

4. B型肝炎ウイルス感染による肝細胞傷害の機序 ～ HBV 遺伝子型と病原性～

田中 靖人¹⁾, 杉山 真也^{1,2)}, 溝上 雅史²⁾

1) 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学, 肝疾患センター

2) 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター

B型肝炎ウイルス (HBV) はB型肝炎の原因ウイルスであるが, 無症候性キャリアが存在することから, ウイルスの直接的な細胞傷害性はないと広く考えられていた. 一方で, 生体肝移植後の免疫抑制時におけるB型肝炎やヒト免疫不全ウイルス (HIV) との共感染例においてHBV増殖及び肝線維化が急速に進展するという報告がなされ, HBVによる直接的な肝傷害性が示唆されている. また, HBVには遺伝子型や特異的な変異が存在し, 病態形成に関与していることが報告されている. 我々は, HBV遺伝子型に対応した複製クローンを作成し, *in vitro*細胞培養系で遺伝子型によるウイルス複製や蛋白産生能の違いを示している. さらに, 近年樹立されたヒト肝臓を持つヒト肝細胞置換免疫不全マウス (キメラマウス) を用いて, 各HBV遺伝子型の感染実験を行い, そのウイルス学的な特徴及び病原性の違いを明らかにしたので, 概説する.

はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) はB型肝炎の原因ウイルスであるが, 無症候性キャリアが存在することから, ウイルスの直接的な細胞傷害性はないと広く考えられていた. 一方で, 生体肝移植後の免疫抑制時におけるB型肝炎やヒト免疫不全ウイルス (HIV) との共感染例において肝線維化が急速に進展するという報告がなされている¹⁾. また, 基礎研究の分野からも細胞株に対するHBVの直接傷害性を示すデータが報告されている. しかしながら, HBV研究の分野では*in vitro*, *in vivo*での有用な感染モデルが存在しなかったために, HBVが示す上記のような病原性について研究を進めることが困難であった.

ところが, ヒト肝臓を持つヒト肝細胞置換免疫不全マウ

ス (キメラマウス) が近年樹立され, HBVの感染実験が比較的容易に行えるようになった. 本稿では, キメラマウスのHBV感染実験で明らかとなった各HBV遺伝子型の性質と病原性の違いについて紹介する.

1. B型肝炎の臨床的背景

HBV感染は主要な世界的健康問題の一つである. HBV感染者数は全世界で4億2千万人, B型肝炎による死亡者数は毎年世界で50万人以上であるといわれている. 本邦での感染率は約1%程度であると推定されており, 感染者数は150万人程度であると考えられている. これまでの国内のHBV感染者のほとんどが母児感染によるものであったが, 近年ではHBs抗原陽性の妊婦からの出生児には, HBIGやワクチン投与が行われており, 新たな母児感染例は稀となった. しかし, 最近では若年者の性行為感染症や薬物中毒者の中でB型急性肝炎が増加しており社会的な問題となりつつある.

臨床像に目を向けると, 同じHBV持続感染者であっても, 臨床病態として早期に肝硬変に進行し, さらに肝細胞癌にまで進展する例と, その病態がほとんど進行しない例が見られる. その要因の一つで, ウイルス側の因子として注目されているのがHBV遺伝子型である. ウイルス複製の過程に逆転写反応を利用するHBVは他のDNAウイル

連絡先

〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学
田中 靖人
TEL: 052-853-8191
FAX: 052-842-0021
E-mail: ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp

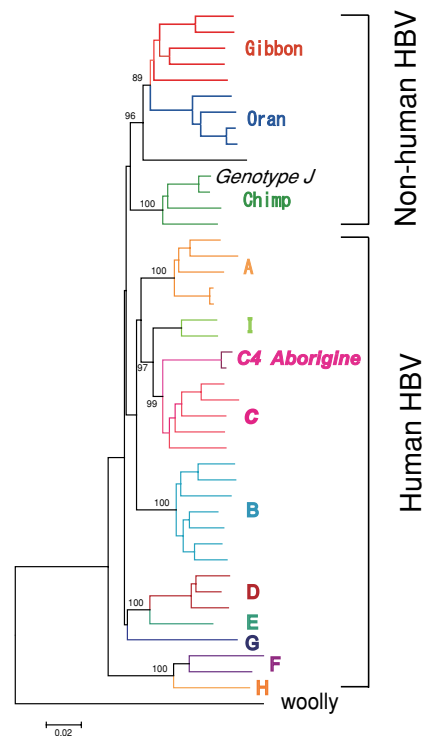


図1 HBV ゲノムを用いた分子系統解析による遺伝子型分類

スと比較して変異が入りやすい。加えて、母子感染で同じ系統のウイルスが代々受け継がれたり、小児期の水平感染により伝播されたりすることにより、HBV 遺伝子型に地域特異性が生まれたと考えられている。最近の臨床的・ウイルス学的検討により B 型肝炎の病態の違いは、HBV 遺伝子型の違いに起因していることが明らかとなってきた²⁾。

2. HBV 遺伝子型の地理的分布

HBV 遺伝子型は HBV の遺伝子配列を用いた分子系統解析により、現在 A 型から J 型までの 9 つの遺伝子型 (Genotype I は C の亜型) に分類され、さらに、それに続く亜型 (subgenotypes) へと細分化されている (図 1)³⁾。興味深いことに、この分子系統解析により分類された遺伝子型または亜型には地域特異性が存在している。すなわち、遺伝子型 A はアフリカ型 (HBV/A1/Aa) と欧米型 (HBV/A2/Ae) に分類され、遺伝子型 B も日本型 (HBV/B1/Bj) とアジア型 (HBV/B2-B5/Ba) に亜型分類されている。遺伝子型 C (HBV/C) は主にアジアに分布し、東南アジア型 (HBV/C1/Cs)、極東型 (HBV/C2/Ce) に細分化されている。遺伝子型 D は中央アジア型 (HBV/D1)、ロシア型 (HBV/D2)、アジア内陸型 (HBV/D3)、ヨーロッパ・アフリカ型 (HBV/D4) 等に分類される。E は西アフリカに分布している (図 2)。そして、F、H は主に中南米に分布し、G は現在のところ北米やヨーロッパ、日本か

ら報告されている。最近、サルスの配列に近い遺伝子型 J がボルネオ渡航歴のある日本人より分離された。こうした系統解析により、HBV 遺伝子型の地理的分布が明らかとなり、HBV の感染経路や起源を探索することが可能となった。現在までに、遺伝子型による臨床的差異は数多く報告されており、この遺伝子型分類の有用性が明らかにされている²⁾。

3. 主な HBV 遺伝子型とその特徴

これまでの B 型肝炎に対する研究では、世界的に存在頻度が高い HBV/A から D がその対象となってきた。そのため、それらの遺伝子型が示す病態やウイルス学的な特徴がよく知られている。前述のように各遺伝子型の分布には地域性があるが、大まかに分けて、欧米・アフリカ地域では HBV/A と D が主に拡散しており、東南アジア・極東地域では HBV/B と C が主な遺伝子型となっている (図 2)。

1) HBV/A と HBV/D

HBV/A2/Ae は一般に予後良好であるが、アフリカに存在する HBV/A1/Aa は肝細胞癌の発症率が高いとされている⁴⁾。一方、HBV/A2 は近年、本邦において若年者の間での水平感染に関与している遺伝子型である。本来、欧米に多く存在する HBV/A2 は、ユニバーサル HB ワクチンが実施されていないわが国において主に性行為により、若者の間

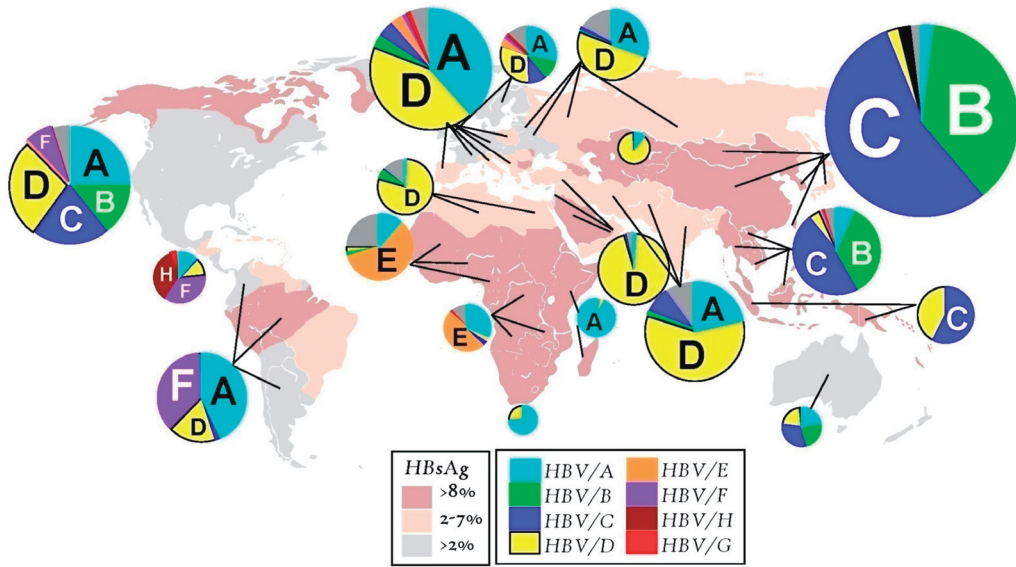


図2 HBV 遺伝子型の世界分布

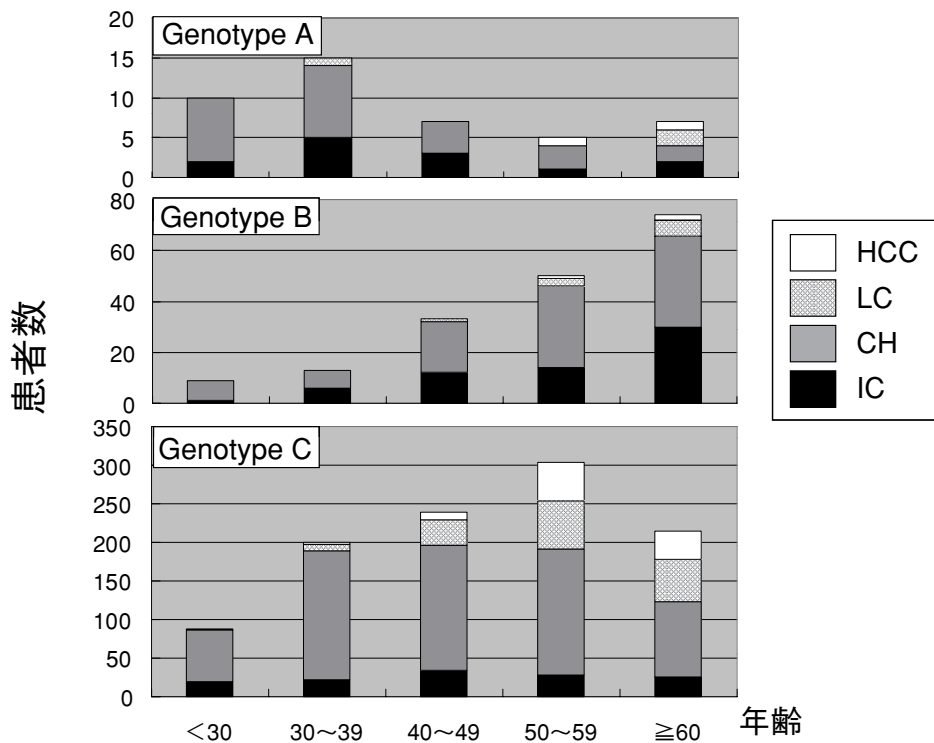
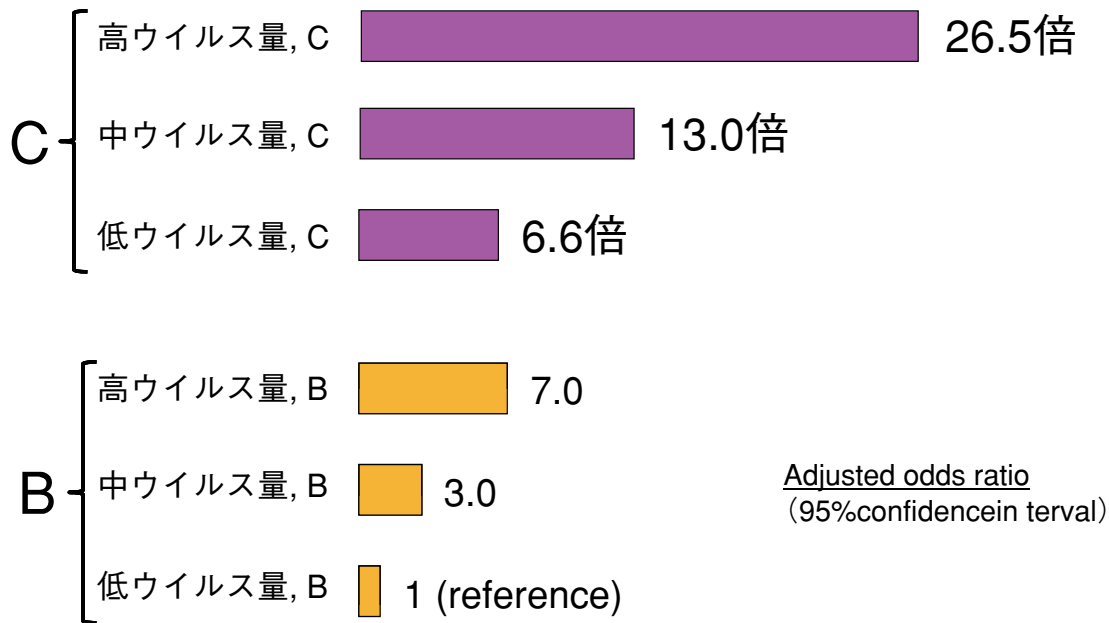


図3 各 genotype における年齢別の病態

で感染が広がっていることが最近の検討から明らかとなっており、都市部を中心に HBV/A2 の割合が増えつつある⁵⁾。B 型肝炎は一般的には、成人期の感染では急性肝炎後にウイルスが排除され肝炎が鎮静化するが、この HBV/A2 では急性肝炎後遷延化する傾向があり、キャリア化しやすいこ

とがその特徴である。

実際我々は、2005～2006年に全国16施設共同研究で、B型慢性肝疾患患者1271例におけるHBV遺伝子型の再調査を行ったところ、HBV/Aが2000～2001年の調査時と比べ約2倍(3.5%)増加し、遺伝子系統解析からは、わ



(Yu MW et al., J Natl Cancer Inst 2005)

図4 肝癌のリスク。高ウイルス量かつ遺伝子型Cで最もリスクが高い

が国のなかでHBV/A株はすでに複数存在し、水平感染により蔓延していることが示唆された⁵⁾。年齢別の検討では若年層にHBV/Aが増加していることが明らかとなっている。しかもHBV/Aは無症候性キャリアか軽度の慢性肝炎の症例が多い(図3)。現在では都市部の若年層において増加傾向を認めているが、これは次第に拡散していき、早急な対策を講じなければ日本全体に広がるのが予想される。HBV感染が性感染症でもあることを啓蒙し、ワクチンを含めた適切な防衛策を考える必要がある。

HBV/Dの分布の大部分は欧米ではあるが、局地的な感染地域がいくつかあり、亜型が複数存在している。HBV/Dの中ではHBV/D1が最も多く確認されており、多数の検討がなされている。HBV/D1には特異的な遺伝子変異があり、病態との関連についての報告がなされている^{6,7)}。臨床的特徴としては、ヨーロッパにおいてインターフェロン治療の反応性をHBV/Aと比較したところ、HBV/Dの反応性が低く治療抵抗性であり、HBV/Aに対して予後不良であることが知られている⁸⁾。

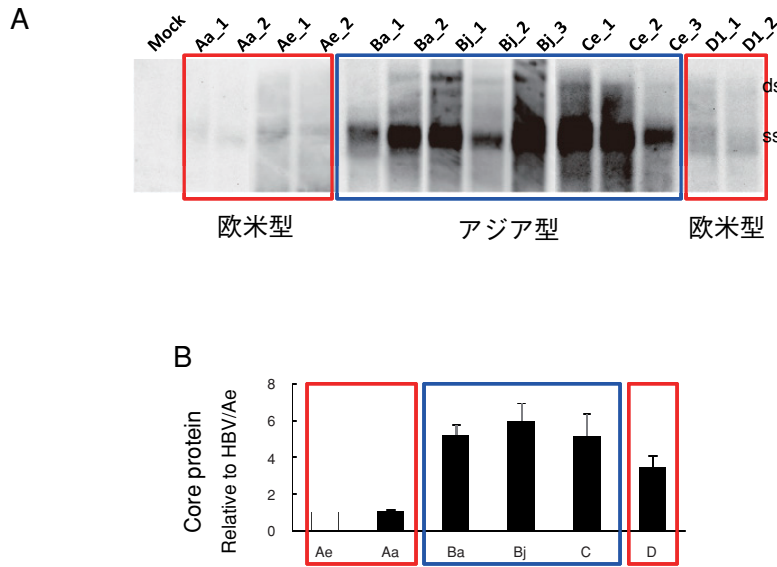
2) HBV/BとHBV/C

HBV/Bでは、日本型であるHBV/B1/Bjは予後良好であるが、アジア型のHBV/B2-5/Baは肝癌(HCC)発症リスクが比較的高く予後不良となる傾向が強く、亜型によりその性質が大きく異なる。日本型とよばれるHBV/B1は日本でのみ観察される株で、東北地方と沖縄に多く分布している。病態としては非常に穏やかで、そのほとんどが無症候

性キャリアとしてその一生を終え、HCCの発症頻度は非常に低い。しかしながら、プレコア領域にナンセンス変異(1896番目)が入ることで急速な複製を行い、劇症肝炎の因子となりうる。HBV/B1と1896変異は劇症肝炎の独立した因子として知られており、HBV/B1はその点では注意が必要である⁹⁾。HBV/B2-5はコアプロモーターからコアにかけての一部分がHBV/Cと類似の遺伝子配列となった組換え型である。HBV/Cの特徴としては予後不良であり、HCCの発症リスクが高いことが知られている^{10,11)}。HBV/B2-5の特徴としては、その組換え配列を持つために、HBV/Cと類似の臨床的性質を示し、HCCの発症リスクは高く予後不良であることが挙げられる^{12,13)}。特に、高ウイルス量のHBV/CはHBV/B2-5以上にHCC発症リスクが高く(図4)、しかもインターフェロン治療抵抗性である¹⁴⁾。

4. HBVによる肝細胞傷害

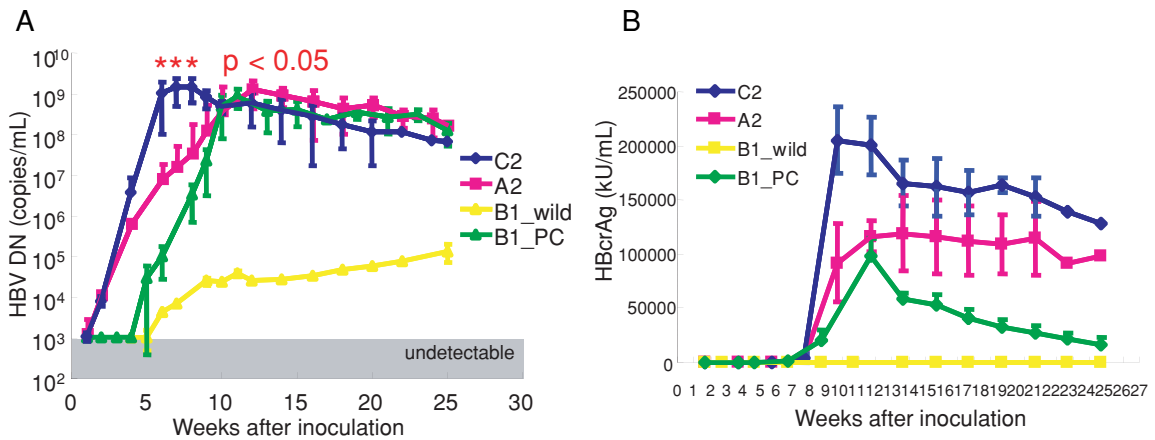
HBV遺伝子型には、それぞれに臨床的な特徴がみられるがその違いが生まれる詳細については不明であった。疫学調査等では、特に世界規模での比較を行う場合に、様々な要因が影響してくる。生活環境・ホストの遺伝的要因といったものが考えられ、病態に影響を及ぼすために、直接的な比較が難しい。しかし、細胞株や動物を用いた実験では背景が均一化されているために、そのような比較を容易に行う事ができる。これまでに我々はヒト肝癌細胞株に加えて、キメラマウスを利用して各HBV遺伝子型の特徴につ



(Sugiyama M. *et al.*, *Hepatology*, 2006より改変引用)

図5 in vitro での HBV/A-D の比較

- A. サザンプロットによる複製の比較
- B. 細胞中のコア蛋白発現量の比較



Sugiyama M. *et al.* *Gastroenterology*. 2009より引用改変

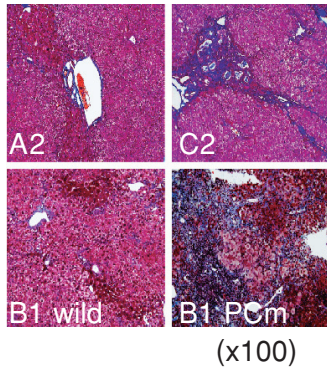
図6 キメラマウスでの感染実験

- A. キメラマウス血清中でのウイルス量の変化
- B. キメラマウス血清中でのコア蛋白量の変化

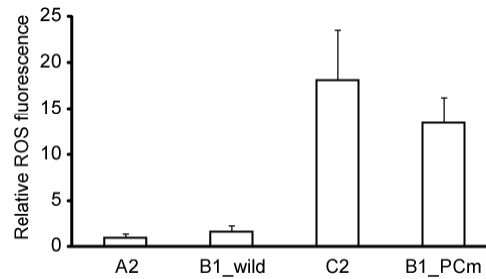
いて検討を行ってきた。キメラマウスは、ヒト肝細胞の移植により、ヒト肝臓とマウス肝臓をキメラ状に持つマウスであり、小型哺乳動物における HBV や HCV の感染実験を可能とした有用なモデルである^{15,16)}。図5はヒト肝癌細胞株 HuH7 細胞と HepG2 細胞を利用した in vitro での検討において、サザンプロットにより各遺伝子型の複製効率を比較したものである。欧米型である HBV/A, D は、ア

ジア型の HBV/B, C に比べてウイルスの複製効率が低く、それと相関して HB コア蛋白の産生能も低い値を示した(図5)^{17,18)}。キメラマウスでの in vivo 感染実験においても同様の傾向を示し、特に感染初期では違いが顕著であり、ウイルス複製効率とコア蛋白の発現量はアジア型で高値であった(図6)。また、感染後6カ月において肝組織像を観察したところ、HBV/C2, HBV/B1_PC【プレコア変異】群

A Masson trichrome staining



B 活性酸素種の発現レベル



Sugiyama M. *et al.* Gastroenterology.2009より引用改変

図7 キメラマウス肝組織における細胞傷害性の解析

- A. キメラマウス肝臓での各 HBV 遺伝子型における線維化進展度の確認
 B. キメラマウス肝臓での活性酸素種の発現レベルの比較

において肝線維化の進展が観察された (図 7A)。一方で HBV/A2 と HBV/B1_wild を感染させた群ではそのような変化は認められなかった。その機構を詳細に検討した結果、線維化進行群では活性酸素種の産生が顕著であり (図 7B)、血中の ALT や TGF- β の値も増加していた¹⁸⁾。線維化関連の遺伝子発現プロファイルを確認したところ、TIMP, MMP, コラーゲンに遺伝子発現の増加が見られ、免疫不全下においても特定の HBV 遺伝子型に感染することで線維化が急速に進行することが示された。

他の研究グループもキメラマウスでの感染実験を行っており、HBV/E を感染させた検討を実施している¹⁹⁾。ここでは、免疫抑制下で Fibrosing cholestatic hepatitis (FCH) を発症した患者の肝組織像とキメラマウスでの病態を比較している。それによると、HBV/E を感染させたキメラマウスでは感染期間が短期間の場合、肝細胞の形態的な変化は認められず、肝臓内の HBV DNA や HBV 関連抗原の蓄積もほとんどなかった。しかしながら、感染期間が長期に及ぶと肝細胞のバルーン化やグラントグラス様の変化が現れ、HBV 関連抗原の蓄積が認められた。この感染長期でのキメラマウス肝組織像を FCH 患者検体と比較するとよく似た形態を示しており、肝臓内での HBV DNA の複製状態を比較しても同様の結果であった。つまり、免疫不全 (抑制) 下での B 型肝炎による FCH の臨床像と HBV 感染したキメラマウスで認められる病態の類似性は、共に獲得免疫による制御を受けず、高いレベルでの HBV の複製と HBV 関連抗原産生・蓄積の亢進が病態形成に寄与しているのではないかと推察される。

5. おわりに

このように、臨床的に免疫抑制下や HIV/HBV の共感染

で見られるような肝線維化の急速な進行が¹⁾、実験的に再現された。HIV と HBV のウイルス間相互作用の影響も考えられるが、基礎研究の面からも示されているように HBV 単独でも直接的に肝細胞への傷害を与えうることが示された (図 7)。しかし一方で、無症候性キャリアが存在することは臨床的な事実である。臨床と基礎研究の結果を併せて考えると、B 型肝炎には、免疫機構の働きがその病態に非常に大きな影響を及ぼしている事を改めて示している。現段階において、免疫機能を備えた有用な HBV 感染実験モデルは確立されていないが、そのモデルの樹立は、持続感染における獲得免疫の働きを理解し、無症候、急性、慢性、劇症といった様々な病態を現わす B 型肝炎の包括的理解に必須である。また、近年盛んに行われているゲノムワイドな解析を実施して、個体と病態の関連についても検討を行っていく必要がある²⁰⁾。これらを理解することは、肝炎の制御を可能とし、予後予測にもつながるため、今後の B 型肝炎研究の重点といえる。

文 献

- 1) Lacombe, K., V. Massari, P. M. Girard, L. Serfaty, J. Gozlan, G. Pialoux, P. Mialhes, J. M. Molina, C. Lascoux-Combe, D. Wendum, F. Carrat, and F. Zoulim. Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV. *Aids* 20:419-27. 2006.
- 2) Miyakawa, Y., and M. Mizokami. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 46:329-38. 2003.
- 3) Tatematsu, K., Y. Tanaka, F. Kurbanov, F. Sugauchi, S. Mano, T. Maeshiro, T. Nakayoshi, M. Wakuta, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*

- 83:10538-47. 2009.
- 4) Tanaka, Y., I. Hasegawa, T. Kato, E. Orito, N. Hirashima, S. K. Acharya, R. G. Gish, A. Kramvis, M. C. Kew, N. Yoshihara, S. M. Shrestha, M. Khan, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 40:747-55. 2004.
 - 5) Matsuura, K., Y. Tanaka, S. Hige, G. Yamada, Y. Murawaki, M. Komatsu, T. Kuramitsu, S. Kawata, E. Tanaka, N. Izumi, C. Okuse, S. Kakumu, T. Okanoue, K. Hino, Y. Hiasa, M. Sata, T. Maeshiro, F. Sugauchi, S. Nojiri, T. Joh, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 47:1476-83. 2009.
 - 6) Elkady, A., Y. Tanaka, F. Kurbanov, T. Oynsuren, and M. Mizokami. Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol* 23:474-81. 2008.
 - 7) Sendi, H., M. Mehrab-Mohseni, M. R. Zali, H. Norder, and L. O. Magnius. T1764G1766 core promoter double mutants are restricted to Hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D. *J Gen Virol* 86:2451-8. 2005.
 - 8) Erhardt, A., U. Reineke, D. Blondin, W. H. Gerlich, O. Adams, T. Heintges, C. Niederau, and D. Haussinger. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology* 31:716-25. 2000.
 - 9) Ozasa, A., Y. Tanaka, E. Orito, M. Sugiyama, J. H. Kang, S. Hige, T. Kuramitsu, K. Suzuki, E. Tanaka, S. Okada, H. Tokita, Y. Asahina, K. Inoue, S. Kakumu, T. Okanoue, Y. Murawaki, K. Hino, M. Onji, H. Yatsushashi, H. Sakugawa, Y. Miyakawa, R. Ueda, and M. Mizokami. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 44:326-34. 2006.
 - 10) Orito, E., M. Mizokami, H. Sakugawa, K. Michitaka, K. Ishikawa, T. Ichida, T. Okanoue, H. Yotsuyanagi, and S. Iino. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 33:218-23. 2001.
 - 11) Orito, E., and M. Mizokami. Differences of HBV genotypes and hepatocellular carcinoma in Asian countries. *Hepatol Res* 37:S33-5. 2007.
 - 12) Sugauchi, F., E. Orito, T. Ichida, H. Kato, H. Sakugawa, S. Kakumu, T. Ishida, A. Chutaputti, C. L. Lai, R. Ueda, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. 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.
 - 13) Sugauchi, F., E. Orito, T. Ichida, H. Kato, H. Sakugawa, S. Kakumu, T. Ishida, A. Chutaputti, C. L. Lai, R. G. Gish, R. Ueda, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 124:925-32. 2003.
 - 14) Kao, J. H., N. H. Wu, P. J. Chen, M. Y. Lai, and D. S. Chen. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 33:998-1002. 2000.
 - 15) Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, D. N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W. R. Addison, K. P. Fischer, T. A. Churchill, J. R. Lakey, D. L. Tyrrell, and N. M. Kneteman. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927-33. 2001.
 - 16) Tateno, C., Y. Yoshizane, N. Saito, M. Kataoka, R. Utoh, C. Yamasaki, A. Tachibana, Y. Soeno, K. Asahina, H. Hino, T. Asahara, T. Yokoi, T. Furukawa, and K. Yoshizato. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165:901-12. 2004.
 - 17) Sugiyama, M., Y. Tanaka, F. Kurbanov, N. Nakayama, S. Mochida, and M. Mizokami. Influences on hepatitis B virus replication by a naturally occurring mutation in the core gene. *Virology* 365:285-91. 2007.
 - 18) Sugiyama, M., Y. Tanaka, F. Kurbanov, I. Maruyama, T. Shimada, S. Takahashi, T. Shirai, K. Hino, I. Sakaida, and M. Mizokami. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes. *Gastroenterology* 136:652-62 e3. 2009.
 - 19) Meuleman, P., L. Libbrecht, S. Wieland, R. De Vos, N. Habib, A. Kramvis, T. Roskams, and G. Leroux-Roels. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J Virol* 80:2797-807. 2006.
 - 20) Kamatani, Y., S. Wattanapokayakit, H. Ochi, T. Kawaguchi, A. Takahashi, N. Hosono, M. Kubo, T. Tsunoda, N. Kamatani, H. Kumada, A. Puseenam, T. Sura, Y. Daigo, K. Chayama, W. Chantratita, Y. Nakamura, and K. Matsuda. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 41:591-5. 2009.

Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in immunosuppressive condition

Yasuhito TANAKA¹⁾, Masaya SUGIYAMA^{1, 2)}, and Masashi MIZOKAMI²⁾

1) Department of Virology & Liver unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan

2) Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Japan

E-mail : ytanaka@med.nagoya-cu.ac.jp

Little is known about the direct cytopathic effect of hepatitis B virus (HBV) and its association with particular viral genotype or genetic mutation. In some immunosuppressed chronic HBV patients who had liver transplantation or HIV-coinfection, high viremia and liver fibrosis may occur. These findings suggest that hepatic injuries could arise in the absence of a mature immune system and the difference of genotype and/or specific mutation would affect cytopathic potential of the virus. We investigate HBV genotype-related differences in viral replication, antigens expression and histopathology using *in vitro* replication model or uPA/SCID mice harboring human hepatocytes, demonstrating that different HBV genotypes and even particular mutation are associated with different virological and histopathological characteristics. Infection with HBV/C2 as well as PC mutant of the HBV/B1 in immunosuppressive conditions can induce direct cytopathic effect in "humanized" part of the murine liver.