

令和元年6月14日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09380

研究課題名(和文) B型肝炎における遺伝子型分布の変遷および分子生物学的検討

研究課題名(英文) Trend and molecular biological analysis of hepatitis B virus genotype distribution

研究代表者

伊藤 清顕 (Ito, Kiyooki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：50551420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、前回調査から5年が経過した2016年度にB型肝炎の全国調査を行うことにより、B型急性および慢性肝炎における遺伝子型分布の変遷を明らかにした。これまでに全国でB型急性肝炎127例、B型慢性肝炎4,350例の臨床情報を収集した。

最終集計の結果、B型急性肝炎では遺伝子型Aが61例(48.0%)、B型慢性肝炎では遺伝子型Aが177例(4.1%)であり、いずれも前回2011年の集計では、B型急性肝炎では遺伝子型Aの割合が47%、慢性肝炎では4.1%であったため、B型急性肝炎および慢性肝炎における遺伝子型Aの割合はほとんど変化していなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、前回調査から5年が経過した2016年度にB型肝炎の全国調査を行うことにより、B型急性および慢性肝炎における遺伝子型分布の変遷を明らかにした。心配されたB型慢性肝炎における遺伝子型Aのさらなる感染の拡大に関しては否定的であった。これは、成人感染のB型急性肝炎の遷延例を慢性肝炎に含めていた可能性や母子感染や幼児期の感染と比較して核酸アナログ製剤によりHBs抗原の消失を認めやすいといった要因が関連しているものと考察された。B型肝炎ワクチンの定期接種が開始された今、今後の遺伝子型の分布や懸念されるワクチンエスケープ変異の増加の有無に関して全国的に調査を続ける必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted a national survey of the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in 2016, five years after the previous survey, to clarify the trend of HBV genotype distribution in acute and chronic hepatitis B virus infection in Japan. We have collected clinical information on 127 cases of acute hepatitis B and 4,350 cases of chronic hepatitis B.

As a result of the final tabulation, there are 61 cases (48.0%) of genotype A in acute hepatitis B, and 177 cases (4.1%) of genotype A in chronic hepatitis B. The proportion of genotype A in acute hepatitis B and chronic hepatitis was almost unchanged since the proportion of genotype A was 47% in acute hepatitis and 4.1% in chronic hepatitis in 2011.

研究分野：肝臓学

キーワード：B型肝炎ウイルス 遺伝子型 ワクチン 急性肝炎 慢性肝炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は世界的にA~Jの10種類の genotype に分類され、各 genotype により地理的分布が異なること、臨床像に違いがあるということが明らかにされている(Miyakawa Y and Mizokami M. *Intervirology* 2003)。以前より本邦ではB型急性、慢性肝炎とともに genotype B および C により多数が占められていた(Orito E, et al. *Hepatology* 2001)。我々はこれまでにB型急性肝炎および慢性肝炎の全国調査を定期的に行い、本邦のB型急性肝炎において欧米型の genotype A による感染が急速に増加しており、いまや半数以上が genotype A による感染となり、B型慢性肝炎における genotype 分布と大きく異なっていることを報告した(Ito K, Mizokami M et al. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015)。また、genotype A による急性感染では他の genotype と比較してHBs抗原が消失するまでの期間が有意に長く、他の genotype ではほとんど認められない慢性化を7-8%程度に認めること、同じ地域の症例でHBVの塩基配列の相同性が高く既に大部分の症例が国内感染であることを報告した(Ito K, Mizokami M et al. *Hepatology* 2014)。これまでの全国調査で収集した多数の診療情報および多数の検体に加え、前回の全国調査から5年後にあたる2015年度のB型急性肝炎および慢性肝炎の全国調査を行い、さらに臨床情報および臨床検体を加えることにより最近の国内の genotype 分布の変遷や genotype A の拡大状況、genotype の違いが病態に与える影響を明らかにすることができる。現在、国内で使用されているHBVに対するワクチンは genotype A を原料とした®ヘプタバックスIIと genotype C を原料とした®ビームゲンの2種類が用いられている。これら2種類のワクチンは異なる genotype にも効果があると報告されているが、genotype の違いが一過性感染の原因となる可能性も指摘されており(2011 *N Engl J Med*)、いまだ十分な情報がないのが現状である。このような genotype が異なるワクチンが感染防御に与える影響を将来評価する上でも、UV導入直前の国内のHBVの感染状況、HBV genotype の分布および変遷を把握し genotype が病態に与える影響を明らかにしておく必要がある。

当研究申請者はBrown University Liver Research Centerにおいて、分子生物学的手法によりHBVのエンベロープ蛋白上のN結合型糖鎖がHBVの分泌に必須のものであり、遺伝子変異によって新たな糖鎖結合部位が形成されるとウイルスの分泌量が増加し、潜伏感染や発癌の原因となり得ることを基礎的研究により明らかにした(Ito K et al. *J Virol.* 2010)。最近、このようなエンベロープ蛋白の糖鎖修飾に関連する遺伝子変異が、潜伏感染や再活性化症例、肝発癌症例に認められることが多数の臨床検体を用いた解析により明らかにされつつある(Yu et al. *J Hepatol.* 2014, Salpini et al. *Hepatology* 2015)。我々は、これまでの全国調査により収集した多数症例からの患者血清に加え、新たに症例及び患者血清を追加することにより、このような糖鎖修飾に関連する遺伝子変異と病態との関連や genotype の違いによるウイルス表面上の糖鎖構造の違いを明らかにする。さらには、我々が開発した蛋白上の糖鎖構造の変化を応用した非侵襲的な肝線維化マーカーを用いることにより各症例の肝線維化の程度を測定し、genotype ごとの肝線維化の程度、肝線維化進展の進行速度の違い等を解析することにより genotype の違いが肝臓の線維化に与える影響を明らかにする。

2. 研究の目的

我々は既にこれまでの5年毎に行ってきたB型急性肝炎および慢性肝炎の全国調査により、多数の臨床情報および臨床検体を保有している。2015年度は前回調査から5年目にあたり、全国調査を継続的に行うことにより国内のB型急性肝炎および慢性肝炎の genotype 分布の動向を含めた全体像を把握することが可能となる。このようなデータは、今後新生児にUVが開始されるにあたり、将来的に genotype ごとのワクチンの有効性の違いやUV導入後の genotype 分布の変化を評価する上でも極めて重要なデータとなる。これまでの保存血清に加えて血清を追加収集し、血清中のHBVの遺伝子や分泌蛋白に関して分子生物学的手法を駆使することによりHBVのウイルス表面および分泌蛋白上の糖鎖修飾と病態との関連を明らかにする。これまでもHBVのbasic core promoter変異やprecore変異と病態との関連が明らかにされているが、さらにエンベロープ領域のワクチンエスケープ変異や糖鎖修飾に関連する遺伝子変異を組み合わせることにより、病態との関連をより明らかにすることができる。特に糖鎖修飾に関連する変異と病態との関連に関しては、必ずしもHBVのmajor cloneの変異が関与するわけではなく、minor cloneとして存在するウイルスの遺伝子変異が病態と関連することも報告されており(*Hepatology* 2015)、Next Generation Sequencing (NGS)を用いた deep sequence を行うことによりウイルスの quasispecies に対応した解析を行う。このことは、我々のin vitro感染実験においてもminor cloneの遺伝子変異がHBV DNAおよび分泌蛋白に影響を及ぼすことから重要性が確認

されている。さらには、我々の開発した WFA+M2BP を用いて各症例の肝線維化の程度を測定することにより、genotype 毎の肝線維化の進展程度や進展速度の傾向を解析する。また、数十種類のレクチンを用いたレクチンアレイを使用することにより患者血液中に存在する HBV 表面上の糖鎖構造をウイルスから分離することなく解析する。これらの結果より、これまで十分ではなかった HBV と宿主細胞との相互作用、特に糖鎖機能との関連を明らかにすることができる。さらには、明らかとなった genotype 間でのエンベロープ蛋白の糖鎖修飾の違いや糖鎖に関連する遺伝子変異と病態との関連を、in vitro 感染実験系に導入し分子生物学的手法を用いて病態に与える影響を詳細に解析し、感染対策の基礎とする。

3. 研究の方法

これまでの全国調査の対象となった施設より、前回の調査以降 2010 年から 2015 年の 5 年間に発生した B 型急性肝炎症例の genotype を含めた臨床情報を取得する。できるだけ保存血清を収集し、genotype が不明な症例に関しては HBV の塩基配列を決定し、系統解析を行うことにより genotype を決定する。Genotype A はもともと欧米に多く認められており、国内では men sex with men (MSM)の間で感染がひろまってきたと考えられているが、感染ルートに関しては未だ不明な点が多い。HBV の塩基配列を国内の B 型急性肝炎症例、慢性肝炎症例、海外の急性肝炎症例、慢性肝炎症例等を含めて系統解析を行うことにより、それぞれの genotype がどこからどのように広がったか解析することが可能となる。特に genotype A に関しては、米国における B 型急性肝炎における subtype A2 症例の拡散時期と国内で genotype A が発見された時期が一致しており、米国で 1990 年代半ばに急速に感染が拡大した strain が日本に輸入された可能性があり、分子生物学的手法を用いて詳細に検討することにより感染ルートが特定できる可能性がある。

患者血清に対してレクチンアレイを用いることにより血液中の HBV の表面上の糖鎖構造を解析し、genotype の違いによるウイルス表面の糖鎖構造の違いを解析する。同じ genotype であっても病態の違いによりウイルス表面の糖鎖構造に変化が認められるかどうかを解析する。

我々は、HBV のエンベロープ蛋白 α -loop 内 146 番目のアスパラギンに N 結合型糖鎖が結合し、ウイルスの分泌に必須であることを報告してきた(Ito K et al. *J Virol.* 2010)。エンベロープ蛋白の免疫原性となる α -loop 内の免疫エスケープ変異によりウイルスの分泌量が低下し、これらの変異によるウイルス分泌量の低下に対して新たな糖鎖結合部位が α -loop 内に形成されることにより HBV の分泌量がレスキューされることも明らかにした。これにより HBs 抗原陰性、HBV DNA 高値という潜伏感染の状態が形成されることを基礎実験により明らかにした。これらのエンベロープ蛋白の糖鎖修飾に関連する遺伝子変異が、潜伏感染や再活性化、肝発癌と関連していることが実際に多数症例の検討で明らかにされ、病態との関連を認めることが報告された(*J Hepatol.* 2014, *Hepatology* 2015)。我々は、急性肝炎や慢性肝炎の多数症例における HBV の塩基配列を解析することにより、エンベロープ蛋白の糖鎖修飾に関連する遺伝子変異と病態との関連を詳細に検討する。これらの変異が国内でも患者血清中の HBV より認められるかどうか、genotype 間で検出頻度の違いがあるかどうかということも含めて検討する。我々のこれまでの解析では、HBV は異なる clone のエンベロープ蛋白等のウイルス蛋白を用いて複製することが可能であり、またウイルス量が多ければ minor clone といえど血液中に大量に認める事になる。このため、我々は NGS を用いて deep sequence を行うことにより quasispecies に対応した解析を行い minor clone における遺伝子変異と病態との関連を明らかにする。

4. 研究成果

本研究において、前回調査から 5 年が経過した 2015 年度の B 型肝炎の全国調査を行うことにより、B 型急性および慢性肝炎における遺伝子型分布の変遷を明らかにした。これまでに全国で B 型急性肝炎 127 例、B 型慢性肝炎 4,350 例の臨床情報を収集した。

最終集計結果を以下に示す。B型急性肝炎においてgenotype解析の結果、genotype Aが61例(48.0%)、Bが15例(11.8%)、Cが50例(39.4%)、Eが1例(0.8%)という結果であった。2011年の前回調査時にはgenotype Aが47%であったため、前回調査時とgenotype Aの割合はほとんど変化していなかった。年代別にgenotype Aの割合を比較しても2013年をピークにその割合は横ばいから減少に転じた。B型慢性肝炎に関しては、B型慢性肝炎に関しては、genotype Aが177例(4.1%)、Bが703例(16.2%)、Cが3,433例(78.9%)、Dが30例(0.7%)、その他のgenotypeは6例(0.1%)という結果であった。こちらも前回2011年の集計では、genotype Aは4.1%であったため、B型慢性肝炎におけるgenotype Aの割合は変化していなかった。B型急性肝炎の増加および慢性化率からするとB型慢性肝炎においてgenotype Aの割合がさらに上昇するものと予想されたが、今回の調査では前回調査と比較してgenotype Aの増加

はほとんど認められなかった。年代別にみても前回の調査でgenotype Aの割合を最も多く認めた20-24歳代(13.0%)から5年後の25-29歳をピークに変化しており、新たな感染拡大というよりは2010年あたりをピークとするgenotype AによるB型急性肝炎の影響を受けているものと思われた。これは、成人感染のB型急性肝炎の遷延例を慢性肝炎に含めていた可能性や母子感染や幼児期の感染と比較して成人感染で慢性化した症例は核酸アナログによりHBs抗原の消失を認めやすいといった因子が関連しているものと考察された。B型肝炎ワクチンの定期接種が開始された今、今後のgenotypeの分布や懸念されるワクチンエスケープ変異の増加の有無に関して全国的に調査を続ける必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. **Ito K**, Yoneda M, Sakamoto K, Mizokami M.
Virological and Clinical Characteristics of Hepatitis B Virus Genotype A.
J Gastroenterol. 2018 Jan;53(1):18-26. Review.
2. **Ito K**, Murotani K, Nakade Y, Inoue T, Nakao H, Sumida Y, Kamada Y, Yoneda M.
Serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2-binding protein levels and liver fibrosis: A meta-analysis.
J Gastroenterol Hepatol. 2017 Dec;32(12):1922-1930
3. **Ito K**, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, 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, Meshiro T, Tanuma J, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Koike K, Mizokami M; Japanese AHB and CHB Study Group.
Geographic distribution and characteristics of genotype A hepatitis B virus infection in acute and chronic hepatitis B patients in Japan.
J Gastroenterol Hepatol. 2016 Jan;31(1):180-9

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Sakamoto K, **Ito K**, Umemura T, Okumura A, Tanaka E, Yoneda M
Investigation of viral factors associated with the development of de novo hepatitis B virus infection by deep sequencing.
2017 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,
Washington DC, USA, September, 2017.
2. **Ito K**, Yotsuyanagi H, Sugiyama M, Yatsuhashi H, Karino Y, Takikawa Y, Kurosaki M, Umemura T, Toyoda H, Yoneda M, Tanaka Y, Mita E, Michitaka K, Maeshiro T
Geographic Distribution and Characteristics of Genotype A Hepatitis B Virus Infection in Acute and Chronic Hepatitis B Patients in Japan.
2017 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses,
Washington DC, USA, September, 2017.
3. **伊藤清顕**, 梅村武司, 米田政志
In vitro 感染モデルを用いた de novo B 型肝炎発症に関連するウイルス側因子の検討
第 55 回日本肝臓学会総会、パネルディスカッション、東京、2019 年 5 月
4. **伊藤清顕**, 梅村武司, 田中榮司
Deep sequencing による de novo B 型肝炎発症に関連するウイルス側因子の解析
第 25 回日本消化器関連学会週間、シンポジウム、福岡、2017 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坂本和賢、井上利恵子、鈴木小百合

ローマ字氏名：Sakamoto Kazumasa, Inoue Rieko, Suzuki Sayuri

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。