

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791192

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスの変異及び免疫複合体が母子感染に与える影響についての検討

研究課題名(英文) Comparative analysis of HVR sequences of HCV genomes in children who developed a persistent carrier state after mother-to-infant transmission with or without subsequent viral clearance

研究代表者

横山 孝二 (Yokoyama, Koji)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50528495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：HCV母子感染例について、超可変領域(Hypervariable region：HVR)の経時的推移を観察した。2例については、乳児期からの経過を追い、1例は自然陰性化し、1例は持続感染となった。自然陰性化例では、HVRに大きな変化はなく、1-2アミノ酸変異のみであったが、持続感染例では、10か月時に飛躍的な変異が生じ、以降も2-10か月ごとの周期でウイルスの大きな変化を繰り返していた。HVRのアミノ酸変異がウイルスの自然陰性化に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Two babies born to HCV-infected mothers were included. Patient A was infected with HCV genotype 2b and Patient B with genotype 1b. Patient B exhibited a spontaneous clearance of HCV at the age of 4. Sequence similarity comparisons and phylogenetic analysis of HCV strains were derived from serum samples of them. Evolution of the HVR-1 was investigated by analyzing the quasispecies heterogeneity and diversity among samples.

In Patient A who presented persistent HCV infection, the quasispecies changed drastically at 10 months of age. The major strain of HVR-1 changed sequentially and drastically. On the other hand, in Patient B, the quasispecies was almost homogenous. The number detection of amino acid substitutions was only one or two throughout the follow up period. Eventually infantile immune response changes the HCV population from quasispecies to homogenous nature. The evolution of HVR-1 during the second half of infancy may contribute to the viral persistence in the host.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：小児消化器病学

キーワード：C型肝炎 超可変領域・HVR 母子感染 自然排除 quasispecies 免疫複合体 ウイルス変異

1. 研究開始当初の背景

(1) HCV は約 9.4 kb の線状一本鎖 (+ 鎖) RNA ウイルスである。血液をはじめとする体液を介して感染するが、輸血のスクリーニング検査が向上した現在では主要な感染経路は周産期の母子感染である。HCV 感染は高率にキャリア化し、その多くは慢性肝炎、肝硬変へと進行し、肝細胞癌のリスクが高くなることから、感染予防は極めて重要である。

(2) HCV の構造蛋白の一つである E2 蛋白の超可変領域 (hypervariable region : HVR) は変異が顕著であり、同一宿主内の HCV 株であっても多数の変異体が存在する (quasispecies)。

(3) ウイルスの増殖には HVR に対する抗体が関与していると考えられ、抗体が結合し免疫複合体を形成したウイルス粒子には感染性がなく、免疫複合体を形成していないフリーな状態のウイルス粒子に感染性があることがチンパンジーへの感染実験で示されている (Kojima et al., *Virology* 204:665-672, 1994)。

(4) 本邦の HCV キャリアは 150 万人以上と推定されており、妊婦の HCV 抗体保有率は 0.5~1 % と考えられている。HCV の母子感染率は、HCV RNA 陽性妊婦からの出生児で 5~10 % 程度と推測されている。HCV RNA 陰性妊婦からの母子感染の報告はない。

(5) 母子感染を予防する有効な方法は確立されていない。母子感染の危険因子として、母体血中 HCV の高ウイルス量、ヒト後天性免疫不全ウイルス (HIV) との重感染などが挙げられている。分娩様式については、母子感染とは関連ないとする見解であったが、近年選択的帝王切開により母子感染率が低下するとの報告もある。

(6) 周産期の母子感染例では、約 30 % が 3 歳までにウイルスが陰性化するとされている。3 歳以降はウイルスの陰性化率は著しく低下し、キャリア化する可能性が高くなる。児のウイルス量が少ない症例で自然陰性化率が高いとする報告は

あるが、陰性化の機序については解明されていない。母体由来の移行抗体から児が産生する抗体への置換とそれに起因する HVR の変異が、ウイルスの自然陰性化と関連があると推測している。

(7) ヒトにおける母子感染においても免疫複合体を形成していない血清中のフリーの状態のウイルス粒子が感染に関与している可能性が示唆されるが、それを証明する報告はない。

2. 研究の目的

(1) C 型肝炎ウイルス (以下 HCV) の母子感染後のウイルス変異が、児のウイルス量、ウイルスの自然陰性化に与える影響を遺伝子学的側面から解明する。

(2) HCV 母子感染後の免疫複合体形成との関連について免疫複合体を形成したウイルスと形成していないウイルスとの感染性の比較を行うことで検討する。

(3) それらを通じて、HCV の母子感染後の自然史を解明し実際の診療に反映させる。

3. 研究の方法

(1) 対象は本学附属とちぎ子ども医療センターで経過観察中の HCV 母子感染によるキャリアのうち本研究に対し文書で同意を得られたものとした。母子感染例 2 例について、乳児期から 4 歳までの検体を用いて HVR-1 の解析を経時的に行った。1 例 (Patient A) は持続感染となり、1 例 (Patient B) は HCV が自然陰性化した。Patient A は生後 1 か月から 51 か月まで、Patient B は生後 8 か月から 56 か月までの検体を用いた。

(2) また、自然陰性化例 3 例、持続感染例 2 例について、免疫沈降により免疫複合体形成の有無で 2 つに分類し、HVR の解析を行った。母に関しても、同意書を取得の上、児の当科初診時に検体の採取を行った。

(3) 検体の採取は、定期外来受診時の血液検査実施時に合わせて血清 2ml を採取する。得ら

れた検体は、-80 のフリーザーで凍結保存した。

(4) RNA の抽出、cDNA 合成

血清あるいは遠心画分 50~100 μ l から TRIZOL-LS を用いて RNA を抽出し、RNase OUT、Superscript を用いて cDNA 合成を行った。

特異 primer を用い、HVR の nested PCR を施行した。

(5) cDNA の cloning

cDNA の精製後、精製された cDNA とプラスミドベクター (pT7Blue T-Vector) の Ligation を行った。

遺伝子組換え大腸菌を用い形質転換を行い、E.coli に Ligation した cDNA を添加した。培地上の colony をチップ先端で colony を採取し、colony direct PCR を行った。

cDNA の sequence を行った。

10 clone を採取し解析を行った。

データの解析は、GENETYX(ver.10)、MEGA6 を用いて行った。

乳児期から解析を行った 2 例については、HVR-1 の変異について、非同義置換(dN)、同義置換(dS)を用いて解析を行った。

(6) 免疫沈降、cloning

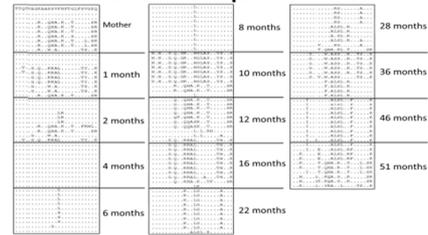
血清 20 μ l を用いて Protein G-Mag Sepharose による免疫沈降を行い、免疫複合体を形成したサンプル(Bf)と免疫複合体を形成していないサンプル (Ff) に分離した。同様の 3 回実施し、サンプルを得た。得られたサンプルを精製後、RNA を抽出し、HVR の PCR を行った。

