

機関番号：84409

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590776

研究課題名 (和文) HBV 持続発現小動物モデルを用いた HBV 複製機構ならびに HBV 変異誘発機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanisms for hepatitis B virus replication and mutagenesis: investigations using virus-expressing mouse system.

研究代表者

大川 和良(OHKAWA KAZUYOSHI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・肝胆膵内科・副部長

研究者番号：80432540

研究成果の概要(和文): *in vitro* ならびに *in vivo* B 型肝炎ウイルス(HBV)発現系を用いて HBV 複製機構と変異誘発機構を検討した。本研究の成果として、1) preS/S 蛋白は単一細胞内 HBV 複製に影響を与えないこと、2) インターフェロン- γ は HBV の初期排除に重要でないこと、3) B 型肝炎劇症化に関与する新規 HBV 変異を同定したこと、4) HBV キャリアの肝炎発症時に起こる HBV 変異は HBV 増殖低下をきたすこと、5) precore、preS2 変異はラミブジン耐性変異 HBV の増殖を補助すること、6) V1753、C2189 変異はアデホビルに対する治療感受性を増加させること、7) 新規核酸アナログ多剤耐性変異を同定したこと、が挙げられた。

研究成果の概要(英文): We studied hepatitis B virus (HBV) replication and mutagenesis using *in vitro* and *in vivo* HBV-expressing systems. The findings showed that 1) HBV preS/S protein may not affect HBV replication in a single HBV-infected cell, that 2) interferon- γ may not play a role on the initial eradication of HBV, that 3) the novel type of HBV mutation associated with fulminant hepatic failure was identified, that 4) HBV mutations occurring from immunotolerant phase to immunoactive phase may reduce HBV replication, that 5) precore and preS2 mutations may support replication of lamivudine-resistant HBV, that 6) V1753 and C2189 mutations may result in the improved antiviral efficacy against adefovir, and that 7) the novel HBV mutation that confer resistance to multiple nucleos(t)ide analogs was identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肝臓学、B 型肝炎、B 型肝炎ウイルス複製、B 型肝炎ウイルス変異

1. 研究開始当初の背景

B 型肝炎ウイルス(HBV)においては簡便かつ安定してウイルス生活環を再現できる *in vivo* モデルが存在せず、HBV 研究における障壁となっている。研究者らは HBV 発現プラ

ズミドを hydrodynamic 法にてヌードマウスに遺伝子導入することにより、長期間肝細胞において HBV 複製が持続することを報告した。(J Hepatol 2006; 44: 267)。このモデルでは HBV 複製中間体の供給は導入された発現プ

ラスミドではなく肝細胞内に生成された covalently closed circular HBV DNA によってなされ、HBV 生活環が長期にわたって肝細胞内において保持される。

マウス肝細胞は HBV レセプターを有しないため、このモデルでは放出されたウイルス粒子の肝細胞への再感染はない。したがって、このモデルは HBV 遺伝子導入がなされた肝細胞において、単一細胞レベルで HBV 生活環が成立する、いわゆる recycling pathway を介する HBV 複製系である。本研究では HBV 発現培養細胞系に加えて、このような HBV 持続発現マウスモデルを用いて、HBV 複製機構ならびに変異誘発機構に関して、多方面にわたる検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、前述の *in vitro* ならびに *in vivo* HBV 複製系を用いて、(1) 単一細胞内における HBV 生活環成立に寄与する各種因子の検討、(2) HBV 長期持続感染に伴って生じるウイルス変異の検討、(3) 抗 HBV 剤投与による薬剤耐性変異ウイルスに関する検討、の3項目について検討した。

3. 研究の方法

(1) 単一細胞内における HBV 生活環成立に寄与する各種因子の検討

HBV 発現マウスの系を用いて、① HBV preS/S 遺伝子の単一細胞内における HBV 生活環に与える影響、② インターフェロン (IFN)- γ の *in vivo* における HBV 複製に与える影響の2項目についての検討を行った。

(2) HBV 長期持続感染に伴って生じるウイルス変異の検討

HBV 感染患者血清からの HBV 塩基配列解析と HBV 発現培養細胞系を用いて、① B 型肝炎劇症化に関与する HBV 変異、② HBV キャリアの無症候期から肝炎期への移行における HBV 変異、の2項目についての検討を行った。

(3) 抗 HBV 剤投与による薬剤耐性変異ウイルスに関する検討、

HBV 感染患者血清からの HBV 塩基配列解析と HBV 発現培養細胞系を用いて、① ラミブジン (LAM) 耐性変異出現機序に関与する HBV 変異、② アデホビル (ADV) 治療効果に寄与する HBV 変異、③ 核酸アナログ多剤耐性変異 HBV、の3項目についての検討を行った。

4. 研究成果

(1) 単一細胞内における HBV 生活環成立に寄与する各種因子の検討

① HBV preS/S 遺伝子の単一細胞内における

HBV 生活環に与える影響

HBV 発現プラスミド pHBV1.5、preS 遺伝子産物を発現できないプラスミド pHBV1.5 Δ PS、preS/S 遺伝子産物を発現できないプラスミド pHBV1.5 Δ S をそれぞれヌードマウスに hydrodynamic 法にて遺伝子導入を行い、1ヶ月後にマウス血中の HBV DNA を測定して HBV 複製レベルの比較を行った。図1に示すとおり、pHBV1.5 を導入したマウス、pHBV1.5 Δ PS を導入したマウス、pHBV1.5 Δ S を導入したマウスの間で HBV 複製レベルには差を認めなかった。以上のことから、単一細胞内における HBV 生活環の成立にはウイルスエンベロープを構成する preS/S 遺伝子産物は必ずしも必要でなく、エンベロープを欠いた未成熟な HBV 粒子においても単一細胞内での HBV 複製は成熟 HBV 粒子と同様に可能であることが明らかとなった。

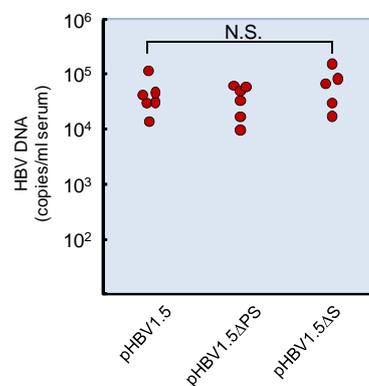


図1. HBV 発現プラスミド pHBV1.5、pHBV1.5 Δ PS、pHBV1.5 Δ S を遺伝子導入したヌードマウスにおける HBV 複製レベルの比較。

② IFN- γ の *in vivo* における HBV 複製に与える影響

hydrodynamic 法にてマウス肝に HBV 遺伝子導入を行う系における HBV 複製はヌードマウスを用いた場合数ヶ月以上保持されるが、免疫系の正常な BALB/c マウスを用いた場合約2週間で認められなくなる。本検討では BALB/c マウスと IFN- γ ノックアウト (GKO) マウスを用いて、上記の *in vivo* HBV 遺伝子導入を施行した。その結果、HBV 遺伝子導入後における肝内での HBV RNA 発現、血中 HBV DNA 量、血中 HBs 抗原量はいずれも両者に差を認めず、さらに GKO マウスにおいても BALB/c マウス同様、遺伝子導入後2週間までに HBV 発現は消失した。以上より *in vivo* における HBV 増殖には IFN- γ はあまり影響を与えず、IFN- γ は免疫機構を介した HBV の初期排除の過程において、あまり重要な役割を果たさない可能性が考えられた。

(2) HBV 長期持続感染に伴って生じるウイルス変異の検討

①B 型肝炎劇症化に関与する HBV 変異

B 型劇症肝疾患の発症に関わる HBV 変異に関してはいまだ完全には明らかになっていない。本検討では経過中に劇症化をきたし、致命的な経過をとった B 型慢性肝炎の 1 例における増悪 1 年前と増悪後の血清から HBV 株のサブクローニングを行い、ウイルス学的特徴の比較検討を行った。増悪 1 年前の HBV 株 (FEP1 株) は preS/S 遺伝子に多くの点変異と欠失変異を有し、この preS/S 遺伝子の変異は環状 2 本鎖(RC)HBV DNA 合成能の低下を引き起こしていた。一方、増悪後の HBV 株 (FEP2 株) ではこのような特徴はみられなかった (図 2)。このことより本症例では preS/S 遺伝子における高変異状態が解除され、RC HBV DNA 合成能が回復した結果、HBV 増殖能が増加し、劇症化に至ったと考えられた。本研究結果は B 型劇症肝疾患発症に関与する新規 HBV 変異を示したもので、意義深いと考えられる。

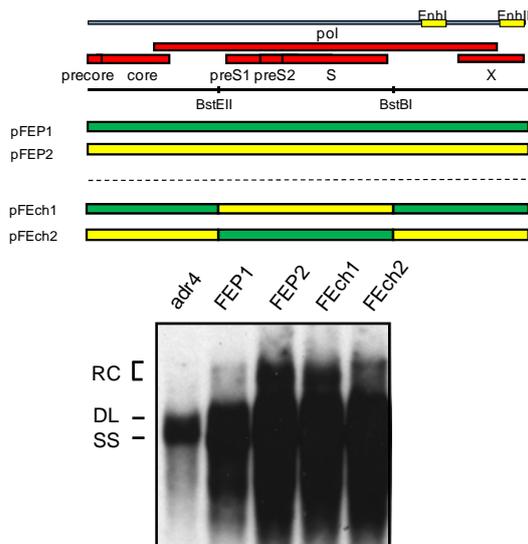


図 2. 劇症化をきたした B 型慢性肝炎症例から得られた HBV 株を培養細胞に導入した際における HBV DNA 複製レベルの検討 (Southern blot)。FEP1: 増悪 1 年前の HBV 株。FEP2: 増悪後の HBV 株。FEch1, FEch2: FEP1 と FEP2 株の chimera (上段に scheme)。

②HBV キャリアの無症候期から肝炎期への移行における HBV 変異

本検討では長期経過観察の後に活動性肝炎を発症した無症候性 HBV キャリアの 1 例から経時的に採取した血清を用いて HBV 全長の塩基配列を同定した。合計 11 カ所の点変異と 2 種類の欠失変異が検出されたが、こ

れらの変異はいずれも肝炎発症と密接に関連して出現していた。さらに図 3 に示すように、培養細胞へのウイルス遺伝子の導入実験において、肝炎発症前より発症後のウイルスにおいて有意に HBV 増殖活性の低下が認められた。以上より HBV キャリアの肝炎発症時に起こる HBV 変異はウイルス増殖低下をきたし、このことは HBV 持続感染維持のためのウイルス側の適応反応であることが示唆された。

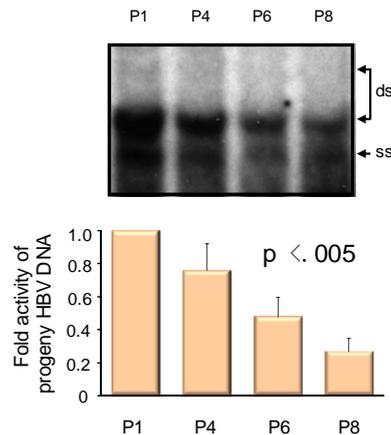


図 3. 長期経過観察の後に活動性肝炎を発症した無症候性 HBV キャリアから得られた全長 HBV を培養細胞に導入した際における HBV DNA 複製レベルの検討 (Southern blot)。P1: 活動性肝炎発症 2.7 年前。P4: 発症前 0.3 年前。P6: 発症後 0.1 年後。P8: 発症後 0.9 年後。下段はバンド強度を定量的に解析した結果。

(3) 抗 HBV 剤投与による薬剤耐性変異ウイルスに関する検討

①LAM 耐性変異出現機序に関与する HBV 変異

LAM 耐性変異 HBV は耐性責任変異である rtM204V/I 変異を有するだけでなく、変異ウイルスの複製を補助する rtL180M 変異も高率に合併する。本研究においては、LAM 耐性変異 HBV 44 株の全塩基配列を検討した。その結果 precore stop codon 変異と preS2 近位部の欠失変異を有する株では有さない株よりも有意に rtL180M 変異が低頻度であった (図 4)。in vitro HBV 増殖系を用いた検討により、これらの precore 変異と preS2 変異を有する HBV では rtL180M を有さない場合でもウイルス複製レベルが保たれていた (図 5)。以上のことより、precore 変異と preS2 変異は rtL180M 変異と同様に LAM 耐性変異 HBV の増殖に補助的に働くことが示された。

