

令和元年5月28日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05826

研究課題名(和文) インドネシアにおける肝疾患の早期診断治療への教育システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of the education system to the early diagnosis of the chronic liver disease in Indonesia

研究代表者

林 祥剛 (Hayashi, Yoshitake)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：50189669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アジア途上国であるインドネシアにおける慢性肝疾患、特に肝がんの現状評価を行い、肝がんやその背景となる肝炎ウイルスの疫学的な調査研究を行った。肝細胞癌例では半数以上にB型肝炎が関与しており、B型肝炎の蔓延防止が急務と考えられた。しかし学童のHBs抗原陽性率は未だ2～4%であり、B型ワクチンプログラムの問題点が明らかとなった。今回の研究では、疾患の進行に伴うウイルス変異や抗ウイルス剤使用における多様性の変化なども明らかとなった。また、伝統的治療からの創薬開発を目指すため、抗ウイルス活性を有するインドネシア固有の天然資源についても検討し、伝統的治療に対する科学的立証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じてインドネシア国の臨床医および基礎研究医とともに学術研究を行うネットワークを構築した。学術的には、同国の肝炎ウイルスの持続感染や病態に関わる宿主遺伝子およびウイルス遺伝子変異についての一因を解明した。また同国の天然資源において抗ウイルス効果を検証し、伝統的治療の科学的立証につながる研究をおこなった。社会的意義としては、同国の肝臓がんの現状と問題点の抽出を行うことができ、医療水準の向上や早期診断治療にむけた患者への啓蒙活動を行う上での基盤が形成された。

研究成果の概要(英文)：The epidemiology of chronic liver diseases and liver cancer in Indonesia was examined with collaborators in Gadjra Mada University and Airlangga University. Hepatitis B virus was involved in more than half of liver cancer, and the prevention of spread of hepatitis B was regarded as urgent issues. However, the positive prevalence of HBs antigen was still 2 to 4% among schoolchildren, and was suggested that there are remaining problems of vaccine program. In this study, the viral dynamics of quasispecies in relation to disease progression or antiviral therapy was examined and clarified. In addition, the antiviral activities of the natural resources peculiar to Indonesia were examined in vitro, and proved the efficacy from several ingredients. This result will give a scientific evidence for traditional medicine and support a development of novel antiviral drugs.

研究分野：病理学

キーワード：インドネシア 肝炎ウイルス 肝がん 早期診断

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C型肝炎ウイルスは肝がんの最大のリスク因子として知られているが、インドネシアにおける肝がんの現状は、検診システムが不十分であることや疾患に対する啓蒙不足から、多くの場合進行した状態での肝硬変肝がんで発見されることが多く、診断時には治療できないことも多い。また東南アジア諸国はB型肝炎ウイルスの蔓延国が多く、インドネシアでもキャリア率は2-10%と高率である。さらに近年では世界的な現在の飽食、肥満の増加により、脂肪肝からの肝がんも増えているが、インドネシアにおける肥満の肝がんへのリスクはあまりわかっていない。このような状況から、インドネシアにおける肝がんを減らしていくにあたり、現在診療されている肝がんの現状評価、リスクとして重要な位置づけを占めるB型肝炎ウイルスの特徴を検討することは重要なことと考えられた。またインドネシア国においては伝統的にジャムウと呼ばれるハーブ薬など古来より伝わる伝統生薬が慢性肝疾患にも用いられているが、これらの抗ウイルス活性を示す成分の解析やその作用機序はあまり調べられておらず、科学的な立証が必要とされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)インドネシア国における慢性肝疾患の臨床背景の解明 (2)病態の進行に関わる因子の分子疫学的解析 (3)インドネシア伝統的治療の科学的立証を行ったうえで、最終的に予防医療や早期診断の重要性を啓蒙するシステム構築を行うことを目的とした。本研究を通じて、インドネシア国に対しては肝臓病の進行を予防すること、日本側にとってはリスクである新興国の肝炎ウイルスの逆輸入の予防、医療産業の海外輸出を将来的な目標としていた。

3. 研究の方法

(1)インドネシア国における慢性肝疾患の疫学調査

インドネシア国での慢性肝疾患の背景を検討するため、肝炎ウイルス、脂肪肝、その他成因を含め、肝疾患の病態の疫学を調査する。

(2)病態の進行に繋がる肝炎ウイルスの分子疫学解析・薬剤耐性肝炎ウイルスの蔓延状況の調査
肝炎ウイルスはその塩基配列の違いによりいくつかの遺伝子型に分類されている。日本とは異なり、HBVでは遺伝子型B3、HCVでは遺伝子型1aの頻度が高いとされるが、病態に関わる遺伝子変異や薬剤耐性領域の解析についてはほとんどなされていない。本研究では、インドネシア特有の遺伝子型のウイルス株を用いて病態に関わる遺伝子変異や、抗ウイルス剤に対する抗ウイルス活性や薬剤耐性の問題について解析する。

(3)インドネシア国で独自に用いられている治療薬ジャムウ等の治療効果の解析

インドネシア国では伝統的にジャムウと呼ばれるハーブ薬など古来より伝わる伝統生薬が慢性肝疾患にも用いられているが、これらの抗ウイルス活性を示す成分の解析やその作用機序はあまり調べられていない。本研究では抗ウイルス治療に有望な薬用植物・天然抽出物を用いてHBVに対する抗ウイルス活性の検定・スクリーニングを行い、薬効成分の解析と同定を行う。

(4)インドネシア国におけるメタボリック症候群としてのNASHの同定と啓蒙

インドネシア国において体重過多は近年問題となりつつあるが、まだまだ脂肪性肝炎の概念は十分に浸透していない。その反面、近年の生活習慣の変化から体重過多、脂肪肝は大きな社会問題となっている。今回の研究では、インドネシア国における脂肪性肝炎の頻度やそれによる発癌の問題を疫学的に調査し、そのリスク因子を検討する。

(5)肝性脳症・細菌性腹膜炎など末期肝硬変における感染症の関与の解析

末期肝硬変に起こる細菌性腹膜炎は、インドネシアでも高頻度で起こる合併症であるが、起原菌の同定やその特徴を検討した研究は未だ無い。本研究を通じて、慢性肝疾患を悪化させる要因となる腸内細菌群や細菌性腹膜炎に関わる起原菌を分析する。

(6)予防医療・早期診断の重要性を啓蒙する医療連携とシステム構築

上記の研究テーマを踏まえて日本とインドネシアの医療連携を行い、インドネシアにおける慢性肝疾患の診断治療の問題点を抽出し、インドネシア国への啓蒙活動とともに日本側から今後診断治療薬の輸出に繋がることをめざす。

4. 研究成果

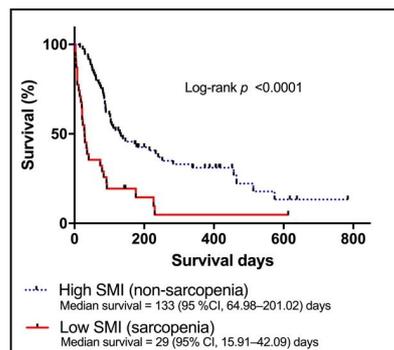
(1)インドネシア国における慢性肝疾患の疫学調査

インドネシアでは1997年にB型肝炎のユニバーサルワクチンプログラムが導入され、出生児

すべてにワクチン接種を行っている。しかしながら不完全なワクチン接種や水平感染の問題もあり、未だ小児のHBVキャリアも少なくない。今回の研究では、インドネシア各地の学童に対するHBVキャリア率を検討し、ワクチンエスケープ変異の存在などの問題点も検討した。HBs抗原陽性率は2.1~4.1%、DPT-HB3ワクチンはカバーされているものの、出生時のワクチン接種率が低いことが示唆された。HBs抗原陽性者のウイルスの11.5%にS領域の抗原決定基である決定領域に変異が認められ、少数ながらワクチンエスケープ変異も存在している可能性が示された(Purwono 2016)。

ガジャマダ大学サルジト病院との共同研究において、同病院で治療が行われた肝細胞癌100例を検討した。その結果、B型肝炎に由来した肝癌は58%と高頻度であり、アジア途上国ではやはりB型肝炎の蔓延、発癌リスクが高いことが再確認された。ほとんどの患者さんは症状出現後に検査で診断され、診断後の予後は 92 ± 8.5 日と極めて低かった。中でも筋肉量の減少(サルコペニア)がある患者はない患者に比べて有意に生存率が低く、今後の早期診断、治療介入に向けた基礎データになりうると考えられた。

(図 サルコペニア有無による肝癌患者生存率)



