

令和元年6月8日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09379

研究課題名(和文) 内因性免疫によるB型肝炎ウイルス多様性メカニズムの解析と根治的治療への応用

研究課題名(英文) Diversity of viral genome mutations during clinical feature of hepatitis B virus infection

研究代表者

渡邊 綱正 (Watanabe, Tsunamasa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：20338528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：内因性自然免疫が関与する抗B型肝炎ウイルス(HBV)作用を検討し、HBV関連肝細胞癌(HCC)のサロゲートマーカー探索を検討した。急性肝炎(20例)を短いintervalで採血し、次世代シーケンサーによる経時的なHBV DNA多様性の検討を進めたが、Genotype特異的なPrimer設計に難渋した。そこで、HBVゲノム変異によるHCCへの関与(HCC有；89例、HCC無；356例)を検討した。HBs抗原低値かつHBコア関連抗原高値がHCC高リスク群であることを見出した。HBs抗原をコードするpreS/S領域の変異によるがん形成の可能性や、宿主ゲノムへの組み込みの可能性などが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の治療戦略では、B型肝炎ウイルス(HBV)根絶に不可欠なcccDNAを制御することはできず、HBV関連肝細胞癌(HCC)発症も制御できず、HCC早期発見の手段も限定的である。本研究は、細胞内におけるHBVゲノム変異ないし組み換えに着目した治療戦略の可能性を模索し、その結果としてHBs抗原タンパクの変異がHCC発症と関連する可能性を見出した。従来から提唱されていたHCCリスク集団とは異なり、新たなHCCリスクのサロゲートマーカーに繋がる可能性があり、社会的意義は大きく、さらに宿主ゲノムへのHBVインテグレーション解析の重要性が再認識されたことから、学術的意義も高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Nucleot(s)ide analogues therapy cannot completely eliminate and inhibit the development of hepatocellular carcinoma (HCC). We investigated diversity of viral genome mutations during clinical feature of hepatitis B virus infection. A total of 20 acute hepatitis B (AH-B) cases were collected. For applying next-generation sequencing platform, we prepared pan-genotypic primers and have been working. Next, we investigated the presence of viral genome mutations representing important predictive markers for HCC in patients with chronic HBV infection. In the cross-sectional analysis, 445 patients were divided according to HCC history and the influence of the viral protein markers. Patients with a history of HCC were found frequently in the low HBsAg group and high HBcrAg group, indicating that preS/S mutants could cause an imbalance of surface protein synthesis resulting in intracellular accumulation and extracellular decrease of HBsAg proteins, and leading to hepatocyte carcinogenesis.

研究分野：肝臓病

キーワード：B型肝炎ウイルス ウイルス遺伝子変異 急性肝炎 肝細胞癌

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) 感染者数は全世界で4億2千万人、さらに死亡者数は年間約50万人以上といわれ、HIV、HCVと並び世界的に重要な感染症の一つである。現在、B型肝炎ウイルス (HBV) に対して核酸アナログ製剤が主に使用されるが、HBV根絶に不可欠なHBV産生の鋳型であるcccDNAを制御することはできず、新たな治療戦略が喫緊の最重要課題である。また、HBV関連肝細胞癌 (HCC) 発症のメカニズムも明らかではなく、HBV感染者に対しては嚴重なモニタリングしか早期発見の手段がない。したがって、HCCスクリーニングのサロゲートマーカー探索も重要な課題である。

HBV同様に逆転写酵素依存性のウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) はウイルスゲノムの組み換えを起こすことが知られるが、そのメカニズムはHIV粒子内に2本存在するゲノムRNAの逆転写時に起こる組み換えによるとされる。一方、HBVはウイルス粒子内のゲノムDNAは1本であり、さらに感染後HBVゲノムは核内でヒストンと結合したミニ染色体といわれるcccDNAとして長期にわたり安定的に存在すると云われている。したがって、HBVゲノムの組み換えは非常に稀であると予測されるが、本邦に蔓延する遺伝子型BjのHBVゲノムはアジアに蔓延する遺伝子型Baと遺伝子型Cの組み換えであることが分子系統樹解析から明らかとなっている。したがって、HBVでもウイルスゲノム組み換えやウイルス遺伝子変異が積極的に生じるメカニズムが存在し、病態と関連している可能性を考えた。

### 2. 研究の目的

臨床サンプルを集積してHBVゲノム変異の出現形態を解析し、ウイルス変異誘導メカニズムを治療に応用すること、あるいはゲノム変異によるウイルス蛋白の変化を検出することによるHCCを含めた病態進展サロゲートマーカーへの応用を検討し、新たなHBV治療モニタリング戦略を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

初代ヒト肝細胞の長期培養系の開発により、HBVウイルス生活環を詳細に解析することが可能となり (Watanabe et al, PLoS One 2015) 持続感染するHBVの解析が可能となった。当研究では、臨床サンプルを収集し、持続感染ないし急性感染時のウイルスゲノム変異を探索し、病態との関連性を検討した。次世代シーケンサーによる経時的なHBVDNA多様性の検討を行うため、全遺伝子型HBVに対してPCRが可能なPrimer設計を行った。さらに、HBV関連HCCとウイルス変異の関連を明らかにするために、既に報告のあるHBs抗原のエピトープ領域であるA-determineの遺伝子変異の関連性に着目し、HCC既往者とHCC非罹患患者における血清ウイルスマーカーの差異を検討し、HCCのサロゲートマーカー探索を行った。

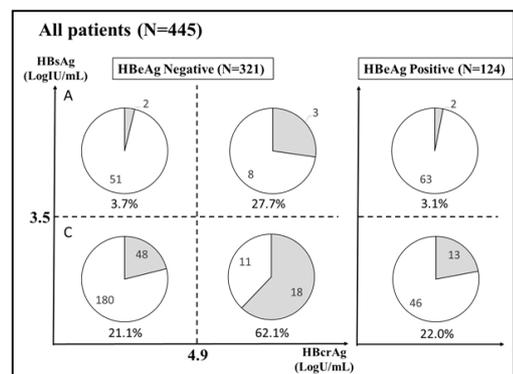
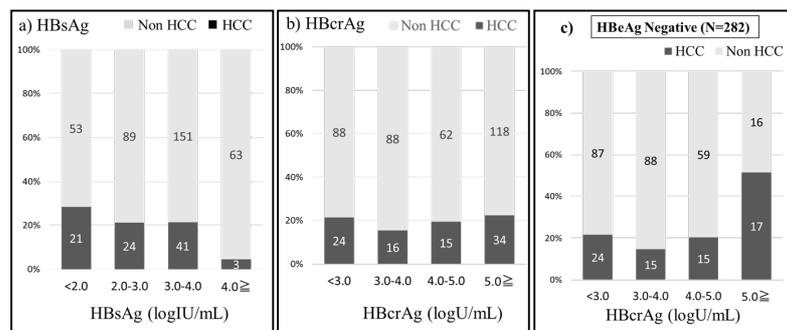
### 4. 研究成果

HBV感染増殖期である急性肝炎初期血清を短いintervalで採取し、持続感染状態における慢性肝炎のウイルス配列変異率と比較することを試みた。B型急性肝炎症例は増加傾向であったが2004年をピークに2010年までほぼ横ばいで推移し、以降は減少に転じ、2015年以降の

当研究で収集することができたB型急性肝炎症例は3年間で20例であった。これまでの報告では、2002年からHBV遺伝子型Aの割合が増加し、約70%を占めることが報告されていたが、今回の対象となった20名のB型急性肝炎患者のHBV遺伝子型は、Aが13例、Bが2例、Cが5例、

であった。次に、次世代シーケンサーによる経時的なHBVDNA多様性の検討を進めたが、遺伝子型の異なるHBVに対してPCR効率が異なることからgenotype特異的なPrimer設計に難渋した。

そこで、HBVゲノム変異によるHCCへの関連性を検討した。HBV関連HCCの治療歴を有する89例とHCC治療歴のない356例を対象とし、各種ウイルス蛋白量とHCC発症率の関連性を検討した。結果、HBs抗原高力価よりむしろHBs抗原低力価で発症例が多く、さらにHBs抗原低値かつHBコア関連抗原高値がHBV関連HCCの高リスク群であることを見出した。HBコア関連抗原量が高値でウイルス複製能力が高いにも関わらず血中HBs抗原低力価となるケースでは、HBs抗原をコードするpreS/S領域のウイルス変異により細胞内小胞体



へのウイルス蛋白蓄積を経て ER ストレス依存性に肝臓がん形成に至る可能性や、宿主ゲノムへのインテグレーションの可能性などが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. 山田 典栄, 平石 哲也, 小林 稔, 池田 裕喜, 渡邊 綱正, 奥瀬 千晃, 今井 康晴, 四柳 宏, 加藤 孝宣, 鈴木 通博, 安田 清美. 首都圏におけるB型急性肝炎の変遷: Genotype Aの急増から10年を経て. 肝臓. 査読有. 2019 年 60 巻 5 号 139-146
2. Shigefuku R, Watanabe T\*, Mizukami T, Matsunaga K, Hattori N, Ehira T, Suzuki T, Nakano H, Sato Y, Matsuo Y, Nakahara K, Ikeda H, Matsumoto N, Tsuda T, Katayama M, Koizumi S, Okuse C, Suzuki M, Otsubo T, Nakajima TE, Yasuda H, Itoh F. (\*corresponding author) Esophagogastric varices were diagnosed in a non-cirrhotic liver case during long-term follow-up after oxaliplatin-based chemotherapy. Clin J Gastroenterol. 査読有. 2018; 11(6):487-492. doi: 10.1007/s12328-018-0873-1.
3. 奥瀬 千晃, 平石 哲也, 石井 俊哉, 森田 望, 末谷 敬吾, 石郷岡 晋也, 池田 裕喜, 渡邊 綱正, 松永 光太郎, 松本 伸行, 高橋 秀明, 四柳 宏, 伊東 文生, 鈴木 通博. 先行する核酸アナログ製剤からテノホビルへの変更が HBs 抗原量に及ぼす影響. 肝臓 58 巻 6 号 354-356 (2017) 査読有.
4. 薩田 祐輔, 平石 哲也, 奥瀬 千晃, 鈴木 達也, 森田 望, 末谷 敬吾, 中野 弘康, 石郷岡 晋也, 石井 俊哉, 高橋 秀明, 池田 裕喜, 渡邊 綱正, 松永 光太郎, 松本 伸行, 四柳 宏, 伊東 文生, 鈴木 通博. アメーバ性大腸炎に続発したB型急性肝炎の1例. 肝臓 58 巻 11 号 626-631 (2017) 査読有.
5. Watanabe T\*, Shigefuku R\*, Kanno Y, Ikeda H, Nakano H, Hattori N, Matsunaga K, Matsumoto N, Kanno SI, Noshio K, Hachiya A, Iwatani Y, Matsumori T, Tsukikawa S, Makizumi R, Otsubo T, Yamamoto H, Itoh F. (\*equal contributors) Fusobacterium nucleatum detected simultaneously in a pyogenic liver abscess and advanced sigmoid colon cancer. Anaerobe. 査読有. 2017;16;48:144-146. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.08.010.
6. Shimizu H, Matsui K, Iwabuchi S, Fujikawa T, Nagata M, Takatsuka K, Tanemura H, Nakazaki H, Nakano M, Watanabe T. Relationship of hepatitis B virus infection to the recurrence of hepatocellular carcinoma after direct acting antivirals. Indian J Gastroenterol. 査読有. 2017;36(3):235-238.
7. Kiyokawa H, Yasuda H, Oikawa R, Okuse C, Matsumoto N, Ikeda H, Watanabe T, Yamamoto H, Itoh F, Otsubo T, Yoshimura T, Yoshida E, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M. Serum monomeric laminin- $\gamma$ 2 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 査読有. 2017;108(7):1432-1439, doi: 10.1111/cas.13261.
8. Michikawa Y, Ikeda H, Okuse C, Okano M, Shigefuku R, Hattori N, Hatsugai M, Takahashi H, Matsunaga K, Watanabe T, Matsumoto N, Yotsuyanagi H, Suzuki M, Itoh F. Development of de novo hepatitis B in patient during follow-up of liver-graft-versus-host disease associated with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Case Rep Inter Med. 3; 16-20, 2016. 査読有.
9. Watanabe T\*, Tsuzuki Y\*, Iio E, Fujisaki S, Ibe S, Kani S, Hamada-Tsutsumi S, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W, Okuse C, Okumura A, Sato Y, Tanaka Y. (\*equal contributors) Virological characteristics of hepatitis B genotype G/A2 recombination virus in Japan. Hepatol Res. 46:775-83, 2016. 査読有.
10. 林 佐奈衣, 高松 悠樹, 前田 賢次, 村上 周子, 尾曲 克己, 松居 剛志, 五十川 正記, 渡邊 綱正, 狩野 吉康, 向後 悟, 満屋 裕明, 田中 靖人. 新規核酸アナログ 4'-C-cyano-2'-amino-2'-deoxyadenosine, 4'-C-cyano-2'-deoxyguanosine は薬剤耐性 B 型肝炎ウイルス変異株に対して有効である. 肝臓 57 巻 6 号 299-301 (2016). 査読有.
11. 重見 麗, 蜂谷 敦子, 松田 昌和, 岡崎 玲子, 小川 慎太郎, 伊藤 恭子, 健山 正男, 今村 顕史, 柳澤 邦雄, 矢野 邦夫, 藤井 輝久, 上田 敦久, 今村 淳治, 渡邊 綱正, 田中 靖人, 横幕 能行, 杉浦 互, 岩谷 靖雅. HIV-1 感染急性期におけるサイトカインのプロファイル解析. 日本エイズ学会誌 18 巻 154-162 (2016). 査読有.

