

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790737
 研究課題名 (和文) HCV 母子感染例では母子間で HCV ゲノム分子進化速度に差があるか？
 研究課題名 (英文) Comparison of the nucleotide substitution rate of the hepatitis C virus in mothers and their infants
 研究代表者
 伊藤 孝一 (ITO KOICHI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：00444977

研究成果の概要 (和文)：HCV の NS5b 領域の分子系統樹による遺伝子解析が母子感染の証明に有用であった。児における HCV NS5b 塩基置換速度は母と比較して遅い傾向がみられた。児の低い immune pressure が HCV の進化に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The phylogenetic analysis of the NS5b region of the HCV genome was useful for proving mother-to-infant transmission of HCV. The evolution of NS5b did not increase in infants infected through mother-to-infant transmission in childhood. The lower immunological pressure generated by the infant host may affect viral evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,000,000	300,000	1,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児医学

キーワード：HCV 遺伝子 NS5B 母子感染

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近では、輸血用血液のスクリーニング法が進み HCV の感染経路として輸血によるものはほとんど無くなり、新たな患者の発生

は減少している。しかし、残念ながら、現時点では HCV については確立された母子感染予防法はなく、母親の血清中 HCV RNA が陽性の場合、その約 10%に母子感染が成立するとき

れ、現在でも全国では数百人規模の新規感染例が存在すると推定される。感染例の約 2/3 は HCV キャリアの状態となり、大部分は小児期から成人に至るどこかで慢性肝炎を発症する。今後、これら母子感染例の予後を予測し、治療を進めていく上で、HCV 母子感染の病態を解明することは、重要な課題の一つと考えられる。

(2) HCV 母子感染例を対象に、それぞれ母子から検出したウイルスの遺伝子解析を実施することにより、病態の一部を解明できると考えた。

2. 研究の目的

(1) HCV 遺伝子の NS5B 領域は、HCV RNA ゲノムの複製において重要な役割を担っている RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) をコードし、その領域の変異は HCV RNA の複製に重要な影響を与えることが、明らかとなっており、インターフェロン治療との関連性も指摘されている。しかしながら、HCV 母子感染例の小児期における HCV NS5B 領域の多様化（進化）について母子間で比較した研究は少なく、詳細は不明である。そこで、HCV NS5B 領域を主要な解析対象とした。

3. 研究の方法

(1) 文書により同意の得られた HCV 母子感染例の患児と母親を対象に、血液を採取。採取した血液は凝固後、直ちに遠心し、RNA 抽出時まで凍結保存した。

(2) 保存血清 50 μ l より SepaGene-RVR (三光

純薬) を用い、添付のマニュアルに従い RNA を抽出した。抽出した RNA、random primer 及び逆転写酵素 SuperScript II を用い、cDNA を作成後、NS5B 領域に設定した primer 及び、FastTaq を用い、nested PCR 法で増幅した。用いたプライマー配列は

NS5B_8278S (8258-8278):

TGATACCCGCTGYTTTGACTC と

NS5B_8618AS (8618-8639):

GTACCTGGTCATAGCCTCCGTG である。

増幅産物は、3% アガロースゲルで泳動後、陽性バンドから DNA を切り出した。切り出した DNA、2nd PCR で用いた primer、BigDye Kit

(Applied BioSystems) にて、Sequence 反応を実施し、ABI 3100 DNA シークエンサーで NS5B 領域の 336 塩基配列の塩基配列を決定

(Direct Sequence 法) し、アミノ酸配列を推定した。

(3) 母子間の HCV 株の塩基相同性、アミノ酸相同性を求めた (母子ともに最も年齢の若い時期で HCV 株の塩基配列を比較)。7 例の HCV 株の塩基配列をもとに参照株を加えて分子系統樹を作成し、ウイルスの由来を推定した。

(4) ウイルスの塩基配列の変化を解析し、塩基置換速度を計算し比較検討した。

4. 研究成果

(1) 対象は 0.5—17 歳の児で follow-up 期間は 0.2—12 年間。対象母子の HCV subtype は母子内で同一の subtype で、以下の通りであった: subtype 1b, 3 組; subtype 2a, 3 組; subtype

2b, 1 組。Peak HCV RNA levelは42-2500KIU/ml。

ALTの持続高値がみられ、PEG-IFN単独療法を施行されたのが2例 (case 3、6) (Table. 1)。

Table1. Characteristics of the patients

Case	HCV genotype	Age (years)	Sex	Peak HCV RNA level (KIU/ml)	Persistently elevated ALT	Peg IFN- α monotherapy
1	1b	13	f	500	-	-
2	1b	17	f	2500	-	-
3	1b	8	f	2300	+	+
4	2a	0.5	f	2300	-	-
5	2a	3	m	42	-	-
6	2a	7	m	1400	+	+
7	2b	9	f	1700	-	-

また、母親でALTの持続高値を認め、IFN療法を施行されたのは1例 (case2の母) であった。

(2)分子系統樹から、母子由来の HCV 株は近縁に存在することが示された。母子間の HCV 株の塩基配列は平均 98.9%、アミノ酸配列は平均 99.8%と高い相同性を示した (Table 2)。

Table 2. Sequence divergence of nucleotides and amino acids between mothers and children

Family	HCV genotype	Years after delivery	Nucleotide sequence identity (%)	Amino acid sequence identity (%)
Family 1	Mother 1b	12.9	-	-
	Child 1b	12.5	99.7	100
Family 2	Mother 1b	16.5	-	-
	Child 1b	16.5	96.7	98.2
Family 3	Mother 1b	7.4	-	-
	Child 1b	7.7	99.7	100
Family 4	Mother 2a	0.2	-	-
	Child 2a	0.4	99.7	100
Family 5	Mother 2a	2.3	-	-
	Child 2a	2.3	99.4	98.1
Family 6	Mother 2a	3.9	-	-
	Child 2a	5.8	99.4	100
Family 7	Mother 2b	8.3	-	-
	Child 2b	8.3	99.4	100

(3)児における塩基置換速度は case2 が 0.74×10^{-3} (substitution/base/year)。その他は全て 0.00×10^{-3} (substitution/base/year)だった。case1、2、3、5、6、7の母の塩基置換速度はそれぞれ、0.52、0.99、0.00、8.93、0.00、2.10(substitution/base/year)だった。Case4の母は1ポイントのみのサンプリングのため塩基置換速度が求められなかった (Table 3、4)。

Table 3. Number of nucleotide and amino acids substitutions and nucleotide substitution rate in the patients infected by mother-to-infant transmission

Child	Years after birth	Years after birth	Nucleotide substitutions	Amino acids substitutions	Nucleotide substitution rate (substitution/base/year) $\times 10^{-3}$
1	0.5 vs. 2.0	2.0	0	0	
	0.5 vs. 9.5	9.5	2	0	
	0.5 vs. 10.5	10.5	1	0	
	0.5 vs. 11.9	11.9	1	0	
	0.5 vs. 12.5	12.5	0	0	0.00
2	4.5 vs. 13.5	13.5	2	0	
	4.5 vs. 14.4	14.4	1	0	
	4.5 vs. 16.5	16.5	3	0	0.74
3	5.8 vs. 6.8	6.8	0	0	
	5.8 vs. 7.7	7.7	0	0	0.00
4	0.2 vs. 0.4	0.4	0	0	0.00
5	2.0 vs. 2.3	2.3	0	0	0.00
6	3.8 vs. 5.8	5.8	0	0	0.00
7	5.3 vs. 8.3	8.3	0	0	0.00

Table 4. Number of nucleotide and amino acids and nucleotide substitution rate in the mothers of the patients infected by mother-to-infant transmission