PCR 産物を用いて、(4)と同様に cloning を行う。それぞれ 100 clone ずつを採取し、解析を行った。

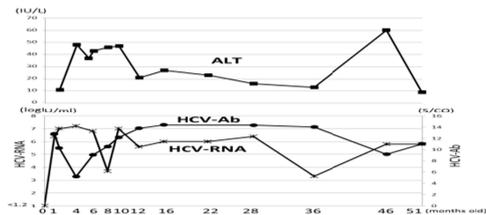
4 . 研究成果

(1) 母子感染例 2 例の経時的検討

Evolution of HVR-1 sequences in Patient A

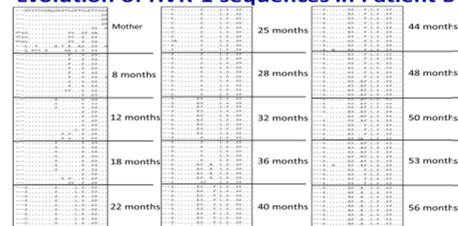


左上に母(産後 1 か月の検体)から得られた 10 clone のアミノ酸配列を示し、以降 Patient A の 1 か月から 51 か月までのアミノ酸配列の結果を示している。母の major population と相違があるアミノ酸のみが表示されている。母の major population と児の major population は同一であった。その株は 4 か月時に単一となったが、その後 10 か月時に飛躍的な変異が出現した。この変異株は母・児には認められていない株であった。本株は 12 か月時には消失しており、また新たな株が出現し、16 か月時にはその株が major population となった。10 か月以降は、このように新たな株の出現、増殖、消退を 2-10 か月毎に繰り返している。

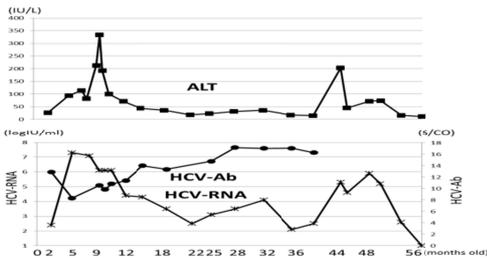


Patient A では、母からの移行抗体は最低となった生後 4 か月時に quasispecies は単一となった。その後獲得免疫の上昇に合わせて肝障害を認めた。ALT 値は児の獲得抗体が定常状態になった 12 か月以降正常化している。10 か月時に quasispecies の飛躍的な進化を来しているが、その際に HCV-RNA が再上昇している。

Evolution of HVR-1 sequences in Patient B



一方、Patient B では母(産後 8 か月の検体)と児の 8 か月時の検体は近似していたが、アミノ酸の挿入と 1-2 アミノ酸の変異がみられた。Patient B では、Patient A のような飛躍的な変異は見られず、1-2 アミノ酸の変異のみであった。TaqMan 法によるリアルタイム PCR でウイルスが検出できなくなった 56 か月時には単一の population となっていた。



Patient B では、獲得抗体が優位となる生後 5 か月以降に ALT 値の上昇を認めているが、ALT 値は Patient A に比し、3-5 倍高値であった。HVR-RNA 量が減少・陰性化する前に ALT 値の一過性上昇を認めた。

Within the sample variability of HVR-1

Patient A (Persistent infection)						Patient B (spontaneous clearance)					
Age (months)	dN	dS	dN/dS	ALT (IU/L)	HCV-RNA (logU/ml)	Age (months)	dN	dS	dN/dS	ALT (IU/L)	HCV-RNA (logU/ml)
1.2	18.7	18.9	0.98	46	7.0	8	1.8	1.0	1.79	11.3	6.1
2	18.3	17.7	1.03	31	7.0	12	4.5	2.0	2.25	71	4.4
4	15.6	15.8	0.98	46	7.0	18	4.0	1.6	2.50	36	3.5
6	2.5	1.3	2.49	43	6.8	22	2.0	0.0	NV	18	2.5
8	0.4	0.4	1.0	37	6.0	25	1.7	1.0	1.70	23	3.1
10	26.7	24.9	1.07	47	7.0	32	0.4	1.0	0.38	36	4.1
12	15.2	15.1	1.01	23	5.6	36	2.4	1.4	1.71	17	2.1
16	11.0	10.4	1.05	67	6.0	40	0.4	0.0	NV	15	2.5
22	2.4	1.5	1.53	23	6.0	44	0.4	0.0	NV	103	5.3
28	12.2	8.1	1.50	35	6.4	45	0.4	1.0	0.36	45	4.6
36	11.8	11.3	1.04	33	3.3	48	1.0	0.0	NV	22	5.9
46	0.4	0.0	NV	60	5.8	50	2.4	0.0	NV	74	5.2
51	25.5	23.8	1.07	9	5.8	53	1.4	0.0	NV	16	2.6
						56	0.0	0.0	NV	13	-1.2

サンプル内の解析では、Patient A では高い dN、dS 率から低い dN、dS 率への変化を数か月周期で繰り返している。一方 Patient B では dN・dS 率は Patient A にくらべ 1/10 程度と低く、また変化も少なかった。dN、dS、dN/dS 比と ALT 値、HCV-RNA 量には相関関係はなかった。

Between group mean distance

Patient A (持続感染)					Patient B (自然排除)				
Age	dN	dS	dN/dS	ALT	Age	dN	dS	dN/dS	ALT
1-2 (months)	20.3	17.7	1.15						
2-4 (months)	12.5	13.4	0.94						
4-6 (months)	5.2	5.4	0.97						
6-8 (months)	1.9	1.7	1.11		8-12 (months)	4.9	0.8	6.16	
8-10 (months)	40.3	25.0	1.61		12-18 (months)	4.9	2.4	2.04	
10-12 (months)	46.0	33.0	1.39		18-22 (months)	0.6	3.5	2.44	
12-16 (months)	27.3	29.2	0.93		22-25 (months)	2.7	0.5	5.27	
16-22 (months)	21.3	9.3	2.30		25-28 (months)	2.5	0.5	5.18	
22-28 (months)	10.9	4.4	2.50		28-32 (months)	2.9	0.5	5.80	
28-36 (months)	18.3	14.2	1.29		32-36 (months)	2.0	5.4	0.37	
36-46 (months)	20.1	11.9	1.70		36-40 (months)	4.2	5.0	0.83	
46-51 (months)	22.6	18.2	1.24		40-44 (months)	0.4	0.0	NV	
					44-48 (months)	0.9	0.0	NV	
					48-50 (months)	0.8	0.0	NV	
					50-53 (months)	1.8	0.0	NV	
					53-56 (months)	4.8	0.0	NV	

サンプル間の比較でも、Patient A では dN、dS は高率から低率への変化を繰り返し、Patient B では、低い dS、dN であった。Patient A では生後

16 か月以降は、dN/dS 比は 1 を上回っており、positive selection が起きていると考えられた。

<考察>

1. HVR-1 の変異の多様性 (乳児期早期)

児の 1 か月時の主要変異体は母と同一株であった。またその変異体は、4 か月時に単一となった。移行抗体が減少し、獲得抗体が優位となる時期に一致していた。ウイルスは、抗体減少により選択圧が低下し、宿主環境に適応する。その後、浄化選択 (Purifying selection) が起き、単一の変異体となると考えられた。

2. HVR-1 の変異の多様性 (乳児期後期)

持続感染例(Patient A)では、10 か月時に飛躍的な変異が起きた。獲得抗体の産生により、選択圧が強まったことが要因であり、Quasispecies は HCV 抗体産生(選択圧)に依存すると考えられた。

3. 選択圧と quasispecies の進化

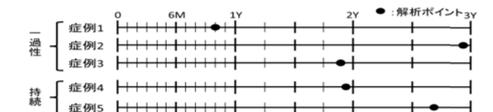
持続感染例 (Patient A)では、Positive selection (dN/dS >1) が繰り返し起きている。一方で自然排除例 (Patient B)では、非同義置換率が低かった (本例では同義置換率も低値)。Quasispecies の進化は、宿主環境に最適化するための selection の結果であり、持続感染例では、宿主免疫に応じて、positive selection が継続的に起きており、これは免疫寛容状態となるまで続けられると考えられた。

<結論>

移行抗体、獲得抗体、選択圧、ウイルス変異が HCV の持続感染/自然排除に関与している。Positive selection が持続感染の主因をなす可能性が考えられた。また、自然陰性化例では HVR-1 の多様性が少なく、持続感染例では多様性が豊富であると考えられた。

(2) 自然陰性化と免疫複合体形成に関する検討

症例	年齢	陰性化年齢	Titer	genotype	IL28B	
					rs12979860	rs8099917
一過性 症例1	10M	1Y5M	1.6E+03	1b	CC	TT
一過性 症例2	2Y11M	3Y5M	2.5E+04	2a	CC	TT
一過性 症例3	1Y10M	3Y5M	5.9E+05	1b	CC	TT
持続 症例4	1Y11M		2.9E+05	2a	CC	TT
持続 症例5	2Y 8M		3.4E+05	2b	CC	TT



一過性感染例 4 例、持続感染例 2 例について、上記のポイントで解析を行った。

Frにのみ認められたウイルス
(生き延びる可能性のあるウイルス)

	症例1 (10M)	症例2 (2V11M)	症例3 (1V10M)	症例4 (1V11M)	症例5 (2V8M)
ニ2アミノ酸	3	4	0	1	0
ニ1アミノ酸	3	9	0	2	6
パターン	1	9	-	2	5

Bfにない strain(生き延びる可能性があると考えられるウイルス)が持続感染例では Fr に 100 個中数個(数パターン)認められた。一過性感染では quasispecies の drastic な変化はなく、また持続感染例では抗体による捕捉を免れる drastic な変化を来すと予測していたが、予測に反する例が一過性感染例に 1 例(症例 2)あり、major strain と大きく異なる strain が存在した。本例は経過中ウイルス量が大きく変化、一過性感染の他の 2 例とは異なる機序でウイルスが排除された可能性も考えられる。Bf には存在せず、Ff には存在する strain が認められ、この strain が感染持続に関与している可能性がある。今回は 1 ポイントでの評価でありそれを証明できなかった。前述した Patient A、Patient B を対象として用いて、母子感染後の quasispecies の経時的な変化を検討する方針としている。10 クローンのみでは、quasispecies 全体を評価できないと考えられ、次世代シーケンサーによる検討を行う方針としている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Yokoyama K, Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Yotsumoto S, Okamoto H, Momoi MY ; Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. Arch Virol , 査読有, 156 : 1591-1601, 2011

横山孝二、熊谷秀規、木村岳人、四元 茂、岡本宏明、桃井眞里子 ; PEG-IFN/リバ

ビリン併用療法が奏功した HCV 2b/1b recombinant 感染症小児 C 型慢性肝炎の 1 例・日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌、査読有、26 : 5-11, 2012

[学会発表] (計 3 件)

横山孝二、熊谷秀規、四元茂、岡本宏明、桃井眞里子 ; ワクチン接種の継続により B 型肝炎ウイルスが陰性化した母子感染例・第 37 回日本小児栄養消化器肝臓学会 . 2010.11.9

横山孝二、熊谷秀規、木村岳人、四元茂、岡本宏明、桃井眞里子ら ; HCV 2b/1b recombinant strain の解析 . 第 38 回日本小児栄養消化器肝臓学会 . 岩手. 2011.10.8

Koji Yokoyama, Hideki Kumagai, Hiroaki Okamoto ; Comparative analysis of the hypervariable region sequences of hepatitis C virus genomes in children who developed a persistent carrier state after mother-to-infant transmission with or without subsequent viral clearance. Taiwan-Japan Joint Meeting & 2014 Annual Meeting of Taiwan Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (TSPGHAN). June 7th 2014

[その他] (計 1 件)

横山孝二、岡本宏明 : 母児感染が問題になる感染症 B/C 型以外のウイルス性肝炎 . 東京、周産期医学 41 : 225-229, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 孝二 (YOKOYAMA Koji)
自治医科大学・小児科学・講師
研究者番号 : 50528495