

厚生労働省難治性疾患対策研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業に関する調査研究班

B型肝炎における経過予測及びHBs抗原消失に
関与するウイルス遺伝子変異の探索

分担研究者 本多 隆 名古屋大学医学部附属病院 助教

研究要旨

B型肝炎症例では自然経過でHBs抗原が消失する予後の良い症例と肝炎が持続して肝硬変、肝臓に至る症例がある。B型慢性肝炎に対する標準的治療には核酸アナログ治療やインターフェロン治療がある。しかしながらB型肝炎に対する核酸アナログ治療やインターフェロン治療を考慮する際、HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。昨年度は肝炎の鎮静化にI97L変異が関与する可能性を報告した。本年度の検討ではI97Lの変異はHBeAb陽性例でHBeAb陰性例と比較して高率にみられた。変異がみられる症例ではその後の経過でHBVDNA、ALTの低下が見られ、一部の症例でHBsAgが陰性化した。

A. 研究目的

B型肝炎のキャリアは世界で約4億人、日本でも約150万人がキャリアであると推計されている。世界でB型肝炎に関連する肝硬変、肝不全、肝臓により年間約100万人が死亡しており世界的にも治療の向上が望まれる疾患である。B型肝炎に対する治療法には核酸アナログ治療やインターフェロン治療があるが、治療を考慮する際HBe抗体陽性となった症例において、その後ウイルス量が低下して肝炎が沈静化し自然経過で予後の良い、治

療介入の必要ない症例と肝炎が持続し肝硬変に進むリスクがあり治療が必要な症例を見極めることが重要になる。

またHBeAg陰性例においてPreCore(PC)領域のG1896Aの変異によりstop codon(TAG)が形成されHBeAgの産生が停止することやBasal Core Promoter(BCP)のA1762T/G1764Aの変異でPreC mRNAの転写効率が低下しHBeAg産生が減少することが報告されている。しかし、PC変異やBCPの変異によりその後の経過を予測することは難しく、自然経過で変動す

る ALT 値や HBVDNA 変動の時間的推移を勘案し適切な治療開始時を決定することが勧められている。現在日本の厚生省のガイドラインで B 型慢性肝炎 HBe 抗原陰性例では HBVDNA が 4 Log copies/mL 以上かつ ALT が 3IU/L 以上で治療の介入をすすめている。しかし、retrospective に症例の経過をみると中にはその後、結果的に自然経過で治療が必要ななかった症例もあり肝炎が沈静化するかどうか判断するための指標が望まれる。昨年度は HBeAb 陽性例の少数例で検討を行った。本年度の研究では HBe 抗体陰性症例および陽性症例において、B 型慢性肝炎症例において coreI97 変異がその後の経過に及ぼす影響を検討することを目標とした。

B. 研究方法

2 年以上経過観察ができた慢性 B 型肝炎患者(genotype C) の対象例のうち観察開始時に血清保存がおこなわれている症例で coreI97 変異が測定された 82 症例を対象とした。HBVDNA5.0 Log copies/mL 以上かつ ALT3IU/mL 以上で推移したもの或いは、肝障害の持続があり核酸アナログ製剤を使用した症例を経過不良例とし、それ以外を経過観察可能例とした。またその後の経過観察後に HBsAg が消失したかどうかも検討した。Core 領域のダイレクトシーケンスを行い確認した。

患者背景

HBeAb 陰性例は 21 例、HBeAb 陽性例

は 61 例であり、平均年齢、性別の割合、

GTP、T.Bil、Alb、血小板、観察期間に有意な差は見られなかったが、ALT は HBeAb 陰性例で 52.0 (27.0-92.0) IU/L と HBeAb 陽性例の 25.0 (17.0-41.5) IU/L と比較して有意に高値であった。また HBsAg 値はそれぞれ、3235 (1932-31809) IU/mL、1730 (476-4520) IU/mL と HBeAb 陰性例で有意に高値であり、HBVDNA は 8.5 (7.7-9.1) Log copies/mL、4.5 (3.5-5.6) Log copies/mL と HBeAb 陰性例で有意に高値であった。

