

平成 22 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790483  
 研究課題名 (和文) 劇症肝炎の集団発生例から得られた B 型肝炎ウイルスを用いた劇症化機序の解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of the mechanism of fulminant hepatitis using a hepatitis B virus strain obtained from a patient in fulminant hepatitis outbreak  
 研究代表者：井上 淳 (Jun Inoue)  
 東北大学・病院・医員  
 研究者番号：60455821

研究成果の概要 (和文)：B 型肝炎ウイルス(HBV)による劇症肝炎発症の機序を解明するため、劇症肝炎集団発生の原因となった HBV 株を用いて、その株に認められた変異の意義や細胞に対する影響を検討した。その結果、この株に認められた 3 箇所の変異が共存すると HBV 複製中間体が細胞内で増加していること、そして HBV コア蛋白が核内に蓄積していることが明らかとなった。また、この株には直接的な細胞障害性が認められ、劇症肝炎発症の機序の一部が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) :To clarify the mechanism of fulminant hepatitis induced by hepatitis B virus (HBV), we focused on a HBV strain obtained from a patient in fulminant hepatitis outbreak, and investigated the significance of mutations found in the strain and the impact to the infected cells. As a result, we demonstrated that the HBV replicative intermediates of HBV with the mutations were increase in the cells, and HBV core protein was accumulated in the nucleus of HBV-transfected cells. Moreover, the strain had direct cytotoxicity, and a part mechanism of fulminant hepatitis was clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科

キーワード：肝臓学、ウイルス性肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎は極めて救命率の低い厚生省特定疾患であり、わが国における急性型劇症肝炎の救命率は約 56.3%、亜急性型劇症肝炎では約 39.3%と報告されている (平成 16 年度

厚生労働省「難治性の肝疾患に関する研究」班による全国集計より)。本邦では年間約 350 例の劇症肝炎の発生があると推定され、2003 年から 2005 年の全国集計では原因の 47.2% を HBV が占めている。HBV による劇症肝炎

では急速に進行し発症から 2-3 日で死に至る例が存在することが知られているが、それらの症例には生体肝移植が有効であることを我々は以前に報告した。このように HBV による劇症肝炎は重篤かつ重要な疾患であるがその病態は未だ明らかにされていない点が多く、その解明が急務である。

HBV による劇症肝炎の発症については大きく 2 つの要因、すなわちウイルスの急激な増殖と宿主の過剰な免疫反応が想定されているが未だ不明な点が多い。ウイルス側の因子として、HBV のプレコア領域の 1896 番目の塩基変異およびコアプロモーター領域の 1762/1764 番目の塩基変異が関与していることが疫学的に示され (Omata et al., *N Engl J Med* 1991; Sato et al., *Ann Intern Med* 1995)、特に後者は *in vitro* の実験系においてその増殖効率が亢進していることが示されている (Baumert et al., *J Clin Invest* 1996)。これらの塩基変異が存在しない劇症肝炎例も存在するため、その他にも様々な因子が関与しているものと考えられている。

従来は肝機能障害がない”healthy carrier”が存在することから、HBV は直接的な細胞障害性を持たず、免疫応答により感染肝細胞の破壊が生じると考えられていた。しかしながら、HBV の持つ直接的な細胞障害性を示唆する報告も散見されており、高度な免疫抑制状態にある患者で肝炎が急速に進行する場合があることや (Benner et al., *Gastroenterology* 1992)、肝細胞をヒト由来のもので置換した SCID マウスに HBV を感染させると肝細胞の障害が生じること (Meuleman et al., *J Virol* 2006) が報告されている。HBV の発現する蛋白の一つである large surface protein が細胞障害性を有するとの報告もあり (Foo et al., *Hepatology* 2002)、発癌に関連する可能性が示唆されている (Nakamoto et al., *Curr Mol Med* 2003)。この細胞障害性が劇症肝炎発症の機序の一部を担っている可能性があるが、この点についての報告はなされていない。

我々は最近、同一の HBV 株の感染による劇症肝炎で 5 例が死亡した集団発生例を経験し、この株の高い病原性に着目した。これらの患者から得られた HBV の塩基配列を解析すると、genotype は B であり、subgenotype は比較的劇症化が少ないと言われている Ba (B2) に分類された。全塩基配列を野生株と比較すると、この株の持つ塩基変異が複数個認められた。その中には既報の 1896 番目の塩基変異と 1762/1764 番目の塩基変異を認めたが、その他に特徴的な塩基変異である 1862 番目の塩基変異を認めた。この変異は genotype A の HBV 株を用いた *in vitro* の解析でウイルスの複製を抑制させることが報告されていた (Guarnieri et al., *J Virol*

2006) が、そのような複製を抑制させるような変異が今回のような劇症肝炎株に認められたということは、従来から想定されていた劇症肝炎発症の機序に反するものであり、さらなる解析が必要と考えられた。この点に関して、ウイルス複製効率とは別に、この株の持つ細胞障害性が劇症肝炎発症に関与していることが仮説として考えられ、その塩基変異との関連を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、i) 上述の劇症肝炎の集団発生を引き起こした HBV 株に特徴的に認められた変異を野生型の塩基に置換させることで、その変異の持つ HBV 複製過程における意義を *in vitro* の実験系により解明する。ii) また、この株の持つ細胞障害性について、変異を野生型に置換したものや軽症の急性肝炎の原因となった野生株と比較することにより明らかにする。iii) さらに、HBV の塩基変異が感染細胞に与える影響のメカニズムを、マイクロアレイ等により包括網羅的に検討する。

## 3. 研究の方法

集団発生した劇症肝炎患者の血清から得られた HBV を基に 1.3 倍長の HBV ゲノムを有するプラスミドを構築する。この株に認められた塩基変異を野生型に置換させたものも構築し、それらの plasmid を肝癌細胞株にトランスフェクションする。まず、その培養液上清と細胞内の HBV 量、HBV 関連粒子および蛋白を測定し、この株に認められた塩基変異のウイルス複製に与える影響を解析する。また、この株の持つ細胞障害性を検討し、塩基変異や細胞内の複製中間体との関連を解析する。さらに、塩基変異あるいは HBV 株による病態の相違をマイクロアレイにより包括網羅的に解析することで、劇症肝炎発症の機序の詳細を明らかにする。

まず、HBV ゲノムを有するプラスミドを肝癌細胞株 (HepG2 等) にトランスフェクションし、その株に認められた変異を野生型に置換させた場合と比較することにより、塩基変異の持つ機能を解析する。HBV を細胞内で発現させるには 1.3 倍長の HBV ゲノムが必要であり、これを有するプラスミドを構築するのは時間を要する作業であるが、我々は劇症肝炎患者血清を用いてすでにこれを構築している。また、コントロールとして軽症の急性肝炎患者から得られた genotype B の野生型 HBV からプラスミドを構築した。劇症肝炎株を基にこの株に認められたコアプロモーター領域およびプレコア領域の変異 (A1762T/G1764A, G1896A)、さらに G1862T などを site-directed mutagenesis を用いて網羅的な組み合わせで野生型に置

換させたプラスミドを構築する。これらを肝癌細胞株である HepG2 にトランスフェクションし、培養液中に放出される HBV 粒子、HBs 抗原、HBe 抗原を real-timePCR 法および ELISA 法で測定する。また、細胞中の HBV 複製中間体の DNA を southern blot により解析し、HBs 抗原、HBe 抗原、HBc 抗原の産生に関連する蛋白を western blot により検討する。以上の手法により、今回認められた塩基変異が HBV 複製系に与える影響を、その細胞外への放出に限らず細胞内での形態も含めて解析する。また、細胞内に複製中間体が蓄積する傾向があれば、その局在を細胞の分画化により検討する。

Southern blot は古典的な方法で最近は一般的には行なわれなくなって来たが、HBV の DNA は複製の過程で様々な形態をとるため、必須の解析方法である。我々は放射性元素を用いずに digoxigenin を用いる実験系を採用してその感度は検証済みであり、技術的な問題はない。トランスフェクション効率のばらつきは SEAP (分泌型アルカリフォスファターゼ) レポーターシステムを用いて補正する。実験は全て triplicate で行ない、少なくとも独立した 2 回以上の実験を行なって再現性を確認する。以上の種々の解析により、今回の株に認められた変異のウイルス複製系に及ぼす影響を検討する。

#### 4. 研究成果

まず、この HBV 株には劇症化との関連が報告されている core promoter 変異 (A1762T/G1764A) および precore 変異 (G1896A) に加え、特徴的な変異である G1862T が認められたため、これらの変異が HBV 複製に与える影響について検討した。この劇症肝炎株を基に、1.3 倍長の HBV ゲノムを含む plasmid を作成し、肝癌細胞株 HepG2 にトランスフェクションしたところ、劇症肝炎株では細胞外の HBV 量は野生株と比較して増加していなかったが、細胞内の HBV 複製中間体が有意に増加していた。免疫染色により劇症肝炎株では HBV コア蛋白が核内に蓄積していることが分かり、このことが HBV の細胞内への蓄積と関連していると考えられた。実際の B 型肝炎の肝組織においても HBV コア蛋白の局在を検討したところ、急性肝炎例と比較して劇症肝炎例においてはコア蛋白が肝細胞の核に局在する傾向が認められた。

次に、この劇症肝炎 HBV 株が細胞に与える影響を検討したところ、野生株と比較して劇症肝炎株において細胞生存性の低下が認められた。この変化は上記の変異と関連しており、特に G1862T が A1762T/G1764A と共存する場合に細胞生存性が低下すると考えられた。これらの場合に培養液上清中の LDH が増加していることから、劇症肝炎 HBV 株に細胞

障害性があるものと考えられた。また、caspase-3/7 の増加は認められないため apoptosis の関与は否定的であり、別の経路による細胞障害が想定された。

さらに、本研究の実験系を用いて薬剤耐性 B 型肝炎患者の病態を明らかにすることもできた。本研究で構築した HBV genome を含む plasmid のポリメラーゼ領域の一部を薬剤耐性患者の HBV の配列と入れ替えることにより、この患者の HBV に認められた変異の意義を in vitro で確認した。lamivudine + adefovir 併用療法に耐性を示した患者に rtA200V という新たな変異を認めたが、この変異が従来から言われている lamivudine 耐性変異 (rtL180M+M204V) とともに存在することでウイルスの複製効率が上昇し、adefovir 耐性も高まることが確認された。

マイクロアレイについては実験系を確立中であり、まとまった結果はまだ得られていない。

本研究により、劇症肝炎発症の機序の一端を解明するとともに薬剤耐性ウイルス出現の機序の解明にも応用することができ、臨床的に意義のある成果が得られたと考えている。

#### 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 2 件)

1. Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Wakui Y, Kondo Y, Fukushima K, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis. *Virology*. 2009;395:202-9. 査読あり

2. Inoue J. Factors involved in the development of fulminant hepatitis B: Are the mutations of hepatitis B virus implicated? *Hepatology Res*. 2009;39:1053-5. 査読なし

[学会発表] (計 4 件)

1. Inoue J, et al. Emergence of multiple drug-resistant mutants of hepatitis B virus with long-term lamivudine and adefovir bitherapy. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2009.10.31. Boston. USA

2. 井上 淳, 他. Adefovir 耐性 B 型肝炎例に認められた新たな変異とその対策について. 第 13 回日本肝臓学会大会 (JDDW 2009). 2009.10.15. 京都.

3. Inoue J, et al. Cytopathic effect of hepatitis B virus obtained from fulminant hepatitis patients. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease

(AASLD). 2008.11.2. San Francisco.USA

4. 井上 淳、他. 劇症肝炎患者から得られたHBV株の持つ細胞障害性についての検討.  
第44回日本肝臓学会総会. 2008. 6. 6. 松山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 淳 (Jun Inoue)  
東北大学・病院・医員

研究者番号 : 60455821

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :