

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590972

研究課題名(和文) 肝移植症例の臨床像からのB型肝炎ウイルスの感染様式の解明

研究課題名(英文) Analysis of hepatitis B virus in patients after liver transplantation

研究代表者

上田 佳秀 (Ueda, Yoshihide)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90378662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：HBs抗原陰性・Hbc抗体陽性のB型肝炎ウイルス(HBV)既往感染者の肝臓内に潜伏しているHBVの感染様式を明らかにした。まず、HBs抗原陰性・Hbc抗体陽性ドナーから肝移植を受けたレシピエントにおいて、高率にHBVの活性化を認めていること、その原因としてHBs抗体エスケープ変異株の出現があることを明らかにした。さらに、次世代ゲノムアナライザーを用いて、HBs抗原陰性・Hbc抗体陽性者から免疫抑制状態において活性化したHBVを解析した結果、HBVの多様性はHBs抗原陽性例のHBVと比較して有意に低いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) infected in individuals who are negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg) but positive for hepatitis B core antibody (anti-HBc), which is indicative of resolved hepatitis B, was analyzed. De novo activation of HBV frequently occurred after liver transplantation from HBsAg-negative and anti-HBc-positive donors due to the emergence of HBV with escape mutations from hepatitis B surface antibody. Moreover, ultra-deep sequencing revealed that the genetic heterogeneity of reactivated HBV in immunosuppressive condition was significantly lower in patients with reactivation from occult HBV carrier status compared with that in patients from HBsAg carrier status.

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 肝移植 免疫抑制

## 1. 研究開始当初の背景

HBs 抗原陰性・Hbc 抗体陽性の B 型肝炎ウイルス (HBV) 既感染者の肝臓内には HBV が潜伏感染していることが明らかとなっている。この HBV 潜伏感染は、通常の状態では問題になることはないが、宿主が免疫抑制状態になった場合には潜伏している HBV が増殖し B 型肝炎を発症することがある。これを *de novo* B 型肝炎と呼び、発症するとその一部が劇症肝炎となり予後が極めて悪いことから、近年大きな問題となっている。そのため、診療ガイドラインが発表されているが、その発症メカニズムや重症化メカニズム、発症や重症化のリスクファクターなど、不明な点が多く残されている。さらに適切な対策を考える上で、臨床像の詳細な説明が急務である。

この *de novo* B 型肝炎の病態は、もともと肝移植症例の知見から明らかとなった。肝移植後の HBV 感染は、通常の B 型肝炎とは異なる特殊な病態であり、これらの病態から明らかとなる知見は、HBV のウイルス動態や肝炎発症機序、治療法を考える上で重要な手がかりを与えてくれる。特に *de novo* B 型肝炎の対策を立てる上で、肝移植症例から明らかとなった知見は非常に重要である。

肝移植後に B 型肝炎再活性化が問題となる 2 つの異なる病態がある。ひとつは、HBs 抗原陽性レシピエントにおける肝移植後の B 型肝炎であり、自然経過では肝移植後に高率に HBV が再感染し、免疫抑制剤などの影響で急速に進行する。現在は核酸アナログ製剤と高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン (HBIG) の併用によって大部分の症例で再活性化予防が可能となっている。もうひとつは、HBs 抗原陰性・Hbc 抗体陽性ドナーからの肝移植後のレシピエントにおける B 型肝炎であり、グラフト肝に潜伏感染している HBV が免疫抑制剤な

どの影響で肝移植後に活性化して *de novo* B 型肝炎を引き起こす。その対策はまだ十分確立されておらず、HBIG 投与などの予防策が行われている現在も HBs 抗体エスケープ変異株などによる HBV 活性化例が存在し、問題となっている。

いずれの病態も、日常診療で遭遇する非移植例での HBV 感染とは異なる病態であり、肝移植以外の通常の B 型肝炎診療の進歩につながる興味深い知見が得られてきている。さらに、ドナーの HBV マーカーやレシピエント HBV マーカーと肝移植後の臨床像の解析から、さらに新しい知見が得られる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝移植症例の臨床像の検討によって HBV の感染様式を明らかにし、免疫抑制状態における最適な HBV 対策を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) *de novo* B 型肝炎における HBV の特徴の解析：

HBs 抗原陰性・Hbc 抗体陽性健ドナーから肝移植を受けたレシピエント 75 例における、*de novo* B 型肝炎の臨床的特徴とウイルス遺伝子の変異解析を行った。

(2) 肝移植後 B 型肝炎再発の臨床的解析：  
HBV 陽性肝移植症例の肝移植後の HBV 再活性化の実態について解析を行った。

(3) HBV の次世代シーケンサー解析：

HBV 陽性慢性肝疾患症例の血中ならびに肝組織から DNA を抽出し、HBV-DNA を HBV 特異的なプライマーを用いた PCR 法にて増幅後、次世代シーケンサーにて遺伝子配列を同定し、コンピューターソフトを用いて HBV の多様性や薬剤耐性変異を含

む既知の HBV 変異解析を行った。

(4) *de novo* B 型肝炎症例の HBV 次世代シーケンサー解析:

当院にて免疫抑制状態にて発症した *de novo* B 型肝炎症例の血中 HBV の次世代シーケンサー解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) *de novo* B 型肝炎における HBV の特徴の解析:

HBs 抗原陰性・Hbc 抗体陽性ドナーから肝移植を受けたレシピエントにおいて、肝移植後に高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG) による HBV 活性化予防を行った 75 例を対象に、肝移植後 *de novo* B 型肝炎の発症について解析した結果、19 例 (25%) で HBV の活性化を認めていることが明らかとなった。その原因としては、HBIG の中止が 8 例、HBs 抗体エスケープ変異株出現が 7 例、原因不明が 4 例であった。HBs 抗体エスケープ変異株による HBV 活性化の臨床的特徴として、HBs 抗原と HBs 抗体が共に陽性であること、エンテカピルの早期投与が効果的であることが明らかとなった。HBV の遺伝配列の解析から、HBs 抗原内の共通抗原基 a に異なる 3 種類の HBs エスケープ変異を同定した。

(2) 肝移植後 B 型肝炎再発の臨床的解析:

HBV 陽性肝移植症例の肝移植後にエンテカピルと HBIG を投与した症例では HBV の再活性化は認めなかったが、ラミブジン + HBIG による予防策を行った症例では 5 年で 6% の再発を認めた。HBV 再発の原因として、ラミブジンに対する耐性変異株の増加を認めた。

(3) HBV の次世代シーケンサー解析:

HBV の遺伝子配列の次世代シーケンサー解析の実験方法を確立させた。HBV 陽性慢性肝疾患症例の血中と肝組織に存在する HBV はいずれも多様性に富んでおり、薬剤耐性変異やプレコア変異、コアプロモーター変異、HBs エスケープ変異を持つウイルスが各症例で種々の割合で存在していることを明らかにした。

(4) *de novo* B 型肝炎症例の HBV 次世代シーケンサー解析

次世代ゲノムアナライザーを用いて、HBs 抗原陰性・Hbc 抗体陽性者から、免疫抑制状態において HBV が再活性化した症例の血中 HBV を解析した結果、HBV の多様性は、HBs 抗原陽性例の HBV と比較して有意に低いことが明らかとなった。重症化に関与することが明らかとなっている、G1896 の変異については、野生型か変異型かのどちらかが相互排他的に存在していた。

#### 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 15 件)

Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H. Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. *J Hepatol.* in press  
doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.033.

Ueda Y, Yoshizawa A, Y Ogura, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Chiba T, Uemoto S. Plasma cell hepatitis induced by the termination of antiviral therapy for

recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Hepatol Res.* in press.

doi: 10.1111/hepr.12243.

Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S. Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation.* 2014; 97(3): 344-350.

doi: 10.1097/01.TP.0000435702.61642.0a.

Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res.* 2013; 43: 67-71.

doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01020.x.

Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, Teramukai S, Uemoto S, Chiba T. Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58380.

doi: 10.1371/journal.pone.0058380.

Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected

liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(11): 3645-3652.

doi: 10.1128/JCM.00676-13.

Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat.* 2012; 19(1):32-38.

doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01398.x.

Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of Hepatitis B Virus Quasispecies in Association with Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS One.* 2012;7(4):e35052.

doi: 10.1371/journal.pone.0035052.

Ueda Y, Marusawa H, Egawa H, Okamoto S, Ogura Y, Oike F, Nishijima N, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. De novo activation of HBV with escape mutations from hepatitis B surface antibody after living donor liver transplantation. *Antivir Ther.* 2011; 16(4): 479-487.

doi: 10.3851/IMP1771.

Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with

antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24907.  
doi: 10.1371/journal.pone.0024907.

〔学会発表〕(計 5件)

上田 佳秀、千葉 勉、上本 伸二. 臓器移植後の肝炎ウイルス対策の現状と問題点. 第 49 回日本移植学会総会. 京都. 2013 年 9 月 7 日

上田 佳秀、吉澤 淳、海道 利実、小倉 靖弘、岡本 晋弥、小川 晃平、秦 浩一郎、藤本 康弘、伊藤 孝司、丸澤 宏之、宮川 文、羽賀 博典、千葉 勉、上本 伸二. 肝移植後HBV対策の現状と問題点. 第30回日本肝移植研究会. 福岡. 2012年6月14日

Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Toshimi Kaido, Yasuhiro Ogura, Kohei Ogawa, Atsushi Yoshizawa, Koichiro Hata, Tsutomu Chiba, Shinji Uemoto. Safety and efficacy of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. The American Association for the Study of Liver Diseases 62th annual meeting. San Francisco, CA, USA. November 5, 2011.

上田 佳秀、海道 利実、小倉 靖弘、小川 晃平、吉澤 淳、秦 浩一郎、八木 真太郎、江川 裕人、千葉 勉、上本 伸二. 肝移植における肝臓内科医の役割. 第 47 回日本移植学会総会 仙台、2011 年 10 月 6 日

上田 佳秀、西島 規浩、丸澤 宏之、上本 伸二、千葉 勉. HBs 抗体エスケープ変異を有する HBV の自然発生頻度と病態形成へ

の関与. 第 47 回日本肝臓学会総会. 東京. 2011 年 6 月 2 日

〔図書〕(計 2件)

上田 佳秀 他. 医薬ジャーナル社. *de novo* B型肝炎 HBV 再活性化予防のために基礎知識. 2013 年. p118-126

上田 佳秀 他. 医薬ジャーナル社. 肝移植後の抗ウイルス治療. 肝硬変のマネジメント 改訂版. 2011 年. p152-157

〔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

上田 佳秀 (UEDA, Yoshihide)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 90378662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし