

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009年 3月 6日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 菅内 文中 

所属機関名： 名古屋市立大学大学院医学研究科

所属部署： 消化器・代謝内科学 職名： 病院講師
〒467-8601

所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1番地

電話： 052-851-5511 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

B型肝炎ウイルス(HBV)組換え遺伝子型の臨床的およびウイルス学的特徴の解析

3. 成果の概要(100字程度)

中国および本邦でのB型慢性肝疾患患者からr-HBV-B/C (Ba)および既存の報告にない新たなr-HBV-A/Cが検出された。中国厦門地区ではr-HBVのB/C (Ba)において、CHおよびLC群と比較してHCC群において遺伝子型Cとは異なる変異が有意に高頻度に認められ、肝発癌とr-HBVによる特異的なウイルス変異との関連が示唆された。

※発表論文等

本研究成果内容の一部を以下の国際学会で発表
第18回アジア太平洋肝臓学会議(2008年3月:ソウル)
第59回全米肝臓学会議(2008年11月:サンフランシスコ)

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 菅内 文中 職名： 病院講師
所属機関： 名古屋市立大学大学院医学研究科 部署： 消化器・代謝内科学

中国側研究者氏名： 夏宁 邵 職名： 主任教授
所属機関： 厦門大学 部署： NIDVD

B型肝炎ウイルス(HBV)組換え遺伝子型の臨床的 およびウイルス学的特徴の解析

研究者氏名 菅内 文中
所属機関 名古屋市立大学大学院医学研究科
共同研究者名 夏宁 邵
所属機関 厦門大学

要旨

DNA データバンクに登録されている 807 本の HBV 全塩基配列を用いて HBV 組換え遺伝子型 (r-HBV) の検索を行なった。合計 28 種類、150 株以上の r-HBV の存在が明らかとなった。本邦の若年発症 B 型肝炎例、免疫・化学療法後の HBV 再燃例および中国厦門地区の B 型慢性肝疾患患者例を用いた r-HBV の検索において、r-HBV B/C および既存の報告にない r-HBV A/C が検出された。各 HBV クローン間の *in vitro* HBV 複製モデルを用いた検討で、遺伝子型 Bj かつ PC 変異クローンで複製がより亢進していた。遺伝子型別の検討で既報にない 171320C, 1504C, 1505C, 1800C, 2045A, 2059A, 2075G 変異が遺伝子型 B の HCC 群、126T, 2120G 変異が遺伝子型 C の HCC 群で高頻度に認められた ($P < 0.05$)。

Key Words B型肝炎、遺伝子型、遺伝子変異、肝炎ウイルス、肝癌

緒言

HBV (Hepatitis B Virus) 遺伝子型は現在までに分子系統樹を基に A から H までの 8 型に分類されている。その世界分布には地域特異性が存在し、HBV 遺伝子型と臨床像との密接な関連についても報告されている。近年 HBV 遺伝子が部分的に異なる遺伝子型に置き換わった HBV 組換え遺伝子型 (r-HBV) の存在が注目され、研究者らもこれまで各種の r-HBV を発見しその臨床的重要性について報告してきた¹⁾²⁾。しかしこれまでに r-HBV を考慮した HBV 遺伝子型分類やその臨床像との関連についての検討は十分ではなく網羅的検討がなされていない。本研究では本邦と中国の夏宁らの共同研究により r-HBV の網羅的検討を行い、その臨床的・ウイルス学的特徴を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

1) DNA データバンクに登録されている HBV 全塩基配列株を用いてコンピュータ解析により全 r-HBV の検索を行いその種類について解析を行った。2) 本邦における若年発症 B 型肝炎 14 症例、免疫・化学療法後の HBV 再燃 4 例および中国厦門地区の B 型慢性肝疾患患者 303 例の保存血清を用いて HBV 塩基配列の決定を行い r-HBV の関与および遺伝子変異と臨床像との特徴について検討を行った。3) *In vitro* HBV 複製モデルを用いて HBV クローンのウイルス複製効率の測定を行いウイルス学的特徴の検討をおこなった。

結果

DNA データバンクに登録されている 807 本の HBV 全塩基配列株について 300bp ごとに分子系統樹の作成を行い確実な非組み換え遺伝子型株 641 本を選出して分子系統樹を作成した。その 641 本をもとに sub-genotype 別を含む各遺伝子型のコンセンサス配列を作成後、残りの 166 本の

HBV 全塩基配列に対して SimPlot 解析を用いて r-HBV 株の検索を行った。SimPlot 解析にて合計 28 種類、150 株以上の r-HBV の存在が明らかとなった。遺伝子型 AD の種類が最も多く 12 種類、30 株以上の r-HBV がアフリカ、欧州、インドに分布していた。その他 2 種類の r-HBV A/C、2 種類の r-HBV A/E、1 種類の r-HBV A/G および A/B/C、アジアに広く分布する 100 株以上で最多の 2 種類の r-HBV B/C、北西中国に分布する 2 種類の r-HBV C/D、1 種類の r-HBV C/F および C/G、2 種類の U/C および 1 種類のチンパンジーと C の r-HBV が検索された。

治療前 HBs 抗原陰性で造血器悪性腫瘍に対する治療後に HBV 再活性をきたした 4 例の HBV 遺伝子型は B_j 2 例、C 2 例であり r-HBV の存在は認めなかった。CP(1762/1764)配列は全例が野生株で PC(1896)変異株は 1 例に認めた。In vitro HBV 複製モデルを用いた再活性化例の各 HBV クローン間の比較検討では、重症肝炎による死亡例の遺伝子型 B_j かつ PC 変異陽性例の HBV クローンで複製がより亢進していた (図 1)。

40 歳以下で発症した肝細胞癌 14 症例の HBV 遺伝子型は遺伝子型 A, Ba (組換え遺伝子型 B/C), C がそれぞれ 1、1、11 例に認められ、残りの 1 例は SimPlot 解析から 2814 番から 1573 番の塩基配列は遺伝子型 Ae に分類され、1574 番から 2813 番の塩基配列は遺伝子型 C に分類される既存の報告にない新たな r-HBV A/C であった(図 2)。PreS 領域において欠損変異が 64% に認められ、PreS1 と PreS2 領域の欠損変異はそれぞれ 35% と 43% に認められた。X 遺伝子の Enhancer II 領域の C1653T 変異は 29% に認められた。コアプロモーター領域の A1762T/G1764A 変異は 79% に認められた。プレコアの G1896A 変異株は 21%、野生株は 57%、混在株は 21% に認められた。

中国廈門地区の B 型慢性肝疾患患者 303 例の遺伝子型は C 144 例 (48%)、r-HBV の Ba が 159 例 (52%) に認められた。遺伝子型毎の肝臨床病期別に年齢、性別をマッチさせたケース・コントロールスタディーにおいて (表 1, 2)、肝発癌関連 HBV 変異について遺伝子型毎に検討した。遺伝子型 Ba では既報の肝発癌関連変異である 68T, 1762T, 1764A, 1768A, 1899A は HCC 群で高頻度に認められ (P < 0.05) (表 3)、既報にない新たな 171320C, 1504C, 1505C, 1800C, 2045A, 2059A, 2075G 変異が HCC 群で高頻度に認められた (P < 0.05) (表 4)。一方遺伝子型 C では既報の肝発癌関連変異である 68T, 386I, 497G, 674C, 1762T, 1764A, 1899A は HCC 群で高頻度に認められ、(P < 0.05) (表 5)。既報にない新たな 126T, 2120G 変異が HCC 群で高頻度に認められた (P < 0.05) (表 6)。

考察

中国および本邦での B 型慢性肝疾患患者から r-HBV B/C (Ba) および既報にない新たな r-HBV A/C が検出された。本邦の 40 歳以下の HBV 関連肝細胞癌発症例では遺伝子型 C が 80% を占めていたが 14% の症例に r-HBV が検出され、肝発癌には PreS 領域の欠損変異とコアプロモーター変異との関連とともに r-HBV についても考慮する必要があると考えられた。また中国廈門地区では r-HBV の B/C (Ba) が 52% に認められ、CH および LC 群と比較して HCC 群において遺伝子型 C とは異なる変異が有意に高頻度に認められ、肝発癌と r-HBV 特異的なウイルス変異との関連が示唆された。

参考文献：

- 1) Sugauchi F, Orito E, Mizokami M et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. J Virol. 76:5985-92;2002.
- 2) Sugauchi F, Orito E, Mizokami M et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. Gastroenterology. 124:925-32;2003.

図1 *In vitro* HBV 複製モデルを用いた各 HBV クローン間の複製効率の比較

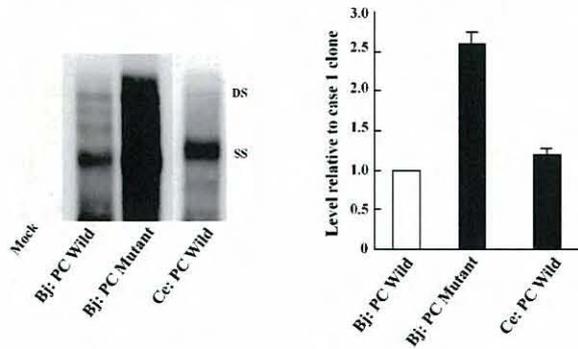


図2 本邦の若年発症肝癌例より検出された新たな組換え HBV 遺伝子型 A/C

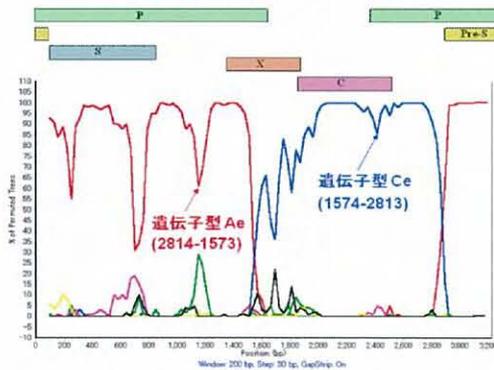


表 1

Genotype C	Clinical status			P Value
	CH (n=52)	HC (n=22)	HCC (n=70)	
Age	49±12	50±11	51±12	Matched
Sex(M:F)	42:9	15:7	10:60	Matched
HCV	0	0	0	Matched
DNA(log10)	6.2±1.6	5.2±1.4	5.0±1.3	NS
ALi(log10)	2.6±0.5	1.8±0.4	1.7±0.3	P<0.001
HBeAg	30(57.7%)	3(13.6%)	9(11.7%)	P<0.001
Anti-HBe	22(42.3%)	12(54.5%)	44(54.1%)	P=0.032
Bibulosity	6(11.5%)	3(13.6%)	13(16.9%)	NS
AFP(log10)	1.2±0.7	1.5±0.9	3.1±1.5	P<0.001
Familial	11(21.2%)	6(27.3)	8(11.4%)	NS

表 2

Genotype B	Clinical status			P Value	Base line in ASC N=83
	CH (n=86)	HC (n=16)	HCC (n=57)		
Age	48±10	50±12	49±11	Matched	32±13
Sex(M:F)	74:12	13:3	51:6	Matched	45:38
HCV	0	0	0	Matched	0
DNA(log10)	6.6±1.7	4.7±2.0	4.5±1.6	P<0.001	unknown
ALi(log10)	2.6±0.5	1.7±0.4	1.7±0.3	P<0.001	<1.6 log10
HBeAg	41(47.7%)	4(25.0%)	6(10.5%)	P<0.001	29/34.9%
Anti-HBe	31(36.0%)	7(43.8%)	38(66.7%)	P<0.001	43/51.8%
Bibulosity	15(17.4%)	10(62.5%)	10(17.5%)	P<0.001	unknown
AFP(log10)	1.2±0.8	0.8±0.6	2.6±1.6	P<0.001	unknown
Familial	17(19.8%)	6(25.0%)	7(12.3%)	NS	7(8.0%)

表 3

Reported HCC-related Mutations of Patients Infected with HBV/B in Minnan

Genotype B	Clinical status				Base line in ASC N=83
	CH (n=86)	HC (n=16)	HCC (n=57)	P Value	
I68T(sAg)	1(1.2%)	1(6.3%)	7(12.3%)	0.009	3(3.6%)
I653I(X:H94Y)	1(1.2%)	2(12.5%)	3(5.2%)	0.230	2(2.4%)
I753C(X:H127T)	1(1.2%)	0	2(3.5%)	0.494	2(2.4%)
I762I(X:K130M)	19(22.1%)	4(25.0%)	38(66.7%)	<0.001	15(18.0%)
I764A(X:V131I)	18(20.7%)	4(25.0%)	33(57.9%)	<0.001	16(18.0%)
I766T(X:Nc)	0	0	2(3.5%)	0.164	3(3.6%)
I768A(X:F132Y)	0	1(6.3%)	4(7.0%)	0.037	1(1.2%)
I896A(PcMut)	53(61.2%)	12(75.0%)	40(70.2%)	0.313	47(56.6%)
I899A(PcMut)	10(11.6%)	4(25.0%)	22(38.6%)	<0.001	10(10.8%)

表 4

New HCC-Related Mutations of HBV Infected Patients with HBV/B in Minnan

Genotype B	Clinical status				Base line in ASC N=87
	CH (n=86)	HC (n=16)	HCC (n=57)	P Value	
A1320C(Xp)	5(5.8%)	0	12(21.0%)	0.008	8(9.6%)
I504C(X:H44T)	3(3.4%)	1(6.3%)	10(17.5%)	0.006	4(4.8%)
I505C(X:Nc)	3(3.4%)	1(6.3%)	9(15.8%)	0.014	2(2.4%)
I635G(X:N88D)	1(1.2%)	1(6.3%)	4(7.0%)	0.346	1(1.1%)
I636I(X:N88I)	1(1.2%)	1(6.3%)	4(7.0%)	0.346	1(1.1%)
I800C(X:C143R)	3(3.4%)	2(12.5%)	15(26.3%)	<0.001	6(7.2%)
I2045A(C:S45I)	6(7.0%)	2(12.5%)	11(19.3%)	0.037	9(10.8%)
I2059A(C:Nc)	1(1.2%)	1(6.3%)	7(8.4%)	0.009	2(2.3%)
I2075G(C:A59V)	2(2.3%)	1(6.3%)	7(8.4%)	0.027	2(2.3%)

表 5

Reported HCC-related Mutations of HBV/C in Minnan

Genotype C	Clinical status			P Value
	CH (n=52)	HC (n=22)	HCC (n=70)	
I68T(HBsAg)	4(7.7%)	2(9.1%)	15(21.4%)	0.042
I386A(X:V4M)	9(17.3%)	6(27.3%)	29(41.4%)	0.008
I467C(X:G32R)	10(19.2%)	5(22.7%)	22(31.4%)	0.169
I497G(X:S42A)	7(13.5%)	5(22.7%)	23(32.9%)	0.018
I653T(X:H94Y)	6(11.5%)	6(27.3%)	19(27.1%)	0.056
I674C(X:S101P)	4(7.7%)	2(9.1%)	15(21.4%)	0.042
I753C(X:H127T)	8(15.4%)	4(18.2%)	21(30.0%)	0.069
I762T(X:K130M)	25(48.1%)	16(72.7%)	54(77.1%)	0.001
I764A(X:V131I)	29(55.8%)	19(86.4%)	64(91.4%)	<0.001
I766T(X:Nc)	7(13.5%)	7(31.8%)	13(18.5%)	0.620
I768A(X:F132Y)	1(1.9%)	9(40.9%)	10(14.3%)	0.114
I896A(PcMut)	17(32.7%)	10(45.5%)	40(57.1%)	0.173
I899A(C:V4M)	2(3.8%)	4(18.2%)	15(21.4%)	0.011

表 6

New HCC-Related Mutations of HBV Infected Patients with HBV/C in Minnan

Genotype C	Clinical status			P Value
	CH (n=52)	HC (n=22)	HCC (n=70)	
I126T(sAg)	10(19.2%)	5(22.7%)	28(40.0%)	0.016
I320C(Xp)	5(9.6%)	2(9.1%)	11(15.7%)	0.378
I846T(PcMut)	9(17.3%)	6(27.3%)	23(32.9%)	0.071
I2120G(C:S74G)	1(1.9%)	2(9.1%)	14(20.0%)	0.003

作成日：2009年3月6日