Mother	Years after delivery	Years after delivery	Nucleotide substitutions	Amino acids substitutions	Nucleotide substitution rate (substitution/base/year) $\times 10^{-3}$
1	0.5 vs. 0.6	0.6	2	0	
	0.5 vs. 4.5	4.5	2	0	
	0.5 vs. 9.5	9.5	3	0	
	0.5 vs. 10.5	10.5	4	0	
	0.5 vs. 11.9	11.9	2	0	0.52
2	13.5 vs. 16.5	16.5	1	0	0.99
3	5.8 vs. 6.8	6.8	0	0	0.00
	5.8 vs. 7.7	7.7	0	0	0.00
5	1.3 vs. 2.3	2.3	3	1	8.93
6	2.0 vs. 3.9	3.9	0	0	0.00
7	6.9 vs. 8.3	8.3	1	0	2.10

(4)塩基相同性、アミノ酸相同性のみでは母子感染を評価することが難しい場合があり、塩基相同性、アミノ酸相同性は比較的高いが、分子系統樹上は二つの配列の位置が離れているため、家族内感染が否定的と考えられる症例も報告されている。今回、NS5B領域を用いた分子系統樹作成により、母子の塩基配列が互いに近くに存在することが示され、母子感染の確定に有用であった。

一般に、ウイルスの進化はホストに最も適応したクローンの選択の結果として成されると推定される。この選択の圧力には複数の因子が関係すると考えられるが、ホストの immune pressure が主要な要因と考えられ、Common variable immunodeficiency (CVID)を合併する慢性C型肝炎患者においてはHCV

の E2/NS1 領域の HVR の塩基置換速度が遅いこと、骨髄移植患者で免疫抑制状態の間では HCV の HVR の塩基置換速度が遅くなることが報告されている。従って、HCV 母子感染例において、母由来の HCV クローンは新しい免疫力の異なる児のもとでは進化速度が母のもととは異なる可能性がある。今回、児の方が塩基置換速度が遅かったのは児の immune pressure が母よりも少ないためである可能性が考えられた。

今回の解析は Direct Sequencing 法によりウイルス塩基配列を決定している。この方法では major なクローンの塩基配列のみを反映している。従って、この方法で塩基置換を認めた場合には、同一クローン内での塩基置換なのか、minor だったクローンが major になったのが問題となる。この点を解決するため、今後、サブクローニングを行うとともに症例をさらに増やして検討する予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①遠藤剛、伊藤孝一、後藤健之、杉浦時雄、今峰浩貴、安藤直樹、植田昭仁、水野晴夫、杉山幸八郎、戸莉創。副作用のため PEG-IFN 投与を中止し、陰性化していた HCV-RNA が陽

転したが、自然経過で再び陰性化した男児例、第 35 回日本小児栄養消化器肝臓学会、2008 年 10 月 11-12 日、東京

② Kenji Goto, Koichi Ito, Tokio Sugiura, Anis Khan, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami. Comparison of the nucleotide substitution rate of the hepatitis C virus NS5b region in mothers and their infants. World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.

2008/8/16-20, Iguassu, Brazil

③ Koichi Ito, Kenji Goto, Tokio Sugiura, Kanji Muramatsu, Toshihiro Ando, Hiroko Maniwa, Takao Yokoyama, Kohachiro Sugiyama, Hajime Togari. Polymorphisms of the Factor VII Gene Associated with the Low Activities of Vitamin K-Dependent Coagulation Factors in One-Month-Old Infants. World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.

2008/8/16-20, Iguassu, Brazil

④ 伊藤孝一、遠藤剛、今峰浩貴、安藤直樹、後藤健之、伊藤哲哉、戸莉創、杉浦時雄、河地豊、小林圭子。高ガラクトース血症を合併した NICCD 患児に対する MCT ミルクの有用性、第 25 回日本小児肝臓研究

会、2008年7月19-20日、東京

〔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) 研究代表者

伊藤 孝一 (ITO KOICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00444977