

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790627

研究課題名（和文） B 型肝炎ウイルスの遺伝子型および変異が病態へ与える影響についての包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive study of hepatitis B virus genotypes and mutations involved in the pathogenesis

研究代表者

井上 淳（INOUE JUN）

東北大学・病院・医員

研究者番号：60455821

研究成果の概要（和文）：

B 型肝炎ウイルス（HBV）の遺伝子型や変異が病態に与える影響を明らかにするため、劇症肝炎を生じる頻度が高いことが報告されている遺伝子型 B1/Bj の HBV について全ゲノム解析を行った。興味深いことに劇症肝炎株にはプレコア領域の 1 塩基の挿入あるいは欠失が高頻度に認められること、さらにコア蛋白の 21 番目のアミノ酸を変化させる塩基変異も高頻度に認められることが明らかとなった。これらを培養細胞を用いた HBV 複製系に導入すると有意に HBV 複製効率が増加しており、劇症肝炎発症の機序の一部を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

To investigate hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations that are involved in the pathogenesis, full-genome analysis of genotype B1/Bj HBV, which is known to occur fulminant hepatitis frequently, was performed. Interestingly, single nucleotide insertion/deletion that causes frameshift in the precore region was found frequently in fulminant hepatitis strains. Furthermore, amino acid 21 mutation in the core protein was also found frequently. In vitro studies clarified that HBV with these insertion/deletion/mutation showed high replication capacity. These findings might clarify a part of fulminant hepatitis pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：肝臓学、ウイルス性肝炎

1. 研究開始当初の背景

HBV 感染者は全世界には 4 億 2 千万人い

ると推定されており、B 型肝炎は世界的な問題の一つである。本邦には約 150 万人の

感染者がいるとされ、そのうち約3万人が肝硬変や肝臓に進行していると言われていた。HBVは他のDNAウイルスに比べて遺伝子多様性が高く、その塩基配列を用いた分子系統解析によりAからJまで10のgenotypeが確認されている。これまでの臨床的研究により、genotypeが病態の違いに影響することが明らかにされ(Kao et al., *Gastroenterology* 2008)、インターフェロンや核酸アナログ治療への反応にも差があることが分かってきた。ただし、HBVのgenotypeの地理的分布には偏りがあり、本邦にはgenotype C,Bが多く、欧米にはA,Dが多いと言った特徴があるため、臨床的な病態の相違は人種・環境因子の違いによる可能性がある。また、HBVには病態と関連する変異があることが以前から報告されている。特に、HBe抗原の産生に関連するコアプロモーター(CP)領域やプレコア(PC)領域の変異が劇症肝炎と関連することが示されており(Omata et al., *N Engl J Med* 1991; Sato et al., *Ann Intern Med* 1995)、発癌との関連も示唆されている(Liu et al., *J Infect Dis* 2006)。劇症肝炎と変異の関連については、本邦から複数の報告があり(Ozasa et al., *Hepatology* 2006)、我々も劇症肝炎の集団発生の原因となったHBV株にG1862Tという特徴的な変異を認めたことを報告した(Inoue et al., *Virology* 2008)。しかしながら、欧米からは変異と劇症肝炎に関連性がないとの報告が多い(Laskus et al., *Gastroenterology* 1993)。劇症肝炎との関連についての基礎的研究においては、これらのCP/PC変異がin vitroのHBV複製系においてウイルス複製を亢進させることが示されており(Ozasa et al., *Hepatology* 2006)、我々は劇症肝炎株に認められた変異が細胞内にHBV複製中間体が蓄積させることを

平成20-21年度の当科学研究費補助金(若手B、課題番号20790483)の課題研究として報告した(Inoue et al., *Virology* 2008)。一方、CP/PC変異がウイルス複製に影響しないとの報告も見られ(Parek h et al., *J Virol* 2003)一定の見解が得られていない。報告によって結果が異なる原因として、研究によって使用した株のgenotypeが違うことが考えられる。実際、HBVキャリアの自然経過の中でgenotype Cと比較してgenotype BではCP変異が起きにくいと報告されており(Orito et al., *Hepatology* 2001)、やはりgenotypeによってCP/PC変異の影響が異なるものと考えられるが、原因は不明である。

2. 研究の目的

本研究ではin vitroのHBV複製系を用いて、HBV変異がウイルス増殖に与える影響のgenotype間での違いを明らかにすることを目的とした。さらに、その違いに関係するHBV genomeの領域あるいは変異を特定することにより、さらに理解を深めることとする。また、劇症肝炎や発癌の機序としてHBVが直接的に感染肝細胞へ与える影響の違いについても、genotypeおよび変異毎の検討で明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HBV複製が亢進していることが予想されるB型劇症肝炎患者の血清からDNAを抽出し、direct sequencingによりprecore領域を中心に可能な限り全ゲノム(3200塩基)の塩基配列を決定する。

(2) 劇症肝炎患者のHBVをgenotype別にデータベース上の非劇症肝炎例のHBVと比較し、劇症肝炎発症と関連のある塩基変異を絞り込む。

(3) 劇症肝炎と関連のありそうな変異の頻度

について、軽症の B 型急性肝炎患者の血清を用いて部分塩基配列を決定して検討する。

(4) 劇症肝炎と関連が認められた変異について、臨床応用可能な簡便に検出できる方法を確立し評価する。

(5) この変異を培養細胞を用いた HBV 増殖系に導入し、その変異がウイルス複製に与える影響を検討する。すなわち、肝癌細胞株内で HBV の増殖が可能となる 1.3 倍長の HBV ゲノムを含む plasmid をトランスフェクションし、この plasmid に site-directed mutagenesis により変異を導入した場合と導入していない場合を比較して HBV 複製の違いが認められるかを検討する。さらに、異なる genotype の HBV にも同様に変異を導入して影響の違いを検討する。

(6) 変異および genotype が細胞に与える影響について、マイクロアレイを用いて包括網羅的に検討する。

4. 研究成果

まず、劇症肝炎を生じる頻度が高いことが報告されている genotype B1/Bj の HBV の特徴について解析を行った。当院における劇症肝炎 HBV 株の部分塩基配列を検討すると、genotype B1/Bj の 5 株中の 3 株に precore 領域の frameshift を生じる 1 塩基の挿入あるいは欠失が認められた。この frameshift は HBe 抗原の産生が停止するものであり、これを in vitro の HBV 複製系に導入すると有意に HBV 複製効率が増加していた。このうち、core 蛋白の開始コドン直前の塩基番号 1901 への一塩基挿入は core 蛋白の翻訳効率に関与する Kozak 配列を変化させており、無細胞蛋白発現系において core 蛋白量が増加していることが確認された (Inoue *e al.*, *J Infect Dis* 2011)。この結果により genotype B1/Bj に劇症肝炎が多

いことの原因の一部を解明することができたものと考えられる。

次に解析範囲をさらに広げ、劇症肝炎患者の HBV の全ゲノム配列を決定して genotype 別にデータベース上の非劇症肝炎株との比較を行った。すると興味深いことに、劇症肝炎の頻度が高い genotype B1/Bj において core protein の 21 番目のアミノ酸を変化させる 1961/1962 番目の塩基変異が 11 例の劇症肝炎の全例 (100%) に認められた。当院および近隣の病院の B 型急性肝炎の血清を用いて同変異を解析してみると、軽症の急性肝炎 96 例には 6% しか認められず、genotype B1/Bj のみの検討でも 29% しか認められなかった (論文投稿中)。この変異は HLA-A2 拘束性 CTL epitope 内に存在していたが、劇症肝炎・急性肝炎例ともに患者の HLA-A2 の有無とは関連を認めなかった。この変異を簡便に検出できる PCR 系を確立し、当院の慢性肝炎 107 例を検討すると、この変異は genotype B1/Bj であることとウイルス量が低いことと関連していた。

この変異を in vitro の HBV 複製系に導入してウイルス複製効率を検討すると、培養上清中に放出されたウイルス量が増加する一方で細胞内の複製中間体は増加しておらず、この変異はウイルスの放出を促進する効果があるものと考えられた。

なお、ウイルスの genotype・変異が細胞に与える影響についてはマイクロアレイなどの実験系を検討中であり、まとまった結果はまだ得られていない。

本研究の結果は特に日本で劇症肝炎を高頻度を生じる genotype B1/Bj の HBV による劇症肝炎の病態理解の一助となるものと考えられた。

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 2 件)

① Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. *J Infect Dis.* 2011;204:1017-25. 査読有

② 井上 淳, 上野義之, 下瀬川徹. B型劇症肝炎における genotype, precore 領域 frameshift の意義. *消化器内科.* 2011;53:595-600. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Jun Inoue, Yoshiyuki Ueno, Hirofumi Niitsuma, Yasuteru Kondo, Eiji Kakazu, Masashi Ninomiya, Osamu Kimura, Tooru Shimosegawa. Association between Mutations in a Cytotoxic T Lymphocyte Epitope of Hepatitis B Virus and Fulminant Hepatitis. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2011 年 11 月 7 日. サンフランシスコ, 米国.

② 井上 淳, 上野義之, 涌井祐太, 福島耕治, 近藤泰輝, 嘉数英二, 二宮匡史, 新妻宏文, 三浦雅人, 下瀬川 徹. Genotype B1/Bj の HBV による劇症肝炎と CTL epitope 変異の関連. 第 47 回 日本肝臓学会総会. 2011 年 6 月 2 日. 東京.

③ Jun Inoue, Yoshiyuki Ueno, Yuta Wakui, Koji Fukushima, Yasuteru Kondo, Eiji Kakazu, Masashi Ninomiya, Hirofumi Niitsuma, Tooru Shimosegawa. The Significance of Frameshift in the Precore Region of Hepatitis B Virus Obtained from Fulminant Hepatitis Patients. The 61th

Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2010 年 11 月 1 日. ボストン, 米国.

④ 井上 淳, 上野義之, 下瀬川 徹. B 型劇症肝炎における genotype, precore 領域 frameshift の意義. 第 14 回 日本肝臓学会大会 (JDDW2010). 2010 年 10 月 15 日. 横浜.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 淳 (INOUE JUN)

東北大学・病院・医員

研究者番号 : 60455821

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者