



Mutations Within Enhancer II and BCP Regions of Hepatitis B Virus in Relation to Advanced Liver Diseases in Patients Infected With Subgenotype B3 in Indonesia

DIDIK SETYO HERIYANTO

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5452

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005452>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Mutations Within Enhancer II and BCP Regions of Hepatitis B Virus in Relation to Advanced Liver Diseases in Patients Infected With Subgenotype B3 in Indonesia

インドネシア国の遺伝子型 B3 B型肝炎感染患者における肝疾患の病態進行に関与する
エンハンサーII・コアプロモーター領域の変異に関する検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
感染病理学
(指導教員：林 祥剛 教授)

Didik Setyo Heriyanto

背景と目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は、その持続感染により肝硬変および肝細胞癌をもたらす、致死に至る。肝障害の進行は、年齢・性別・人種といった宿主因子と、ウイルス量・ウイルス遺伝子型・ウイルス変異などのウイルス側因子により規定されるとされる。B型肝炎ウイルスは、S、Polymerase、Precore/core、Xの4つの重なり合うオープンリーディングフレームから構成される不完全2本鎖DNAウイルスである。BCP領域(1742-1849)はコアプロモーター領域の一部のプレゲノムRNAを構成し、エンハンサーII領域(1636-1741)はS、Core、X領域の転写活性を調節するとされる。これまでEnhancer II領域のC1653TやBCP領域のA1762T/G1764A、T1753V、C1766T変異が肝発癌に関連することが報告されてきた。しかしこれら変異は発癌に関連しないとした相反する報告もあり、おそらく肝炎の遺伝子型や人種といった他の要因が関係しているためと考えられている。

HBV遺伝子型B型(HBV/B)はインドネシアを含む東南アジアおよび中国・台湾などに広く蔓延している。東アジアに分布するHBV/Cと違って、HBV/Bは線維化進展が少なく、ウイルス量が少なく、インターフェロン治療に対する反応性も良好とされている。HBV/Bはさらにいくつかの亜型分類がなされているが、多くの報告はHBV/B1あるいはHBV/B2によるものである。インドネシア国では多くがHBV/B3であるが、HBV/B3について臨床病態とウイルス遺伝子変異の関連を調べた報告はほとんどない。そのため、インドネシア国の慢性B型肝炎および肝硬変肝病患者におけるXおよびBCP領域における遺伝子変異を解析し、臨床病態との関連について検討した。

対象と方法

インドネシア国・ジョクジャカルタ市におけるサルジト病院に通院および入院しているHBs抗原陽性の肝硬変・肝臓癌患者(n=40、男性31名・女性9名、平均年齢54±11歳)と慢性肝炎患者(n=109、男性71名・女性38名、平均年齢38±13歳)を対象とした。本研究は神戸大学およびガジャマダ大学の倫理委員会の承認を得て、患者からも文書での説明と同意を得た。

採取された血液は血清分離されたあと、HBs抗原についてはR-PHA法およびEIA法によって検出をおこない、HBs抗原陽性検体については、キアゲンキットを用いてDNAの抽出を行った。HBV-DNA量についてはS領域の特異的プライマー・プローブセットを用いて、リアルタイムPCR法により測定された。S領域、Pre-S2領域、X領域お

およびプロコア・コアプロモーター領域については、各領域の特異的プライマーを用いて nested PCR により各領域を増幅、アガロースゲルで確認したのち、アップライドライオシステムズ社の ABI prism 3100-Avant genetic analyzer を用いて Direct sequencing 法にて遺伝子配列を決定した。

遺伝子型については、既知の配列を DNA Data Bank of Japan および Genebank database より入手し、Clustal X version 2.0.1.2 ソフトウェアおよび MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) ソフトウェアにより遺伝子配列の並び替えおよび遺伝子系統樹の作成を行い決定した。

それぞれの統計学的解析は、SPSS version 17.0 ソフトウェアを用い、フィッシャーおよびスチューデント検定により有意差検定を行った。肝硬変肝癌への進展の独立因子の解析には多変量解析を用い、それぞれ $p < 0.05$ を統計学的有意と判断した。

結 果

臨床背景について、肝硬変肝癌群(年齢 54 ± 12 歳、ALT 値 13.9 ± 16.9 IU/L)は慢性肝炎群(年齢 38 ± 13 歳、ALT 値 29.7 ± 57.8 IU/L)に比較して有意に年齢が高く、ALT 値が低かった ($p < 0.001$)。またウイルス量が 4 logcopies/ml 以上となる割合は、肝硬変肝癌群 35.4%と慢性肝炎群 20.5%に比べて高い傾向を示した ($p = 0.14$)。S および Pre S2 領域の分子系統樹解析によれば、今回検討された B 型肝炎ウイルスはすべて遺伝子型 B3 であった。

エンハンサー II およびコアプロモーター領域の遺伝子解析では、T1631C 変異 (48.7% vs. 2.3%) および C1638T 変異 (51.4% vs. 2.3%) が、それぞれ肝硬変肝癌患者において慢性肝炎患者よりも有意に高い傾向を示した。同様にコアプロモーター領域では、T1753V 変異 (51.4% vs. 13.6%)、A1762T/G1764A 変異 (62.2% vs. 18.2%) が肝硬変肝癌患者に有意に高頻度に見られた ($p < 0.001$)。

これら因子を多変量解析すると、45 歳以上であること (OR 2.61, $p = 0.034$)、C1638T 変異を有すること (OR 1074.57, $p = 0.005$)、T1753V 変異を有すること (OR 6.39, $p = 0.047$) の 3 つの因子が、慢性肝炎から肝硬変肝癌への進展に関与する独立した因子であることが解明された。

考 察

今回の検討ではすべての症例が遺伝子型 B3 であり、これはインドネシア国に多くを占める B 型肝炎の遺伝子型であった。肝硬変肝癌患者における年齢は、慢性肝炎患

者におけるものよりも有意に高かったが、これはこれまでのインド、日本、米国などとの報告に一致する。特に 45 歳以上では肝硬変肝癌へのリスクが高まる結果であったが、これもこれまでの台湾からの報告とほぼ一致するものであった。

エンハンサー II 領域には、これまで遺伝子型 C1, C2 を主体とする日本や韓国では多くの変異が報告されており、なかでも 1653 領域の変異が肝癌発生に寄与するとの報告があるが、遺伝子型 B ではこの領域の変異は少ないとされてきた。今回の検討では T1631C や C1638T など多くの変異が認められたが、これは遺伝子型 B3 を対象としていたことがこれまでの報告と異なっているのかもしれない。この領域の変異が臨床病態の進行につながる明確なメカニズムは分かっていないが、エンハンサー II 領域の変異は HBx 蛋白のアミノ酸変異を通じて HBx 蛋白構造の変化をもたらし、核転写因子である HNF との相互作用に変化を与えている可能性がある。またこれらの C1638T ウイルス変異は慢性感染に伴う肝炎の進行していく免疫学的圧力から回避する方向に働いているのかもしれない。

T1753V 変異についても、香港からは同様の変異が肝疾患の進展に寄与するとする報告がある一方、日本や中国からは支持しないとする報告もある。この違いは遺伝子型や宿主免疫の違いによるものと考えられている。T1753V はアミノ酸変異 I127T をもたすが、このアミノ酸変異 (HBx 変異) が腫瘍原性となる NF- κ B のシグナル機構に変化を与えているのかもしれない。

今回の検討では、C1638T, T1753V 変異のほかに、T1631C や A1762T/G1764A 変異が肝硬変肝癌患者に高頻度であったが、これらは単変量解析では有意差が認められたものの、多変量解析では有意差は得られなかった。これらの変異は宿主の変異への適応状態を示している可能性があり、持続する長期間の感染状態によりもたらされたものかもしれない。今後は長期間の観察研究や前向き研究により、解明すべき問題であると考えられた。

結 論

C1638T 変異、T1753V 変異および 45 歳以上であることは、インドネシア慢性 B 型肝炎患者の肝疾患の進展に関わる独立因子であり、このことは B 型肝炎の遺伝子型 B3 の臨床病態を考える上で重要な知見であると考えられた。

Summary

Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious health problem throughout the world and has been suggested that viral factors, and host properties, as well as unhealthy life style, might contribute to the progression of liver diseases. HBV is a partially double-stranded DNA virus with four overlapping open reading frames (ORFs), which encode the surface, polymerase, precore/core, and X proteins, respectively. The transcriptional activity of these ORFs is regulated by the overlapping core (CP) and enhancer II (Enh II) promoters. CP consists of the upper regulatory region (nt. 1613–1742) and the basal core promoter (BCP, nt. 1742–1849), which directs the transcription of both pregenomic and precore mRNAs. Enh II (nt. 1636–1741) is composed of the boxes α (nt. 1646–1668) and β (nt. 1704–1715), which stimulates the transcription of surface, core, and X mRNAs. It has been reported that various mutations in BCP, Enh II and precore regions were associated with the severity of liver diseases. However, these results are sometimes controversial and other factors such as genotypes and the race of HBV-infected individuals may influence this correlation.

Genotype B is found predominantly in South East Asian countries, including Indonesia. Several studies revealed that genotype B has been associated with the development of less severe liver fibrosis, lower serum levels of HBV-DNA in cases who are HBV envelope antigen (HBeAg) negative, a better response to interferon therapy, and earlier HBeAg seroconversion, compared to those with genotype C. Subgenotype B3 has been reported as the most prevalent subgenotype transmitted in Indonesia. So far, the analysis of genomic mutations in relation to disease progression has not been conducted in the subgenotype B3 infected populations. Therefore, it is reasonable to investigate the genomic mutations within the X, BCP, and precore/core regions of HBV genome in Indonesian cases with chronic HBV infection (CHB) and to correlate these mutational profiles with the progressivity of liver diseases.

This study involved HBV surface antigen (HBsAg) positive cases with advanced liver diseases (ALD) comprising liver cirrhosis (LC) and HCC (n = 40, 31 male and 9 female, mean age 54.4 ± 11.6 years old) and CHB (n = 109, male 71 and female 38, mean age 38.0 ± 13.4 years old) admitted to the Department of Internal Medicine, Dr. Sardjito Hospital, Yogyakarta, Indonesia. Cases with ALD included 10 cases with HCC and 30 cases with LC. Cases with positive HBsAg expression for more than six months that did not fulfill the diagnostic criteria of

LC or HCC, were diagnosed with CHB. All study participants were tested for HBsAg, hepatitis B core antigen antibody (anti-HBc), HBeAg, and the antibody to the hepatitis C virus (HCV).

Determination of HBV-DNA copy numbers was performed by quantitative-Real Time PCR with primer pairs covering the surface (S) region of HBV genome. The analysis of HBV genomic mutations was performed by Nested PCR with primer pairs covering the precore/core, BCP, X, and S regions. The direct sequencing was performed to determine the presence of mutations. The obtained sequences from each region were aligned with reference sequences retrieved from the GenBank databases. A phylogenetic tree was constructed to determine the genotype and subgenotype of each isolate. Univariate and multivariate logistic regression analysis were performed to identify the variables, which correlated independently with the development of severe liver diseases.

In the clinical presentation, cases with ALD were significantly older ($P < 0.001$) and had lower ALT levels ($P = 0.011$) than other cases. Eleven cases out of 31 (35.4%) with ALD and 8 cases out of 39 (20.5%) with CHB had HBV-DNA with more than 4 log copies, respectively ($P = 0.14$). The variations in the Enh II and CP/Precore region in ALD were identified. Univariate analysis showed the presence of C1638T, T1631C, C1495T, and C1726A mutations within the overlapping X and Enh II regions with those in CHB ($P < 0.05$). While the C1638T and T1631C mutations were sense mutation, the C1495T and C1726A mutations substituted proline to serine and threonine to asparagine, respectively. Another sense mutations, C1505A was also detected in 3 (8.1%) of 37 ALD. The incidence of C1505A mutation, however, was comparable between ALD and other cases ($P > 0.05$). The presence of A1762T/G1764A double mutations within BCP, which resulted in the substitution of lysine to methionine and valine to isoleucine, respectively, was observed more frequently in ALD, compared to those with other cases ($P < 0.001$). The other point mutations within this region, T1753V and T1768A, leading to amino acid substitutions from isoleucine to threonine or asparagine and from phenylalanine to tyrosine, respectively, were also found more frequently in ALD than those with CHB ($P < 0.05$). Base and amino acid sequencing analyses of the precore and core regions showed that the G1896A, G1899A, and C1915T mutations were more prevalent in ALD, compared to those with CHB ($P < 0.05$). The G1896A mutations resulted substitution of glycine to aspartic acid. However, the C1915T mutation was a sense mutation. Multivariate analyses showed the age greater than 45 years at the time of sample collection (OR 2.62; $P = 0.034$) and the presence of C1638T (OR