### 〔学会発表〕(計 15 件)

1. 重福隆太, 渡邊綱正, 服部伸洋, 池田裕喜, 松永光太郎, 松本伸行, 鈴木通博, 伊東文生. アルコールおよび NASH 肝硬変症例における門脈に流入する細菌叢の次世代シーケンズ解析. 第 37 回アルコール医学生物学研究会学術集会. 2018.
2. 服部伸洋, 渡邊綱正, 近江亮介, 重福隆太, 池田裕喜, 松永光太郎, 松本伸行, 内藤貴基, 平 泰彦, 伊東文生. 鉄中毒による急性肝不全の 1 例. 第 44 回日本急性肝不全研究会. 2018.
3. Matsumoto Nobuyuki, Hattori Nobuhiro, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Watanabe Tsunamasa, Suzuki Michihiro, Itoh Fumio. Strict Recognition of EOB By the Hepatocyte Specific OATP Transporters. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2018). 2018.
4. 重福隆太, 高橋秀明, 中野弘康, 服部伸洋, 池田裕喜, 渡邊綱正, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 伊東文生, 鈴木通博. 門脈圧亢進症を有する肝硬変および非肝硬変症例の ICG 停滞率と肝血行動態の比較検討. 第 24 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2017.
5. 渡邊綱正, 茶山一彰, 熊田博光. Efficacy and Safety of Glecaprevir/Pibrentasvir in Japanese Patients with Genotype 3 HCV, Prior DAA Experience or Severe Renal Impairment. 第 53 回日本肝臓学会総会, 2017.
6. 重福隆太, 高橋秀明, 中野弘康, 服部伸洋, 池田裕喜, 渡邊綱正, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 佐瀬茂, 伊東文生, 鈴木通博. アルコール性肝硬変における内視鏡的食道静脈瘤硬化療法前後の血行動態の変化 ~ C 型肝硬変との比較 ~. 第 36 回 アルコール医学生

- 物学研究会 (JASBRA) 学術集会, 2017
7. 高橋秀明, 重福隆太, 中野弘康, 服部伸洋, 池田裕喜, 渡邊綱正, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 佐瀬 茂, 伊東文生, 鈴木通博. 脂肪性肝疾患と肝機能, 肝血流-C型慢性肝疾患との比較も含めて-. 第36回アルコール医学生物学研究会学術集会, 2017
  8. 重福隆太, 高橋秀明, 中野弘康, 田村知大, 平石哲也, 野口陽平, 公文大輔, 服部伸洋, 池田裕喜, 渡邊綱正, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 佐瀬 茂, 伊東文生, 鈴木通博. アルコール性肝硬変における内視鏡的食道静脈瘤硬化療法前後の血行動態の変化-C型肝硬変との比較-. 第36回アルコール医学生物学研究会学術集会, 2017
  9. 重福隆太, 渡邊綱正, 中野弘康, 服部伸洋, 池田裕喜, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 鈴木通博, 伊東文生. オキサリプラチンによる食道胃静脈瘤形成予測には血小板数と脾臓径の推移が有用である. 第53回日本肝臓学会総会, 2017
  10. Hattori Nobuhiro, Shigefuku Ryuta, Watanabe Tsunamasa, Matsumoto Nobuyuki, Nakano Hiroyasu, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Okuse Chiaki, Suzuki Michihiro, Itoh Fumio. The characterization of esophagogastric varices associated with oxaliplatin administration. The annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) The International Liver Congress 2017, 2017.
  11. 中野弘康, 松永光太郎, 重福隆太, 服部伸洋, 池田裕喜, 渡邊綱正, 松本伸行, 佐瀬 茂, 伊東文生. 集学的治療により肝予備能の改善を得た B 型肝硬変の 1 例. 第 23 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2016.
  12. 菅野優樹, 重福隆太, 渡邊綱正, 中野弘康, 池田裕喜, 白勢大門, 服部伸洋, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 鈴木通博, 伊東文生. S 状結腸癌が細菌の侵入経路と考えられた *Fusobacterium nucleatum* による化膿性肝膿瘍の 1 例. 第 339 回 日本消化器病学会 関東支部例会 (2016)
  13. 重福隆太, 中野弘康, 路川陽介, 服部伸洋, 池田裕喜, 高橋秀明, 渡邊綱正, 松永光太郎, 松本伸行, 奥瀬千晃, 鈴木通博, 伊東文生. *Fusobacterium* による化膿性肝膿瘍の 5 症例の臨床的特徴. 第 102 回 日本消化器病学会 総会 (2016)
  14. 渡邊綱正, 山田典栄, 奥瀬千晃, 池田裕喜, 松本伸行, 中野弘康, 平石哲也, 重福隆太, 服部伸洋, 松永光太郎, 小林 稔, 安田清美, 四柳 宏, 鈴木通博, 伊東文生. HBs 抗原消失を目標とした治療法の試み ~ 肝炎応答と HBs 抗原減少の関連 ~. 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016.
  15. Shigefuku Ryuta, Takahashi Hideaki, Nakano Hiroyasu, Hattori Nobuhiro, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Watanabe Tsunamasa, Matsumoto Nobuyuki, Okuse Chiaki, Sase Shigeru, Itoh Fumio, Suzuki Michihiro. Hepatic hemodynamics and liver function before and after endoscopic injection sclerotherapy. The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 ; なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

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。