

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07980

研究課題名(和文) B型・C型肝炎ウイルスの遺伝子変化の特徴と病態との関連性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the characteristics of genetic changes in hepatitis B and C viruses and their relationship with clinical conditions

研究代表者

上田 佳秀 (Ueda, Yoshihide)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：90378662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型慢性肝炎ならびに肝移植C型肝炎再発症例の抗HCV治療前後の血清におけるHCV遺伝子配列を1分子リアルタイム・シーケンサーならびに次世代シーケンサーを用いて同定した。HCV遺伝子配列の変化の分子系統樹解析を行い、HCV遺伝子変異バイアスの特徴としてtransition変異が多く生じていること、中でもA→GとU→C変異の頻度が高いことを明らかにした。一方、既知の薬物耐性変異はtransversion変異によっても生じていた。B型慢性肝炎患者のHBV遺伝子配列を同様に解析した結果、HBVのpreS/S領域ならびにC領域に欠失を認めるHBVの構造変化を多数例で認め、臨床経過との関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、C型ならびにB型肝炎ウイルスの感染患者体内で生じている遺伝子変異バイアスを明らかにし、遺伝子構造変化も含めた遺伝子変化と病態との関連を解明した。これらの遺伝子配列の変化が臨床経過と関連していることから、臨床像の予測や個々の症例に最適な治療法の検討へと繋がることを期待できる。また、近年問題となった新型コロナウイルス感染症(COVID-19)のように、社会的に問題となり早急な対策が必要となる新規ウイルス感染症の遺伝子変異の解析にも応用できる解析手法を確立したため、様々なウイルスの遺伝子変化と病態との関係を解明する研究方法として今後の学術的な発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We identified HCV genome sequences in the serum of patients with chronic hepatitis C and recurrent hepatitis C after liver transplantation before and after anti-HCV treatment, using a single-molecule real-time sequencer and next-generation sequencer. We conducted a molecular phylogenetic tree analysis of changes in HCV gene sequences and found that transition mutations occur frequently as a characteristic of HCV gene mutation bias, and that A→G and U→C mutations are particularly frequent. On the other hand, known drug resistance mutations were also caused by transversion mutations. As a result of similar analysis of the HBV gene sequences of chronic hepatitis B patients, structural changes in HBV including deletions in the HBV preS/S region and C region were found in many cases, and the relationship with clinical course was clarified.

研究分野：肝臓病学

キーワード：C型肝炎ウイルス B型肝炎ウイルス 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは遺伝子変異が生じやすく、遺伝子の変化によって増殖力や治療抵抗性などが変化し、感染宿主の病態に大きな変化を与える。ウイルス遺伝子の変異機構については、ポリメラーゼの性質、遺伝子配列の特徴、遺伝子の2次構造、細胞内環境、免疫反応、複製機構など、様々な因子が複合的に作用する。この遺伝子変異機構がウイルス間で異なることから、ウイルスの種類によって生じる遺伝子変異の特徴(変異バイアス)が異なる。例えば、HCVの変異機構としては、HCVのRNA依存性RNAポリメラーゼであるNS5Bの性質により、transition変異が多く生じ、中でもA GとU C変異の頻度が高いことがin vitroの実験や培養細胞の研究から明らかにされている。しかしながら、実際のウイルス感染患者の体内では、免疫反応や治療薬など様々な影響が加わるため、生じる変異バイアスが異なると予想される。また、病態の変化や治療などの影響によって、遺伝子変異機構が変化する可能性がある。

申請者は既に、10年間継続培養したHCV複製培養細胞(HCVレプリコン細胞)において、第三世代シーケンサー解析ならびに系統樹解析を行うことによって、変異バイアスを解析する技術を確立した。10年間の培養によってHCVは細胞内で多数の変異を獲得し、培養開始時とは遺伝的距離の離れた異なるクラスターとなり多様なクローンに進化していた。変異バイアスの解析から、これまでの報告と同様にtransition変異、中でもA GとU C変異の頻度が高いことが示された。加えて、頻度は低いながらtransversionによって生じている変異はHCV複製に重要な変異であることを明らかにしている。すなわち、ウイルスの持つ変異バイアスとは異なる変異を探索することで、ウイルスの生存に重要な変異部位を同定することが可能となる。申請者は、この解析技術を用いてHCV感染患者ならびにHBV感染患者の体内で実際に生じている変異バイアスを明らかにし、遺伝子変化と病態との関連を解析することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、HCVならびにHBVの感染患者体内で生じている遺伝子変異バイアスを明らかにし、遺伝子構造変化も含めた遺伝子変化と病態との関連を解明することを目的とした。

