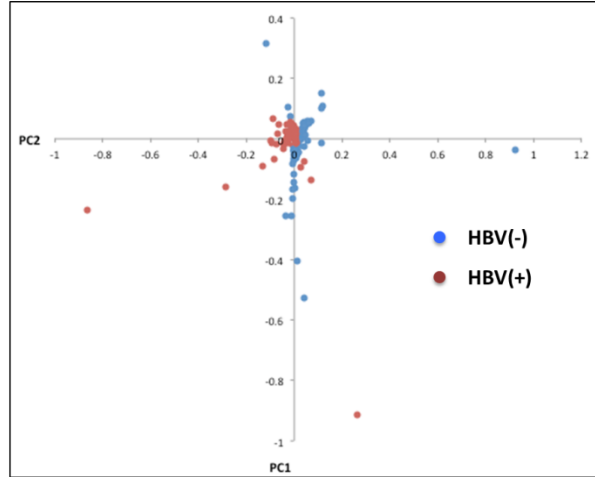
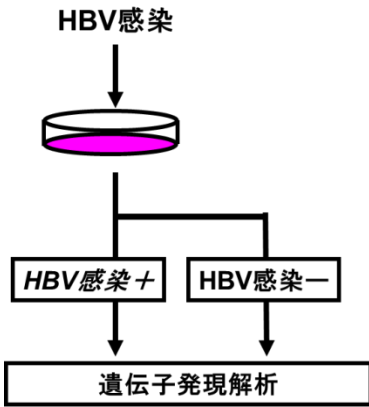
表6 PreS/S領域の肝がん特異的配列(ペプチド)

AA posi	166	236	251	275	310	%
コンセンサス	S	P	L	Q	S	-
パターン1	L	P	L	Q	S	10.7
パターン2	L	Q	R	L	S	83.6

「肝臓内での感染免疫機構の解析」

肝細胞の1細胞解析

図7

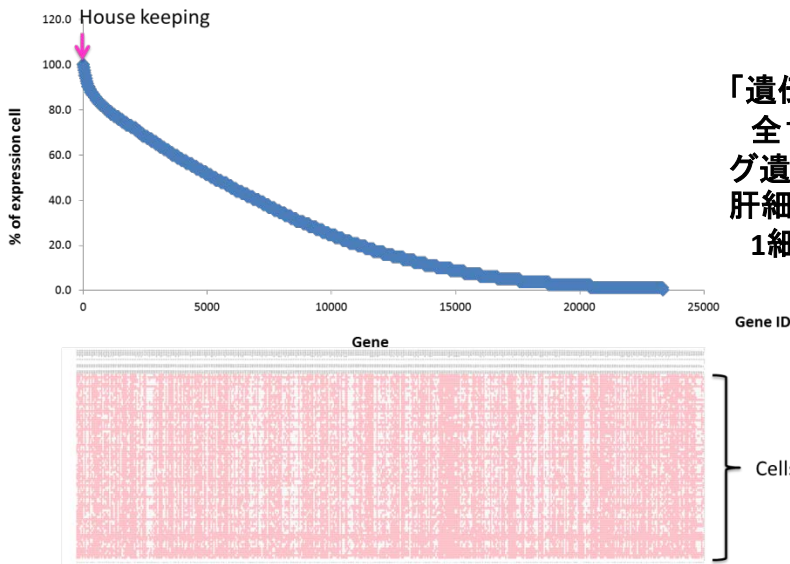


「主成分分析による1細胞ごとのmRNA発現変化」

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。

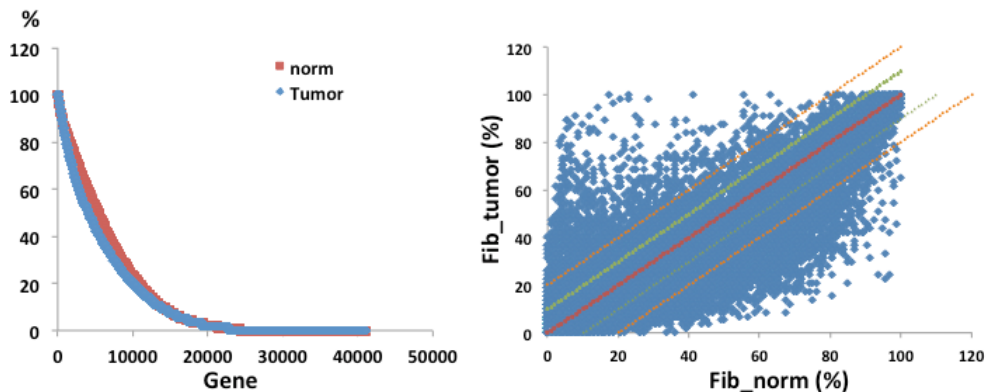
図8



「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

図9



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： 肝臓内免疫機構拠点と連携した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
Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis.	□ N shida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M , Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M.	Sci. Rep.	28814	2016
The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly.	Dansako H, Ueda Y, Okumura N, Satoh S, Sugiyama M , Mizokami M, Ikeda M, Kato N.	FEBS J.	283(1):144-56.	2016