1074.57; $P = 0.005$) and T1753V (OR 6.39; $P = 0.047$) mutations, were associated independently with the development of advanced liver diseases.

These present results demonstrated that all isolates involved were subgenotype B3. This is consistent with previous studies that revealed subgenotype B3 is predominant in Indonesia. HBV viral load was indeed lower in ALD, but it was without statistically significant. It suggests that the development of LC and HCC might progress, irrespective of the concentration of circulating virus. Multivariate logistic regression analysis revealed that individuals with CHB had an increased risk for developing ALD when they reached the age of 45. It might represent the time course of the natural history of chronic HBV infection. Some previous studies demonstrated that the accumulation of host-adaptive mutations within the HBV genome in the elderly, as a result of HBV infection during the younger age without virus elimination, might be associated with the progression of liver diseases. The detection of C1638T mutation in a significant proportion of cases with ALD in this study was in contrast to those observed in Japan and Korea, in which infection with subgenotype C1 and C2 are prevalent, in the aspect of involved nucleotides. In Japanese and Korean populations, the mutation mainly occurred at nt. 1653 within box α . These findings have suggested that each genotype or subgenotype may have specific mutation profiles and the pathogenic role of mutations involving the Enh II nucleotides is genotype or subgenotype specific. Although the exact mechanisms remain to be elucidated, mutations involving the sequences upstream of box α have the capability of inducing some conformational changes, which facilitate the interaction with the hepatocyte nuclear factor (HNF). Analyses of T1753V have been conducted in Japanese, Chinese, and South Korean cases with progressive liver diseases, the results have been inconsistent. It is probable that the inconsistency was derived from differences in genotyping or the different immune system of the host. Mutation T1753V occurred within BCP resulted in amino acid substitution at codon 127 from isoleucine to threonine or asparagine. The previous investigation revealed that HBx mutation within BCP could modulate the NF- κ B signaling pathway, which is associated with tumorigenesis. NF- κ B seems to have a central function in liver homeostasis, pathophysiology and regulation of the inflammation-fibrosis-cancer axis as well as playing a role in the development of ALD. The presence of T1631C, A1762T/G1764A, and G1896A mutations in cases with ALD was more prevalent compared to that in CHB by univariate analysis. These

findings indicate that these mutations may represent host-adaptive mutations, which are acquired as a result of persistently occurring HBV infection for a long period of time.

In summary, the presence of C1638T and T1753V mutations, as well as age greater than 45 years old, constituted independent risk factors for developing HCC and cirrhosis in cases with the subgenotype B3 infection. In addition, the presence of C1638T and T1753V mutations may serve as predictive markers for the progression of liver diseases in Indonesia.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2247 号	氏 名	Didik Setyo Heriyanto
論文題目 Title of Dissertation	Mutations Within Enhancer II and BCP Regions of Hepatitis B Virus in Relation to Advanced Liver Diseases in Patients Infected With Subgenotype B3 in Indonesia インドネシア国の遺伝子型 B3 B 型肝炎感染患者における肝疾患の病態進行に関するエンハンサーII・コアプロモーター領域の変異に関する検討		
審査委員 Examiner	主 査 川 端 英 人 Chief Examiner 副 査 堀 田 博 一 Vice-examiner 副 査 木 村 康 子 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

論文題目

Mutations Within Enhancer II and BCP Regions of Hepatitis B Virus in Relation to Advanced Liver Diseases in Patients Infected With Subgenotype B3 in Indonesia

インドネシア国の遺伝子型 B3 B 型肝炎感染患者における肝疾患の病態進行に関するエンハンサーII・コアプロモーター領域の変異に関する検討

背景と目的 HBV 遺伝子型 B 型 (HBV/B) はインドネシアを含む東南アジアおよび中国・台湾などに広く蔓延している。東アジアに分布する HBV/C と違って、HBV/B は線維化進展が少なく、ウイルス量が少なく、インターフェロン治療に対する反応性も良好とされている。HBV/B はさらにいくつかの亜型分類がなされているが、多くの報告は HBV/B1 あるいは HBV/B2 によるものである。インドネシア国では多くが HBV/B3 であるが、HBV/B3 について臨床病態とウイルス遺伝子変異の関連を調べた報告はほとんどない。そのため、インドネシア国の慢性 B 型肝炎および肝硬変肝癌患者における X および BCP 領域における遺伝子変異を解析し、臨床病態との関連について検討した。

対象と方法 インドネシア国・ジョクジャカルタ市におけるサルジト病院に通院および入院している HBs 抗原陽性の肝硬変・肝癌患者 (n=40、男性 31 名・女性 9 名、平均年齢 54±11 歳) と慢性肝炎患者 (n=109、男性 71 名・女性 38 名、平均年齢 38±13 歳) を対象として、HBV-DNA 量、X 領域およびブレコア・コアプロモーター領域の遺伝子配列を検索した。

結果 臨床背景について、肝硬変肝癌群 (年齢 54±12 歳、ALT 値 13.9±16.9IU/L) は慢性肝炎群 (年齢 38±13 歳、ALT 値 29.7±57.8IU/L) に比較して有意に年齢が高く、ALT 値が低かった (p<0.001)。またウイルス量が 4 logcopies/ml 以上となる割合は、肝硬変肝癌群 35.4%と慢性肝炎群 20.5%に比べて高い傾向を示した (p=0.14)。S および Pre S2 領域の分子系統樹解析によれば、今回検討された B 型肝炎ウイルスはすべて遺伝子型 B3 であった。エンハンサーII およびコアプロモーター領域の遺伝子解析では、T1631C 変異 (48.7% vs. 2.3%) および C1638T 変異 (51.4% vs. 2.3%) が、それぞれ肝硬変肝癌患者において慢性肝炎患者よりも有意に高い傾向を示した。同様にコアプロモーター領域では、T1753V 変異 (51.4% vs. 13.6%)、A1762T/G1764A 変異 (62.2% vs. 18.2%) が肝硬変肝癌患者に有意に高頻度に見られた (p<0.001)。これら因子を多変量解析すると、45 歳以上であること (OR 2.61, p=0.034)、C1638T 変異を有すること (OR 1074.57, p=0.005)、T1753V 変異を有すること (OR 6.39, p=0.047) の 3 つの因子が、慢性肝炎から肝硬変肝癌への進行に関する独立した因子であることが解明された。

考察 今回の検討ではすべての症例が遺伝子型 B3 であり、これはインドネシア国に多くを占める B 型肝炎の遺伝子型であった。肝硬変肝癌患者における年齢は、慢性肝炎患者におけるものよりも有意に高かったが、これはこれまでのインド、日本、米国などとの報告に一致する。特に 45 歳以上では肝硬変肝癌へのリスクが高まる結果であったが、これもこれまでの台湾からの報告とほぼ一致するものであった。エンハンサーII 領域には、これまで遺伝子型 C1, C2 を主体とする日本や韓国では多くの変異が報告されており、なかでも 1653 領域の変異が肝癌発生に寄与するとの報告があるが、遺伝子型 B ではこの領域の変異は少ないとされてきた。今回の検討では T1631C や C1638T など多くの変異が認められたが、これは遺伝子型 B3 を対象としていたことがこれまでの報告と異なっているのかもしれない。この領域

の変異が臨床病態の進行につながる明確なメカニズムは分かっていないが、エンハンサーII領域の変異はHBx蛋白のアミノ酸変異を通じてHBx蛋白構造の変化をもたらし、核転写因子であるHNFとの相互作用に変化を与えている可能性がある。またこれらのC1638Tウイルス変異は慢性感染に伴う肝炎の進行していく免疫学的圧力から回避する方向に働いているのかもしれない。

本研究はインドネシア国のB型肝炎感染患者について、その肝疾患の病態進行を研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった遺伝子型B3について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。