この目的を達成するために、申請者の以下の学術的独自性と創造性を生かして研究を行なった。

- (1) 1分子リアルタイム・シーケンサー技術を用いた解析：本研究では、シーケンシングリード長の長いディープシーケンシングという特性をもつ、1分子リアルタイム・シーケンサーを用いることによって、従来型の直接塩基決定法や次世代シーケンサー解析法ではできなかった各ウイルスクローンの長いリード長の遺伝子解析が可能である。これにより、離れた部位に存在する多重変異や欠失や増幅などの構造変化の情報が得られた。
- (2) 申請者のこれまでの肝炎ウイルス解析の経験と知識に基づいた研究：ウイルスの動態の解析を行う上での最大の障壁は、ウイルスが感染患者内で遺伝子的に均一なクローンの集合体としてではなく、様々な変異を有した多様なクローンの集合体(quasispecies)として存在していることである。申請者は次世代シーケンサーや第三世代シーケンサーを用いてディープシーケンシングを行うことによって、その全体像の把握が可能であることを示し、これまででも多数の研究結果の論文報告を行ってきた。
- (3) 肝移植前後のウイルス感染を含めた豊富な検体：神戸大学ならびに前任の京都大学医学部附属病院にて多数のB型肝炎ならびにC型肝炎患者の診療を行い、経時的な検体を保存している。
- (4) 新規ウイルス感染症にも応用できる研究技術：本研究で確立された研究技術は、他のウイルスの遺伝子変異の解析にも応用できる解析手法となるため、様々なウイルスの遺伝子変化と病態との関係を解明する研究法として、今後の学術的な発展が期待できる。

3. 研究の方法

1. C型慢性肝炎患者の経過におけるHCV遺伝子変異バイアスの特徴

C型慢性肝炎患者の診断時、抗HCV治療開始前、治療終了後、治療後長期経過後の血清よりRNAを抽出し、RT-PCRにて増幅後、1分子リアルタイム・シーケンサーならびに次世代シーケンサーを用いてHCV遺伝子配列の同定を行った。肝移植症例については、肝移植前の血清ならびに肝組織、肝移植後の再感染後、急性肝炎期、慢性肝炎期、抗HCV治療前、治療1週間後、HCV再発時、HCV再発後6ヶ月、1年後の血清を用い同様に解析を行った。これらを経時的に比較して分子系統樹解析を行い、病態に応じたHCV遺伝子変異バイアスを明らかにした。

2. C型慢性肝炎の経過における遺伝子変化と病態との関連

上記1の解析結果より明らかになった変異バイアスとは異なる変異パターンを示す遺伝子変異

を中心に解析を行い、HCV 感染、複製、増殖、治療抵抗性、治療後のウイルス増加の際に生じる遺伝子変化を明らかにした。さらに、免疫抑制状態である肝移植後と免疫能が正常な通常の C 型慢性肝炎と比較検討し、免疫反応によって生じる変異バイアスの変化も明らかにした。

3. B 型慢性肝炎患者の経過における HBV 遺伝子変異バイアスの特徴

HCV で解析した方法と同様に、B 型慢性肝炎患者の血清より DNA を抽出し、HBV-DNA を PCR にて増幅後、1 分子リアルタイム・シーケンサーならびに次世代シーケンサー解析を行った。これまでに保存している、無症候性キャリア、肝炎発症期、慢性肝炎期、HBe セロコンバージョン前後、核酸アナログ投与前後の血清を用いて解析を行った。経時的に比較して分子系統樹解析を行い、HBV 遺伝子変異バイアスを明らかにした。

4. HBV の遺伝子構造変化の意義

シーケンスリード長の長い 1 分子リアルタイム・シーケンサーを用いることによって、従来型の解析法ではできなかった遺伝子構造変化（欠失、増幅）の解析が可能である。既に論文報告した HCV の構造変化の解析技術を HBV に応用し、HBV の遺伝子構造変化の詳細を明らかにするとともに、病態との関連を解析した。

4. 研究成果

1. C 型慢性肝炎患者の経過における C 型肝炎ウイルス（HCV）遺伝子変異バイアスの特徴：

C 型慢性肝炎患者 4 例ならびに肝移植 C 型肝炎再発症例 4 例の抗 HCV 治療開始前ならびに治療終了後の血清における HCV 遺伝子配列を 1 分子リアルタイム・シーケンサーならびに次世代シーケンサーを用いて同定した。HCV 遺伝子配列の変化を経時的に比較して分子系統樹解析を行うことによって、HCV クローンの治療前後の変化、治療後の自然経過による変化、さらに治療法の違いによる変化を明らかにした。