研究発表及び特許取得報告について

<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, Sugiyama M, 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>
<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, Sugiyama M, Yatsushashi 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, Sugiyama M, 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>

研究発表及び特許取得報告について

<p>Use of nucleoside analogs in patients with chronic hepatitis B in Nepal: A prospective cohort study in a single hospital.</p>	<p>Masaki N, Shrestha PK, Nishimura S, Ito K, Sugiyama M, Mizokami M.</p>	<p>Hepatol Res.</p>	<p>45(12):1163-9.</p>	<p>2015</p>
<p>Negative regulation of hepatitis B virus replication by forkhead box protein A in human hepatoma cells.</p>	<p>Okumura N, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, Sugiyama M, Mizokami M, Kato N.</p>	<p>FEBS Lett.</p>	<p>28;589(10):1112-8.</p>	<p>2015</p>
<p>Differential Expression of CX3CL1 in Hepatitis B Virus-Replicating Hepatoma Cells Can Affect the Migration Activity of CX3CR1+ Immune Cells.</p>	<p>Kondo Y, Kimura O, Tanaka Y, Ninomiya M, Iwata T, Kogure T, Inoue J, Sugiyama M, Morosawa T, Fujisaka Y, Shimosegawa T.</p>	<p>J Virol.</p>	<p>15;89(14):7016-27.</p>	<p>2015</p>
<p>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.</p>	<p>Komada K, Sugiyama M, Vongphrachanh P, Xeuatvongsa A, Khamphaphongphane B, Kitamura T, Kiyohara T, Wakita T, Oshitani H, Hachiya M.</p>	<p>Int J Infect Dis.</p>	<p>6;36:21-26.</p>	<p>2015</p>
<p>A novel reporter system to monitor early stages of the HBV life cycle.</p>	<p>Nishitsuji H, Ujino S, Shimizu Y, Harada K, Zhang J, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K.</p>	<p>Cancer Sci.</p>	<p>106(11):1616-24.</p>	<p>2015</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy.</p>	<p>Miyakawa K, Matsunaga S, Watashi K, <u>Sugiyama M</u>, Kimura H, Yamamoto N, Mizokami M, Wakita T, Ryo A.</p>	<p>Oncotarget</p>	<p>6 (26) :21840-52.</p>	<p>2015</p>
<p>Seroepidemiological study of hepatitis B virus markers in Japan.</p>	<p>Kiyohara T, Ishii K, Mizokami M, <u>Sugiyama M</u>, 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, <u>Sugiyama M</u>, 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>Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) expression.</p>	<p>Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, <u>Sugiyama M</u>, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T.</p>	<p>J Biol Chem</p>	<p>290</p>	<p>2015</p>

研究発表及び特許取得報告について

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, Sugiyama M. Morosawa T, Fujisaka Y, Shimosegawa T.	J Virol.	89	2015
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	9	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Variation of PreS-S gene in HBV-associated HCC patients with HLA-DPB1*0201	Masaya Sugiyama , Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, and Masashi Mizokami	第64回日本ウイルス学会学術集会	札幌	2016年10月

研究発表及び特許取得報告について

TLR4経路阻害によるB型肝炎ウイルス感染キメラマウスの肝線維化抑制効果の検討	<u>杉山真也</u> 、考藤達哉、溝上雅史	第52回日本肝臓学会総会	千葉	2016年5月
TLR4 signaling mediates liver fibrosis in chimeric mice with humanized liver persistently infected with HBV	<u>Masaya Sugiyama</u> , Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami	第52回日本肝臓学会総会	千葉	2016年5月
Toll-like receptor 4 pathway mediate liver fibrosis in chimeric mice with human hepatocytes persistently infected with HBV.	<u>Masaya Sugiyama</u> , Tatsuya Kanto, and Masashi Mizokami	The international Liver Congress 2016 EASL	Barcelona	2016年4月
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	<u>杉山真也</u> 、考藤達哉、溝上雅史	第51回日本肝臓学会総会	熊本	2015年5月
Effect of toll-like receptor 4 signaling on liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes persistently infected with hepatitis B virus	<u>Masaya Sugiyama</u> , Tatsuya Kanto, Masashi Mizokami	2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses	Bad Nauheim	2015年10月
TLR4 signaling mediate liver fibrosis in chimeric mice persistently infected with HBV	<u>Masaya Sugiyama</u> , 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	<u>Masaya Sugiyama</u> , 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	<u>Masaya Sugiyama</u> , 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

研究発表及び特許取得報告について

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、 杉山 真也 、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
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
Association of sphingolipid biosynthesis pathway as a novel therapeutic target for HBV replication.	Masaya Sugiyama , Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, Masayuki Sudoh, and Masashi Mizokami.	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
該当なし				

研究発表及び特許取得報告について

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型肝炎関連疾患に關与するHLA遺伝子多型」	特願2016-204735	溝上雅史、西田奈央、 <u>杉山真也</u> 、徳永勝士、澤井裕美	2016年10月18日	日本、PCT

※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