

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究B 海外学術調査

研究期間：2009～2012

課題番号：21406007

研究課題名（和文） HBV ゲノム相違を背景にした肝炎・肝癌の地理病理と病因論の展開

研究課題名（英文） Geographic pathology of HBV-related hepatitis and liver cancers based on characterization of HBV genome variant

研究代表者 阿部 賢治 (ABE KENJI)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：60130415

研究成果の概要（和文）：

(1) アジアの小児に発症した肝癌組織の 86%に HBV DNA が検出された。HBV のシーケンス解析から、塩基の部分欠損が pre-S2 領域での欠損が全例で nt 4～57 の位置に出現していた。小児肝癌発生要因として HBV 感染が重要であり、またこの引き金として pre-S2 のホットスポット変異が深く関わっていることが強く推察された。

(2) 台湾アボリジンから分離された HBV が従来の HBV 分類に属さず、新型のサブゲノタイプ HBV/D10 と命名した。

(3) 中国東北部黒龍省近辺に住む中国人に発生した胆管癌症例 66 例を対象にして、HBV 感染との関連を調査した。血中 HBsAg 陽性例は、胆管癌 66 例中 18 例 (27.3%) であった。さらに PCR 法にて癌組織内 HBV DNA を検索した結果、肝内胆管癌の 8 例 (34.8%) で陽性を示したのに対し、肝外胆管癌群と非肝疾患群の肝組織では全例陰性であった。肝内胆管癌の発生要因の一つとして、HBV の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

(1) HBV DNA in HCC tissues from children patients was detected in 36 of 42 (86%) cases tested. Surprisingly, very high prevalence of HBV pre-S deletion mutant was recognized in 27 of 30 (90%) HCCs examined. Interestingly, the pre-S2 mutant consistently appeared with deletion at nt 4-57 in all of the 20 cases with pre-S2 mutant (100%). This hot spot mutation in the pre-S2 was further confirmed by complete genomic sequence of HBV in a Japanese boy who eventually developed HCC.

(2) We identified a novel subgenotype HBV/D10 in Taiwanese aborigine HBV carriers.

(3) HBV infection appears to be associated with the pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) in northern China. The high fatality rate of cholangiocarcinoma intensifies the need for further research to understand the precise mechanism of HBV infection and the development of ICC.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------|------------|
| 2009 年度 | 3,600,000 | 0 | 3,600,000 |
| 2010 年度 | 3,300,000 | 0 | 3,300,000 |
| 2011 年度 | 3,300,000 | 0 | 3,300,000 |
| 2012 年度 | 3,300,000 | 0 | 3,300,000 |
| 総計 | 13,500,000 | 0 | 13,500,000 |

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：医歯薬学 A・人体病理学

キーワード：アジア、国際連携、国際研究、B 型肝炎ウイルス (HBV)、ウイルス肝炎、ウイルス肝臓、地理病理学、分子疫学

1. 研究開始当初の背景

アジアはとりわけ HBV 浸淫国が多く、これが肝臓発生の最大要因となっており、その予防対策確立は国際保健上、極めて重要な課題となっている。ウイルス肝炎予防は、つまりは肝臓発生の予防にもつながり、その臨床的意義は大きい。一方で、成因不明の肝炎・肝臓も未だに存在し、特に東南アジア地域が多い。HBV は最近の研究から各種ゲノタイプが存在し、肝臓状態、治療抵抗との関連が示唆されている。特にアジア株肝炎ウイルスは強いバリエーションを示し、病原性との関連が推察されている。また WHO による発展途上国における HBV ワクチン母感染予防対策が進められているが、ワクチン抵抗性を示す変異株が流行している実態も次第に明らかとなってきた。

2. 研究の目的

アジアは、肝炎ウイルス関連肝臓の多発地域であることから、ウイルス感染と肝臓発生の関連を詳しく解析することは、臨床的にも重要である。本研究では、アジアに流行する HBV ゲノムの多様性をまず明らかにした上で、肝臓発生の関連を地理病理学的、分子疫学、分子生物学的に解明することを目的とした。更にはこの目的達成のため、アジア各国との国際連携による共同研究体制の基盤を構築することを目標とした。

3. 研究の方法

アジア 6 か国 (ベトナム、カンボジア、タイ、台湾、中国、韓国) と米国の計 7 か国との国際共同研究を実施した。参加各国の大学、医療機関の協力で得られた肝炎・肝臓患者血清および肝臓組織を対象にして、病理、ウイルス、遺伝子診断を試みた。

4. 研究成果

(1) アジアにおける小児肝臓の病理と成因：

ベトナム、台湾、韓国、日本の 4 か国における調査から、計 42 例 (ベトナム 28 例、韓国 7 例、台湾 4 例、日本 3 例) の小児における原発性肝臓症例を収集することが出来た。性差は男児 34 例：女児 8 例 (4.3:1)、平均年齢は 11±3 歳であった。また対象例として、10 例の肝臓腫 (平均年齢 4±3 歳) も同様に検索した。小児肝臓症例では、56% で肝臓硬変を伴っていた。PCR 法にて、肝臓組織内の肝炎ウイルス遺伝子検出を試みた結果、肝臓症例では HBV DNA が 36/42 (86%) と極めて高率に検出できた。HCV RNA は全例で陰性であった。こ

れに対し、肝臓腫では HBV DNA、HCV RNA 共に陰性であった。更に興味あることに、HBV pre-S 遺伝子の欠損変異が 90% (27/30) の症例で観察された。その内訳は、pre-S2 (20/27; 74%)、pre-S1 (5/27; 18.5%)、pre-S1/S2 (2/27; 7.4%) であった。驚きは、pre-S2 変異がその全例で 4~57 番目の塩基が欠損していたことである。この欠損箇所には、CD8 T cell エピトープが存在することから、エスケープ変異と考えられた。さらに母感染により HBV キャリアに移行した少年で長期追跡調査を行ったところ、6 歳で慢性肝炎、8 歳で HBV pre-S2 変異、13 歳で pre-S1+pre-S2 変異が出現した後、まもなく肝臓が発症した。同じ母から生まれた別の姉妹も HBV キャリアに移行したが、ウイルス変異や肝臓機能異常は全く観察されなかった。この pre-S2 部分欠損変異遺伝子は、発症に関与する ER ストレスシグナル遺伝子の活性化をきたし、またトランスジェニックマウスにて肝臓を発症することが確認されている。以上のことから、小児肝臓発生要因として HBV 感染が重要であり、またこの引き金として pre-S2 のホットスポット変異 (nt 4~57 欠損変異) が深く関わっていることが強く推察された。これは成人肝臓でも同じ現象が当てはまり、HBV pre-S2 変異による肝臓発生の分子機構を考える上で、重要な知見を得ることができた。

(2) 台湾アボリジンから分離された HBV ゲノムの特徴：

台湾に古くから在住するアボリジン 27 例から分離された HBV の分子ウイルス学的特徴を検討した。結果は、pre-S1/pre-S2 領域の解析から、ゲノタイプ B が 21 例 (77.8%) と最も多く、次いでゲノタイプ D が 6 例 (22.2%) であった。サブゲノタイプ分類ではゲノタイプ B では全例で B2、ゲノタイプ D は全例で既知のサブゲノタイプ分類である D1~D9 のいずれとも異なる集簇を形成した。さらに詳細に検討するため、ゲノタイプ D から 4 株とゲノタイプ B から 2 株を選び、全塩基配列を決定した。ゲノタイプ D の 4 株は全て 3182 塩基からなった。分子系統樹解析で同様に独自の集簇を形成した。分岐部は 99% の高いブートストラップ値を示したため、新規サブゲノタイプとして HBV/D10 と命名した。今回分離された HBV/D10 には、レコンビナントは存在しなかった。またサブゲノタイプ B2 に属す 2 株は、ゲノタイプ B/C のレコンビナントであった。

(3) HBV と胆管癌発生の関連について :

中国東北部黒龍省近辺に住む中国人に発生した胆管癌症例 66 例 (肝内胆管癌 23 例 + 肝外胆管癌 43 例) である。またコントロールとして、非肝疾患患者 52 例も併せて比較検討した。血中 HBsAg 陽性例は、胆管癌 66 例中 18 例 (27.3%) であったのに対し、非肝疾患群では 52 例中 2 例 (3.9%) と胆管癌群で有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。さらに PCR 法にて癌組織内 HBV DNA (HBx gene) を検索した結果、肝内胆管癌の 8 例 (34.8%) で陽性を示したのに対し、肝外胆管癌群と非肝疾患群の肝組織では全例陰性であった。また肝内 HBV DNA 陽性を示した 8 例は、免疫染色にて 7 例で肝内 HBsAg 陽性が確認できた。肝内 HBV DNA 陽性を示した 8 例の組織病理学的所見は、非癌部において 4 例では非癌部の門脈域にリンパ球浸潤、2 例では肝硬変、2 例では脂肪変性が観察された。肝内胆管癌の組織分類は、高分化型 (1 例)、中等度分化型 (5 例)、低分化型 (2 例) であった。胆管癌患者の HBV 感染と非感染例において、両者に臨床的所見の差異は認められなかった。以上の所見から、肝内胆管癌の発生要因の一つとして、HBV の関与が示唆された。今後更に両者の因果関係について、発生機序も含めた詳しい研究が必要である。

(4) 国際連携による共同研究体制の基盤構築 :

4 年間に亘る本国際研究を通じて、ベトナム、カンボジア、タイ、ミャンマー、台湾、韓国、中国、米国の主要大学・医療機関との間で、緊密な関係を構築することができた。特にベトナム、カンボジア、タイ、中国との間では、現地での感染症の病理、血清、遺伝子診断の技術・研究指導、セミナー開催などを活発に行った結果、強い相互信頼関係を築くことができた。本研究の当初の重要な目標の一つである、アジアにおける国際連携に基づく感染症分野での国際共同研究体制の基盤を構築することができた。今後の国際研究活動に活用して行きたい。

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 12 件)

1. Kenji Abe, Swan N. Thung, Han-Chieh Wu, Tung Thanh Tran, Phuc Le Hoang, Khai Dinh Truong, Ayano Inui, Ja June Jang, Ih-Jen Su: Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian

children. *Cancer Science* 100: 2249-2254, 2009

(doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01309.x)

2. Kenji Abe: Review: Pathology of hepatitis B virus infection in humans and animals. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 39: 453-455, 2009
3. Stephen C. Ward, Swan N. Thung, Kiat Hon Lim, Tung Thanh Tran, Thi Khang Bui Hong, Phuc Le Hoang, Ja June Jang, Young Nyun Park, Kenji Abe: Hepatic progenitor cells in liver cancers from Asian children. *Liver International* 30: 102-111, 2010
(DOI:10.1111/j.1478-3231.2009.02126.x)
4. Moh Moh Htun, Khin Pyone Kyi, Khin May Oo, Myo Khin, Win Maw Tun, San San Oo, Khin Ohnmar Lwin, Kenji Abe: Presence of hepatitis C virus RNA by nested polymerase chain reaction in plasma-derived hepatitis B vaccine non-responders. *Myanmar Health Sciences Research Journal* 22: 101-104, 2010
5. David T. Chao, Kenji Abe, Mindie H. Nguyen: Systematic review: Epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34: 286-296, 2011
(doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04714.x)
6. Van H. Pham, Huyen D.P. Nguyen, Phat T. Ho, Dien V. Banh, Hoa L.T. Pham, Phiet H. Pham, Ling Lu, Kenji Abe: Very high prevalence of hepatitis C virus genotype 6 variants in Southern Vietnam: Large-scale survey based on sequence determination. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64: 537-539, 2011
7. Yiqi Wu, Tianzhen Wang, Shengqian Ye, Ran Zhao, Xiaohui Bai, Yingying Wu, Kenji Abe, Xiaoming Jin: Detection of hepatitis B virus DNA in paraffin-embedded intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma tissue in the northern Chinese population. *Human Pathology* 43: 56-61, 2012
(doi:10.1016/j.humpath.2011.04.004)
8. Apiradee Theamboonlers, Kenji Abe, Chittima Thongmee, Yong Poovorawan: Complete coding sequence and molecular analysis of hepatitis A

- virus from a chimpanzee with fulminant hepatitis. *Journal of Medical Primatology* 41: 11-17, 2012 (doi:10.1111/j.1600-0684.2011.00515.x)
9. Yongshui Fu, Weibing Qin, Hong Cao, Ru Xu, Yi Tan, Teng Lu, Hongren Wang, Wangxia Tong, Xia Rong, Gang Li, Manqiong Yuan, Chunhua Li, Kenji Abe, Ling Lu: HCV 6a prevalence in guangdong province had the origin from Vietnam and recent dissemination to other regions of China: Phylogeographic analyses. *PLoS One* 7: e28006, 2012 (doi:10.1371/journal.pone.0028006)
 10. Wang H, Yuan Z, Barnes E, Yuan M, Li C, Fu Y, Xia X, Li G, Newton P, Vongsouvath M, Klenerman P, Pybus OG, Murphy D, Abe K, Lu L: Eight novel hepatitis C virus genomes reveal the changing taxonomic structure of genotype 6. *Journal of General Virology* 94: 76-80, 2013 (DOI 10.1099/vir.0.047506-0)
 11. Zhang Y, Wu Y, Ye S, Wang T, Zhao R, Chen F, Abe K, Jin X: The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. *Virus Research* 171: 65-70, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.027>)
 12. Van Hung Pham, Thong Van Nguyen, Truc Thanh Thi Nguyen, Linh Duy Dang, Ngoc Hieu Hoang, Truong Van Nguyen, Kenji Abe: Rubella epidemic in Vietnam: characteristic of rubella virus genes from pregnant women and their fetuses/newborns with congenital rubella syndrome. *Journal of Clinical Virology* 57: 152-156, 2013 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.02.008>)
- [学会発表] (計 12 件)
1. Swan N. Thung, Tung Thanh Tran, Phuc Le Hoang, Ja June Jang, Young Nyun Park, Kenji Abe: Stem cell origin of liver cancers in Asian children. United States and Canadian Academy of Pathology, March 2009, Boston, U. S. A.
 2. Kenji Abe: Invited lecture: Pathogenesis of hepatitis B virus infection and its related hepatocellular carcinoma. The 7th Pathology Conference of Vietnam, September 2009, Ho Chi Minh City, Vietnam
 3. Kenji Abe: Invited lecture: Pathology of hepadna virus infection in humans and animals. The 4th Asian Society of Veterinary Pathologists (ASVP) Conference, November 2009, Bangkok, Thailand.
 4. Kenji Abe, Swan N. Thung, Han-Chieh Wu, Tung Thanh Tran, Phuc Le Hoang, Ayano Inui, Ja June Jang, Ih-Jen Su: Hot spot mutation of hepatitis B virus pre-S2 gene related to hepatocellular carcinoma in Asian children. The Excellence in Pediatrics International Conference, December 2009, Firenze, Italy.
 5. Kenji Abe: Invited lecture: Hepatitis C in experimentally infected chimpanzees: comparison with hepatitis B. 4th Ditan International Conference on Infectious Diseases, July 2010, Beijing, China
 6. Kenji Abe: Invited lecture: Molecular-based epidemiology and pathology of hepatitis B virus infection. The National Conference on Medical Molecular Biology and Biochemistry, September 2010, Hanoi, Vietnam
 7. Kenji Abe: Invited lecture: Hepatitis B and C in Asia. National Conference of Vietnamese Association for Hepatology, August 2011, Dalat, Vietnam
 8. 乾あやの、角田知之、十河剛、小松陽樹、藤澤知雄、阿部賢治：小児期のHBV関連肝細胞癌の発生に関する検討。第48回日本肝臓学会総会、2012年6月、金沢
 9. Ayano Inui, Tomoo Fuijisawa, Tomoyuki Tsunoda, Manari Kawamoto, Sonoko Ijichi, Tsuyoshi Sogo, Haruki Komatsu, Ih-Jen Su and Kenji Abe: Hepatitis B virus associated hepatocarcinogenesis in Asian children. 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (WCPGHAN), November 14-18, 2012, Taipei, Taiwan
 10. Kenji Abe: Invited lecture: Animal models for human hepatitis B. 7th National Conference of Vietnamese Association for Hepatology. August 17-18, 2012, Danang, Vietnam
 11. Mabel Ko, Hongfa Zhu, Kenji Abe, Xuchen Zhang, Isabel Fiel, Stephen Ward, Swan N. Thung: Occult HBV and HCV

infection in non-B non-C
hepatocellular carcinoma: A clinical
and molecular pathologic study. 102nd
Annual Meeting of The United States
and Canadian Academy of Pathology
(USCAP), March 2-8, 2013, Baltimore,
U. S. A.

12. Kenji Abe: Invited lecture: Hepatitis
B and C in Asia. National Conference
of Vietnamese Association for
Hepatology, August 2011, Dalat,
Vietnam

〔図書〕 (計1件)

1. Kenji Abe: Chapter 76: Hepatitis B
virus. In: Don Liu eds. Molecular
detection of human viral pathogens.
Florida, U. S. A. : Taylor & Francis CRC
Press, 2010, p847-859

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 賢治 (ABE KENJI)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官
研究者番号 : 60130415