HCV 遺伝子変異バイアスの特徴として transition 変異が多く生じていること、中でも A G と U C 変異の頻度が高いことを明らかにした。この遺伝子変異バイアスは、また、抗 HCV 治療中でも治療後の自然経過でも同様の傾向を認めた。さらに、免疫抑制状態である肝移植後と免疫能が正常な通常の C 型慢性肝炎と比較検討し、変異バイアスが同様であることも明らかにした。また、この変異バイアスは長期継代した HCV 複製培養細胞（HCV レプリコン細胞）と同様であった。これらの結果より、変異バイアスはウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの特徴によるものである可能性が示唆された。

一方で、既知の薬物耐性変異である NS3 の D168 の変異や NS5A の L31 の変異は主に transversion 変異によっても生じていた。このことは、薬物耐性変異は transition 変異と transversion 変異の両方によって生じ、変異が生じた HCV クローンが治療中に選択されて増殖しているものと考えられた。

以上の結果を論文にて報告した。

2. B 型肝炎ウイルス（HBV）の遺伝子構造変化の意義：

HCV で解析した方法と同様に、B 型慢性肝炎患者 10 例の血清 25 サンプルより DNA を抽出し、HBV-DNA を PCR にて増幅し、1 分子リアルタイム・シーケンサーならびに次世代シーケンサー解析を行った。

解析の結果、797,352 の HBV クローンが同定された。HBV 遺伝子の大きな変化として HBV の preS/S 領域ならびに C 領域に欠失を認める HBV の構造変化を多数例で認めた。欠失遺伝子の領域と長さは症例によって様々であり、また、同一症例内でも複数の欠失 HBV クローンが存在していた。さらに、自然経過中にこの欠失 HBV クローンの比率が大きく変化していることも明らかになった。HBV 構造変化と臨床経過の特徴との関連を解析し、HBe 抗体陰性例や肝酵素高値例で多様な遺伝子欠失を認めていることを明らかにした。

さらに、1 分子リアルタイム・シーケンサーならびに次世代シーケンサー解析結果を元に分子系統樹解析を行い、欠損を持つウイルスと欠損のない全長ウイルスは、それぞれ別の起源から生じており、いずれも遺伝子変異を繰り返しながら進化していることが明らかになった。

以上より、本研究では新しいロングリードの 1 分子リアルタイム・シーケンシング技術を用いることによって、HBV は遺伝子の点変異だけでなく、さまざまな構造異常、特に欠失変異体が生じていることを明らかにした。抗ウイルス療法のない自然経過でも、特に活動性肝炎の条件下で様々な欠損 HBV クローンが生成されることが明らかになった。これらの欠失 HBV クローンは多くの場合、全長 HBV クローンとは独立して進化していた。本研究で確立されたウイルスのロングリード全ゲノムシーケンシングの新しい解析プラットフォームは、今後 HBV 解析の標準的解析法となるだけでなく、他のウイルスへの応用が期待される。

以上の結果を論文にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Fumiyasu, Takeda Haruhiko, Ueda Yoshihide, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Eso Yuji, Arasawa Soichi, Iguchi Eriko, Shimizu Takahiro, Mishima Masako, Kumagai Ken, Yamashita Taiki, Uemoto Shinji, Kato Nobuyuki, Marusawa Hiroyuki, Sekine Akihiro, Seno Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Mutational spectrum of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C determined by single molecule real-time sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11151-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Arasawa Soichi, Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Iguchi Eriko, Eso Yuji, Shimizu Takahiro, Takahashi Ken, Yamashita Taiki, Ueda Yoshihide, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Evolutional transition of HBV genome during the persistent infection determined by single-molecule real-time sequencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 e0047 ~ e0047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/HCG.0000000000000047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihide Ueda
2. 発表標題 Current State of the Art in Liver Transplantation in the Japan. Management of Post-Transplant HBV and HCV
3. 学会等名 AASLD. The Liver Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 一般財団法人日本移植学会Transplant Physician委員会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ばーそん書房	5. 総ページ数 266
3. 書名 必携 内科医のための 臓器移植診療ハンドブック	

1. 著者名 上田 佳秀	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社 日本臨床	5. 総ページ数 6
3. 書名 ウイルス性肝炎学2023 最新の病態・診断・治療情報 -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------