

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590985

研究課題名(和文)肝細胞内微量B型肝炎ウイルスの病的意義に関する研究

研究課題名(英文)Pathogenesis of hepatitis B virus in hepatocyte, undetectable in peripheral blood

研究代表者

田守 昭博(Tamori, Akihiro)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30291595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞内に感染する微量HBVの病態を明らかにするため前向き研究(観察期間中央値24ヶ月(2-61ヶ月))を実施した。その結果HBs抗原陰性例からのHBV再活性化は関節リウマチRA例3/88(3%)、悪性リンパ腫ML例3/30(10%)、造血幹細胞移植HSCT例5/19(26%)であった。再活性化までの期間はHSCT3例とRA1例では1年以上、それ以外では1年以内であった。増殖したHBVにはHBs抗原に高率に変異を認めた。モニタリング例では、HBs抗原の有無に関わらずHBV DNAが定量された時点で核酸アナログを投与し、重篤な肝障害を阻止できた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the clinical characteristics of hepatitis B virus reactivation (HBV-R), we performed a prospective long-term study of patients who receive immunosuppressive or cytotoxic therapy. We enrolled 229 patients with anti-HBc. HBV DNA levels were measured every month to 3 months by a real-time PCR method. The mean observation period was 24 months (range: 2-61 months). Entecavir was administered to all of 20 patients with more than 2.1 log/ml of HBV DNA at the enrollment. In HBsAg-negative patients, HBV was reactivated in 3/30 (10%) ML patients treated with rituximab combination therapy, and 5/19 (26%) patients with HSCT. In RA patients, HBV reactivation occurred in 3/88 (3%) patients. Entecavir inhibited HBV amplification and prevented HBV-associated hepatic failure in patients with HBV reactivation. Mutations in the 'a' determinant region with amino acid replacement were detected in 4 of the 8 patients with HBV-R.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス 再活性化 長期予後

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は 1963 年 Dr. Blumberg によって発見された非閉環状 2 本鎖 DNA ウイルスである。これまでの研究から HBV 感染の病態と血清学的診断法が確立され、臨床医にとってその診断は容易であると考えられていた。しかし肝移植例の解析から HBs 抗原陰性ドナーからの肝移植によりレシピエントに B型肝炎が発症する例が存在することが明らかとなった。また新たに開発された分子標的薬による治療後に De Novo 肝炎として HBs 抗原陰性例から重篤な B型肝炎が発症することも注目されている。我が国やアメリカの肝臓病学会からガイドラインが提示され臨床現場での応急対応として啓発されてきた。しかし、その病態や治療法別の HBV 再活性化の頻度など不明な点が多数残されていた。

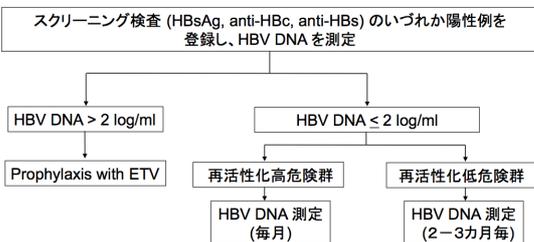
2. 研究の目的

本研究は、肝組織内に微量に存在する B型肝炎ウイルス (HBV) の病態を解析し臨床例における再活性化肝炎の新たな対応策を提示するとともに肝発癌への関与について検討することが目的である。HBV は血液中に検出されなくなっても肝細胞内には持続感染していることが知られている。そこで肝細胞内 HBV 量と covalently closed circular DNA (ccc DNA) および HBV 塩基配列の検討および HBV 免疫応答を定量的に評価し、宿主とウイルスの両面から解析することを目的とした。また発癌については HBV DNA のヒトゲノムへの組み込み位置によって microRNA (miRNA) 発現を介した遺伝子変化が起こっているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

HBV 再活性化に関する前向き研究に登録された患者を対象に HBV 増殖のあった症例となかった症例の臨床背景を比較するとともに免疫応答に関与する分子の遺伝子多型を解析する。また増殖した HBV 遺伝子配列を決定し、その特徴を明らかにする。

対象例は造血幹細胞移植 (HSCT) 23 例、悪性リンパ腫 (ML) 34 例、関節リウマチ (RA) 103 例、腎移植例 12 例、膠原病関連疾患 22 例、リツキシマブ以外の化学療法 35 例である。



上記に示すフローチャートに従って登録例を定期的に追跡した。

- (1) 対象例の血清 HBV 関連マーカーを測定。HBs 抗体、HBc 抗体、HBs 抗原。
- (2) 血液中 HBV DNA の検出あるいは増加した

場合にそのウイルスの塩基配列を解析。再活性化時の治療介入薬であるエンテカビルの薬剤応答性を規定する塩基配列と HBs 抗原をコードする領域の塩基配列を決定。

- (3) 対象例の HLA 遺伝子タイピングを解析。HLA-class I, II について抗原分類を実施し、再活性化した登録例では遺伝子型を決定した。
- (4) HBs 抗体価 50 mIU/mL 未満の観察例への HBs 抗体ワクチン接種による HBs 抗体価の測定。

4. 研究成果

(1) 観察期間中央値 24 ヶ月 (2-61 ヶ月) において HBs 抗原陰性例からの HBV 再活性化は RA 症例 3/88 (3%)、ML 症例 3/30 (10%)、HSCT 症例 5/19 (26%) であった。それ以外の登録例からは、HBV 再活性化を認めなかった。再活性化例の登録時 HBs 抗体価は陰性 2 例、50mIU/mL 未満 8 例、100mIU/mL 以上 1 例であり、再活性化時には 1 例を除き HBs 抗体は陰性であった。HBs 抗体価 200 mIU/mL 以上の症例からの再活性化はなかった。再活性化までの期間は HSCT 3 例と RA 1 例において 1 年以上、残る 7 例では 1 年以内であった。RA 症例における追跡結果の詳細を下記の表に示す。

HBs抗原陰性関節リウマチ例の長期経過 (生物学的製剤投与 77 例)

観察期間	4年以上	4年未満-2年以上	2年未満
症例数	20	27	30
登録時・年齢	64 (15-72)	62 (40-82)	62 (35-80)
性別 (男・女)	4/16	2/25	6/23
HBs抗体陽性例	16 (80%)	16 (59%)	19 (63%)
内HBs抗体陰転例	1 (6%)	0	0
治療法	Infliximab (Remicade): 12 Etanercept (Enbrel): 8	Infliximab (Remicade): 7 Etanercept (Enbrel): 10 Adalimumab (Humira): 5 Abatacept (Orencia): 1 Tocilizumab (Actemra): 2 Orelizumab (Simponi): 1	Infliximab (Remicade): 9 Etanercept (Enbrel): 12 Adalimumab (Humira): 1 Abatacept (Orencia): 4 Tocilizumab (Actemra): 2 Golimumab (Simponi): 1
HBV再活性化	0	1*	1*

*70歳・女性、Abatacept, MTXにて加療。
*71歳・女性、Adalimumab, MTXにて加療。

(2) 再活性化した HBV の塩基配列ではエンテカビル薬剤耐性を示す変異は検出しなかった。一方再活性化した 4 例において HBs 抗原をコードする 'a' determinant 領域にアミノ酸置換を有する変異を認めた。

(3) HLA-A, -B, -C, -DQ, -DR, -DP1 と DPB1 の頻度について HBV 再活性化 8 例と非再活性化 32 例で比較したところ HLA-DQ 4 アリルに統計学的有意差を認めた ($p = 0.026$)。

(4) HBV 母子感染予防のために保険承認されている HB ワクチン接種を 14 例 (同意の後) に実施した。その内 4 例で抗体価が 100 mIU/mL 以上へ上昇した。

以上の結果から肝臓内に微量に存在する HBV の増加には、使用された薬剤が関与していることが明らかとなった。また HBs 抗原をコードしている塩基配列に変異を持った HBV が肝臓内に持続感染しており HBV 再活性化に関与している可能性が示唆された。一方、登録例

の HLA 抗原タイピングにより HBV 再活性化の頻度に差異があり、宿主因子の免疫応答も再活性化に関与している可能性が推測された。そらなる病態解明と臨床対策について今後研究を進める必要がある。

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9件)

1. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. A prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読あり、2014 in press
2. Nishida N, Sawai H, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M et al. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One*. 査読あり、2014; 9:e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.
3. Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S, Kawada N. Combination therapy with a nucleos(t)ide analogue and interferon for chronic hepatitis B: simultaneous or sequential. *J Gastroenterol*. 査読あり、2013;48:999-1005. doi: 10.1007/s00535-012-0742-5.
4. Tamori A, Kawada N. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. *World J Gastroenterol*. 査読あり、2013; 19:5395-401. doi: 10.3748/wjg.v19.i33.5395.
5. Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kobayashi S, Sakaguchi H, Shiomi S, Kim SR, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Kawada N. Entecavir and interferon-sequential therapy in Japanese patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Gastroenterol*. 査読あり、2013;48:397-404. doi: 10.1007/s00535-012-0645-5.
6. Kozuka R, Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. Anti-hepatitis B virus therapy: To stop, or not to stop: Has the question been solved? *Hepatol Res*. 査読あり、2012;42:946-7. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01001.x.
7. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A,

Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M et al. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 査読あり、2012;76:e39175. doi: 10.1371/journal.pone.0039175.

8. Tani Y, Aso H, Matsukura H, Tadokoro K, Tamori A, Nishiguchi S, Yoshizawa H, Shibata H. Significant background rates of HBV and HCV infections in patients and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-HBc titres with high anti-HBs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections. *Vox Sang*. 査読あり、2012;102:285-93. doi: 10.1111/j.1423-0410.2011.01561.x.
9. Tamori A, Koike T, Goto H, Wakitani S, Tada M, Morikawa H, Enomoto M, Inaba M, Nakatani T, Hino M, Kawada N. Prospective study of reactivation of hepatitis B virus in patients with rheumatoid arthritis who received immunosuppressive therapy: evaluation of both HBsAg-positive and HBsAg-negative cohorts. *J Gastroenterol*. 査読あり、2011;46 :556-64. doi: 10.1007/s00535-010-0367-5.

[学会発表](計10件)

1. 田守 昭博 他、HBV 再活性化における宿主因子とウイルス因子に関する検討、第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29 日、東京
2. Tamori A, et al. Clinical characteristics of hepatitis B virus reactivation in prospective long-term study for patients with hematologic malignancy. 第 49 回ヨーロッパ肝臓学会、2014 年 4 月 11 日、ロンドン
3. 田守 昭博 他、前向き登録例の長期経過からみた HBV 再活性化対策の現状、第 17 回日本肝臓学会総会、2013 年 10 月 9 日、東京
4. 田守 昭博 他、全数調査から見た輸血後 B 型肝炎ウイルス陽転例の解析—HBV 再活性化の可能性—、第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 7 日、東京
5. 田守 昭博 他、長期観察による HBV 再活性化頻度と治療介入例の予後、第 99 回日本消化器病学会総会、2013 年 3 月 22 日、鹿児島
6. 田守 昭博 B 型肝炎の最新情報、第 56 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会、2012 年 11 月 17 日、大阪

7. Tamori A, et al. Prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections; JRC NAT Screening Research. 第 63 回アメリカ肝臓病学会、2012 年 11 月 10 日、ボストン
8. 田守 昭博 他、前向き研究からみた B 型肝炎ウイルス再活性化の頻度と HBs 抗体価の推移、第 48 回日本肝臓学会総会、2012 年 6 月 7 日、金沢
9. 田守 昭博 他、B 型肝炎ウイルス再活性化の頻度とウイルス変異の臨床的意義、第 39 回日本肝臓学会西部会、2011 年 12 月 9 日、岡山
10. Tamori A, et al. Prospective study of reactivation of hepatitis B virus in patients who received immunosuppressive therapy or cytotoxic therapy: Evaluation of both HBsAg- positive and - negative cohorts 第 62 回アメリカ肝臓病学会、2011 年 11 月 6 日、サンフランシスコ

〔図書〕(計 1 件)

田守 昭博 他、最新医学社、B 型肝炎再活性化の現状と対策、2013、148

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/hepatology/research/ronbun.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田守 昭博 (TAMORI, Akihiro)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：3 0 2 9 1 5 9 5

(2) 研究分担者

榎本 大 (ENOMOTO, Masaru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：2 0 4 2 3 8 7 4

(2) 研究分担者

村上 善基 (MURAKAMI, Yoshiki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：0 0 3 9 7 5 5 6

(3) 連携研究者

なし