(2)病態の進行に繋がる肝炎ウイルスの分子疫学解析・薬剤耐性肝炎ウイルスの蔓延状況の調査

ジョクジャカルタ市のガジャマダ大学との共同研究においては、HBs抗原陰性の健常者を対照にHBs抗原陽性患者の宿主免疫を検討した。HLA-DPA1 rs3077 CTおよびTT多型は、HBs抗原陽性キャリアに比べてHBs抗原陰性かつHBc抗体陽性者に多く、HBs抗原の排除を増やし持続感染成立に抑制的な因子となりうることを示された。またHLA-DPB1 rs9277535 GAおよびAA多型については非感染者に比べてHBs抗原陽性キャリアの頻度が低く、HBV持続感染の起こりにくい因子となりうることを示された。(Wasityastuti 2016, Mardian 2017)。アジア各国からHBVとHLA抗原についての報告があるが、インドネシアにおける研究はこれまで皆無であり、今回の研究によって、インドネシア人においてもHLA-DP抗原のSNPがB型肝炎ウイルスの感染感受性やウイルス排除(潜在性感染)に関与していることが示唆された。

スラバヤ市のアイルランガ大学との共同研究では、慢性肝炎例と進行肝疾患(肝硬変肝癌)例のB型肝炎ウイルスのウイルス多様性について次世代シーケンサーを用いて解析し、進行肝疾患例ではウイルス多様性がSおよびX領域に多様性が高頻度に見られること、X領域では特にB細胞エピトープとBCP領域に頻度が高いことが示された。(Putri 2019)。次世代シーケンサーを用いたインドネシアHBV全領域の研究はこれまでなく、今回の研究により疾患の進行とウイルス変異の関連についての一端が解明されたと考えている。

次世代シーケンサーを用いた解析では、1%未満のごく少量であるが抗ウイルス剤治療前の患者検体からも薬剤耐性となりうる変異ウイルス(rtM204I)の潜在的な存在が示された。A-B interdomainにはrtH124D, rtR153Q, rtS246Cといったこれまで報告のない変異も認められたが、抗ウイルス剤使用後は薬剤感受性の高いウイルスは早期に排除され、ウイルスの多様性は低下していた(Wasityastuti 2016)。今回の研究により、抗ウイルス治療前の患者検体にも、薬剤耐性の可能性のあるウイルスが潜在的に存在することが改めて示された。

カリマンタン島では赤十字社とも共同研究を行い、B型肝炎ウイルスキャリアと慢性肝炎患者のウイルスについて検討した。その結果、ウイルスキャリアの97.8%、慢性肝炎患者85.4%が遺伝子型Bであること、X領域のC1505A変異やBCP領域のT1753V、A1762T/G1764A変異は進行した肝疾患患者のみに認められる変異であることを報告した(Wahyuni 2019)。カリマンタン島からのHBV患者を対象としたウイルス変異の検討は今回が初めてである。

(3)インドネシア国で独自に用いられている治療薬ジャムウ等の治療効果の解析

インドネシアに自生する薬用植物からのB型肝炎に対する抗ウイルス物質の探索についての研究では、HBV初期感染時と、侵入・感染後の過程への影響を評価する系で検討を行なった。植物粗抽出エキスは、異なる部位を含む46種の薬草からメタノール抽出により調製した。HBV初期感染過程への影響については、100 µg/ml粗エキス存在下でHBVを感染させたHepG2-NTCP細胞からのHBs抗原産生量をELISAにて測定し、*Cassia fistula*(47%)、*Melastoma malabathricum*(60%)と*Cananga odorata*(42%)に中程度の感染阻害活性が見られた。HBV感染後期過程への影響については、HepAD38.2細胞を粗エキスを含む培地で12日間培養し上清中のHBV-DNAゲノム量の定量を行い、*C. odorata*に最も強い抗HBV活性が見られた(IC50: 56.5 µg/ml)。*C. odorata*は、現地でマラリア、喘息、痛風、肺炎、糖尿病、リュウマチ、炎症などの治療で伝統生薬として用いられている。また、*C. odorata*の樹皮や葉からの抽出物には、これまで抗細菌や抗真菌活性が報告されているが、今回の抗ウイルス活性は初めての報告である。今回の研究により、*C. odorata*は、新規抗HBV治療薬の開発に向けた候補物となることが示唆

された。

(4)インドネシア国におけるメタボリック症候群としての NASH の同定と啓蒙

今回検討された肝細胞癌において、肝炎ウイルスによらない肝発癌は 34%に認められた。これらの症例の背景因子については今後検討予定であるが、今回の研究においてインドネシア国においても非ウイルス発癌が比較的高頻度に認められることが明らかとなった。

インドネシア国の多くの国民はイスラム教徒であり、飲酒はほとんどしないことから、非ウイルス発癌の多くは NASH によるものと考えられる。継続的な症例の集積やそのリスク因子の検討については、現在も継続中である。

(5)肝性脳症・細菌性腹膜炎など末期肝硬変における感染症の関与の解析

ガジャマダ大学微生物学教室の Tri Wibawa 教授とともに、細菌性感染症についての共同研究を進めた。現在も継続中であり、今後具体的な解析を行っていく予定としている。

(6)予防医療・早期診断の重要性を啓蒙する医療連携とシステム構築

研究協力者であるアイルランガ大学熱帯病研究所 Maria Lusida 教授、ガジャマダ大学サルジト病院 Neneng Ratnasari 消化器内科部長とともに今回の研究内容を共有し、特に肝細胞癌の診断治療については、早期診断の重要性を再認識した。ガジャマダ大学放射線科 Lina Cholida 教授とは、診断技術の確立、CT/MRI 検査といった機器導入についての討議を行い、今後若手臨床医を教育するうえでの日本への短期研修プログラムの作成といった国際交流共同研究についても継続的に行っていくことを確約した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)すべて査読あり

1. Putri WA, Yano Y, Yamani LN, Liang Y, Mardian Y, Utsumi T, Soetjipto, Lusida MI, Hayashi Y. Association between quasispecies variants of hepatitis B virus, as detected by high throughput sequencing, and progression of advanced liver disease in Indonesian patient. *Molecular Medicine Reports*, in press.
2. Putri WA, Yano Y, Yamani LN, Lusida MI, Soetjipto, Liang Yujiao, Mardian Y, Wasityastuti W, Hayashi Y. Association between HBX variations and development of severe liver disease among Indonesian patients. *Kobe J Med Sci*. in press.
3. Wahyuni RM, Utsumi T, Juniastuti, Yano Y, Murti IS, Amin M, Yamani LN, Istimagfiroh A, Purwono PB, Soetjipto, Lusida MI, Hayashi Y. Analysis of hepatitis B virus genotype and gene mutation in patients with advanced liver disease in East Kalimantan, Indonesia. *Biochemical Reports*. 2019, 303-310. doi: 10.3892/br.2019.1202
4. Hatazawa Y, Yano Y, Okada R, Tanahashi T, Hayashi H, Hirano H, Minami A, Kawano Y, Tanaka M, Fukumoto T, Murakami Y, Yoshida M, Hayashi Y. Quasispecies variant of pre-S/S gene in HBV-related hepatocellular carcinoma with HBs antigen positive and occult infection. *Infect Agent Cancer*. 2018;13:7. doi: 10.1186/s13027-018-0179-4. eCollection 2018.
5. Liang Y, Yano Y, Putri WA, Mardian Y, Okada R, Tanahashi T, Murakami Y, Hayashi Y. Early changes in quasispecies variant after antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Mol Med Rep*. 2018 Apr;17(4):5528-5537. doi: 10.3892/mmr.2018.8551.
6. Yamani LN, Yano Y, Utsumi T, Wasityastuti W, Rinonce HT, Widasari DI, Juniastuti, Lusida MI, Soetjipto, Hayashi Y. Profile of Mutations in the Reverse Transcriptase and Overlapping Surface Genes of Hepatitis B Virus (HBV) in Treatment-Naïve Indonesian HBV Carriers. *Jpn J Infect Dis*. 2017;70(6):647-655. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.078.
7. Ratnasari N, Nurdjanah S, Sadewa AH, Hakimi M, Yano Y. Difference of polymorphism VEGF-gene rs699947 in Indonesian chronic liver disease population. *PLoS One*. 2017 Aug 24;12(8):e0183503. doi: 10.1371/journal.pone.0183503. eCollection 2017.
8. Chen M, Aoki-Utsubo C, Kameoka M, Deng L, Terada Y, Kamitani W, Sato K, Koyanagi Y, Hijikata M, Shindo K, Noda T, Kohara M, Hotta H. Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A₂ targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci Rep*. 2017;7(1):15931. doi: 10.1038/s41598-017-16130-w.
9. Mardian Y, Yano Y, Wasityastuti W, Ratnasari N, Liang Y, Putri WA, Triyono T, Hayashi Y. Genetic polymorphisms of HLA-DP and isolated anti-HBc are important subsets of

- occult hepatitis B infection in Indonesian blood donors: a case-control study. *Virology*. 2017 Oct 23;14(1):201. doi: 10.1186/s12985-017-0865-7.
10. Utsumi T, Pranawa, Lusida MI, Yano Y, Wahyuni RM, Istimagfiroh A, Amin M, Rinonce HT, Juniastuti, Wardana A, Tjempakasari A, Basuki W, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Prevalence and risk factors of hepatitis B and C virus infections among hemodialysis patients from private hemodialysis units in Surabaya, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2016 Sep;47(5):927-34.
 11. Wasityastuti W, Yano Y, Widasari DI, Yamani LN, Ratnasari N, Heriyanto DS, Okada R, Tanahashi T, Murakami Y, Azuma T, Hayashi Y. Different Variants in Reverse Transcriptase Domain Determined by Ultra-deep Sequencing in Treatment-naïve and Treated Indonesian Patients Infected with Hepatitis B Virus. *Kobe J Med Sci*. 2016 Jun 16;62(1):E1-8.
 12. Purwono PB, Juniastuti, Amin M, Bramanthi R, Nursidah, Resi EM, Wahyuni RM, Yano Y, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y, Utsumi T, Lusida MI. Hepatitis B Virus Infection in Indonesia 15 Years After Adoption of a Universal Infant Vaccination Program: Possible Impacts of Low Birth Dose Coverage and a Vaccine-Escape Mutant. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Sep 7;95(3):674-9. doi: 10.4269/ajtmh.15-0121.
 13. Wasityastuti W, Yano Y, Ratnasari N, Triyono T, Triwikatmani C, Indrarti F, Heriyanto DS, Yamani LN, Liang Y, Utsumi T, Hayashi Y. Protective effects of HLA-DPA1/DPB1 variants against Hepatitis B virus infection in an Indonesian population. *Infect Genet Evol*. 2016 Jul;41:177-184. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.034.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Puguh Indrasetiawan; A crude extract from *Cananga odorata* exhibits antiviral activity against hepatitis B virus, 日本薬学会第 139 年会
2. 靱 千恵; Methyl-pheophorbide A による C 型肝炎ウイルス感染性粒子形成阻害機構の解析, 日本薬学会第 139 年会
3. Putri W Aristyaning; Profile of HBx variation in relation to HCC development among Indonesian patients, The 25th APASL Single Topic Conference on HCC Yokohama
4. 畑澤 友里; A Comparison of Quasispecies Variant of Pre-S/S Gene in HBV-related HCC with HBs Antigen Positive and Occult Infection, The 25th APASL Single Topic Conference on HCC Yokohama
5. Mardian Yan; Reduced muscle (radio) density and Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging are independently survival prognostic of Indonesia hepatocellular carcinoma (HCC) patients. *International Digestive Disease Forum (IDDF) 2018*
6. 矢野 嘉彦; 進行肝疾患における HBV ウイルス多様性の変化 - インドネシア人の次世代シーケンサーを用いた解析から, 第 54 回日本肝臓学会総会
7. 矢野 嘉彦; B 型慢性肝炎における X 領域の多様性が病態の進行に關与する - インドネシア国における解析から, 第 53 回日本肝臓学会総会
8. 靱 千恵; Chlorophyll-breakdown product, methyl-pheophorbide A inhibits hepatitis C virus infection by suppressing virion assembly, 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2017 年 10 月 28 日 ~ 10 月 30 日, 大阪
9. Wahyu Aristyaning Putri; Quasispecies variant of HBV X region detected by Next Generation Sequencing related to progression Advanced Liver Disease among Indonesian Patients, アジア太平洋肝臓学会 (APASL) 2017 年 02 月 18 日 ~ 2017 年 02 月 18 日 上海
10. Yan Mardian; Single-Nucleotide Polymorphism in HLA DPA1 Gene Associates with Occult Hepatitis B Infection (OBI) in Indonesian Blood Donors, APASL STC 2016, 2016 年 12 月 17 日 ~ 2016 年 12 月 17 日 北京
11. Wahyu Aristyaning Putri; Quasispecies variant of HBV X region detected by Deep Sequencing related to progression Advanced Liver Disease in Indonesian Patients, APASL STC 2016, 2016 年 12 月 17 日 ~ 2016 年 12 月 17 日 北京
12. 矢野 嘉彦; インドネシアにおける B 型肝炎ウイルス感染に關連する宿主因子の検討, 第 20 回日本肝臓学会大会, 2016 年 11 月 03 日 ~ 2016 年 11 月 03 日, 神戸

〔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

研究分担者氏名：矢野 嘉彦
ローマ字氏名：YANO, Yoshihiko
所属研究機関名：神戸大学
部局名：医学研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：60419489

研究分担者氏名：鞠 千恵
ローマ字氏名：UTSUBO, Chie
所属研究機関名：神戸大学
部局名：保健学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：50570834

研究分担者氏名：亀岡 正典
ローマ字氏名：KAMEOKA, Masanori
所属研究機関名：神戸大学
部局名：保健学究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：60281838

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：LUSIDA, Maria Inge

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：RATNASARI, Neneng

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：MUHAMMAD, Hanafi

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。