②ADV 治療効果に寄与する HBV 変異

LAM 耐性をきたし ADV 追加投与を施行し

た 30 例において治療効果に影響を与える HBV 変異の総括的スクリーニングを施行したところ、V1753 (V=not T)と C2189 変異を有する HBV 株では ADV に対する治療効果が良好な傾向が認められた (図 6)。しかしながら in vitro HBV 増殖系を用いた検討では V1753、C2189 変異ウイルスの ADV 感受性は野生株と比べて差を認めなかった。このことよりこれらの変異を有する HBV は宿主免疫反応によるウイルス排除を受けやすく、その結果アデホビル治療効果がより良好となる可能性が示唆された。

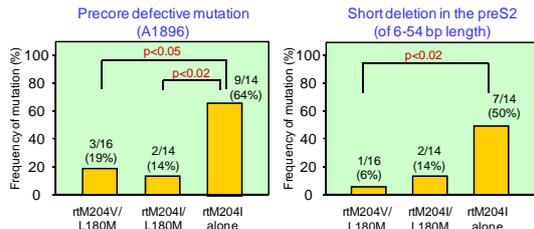


図 4. LAM 耐性変異 HBV 44 株における rtM204/L180 変異パターン別にみた precore stop codon 変異、preS2 近位部の欠失変異の出現頻度。

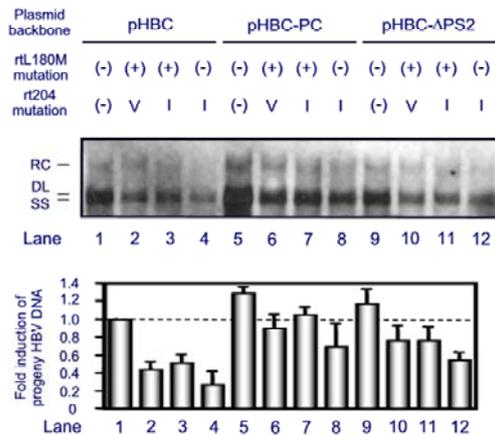


図 5. 各種変異 HBV を培養細胞に導入した際における HBV DNA 複製レベルの検討 (Southern blot)。pHBC: wild-type HBV。pHBC-PC: precore defective mutation を有する HBV。pHBC-ΔPS2: preS2 deletion を有する HBV。下段はバンド強度を定量的に解析した結果。

③核酸アナログ多剤耐性変異 HBV

HBV 治療薬として核酸アナログが広く用いられているが、耐性ウイルスの出現が大きな問題点である。本検討では LAM、ADV、エンテカビル(ETV)の 3 剤にて治療した B 型慢性肝炎症例から多剤耐性 HBV の同定を試みた。結果として本症例からは i) rtL204V/rtL180M/rtS202G 変異を有する

LAM/ETV 耐性株と ii) rtA181T 変異を有する LAM/ADV 耐性株の 2 系統の変異 HBV が同定された (図 7)。本症例では最終的に ETV、ADV 併用療法が効果的であった。今後、核酸アナログ治療の進歩に伴い複雑な多剤耐性 HBV の出現が予測されるため、本研究結果は非常に示唆に富むものと思われた。

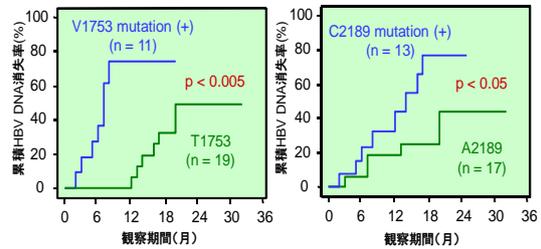


図 6. LAM 耐性をきたし ADV 追加投与を施行した B 型慢性肝炎 30 例における V1753 変異の有無、C2189 変異の有無別にみた累積 HBV DNA 消失率。



図 7. LAM、ADV、ETV の 3 剤にて治療した B 型慢性肝炎症例から得られた多剤耐性 HBV における RT 領域のアミノ酸配列。P1-P5 はそれぞれ異なる時点における血清サンプルリングポイントを示す。P2、P5 では rtA181T 変異を有する LAM/ADV 耐性株、P3、P4 では rtL204V/rtL180M/rtS202G 変異を有する LAM/ETV 耐性株が出現していた。

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 11 件)

- ① Ohkawa K, et al. Prior splenic irradiation reduces hematologic adverse events during chemotherapy in pancreatic tail cancer: a report of a patient with liver cirrhosis. Clin J Gastroenterol 2010; 3: 337-42.
- ② Kawada N, Ohkawa K, et al. Improved diagnosis of well-differentiated hepatocellular carcinoma with Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI and Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography. Hepatol Res 2010; 40: 930-6.
- ③ Ohkawa K, et al. Alterations in hepatitis B virus nucleotide sequences in a chronic virus carrier from immunotolerant to immunoactive phase. Biochem Biophys Res Commun 2010; 394: 574-80.

④Ohkawa K, et al. Fatal exacerbation of type B chronic hepatitis triggered by changes in relaxed circular viral DNA synthesis and virion secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 87-93.

⑤Kurashige N, Ohkawa K, et al. Two kinds of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternately and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir. *Antivir Ther* 2009; 14: 873-7.

⑥Kurashige N, Ohkawa K, et al. Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance. *J Gastroenterol* 2009; 44: 864-70.

⑦Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, et al. Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2009; 44: 601-7.

⑧Ohkawa K, et al. Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis. *J Med Virol* 2009; 81: 798-806.

⑨Ohkawa K, et al. Supportive role played by precore and preS2 genomic changes in the establishment of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Infect Dis* 2008; 198: 1150-8.

⑩Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, et al. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology Res* 2008; 38: 622-8.

⑪Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, et al. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology Res* 2008; 38: 450-6.

[学会発表] (計8件)

①大川和良ら. 長期経過観察を経て肝炎を発症したHBe抗原陽性無症候性HBVキャリアの1症例におけるHBV全塩基配列の経時的変化とその病態的意義についての検討. 第46回日本肝臓学会総会. 平成22年5月27日. 山形

②大川和良ら. エンテカビル治療を施行したB型慢性肝疾患症例における薬剤耐性についての検討. 第13回日本肝臓学会大会. 平成21年10月15日. 京都

③大川和良ら. 9年間の経過観察を経て肝炎を発症したHBe抗原陽性無症候性HBVキャリアの1症例における各種HBVマーカーならびにHBV全塩基配列の経時的検討. 第45回日本肝臓学会総会. 平成21年6月5日. 神戸

④倉繁奈緒, 平松直樹, 大川和良ら. ラミブジンからエンテカビルへの切替症例におけるラミブジン非耐性B型慢性肝疾患の治療成績—OLF多施設共同研究. 第45回日本肝臓学会総会. 平成21年6月4日. 神戸

⑤Ohkawa K et al. Supportive activity of precore and preS2 viral genomic changes against replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 2, 2008. San Francisco

⑥倉繁奈緒, 平松直樹, 大川和良ら. OLF参加施設におけるB型慢性肝疾患に対するエンテカビルの治療成績. 第12回日本肝臓学会大会. 平成20年10月1日. 東京

⑦倉繁奈緒, 平松直樹, 大川和良ら. OLF参加施設におけるB型慢性肝疾患に対する核酸アナログ療法の治療成績. 第44回日本肝臓学会総会. 平成20年6月6日. 松山

⑧大川和良ら. ラミブジン耐性B型肝炎ウイルス成立機転に対するprecoreならびにpreS2変異の補助的役割. 第44回日本肝臓学会総会. 平成20年6月5日. 松山

6. 研究組織

(1)研究代表者

大川 和良(OHKAWA KAZUYOSHI)
地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター (研究所)・
肝胆膵内科・副部長
研究者番号: 80432540

(2)研究分担者(2008年のみ)

巽 智秀(TATSUMI TOMOHIDE)
大阪大学大学院医学系研究科・消化器
内科学・助教
研究者番号: 20397699