

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590788

研究課題名（和文） B型肝炎ウイルス組換え遺伝子型の網羅的検討

研究課題名（英文） A comprehensive study of recombinant hepatitis B virus genotype

研究代表者

菅内 文中 (SUGAUCHI FUMINAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20405161

研究成果の概要（和文）：DNA データバンクに登録されている 807 本の HBV 全塩基配列を用いて HBV 組換え遺伝子型(r-HBV)の検索を行なった。12 種類の A/D、2 種類の A/C、2 種類の A/E、1 種類の A/G、1 種類の A/B/C、2 種類の B/C、2 種類の C/D、1 種類の C/F、1 種類の C/G、2 種類の U/C および 1 種類の Chimp/C の合計 28 種類の r-HBV の存在が明らかとなった。r-HBV の組換え好発領域は S 遺伝子の C 末端領域と core 遺伝子領域に多い傾向にあった。

研究成果の概要（英文）：We investigated recombinant HBV genotype (r-HBV) using 807 full-genome sequences of HBV retrieved from DNA Data Bank. Twenty eight r-HBV were shown, 12 for A/D, 2 for A/C, 2 for A/E, 1 for A/G, 1 for A/B/C, 2 for B/C, 2 for C/D, 1 for C/F, 1 for C/G and 2 for U/G. Junction of r-HBV was more common at C terminus of S gene and 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	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：B型肝炎ウイルス、遺伝子型、肝癌、ウイルス変異

## 1. 研究開始当初の背景

HBV (Hepatitis B Virus) 遺伝子型は現在までに分子系統樹を基に A から H までの 8 型に分類されている。その世界分布には地域特異性が存在し、HBV 遺伝子型と臨床像との密接な関連についても報告されている。

近年 HBV 遺伝子が部分的に異なる遺伝子型に置き換わった HBV 組換え遺伝子型(r-HBV)

の存在が注目され、申請者らもこれまで各種の r-HBV を発見しその臨床的重要性について報告してきた (Sugauchi et al. J Virol 2002; Sugauchi et al. Gastroenterology 2003; Sugauchi et al. Clin Infect Dis 2004)。しかしこれまでに r-HBV を考慮した HBV 遺伝子型分類やその臨床像との関連についての検討は十分ではなく網羅的検討がなされて

いない。

## 2. 研究の目的

r-HBV の網羅的検討を行い、その臨床的・ウイルス学的特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 現在までに DNA データバンクに登録されている HBV 全塩基配列株と PC ソフトを用いて全 r-HBV の検索を行いその種類、組換え好発領域について解析を行った。(2) r-HBV が分布するアジア・アフリカ地域の HBs 抗原陽性の保存血清から HBV 塩基配列の決定を行い、系統解析により新たな r-HBV の検索を行った。(3) 本邦における若年発症 B 型肝炎 14 症例および免疫・化学療法後の HBV 再燃 4 例において、保存血清を用いて HBV 塩基配列の決定を行い r-HBV の関与について検討を行った。(4) *In vitro* HBV 複製モデルを用いて各 HBV クローンのウイルス複製効率の測定 (サザンブローディング、Real time detection-PCR)、蛋白発現レベル測定 (HBs 抗原、HBe 抗原、コア抗原) を行いウイルス学的特徴の検討をおこなった。HBV 遺伝子解析およびクローン作成のための検体採取について、当大学倫理委員会で承認された同意書を用いて書面上でインフォームドコンセントを得ているものを対象とした。

## 4. 研究成果

DNA データバンクに登録されている 807 本の HBV 全塩基配列株について 300bp ごとに分子系統樹の作成を行い確実な非組み換え遺伝型株 641 本を選出して分子系統樹を作成した。その 641 本をもとに sub-genotype 別を含む各遺伝子型のコンセンサス配列を作成後、残りの 166 本の HBV 全塩基配列に対して SimPlot 解析を用いて r-HBV 株の検索を行っ

た。SimPlot 解析にて合計 28 種類、150 株以上の r-HBV の存在が明らかとなった。遺伝子型 AD の種類が最も多く 12 種類、30 株以上の r-HBV がアフリカ、欧州、インドに分布していた。その他 2 種類の r-HBV A/C、2 種類の r-HBV A/E、1 種類の r-HBV A/G および A/B/C、アジアに広く分布する 100 株以上で最多の 2 種類の r-HBV B/C、北西中国に分布する 2 種類の r-HBV C/D、1 種類の r-HBV C/F および C/G、2 種類の U/C および 1 種類のチンパンジーと C の r-HBV が検索された。HBV 遺伝子型の組換え好発領域は S 遺伝子の C 末端領域とコア遺伝子領域で多い傾向にあった。

アジア・アフリカ地域の HBs 抗原陽性保存血清を用いて HBV の塩基配列の決定を行い r-HBV の検索によって、遺伝子型 A と E が分布するコート・ジボアール国から既存の報告にない新たな r-HBV A/E が検出された。また遺伝子型 C と D が分布するネパール国から既存の G23 と同一の r-HBV C/D が検出された。

治療前 HBs 抗原陰性で造血器悪性腫瘍に対する治療後に HBV 再活性をきたした 4 例の保存血清より HBV-DNA を抽出し、r-HBV の検索を行った。また *in vitro* HBV 複製モデルを用いてウイルス変異とウイルス複製効率について検討した。HBV 遺伝子型は Bj 2 例、Ce 2 例であり r-HBV の存在は認めなかった。CP(1762/1764) 配列は全例が野性株で PC(1896) 変異株は 1 例に認めた。*In vitro* HBV 複製モデルを用いた再活性化例の各 HBV クローン間の比較検討では、重症肝炎による死亡例の遺伝子型 Bj かつ PC 変異陽性例の HBV クローンで複製がより亢進していた。

40 歳以下で発症した肝細胞癌 14 症例を対象として保存血清より HBV-DNA を抽出し HBV の全塩基配列の決定を行い r-HBV の検索をおこなった。14 症例の平均年齢は  $29.6 \pm 6.1$  歳 (18~38) で男女比は 10:4。HBe 抗原陽性率は

50% (7)であった。HBV 全塩基配列を用いた系統樹解析では遺伝子型 Ae, Ba (組み換え遺伝子型 B/C), Ce がそれぞれ 1、1、11 例に認められ、残りの 1 例は SimPlot プログラム解析から 2814 番から 1573 番の塩基配列は遺伝子型 Ae に分類され、1574 番から 2813 番の塩基配列は遺伝子型 Ce に分類される既存の報告にない新たな r-HBV Ae/Ce であった。PreS 領域において欠損変異が 64% に認められ、PreS1 と PreS2 領域の欠損変異はそれぞれ 35%と 43%に認められた。X 遺伝子の Enhancer II 領域の C1653T 変異は 29% に認められた。コアプロモーター領域の A1762T/G1764A 変異は 79% に認められた。プレコアスタートコドン上流の Kozak 塩基配列 GCACC は 13 例において野生株であったが r-HBV Ae/Ce 症例においては GTATC 変異が認められた。プレコアの G1896A 変異株は 21%、野生株は 57%、混在株は 21% に認められた。本邦における 40 歳以下の HBV 関連肝細胞癌発症例では遺伝子型 Ce が 80%を占めていたが 14%の症例に r-HBV が検出されそのうちの 1 例は新たな r-HBV Ae/Ce であり、若年の慢性 HBV キャリアーからの肝細胞癌発症においては PreS 領域の欠損変異とコアプロモーター変異との関連とともに r-HBV についても考慮する必要があると考えられた。

#### 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 6 件)

- ① Sugauchi F, Mizokami M. (8人中1番目). 査読有. Virological Characteristics of hepatitis B virus on reactivation of hepatitis B in individuals with resolved infection. J Med Virol.

83:412-8, 2011.

- ② Matsuura K, Sugauchi F, Mizokami M. (22人中18番目). 査読有. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. J Clin Microbiol. 47:1476-83, 2009.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Sugauhch F. In vivo model using uPA /SCID mice with human hepatocytes to study cross-genotype protection of HBV and a role of HBs antigen mutation in immunity escape. The 61<sup>st</sup> annual meeting of the AASLD. 2010年10月30日-11月3日. The Hynes Convention Center (Boston USA.)
- ② 菅内文中. B型肝炎の母子および水平感染の実態とワクチン戦略: ヒト肝細胞キメラマウスにおけるB型肝炎ウイルス感染防御の試み. 第46回日本肝臓学会総会. 2010年5月27-28日. ホテルメトロポリタン山形(山形市).
- ③ Matsuura K, Sugauhch F. Identification of genetic variants associated with chronic hepatitis B or C in a genome-wide association. The 8<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference "HBV Now In Asia". 2009年11月21-22日. National Center for Global Health and Medicine (Tokyo Japan).
- ④ Matsuura K, Sugauhch F. A genome-wide association study identifies genetic variants in the HLA-DP associated with chronic hepatitis B. The 60<sup>th</sup> American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2009

- 年10月30日－11月3日. The Hynes Convention Center (Boston USA).
- ⑤ Sugauchi F. Clinical significance of a novel high-sensitivity hepatitis B surface antigen immunoassay in patients with hepatitis B virus infection. The 60<sup>th</sup> American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2009年10月30日－11月3日. The Hynes Convention Center (Boston USA).
- ⑥ 菅内文中. B型慢性肝炎難治例への対策 B型肝炎に対する Adefovir、Entecavir の治療成績と多剤耐性HBV変異株に対する Tenofovir の有効性 (シンポジウム 10: B型慢性肝炎難治例への対策). 第13回日本肝臓学会大会 2009年10月14-16日. 京都国際会館(京都市).
- ⑦ Sugauchi F. Influences of hepatitis B virus genotype and precore mutations on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. The 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2008年10月31日 - 11月4日. Moscone West Convention Center (San Francisco USA).
- ⑧ 菅内文中. 造血器悪性腫瘍治療後のHBV再活性化に対する方策 (シンポジウム). 第12回日本肝臓学会大会. 2008年10月1-4日. グランドプリンスホテル新高輪他 (東京都)
- ⑨ 田中靖人. 菅内文中. B型ウイルス肝炎の治療 B型慢性肝炎に対するエンテカビル長期投与の有用性 (ワークショップ). 第44回日本肝臓学会総会. 2008年6月5日-6日. 愛媛県県民文化会館 (松山市).
- ⑩ 田中靖人. 菅内文中. B型慢性肝疾患の治療戦略 エンテカビル長期投与による治療効果及び耐性変異出現パターン. 第94回日本消化器病学会総会. 2008年5月8日-10日. 福岡サンパレスホテル & ホール (福岡市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅内 文中 (SUGAUCHI FUMINAKA)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：20405161

### (2) 研究分担者

溝上 雅史 (MIZOKAMI MASASHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・客員教授  
研究者番号：40166038