HBeAb 陽性例において I97wild と I97L 変異ありの背景を比較すると、I97L 変異のある症例で年齢が 43 (35-49)歳であり I97wild の 49 (41-62)歳と比較して有意に若年であった($P=0.046$)。しかし、他の性別、ALT、GTP、T.Bil、Alb、血小板値、HBsAg、HBVDNA、観察期間に関して有意な差はみられなかった。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究は名古屋大学医学部付属病院の倫理委員会より承認されている。

この中で B 型肝炎患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。また、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報も適正に管理保存している。

C. 結果

HBsAg 陰性例、HBsAg 陽性例の I97L 変異の割合

HBsAg 陰性例において I97L 変異は 14.3% (3/21)、HBsAg 陽性例においては 50.8% (31/61) 見られ、HBsAg 陽性例で有意に高率に存在していた ($P=0.002$)。

HBsAg 陽性の有無、I97L 変異の有無によるその後の経過

HBsAg 陰性例では I97wild の症例で 1 例のみが経過観察可能例であったが、I97L 変異例も含めて他の 20 例は経過観察不良例であった。一方、HBsAg 陽性例では I97wild の症例は 36.0% (9/25) が経過観察可能例であったのに対して I97L 変異がある症例では 67.7% (21/31) で経過観察可能例であり、有意に I97L 変異がある症例で経過観察可能例が高率であった ($P=0.018$)。

HBsAg 陽性例で I97L 変異がある症例では HBVDNA は 4 Log copies/mL から徐々に低下し 3 Log copies/mL 程度まで低下したが、I97wild の症例では 5~6 Log copies/mL で推移した。ALT 値も I97L 変異がある症例では経過とともに 30IU/L 未満で推移し肝炎の鎮静化がみられたのに対して、I97wild の症例では時々 ALT の上昇がみられ、30IU/以上で推移した。

HBsAg 陽性の有無、I97L 変異の有無による HBsAg 消失の有無

HBsAg 陰性例では I97L 変異の有無に

かかわらず HBsAg の消失は見られなかった。一方、HBsAg 陽性例では I97wild の症例では HBsAg の消失はみられなかったが、I97L 変異のある症例の 8 例 25.8% で HBsAg が消失していた ($P=0.006$)。

D. 考察

本研究では I97L の変異は HBsAg 陽性例で HBsAg 陰性例と比較して高率にみられた。変異がみられる症例ではその後の経過で HBVDNA、ALT の低下が見られ、一部の症例で HBsAg が陰性化した。

I97L 変異は HBV の core 領域に自然経過中におこる最も頻度の高い変異であることが報告されている。Ehata らは I97L 変異を含む core84-101 の変異は CTL などの免疫応答による肝障害を反映したものと報告した (Ehata et al. JCI 1991. 89:332-338)。その中で HBsAg 陽性例の内 4 例全例では I97L が認められた。またその後の報告では core 84-99 の変異は劇症肝炎などの激しい肝障害と関連していることを明らかにした (Ehata et al. JCI 1993. 91:1206-1213)。

Ehata らの論文では HBsAg が陽性であるものは 4 例全例で I97L 変異が陽性であった。この違いは以前の測定法では HBVDNA が低値まで測定できなかったため、HBVDNA 4.0 LogIU/mL 未満と低ウイルス量の症例が以前の報告では検討できていない可能性があると思われた。

一方、In vitro の解析で core 領域の I97L は HBV capsid 粒子の構造や機能への感受

性が高く重要な部位であり、I97L への変異により immature secretion が認められている (Bo Ning et al. J of Virology 2004;78:13653-1366)ことから、I97L 変異が認められる症例では HBVNDNA 量が低下してくることが推察できる。今回の検討において HBeAb 陰性例で I97L 変異の頻度は低く HBeAb 陽性例では頻度が高く、更にその後 HBsAg が消失した症例もみられたことから、肝硬変でない HBe 抗体陽性で、Core I97L 変異は B 型肝炎のその後の沈静化を予測するのに有用な可能性がある。

E.結論

B 型慢性肝炎において、治療を選択するためにその後の経過を予測するには HBVDNA、ALT の値に加えて core I97L の変異測定が有用になる可能性がある。

F.健康危険情報

特記事項なし。

G.研究発表

論文発表

1. Ishigami M, Honda T, Ishizu Y, Onishi Y, Kamei H, Hayashi K et al. Frequent incidence of escape mutants after successful hepatitis B vaccine response and stopping of nucleos(t)ide analogues in liver transplant recipients. Liver Transpl. 2014;20:1211-1220
2. Imai N, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K et al. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A review of techniques. World J Hepatol. 2014;27:844-850
3. Tachi Y, Hirai T, Miyata A, Ohara K, Iida T, Ishizu Y, Honda T, et al. Progressive fibrosis significantly correlates with hepatocellular carcinoma in patients with a sustained virological response. Hepatology Research 2015;30:178-183
4. Hayashi K, Katano Y, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M et al. Association of interleukin 28B polymorphism and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with interferon responsiveness J Gastroenterol Hepatol 2015;30:178-183
5. Honda T, Ishigami M, Hayashi H, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K et al. Effect of Peginterferon alfa-2b and Ribavirin on Hepatocellular Carcinoma Prevention in Older Patients with Chronic Hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol 2015;30:321-328
6. Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K et al. Hepatitis B e antigen and hepatitis B surface antigen seroclearance with emergence of lamivudine-associated mutation and core mutation after elevation of CD4 in a patient with hepatitis B and HIV. Internal Medicine 2015;54:585-590

7. Ishizu Y, Ishigami M, Suzuki N, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K et al. Endoscopic treatment of esophageal varices on hemophilic patients with liver cirrhosis. *Gastrointest Endosc* 2015;81:1059-1060
8. Yamada K, Ishigami M, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Goto H. Association between responses to interferon therapy and genetic variation in interferon -28B and the core region of hepatitis C virus genotype 3a. *J Med Virol*. In Press.
9. Ando T, Kojima K, Isoda H, Eguchi Y, Honda T, Ishigami M, Kimura S. Reactivation of resolved infection with the hepatitis B virus immune escape mutant G145R during dasatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. In Press.
10. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、石川哲也、中野 功、片野義明、後藤秀実。C型慢性肝炎難治例における Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果と発癌抑制効果。消化器科 2014;58:337-341
11. 学会発表
 1. Honda T, Ishigami M, Luo F, Ishizu Y, Kuzuya T, Hayashi K, Shimomura Y, Goto H Oral supplementation of BCAA alleviates hepatic steatosis and liver injury associated with NASH 63th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD). Nov. 9, 2014 Boston
 2. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、石川哲也、中野 功、後藤秀実。HBe 抗体陽性 B 型慢性肝炎における経過予測に必要なウイルス遺伝子変異の検討。分岐鎖アミノ酸による NASH マウスモデルにおける肝脂肪抑制効果。第 100 回日本消化器病学会総会 平成 26 年 4 月 26 日 東京都
 3. 本多 隆、石上雅敏、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、中野 聡、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、片野義明、後藤秀実。C 型慢性肝炎難治例における PegIFN・Ribavirin・Telaprevir3 剤併用療法の治療効果。第 50 回日本肝臓学会総会 平成 26 年 5 月 29 日 東京都
 4. 本多 隆、石上雅敏、加藤幸一郎、新家卓郎、今井則博、阿知波宏一、荒川恭宏、山田恵一、石津洋二、葛谷貞二、林 和彦、中野 功、石川哲也、後藤秀実。高齢者 C 型慢性肝炎における PegIFN・Ribavirin・Simeprevir3 剤 併 用 療 法 の 治 療 効 果 。

JDDW-Japan2014 平成 26 年 10 月 8 日

5. 本多 隆、石上雅敏、後藤秀実. B 型肝炎における経過予測及び HBs 抗原消失に関するウイルス遺伝子変異.
第 40 回日本肝臓学会東部会 平成 26 年 11 月 27 日 東京都

H.知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし