

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590763

研究課題名（和文） B型肝炎ウイルススプライシングバリエーションによる慢性肝炎の制御

研究課題名（英文） Control of chronic hepatitis by splicing variant of hepatitis B virus

研究代表者

四柳 宏 (YOTSUYANAGI HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院 准教授

研究者番号：30251234

研究成果の概要（和文）：

1. 肝炎沈静化における HBV コア遺伝子のアミノ酸配列に関して検討した。その結果、(1) Basic Core Promoter 領域の変異 (nt. 1762) が少ないほど肝炎は沈静化しやすい。(2) 肝炎が沈静化しやすい症例でコア遺伝子のアミノ酸置換数がより多い。点が明らかになった。

2. HBV Splicing Variant に関しては、得られたクローンの詳細な解析を行った。core 領域末端から PreS 領域全体および S 領域の一部まで (nt. 2448～488) (nt. 2448～2934, 3019～488) の deletion、core 領域内 (nt. 2088～2349) に deletion を有するクローン (2.1kb 長) が splicing variant の主体であったが、この他に 6 種類の Splicing Variant が存在した。このうち 3 種類はコア領域のアミノ酸の大きな欠失 (67AA, 87AA) を伴っていた。

研究成果の概要（英文）：

1. Nucleic or amino acid substitutions in the core gene of hepatitis B virus (HBV) core region were studied. (1) Smaller number of nucleic acid substitutions in the basic core promoter region was associated with inactivation of hepatitis. (2) Larger number of substituted amino acid in the core region was associated with inactivation of hepatitis.
2. The amino acid sequences of HBV splicing variant clones were analyzed. The majority of HBV clones had deletions spanning from end of core to preS-s regions (nt. 2448～2934, 3019～488). Six splicing patterns were found in the clones, three of which had large deletion (67AA, 87AA) in the core region.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：肝臓病学

キーワード：HBV コア遺伝子 Splicing Variant アミノ酸置換

1. 研究開始当初の背景

日本に 200 万人弱いると推定される B 型肝炎ウイルス (以下 HBV) キャリアは、幼少期は HBe 抗原陽性・肝機能正常の無症候性キャリアであるが、成人期になると肝炎を発症してくることが知られている。そのメカニズムは不明である。また、B 型慢性肝炎患者の多くが肝炎の時期を経た後 HBe 抗体陽性・肝機能正常の無症候性キャリアに移行することが知られているが、このメカニズムも不明である。B 型肝炎ウイルスキャリアの 5% が最終的には肝硬変に至るが、肝炎の持続期間と程度で最終転帰が決定することを考えると、肝炎の発症・沈静化のメカニズムを知ることが本疾病の制御・治療上極めて重要なことである。

肝炎の発症・沈静化の機序を考える上で最も重要なのはウイルス側要因である。これまで B 型肝炎の臨床経過に影響を及ぼすウイルス学的要因として、HBV ゲノタイプ、HBV 遺伝子変異 (主としてプレコア領域 1896 番目の塩基変異・コアプロモーター領域 1762/1764 番目の塩基変異) が検討されてきた。また、コア領域の特定部位のアミノ酸変異が、肝炎の沈静化に重要であるということもわかってきている。

しかし、これまでの研究のほとんどは HBV ゲノムの一部を PCR で増幅後ダイレクトシーケンシングを行った結果を解析したものであり、ゲノムの構造全体を明らかにしていない。また、研究のほとんどは Cross Sectional Study であり、肝炎の発症・進展とともにどのような変化が起きるのかが検討されていない。これでは肝炎の発症・沈静化のメカニズムを知るには不十分である。

我々は B 型肝炎の発症時に HBV ゲノムに起きている変化を知る目的で、HBe 抗原陽性無症候性キャリア 4 名と HBe 抗原陽性慢性肝炎症例 5 名の血清から HBV 全長遺伝子の増幅及びサブクローニングを行い、10 個以上のクローンを各サンプルから得て、HBV の遺伝子構造を検討した。その結果、3.2kb 長のウイルスゲノムの他に、core 領域末端から PreS 領域全体および S 領域の一部まで (nt. 2448~488) (nt. 2448~2934, 3019~488) の deletion、core 領域内 (nt. 2088~2349) に deletion を有するクローン (2.1kb 長) が存在することを確認した。

2.1kb 長の Splicing Variant が肝炎の発症・沈静化において大きな役割を果たしていることを示唆するものである。

2. 研究の目的

2.1kb 長の Splicing Variant が肝炎の発症・沈静化において果たす役割を検討することである。

3. 研究の方法

(1) HBe 抗原陽性無症候性キャリアと HBe 抗原陽性慢性肝炎症例とから HBV 全長遺伝子の増幅及びサブクローニングを行い、HBV の遺伝子構造を検討する。

(2) これらのクローンの占める割合が病態毎や臨床経過により、異なるかどうかの検討を行う。

(3) Splicing Variant の増殖能及び HBV 関連蛋白の産生能を検討し、この Variant の臨床的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 肝炎沈静化における HBV コア遺伝子のアミノ酸配列に関して検討した。その結果、(1) Basic Core Promoter 領域の変異 (nt. 1762) が少ないほど肝炎は沈静化しやすい。(2) 肝炎が沈静化しやすい症例でコア遺伝子のアミノ酸置換数がより多い。(3) CD4 epitope 領域のアミノ酸置換が起こることが肝炎の沈静化と関連する可能性がある。一方 B cell epitope 領域のアミノ酸置換が生じないことが肝硬変、肝細胞癌への進展と関連する可能性がある。点が明らかになった。

(2) 研究の中心である HBV Splicing Variant に関しては、得られたクローンの詳細な解析を行った。core 領域末端から Pres 領域全体および S 領域の一部まで (nt. 2448~488) (nt. 2448~2934, 3019~488) の deletion core 領域内 (nt. 2088~2349) に deletion を有するクローン (2.1kb 長) が splicing variant 去 nt. の主体であったが、この他に 6 種類の Splicing Variant が存在した。このうち 3 種類はコア域のアミノ酸の大きな欠失 (67AA, 87AA) を伴っていた (図 1)。

(3) Splicing Variant は無症候性キャリアの 47 クローン中 2 クローン (4%)、慢性肝炎の 54 クローン中 27 クローン (50%) に認められ、慢性肝炎で有意に高率に認められた ($p < 0.0001$)。

(4) 経時的な検討を行ったところ、肝炎の発症とともに Splicing Variant が出現し、肝炎の沈静化とともに消退する傾向が認められた splicing Variant がウイルスの増殖及び肝炎を抑えることを示唆する成績と思われる。

(5) Splicing Variant の割合を PCR 後の Densitometry で行った。無症候性キャリアでは産物のほとんどは Splicing のないもので

あったが、肝炎の発症に伴い、その割合がま
増し、HBe 抗体陽性の無症候性キャリアでは
産物のほとんどに Splicing を伴っていた。

図1 : deletion mutant の欠失部位

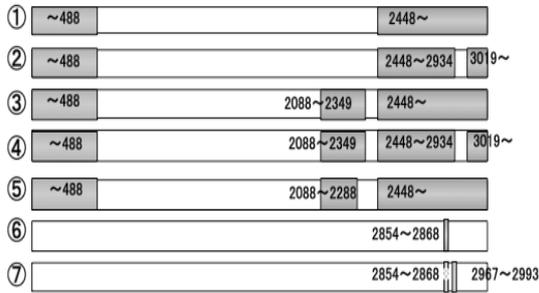
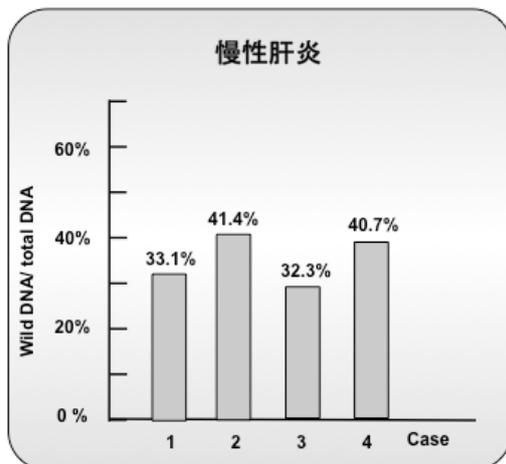
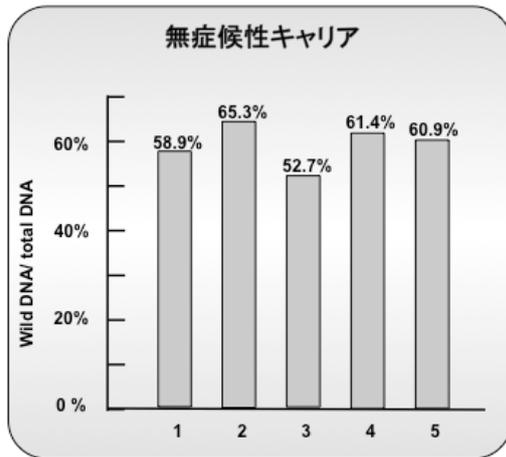


図2 : 無症候性キャリアと慢性肝炎における
Wild type DNA/ Total DNA の比率



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 1 件)

Yamada N, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Koike K, et al.: "Nucleotide and amino acid sequences of the basic core promoter, precore and core regions and the outcome of persistent genotype C hepatitis B viral infection with antibody to e antigen" J. Hepatol (accepted)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1 山田典栄、四柳宏、ら: "B型慢性肝疾患におけるB型肝炎ウイルス欠失変異" 第45回日本肝臓学会総会. (20090603). 神戸市

2 Yamada N, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Koike K et al.: "Large deletion mutant of hepatitis B virus with amino acid substitutions in the core region emerges and dominates around the onset of active hepatitis in persistent HBV carriers" アメリカ肝臓学会Annual Meeting. (20081102). サンフランシスコ. 米国

3 山田典栄、四柳宏、新谷良澄、小池和彦他: "HBe抗原陽性B型慢性肝疾患におけるB型肝炎ウイルス欠失変異" 日本肝臓学会総会. (20080605). 松山市

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四柳 宏 (YOTSUYANAGI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30251234

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：