

原 著

再燃を繰り返す B 型慢性肝炎における
HBV precore-core 領域の解析

東京女子医科大学 消化器内科学 (主任: 小幡 裕教授)

安 部 康 二

(受付 平成4年11月18日)

**Mutation of the Precore and Core Regions of Hepatitis B Virus Genome in
Association with the Elevation of Serum ALT
Level in Chronic Hepatitis B****Koji ABE**Department of Medicine (Director: Prof. Hiroshi OBATA), Institute of Gastroenterology,
Tokyo Women's Medical College

Based on the prediction that nucleocapsid protein might be the immunological epitope recognized by HBV-specific cytotoxic T cells (CTL), we serially studied the nucleotide sequences of the precore and core regions to evaluate their biological significance in the generation of hepatocyte injury.

We found that several mutations existed in these regions only in chronic hepatitis B patients with a high serum ALT level. These mutations were not observed in the same patients with normal ALT level.

The same results were observed in four patients; hence these mutations might play an important role in the generation of hepatocyte injury.

緒 言

B 型肝炎は B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染のみでは発症せず宿主の免疫反応, 中でも細胞性免疫が関与して, cytotoxic T lymphocytes (CTL) による肝細胞障害が誘導され発症すると考えられている。HBV DNA の遺伝子配列中読み取り枠 (open reading frame: ORF) は, pre-S/surface (envelope) 遺伝子, precore-core (nucleocapsid) 遺伝子, pol (polymerase) 遺伝子, X 遺伝子の 4 遺伝子が知られているが (Fig. 1), 最近の分子生物学的研究では, pre-S2 peptide と一定のクラス-1 分子の組合せにより宿主の免疫応答に変化を及ぼし, CTL の標的抗原になると推定されている¹⁾。一方で HBV に対する細胞性免疫反応による細胞障害試験の成績は, precore-core 領域の遺伝子が

ら翻訳される nucleocapsid (HBe & HBc) 抗原が HBV 持続陽性者の T 細胞による肝細胞障害の主な標的であることを示唆している^{2)~4)}。さらに, 臨床例を用いた HBV DNA の解析によると, e 抗体陽性となっても, precore-core 領域の点突然変異や欠損が生じ肝炎の病態を変化させることが報告されている^{5)~7)}。これらの臨床例を用いた報告は症例の一時期を解析したものが多いため, 今回我々は HBc 抗原をコードする precore-core 領域の遺伝子に注目し, B 型慢性肝炎 e 抗体陽性例の複数例につき増悪期とその直後正常に復した時期とで HBV DNA precore-core 領域を解析し, precore-core 領域変異ウイルスと肝炎再燃の関連について検討した。

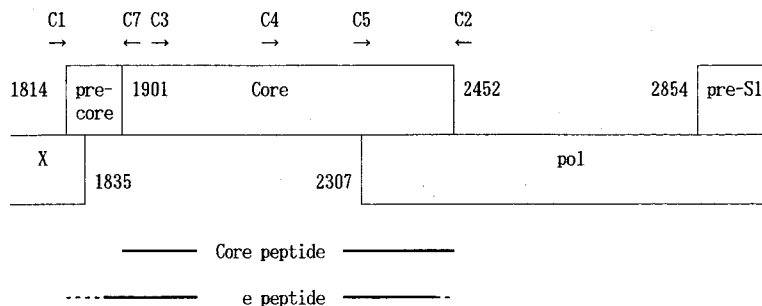


Fig. 1 B型肝炎ウイルスの遺伝子読み取り枠とPCR, シークエンスを用いたプライマーの位置

precore-core=precore-core 遺伝子領域, pre-S1=preS-surface 遺伝子領域, X=X 遺伝子領域, pol=polymerase 遺伝子領域を示す. 数字はHBV DNAのnucleotideの番号である. C1, C2はPCRプライマーでcore領域全体の増幅の際用いた. C3, C4, C5, C7, はシークエンスプライマーでシークエンス反応に用いた.

Core peptideはprecore-core領域より翻訳される, precore領域は疎水性に富み, peptideの膜との結合に必要である. 小胞体内でN末端, C末端が切断され(点線部)e peptideとして血中に放出される.

Table 1 Primer position

Primer		nt	Sequence
PCR	sense C1	1792-1811	5'-AATTGGTCTGTTACCAGCA-3'
	anti-sense C2	2455-2474	5'-ACCTTATGAGTCCAAGGGAT-3'
Sequence	sense C1	1792-1811	5'-AATTGGTCTGTTACCAGCA-3'
	C3	1957-1973	5'-GCCTTCTGACTTCTTTC-3'
	C4	2125-2141	5'-TTTGAAGACCCAGCAT-3'
	C5	2286-2302	5'-CTCCTGCTTACAGACCA-3'
	anti-sense C2	2455-2474	5'-ACCTTATGAGTCCAAGGGAT-3'
	C7	1912-1931	5'-CTCCAAATTCTTTATACGGG-3'

対象と方法

B型慢性肝炎の患者で再燃を繰り返す, e抗体陽性例4例について各々肝機能増悪期, 正常期の血清を用いた (Fig. 2, Table 2). 4例はいずれも正常値で推移していたトランスアミナーゼが増悪期には各々の症例でGPTが700KUから244KUに上昇し, DNA polymerase (DNA-P)も上昇を認めていた (1,745cpmから60cpm). この時期の血清を増悪期として用いた. トランスアミナーゼの上昇は一過性でその4週後には, ほぼ正常化しDNA-Pも0ないし正常値に回復していた. この時期の血清を正常期として用いた. C型肝炎抗体 (C-100, 2nd. generation)は4例とも陰性であった.

1. 血清からのHBV DNAの抽出

患者血清100 μ lをTE(10mM Tris HCl, pH 8/1mM EDTA) 200 μ lで希釈し, proteinase K (10 mg/L, シグマ社製)3 μ l(反応液: 0.01M Tris(pH 7.8), 0.005M EDTA, 0.5%SDS)を加え70 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベーションした. 反応後フェノール/クロロホルム抽出を行い, エタノール沈澱にてHBV DNAを回収した. 得られたDNAはTE 100 μ lに溶解した.

2. HBV DNAの増幅

HBV DNA 100 μ l中10 μ lを用いてPCR (polymerase chain reaction)を行った. Taq polymerase (Cetus社製) 1 unitを加え, C1 (nucleotide: nt 1792-1811), C2 (nt 2455-2474) 両

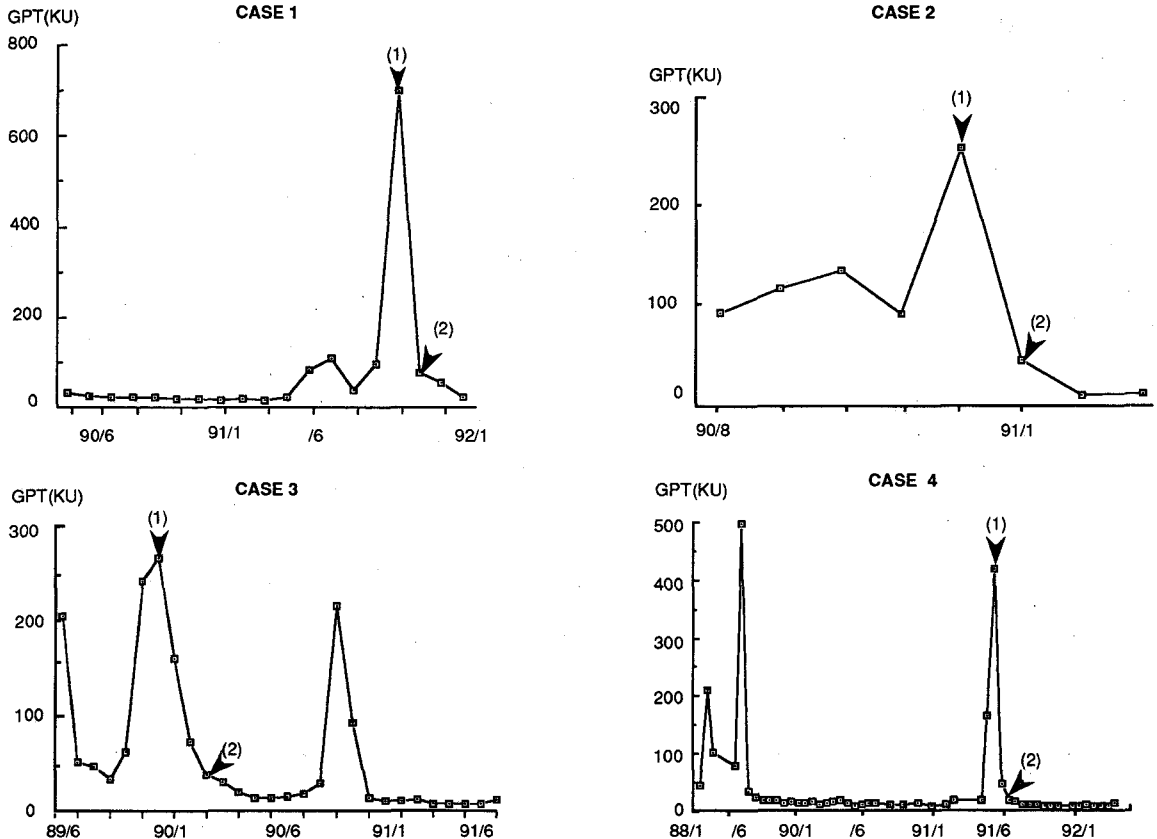


Fig. 2 臨床経過

肝炎が再燃し、トランスアミナーゼがピークに達した時点での血清を増悪期(1)として用い、その4週後トランスアミナーゼが正常化した時点での血清を正常期(2)として用いた。

Table 2 Patient profile

Case	Sex	Age	Stage	eAg/eAb	GPT (KU)	DNA-P (cpm)
1	M	24	(1)増悪期	-/+	700	67
			(2)正常期	-/+	20	0
2	M	39	(1)増悪期	-/+	262	60
			(2)正常期	-/+	42	0
3	M	43	(1)増悪期	-/+	244	1,745
			(2)正常期	-/+	27	4
4	M	47	(1)増悪期	-/+	419	ND
			(2)正常期	-/+	11	ND

ND=測定されていない。

プライマーを用い、precore-core領域(639 base pair: b.p.)の増幅を行った。増幅にはthermal cycler (Cetus社製)を使用し、denature: 94°C/

30秒, annealing: 37°C/30秒, extension: 72°C/1分で40 cycle行った。プライマーの位置と増幅されるHBV DNAの部位はFig. 1とTable 1に示した。

3. 核酸配列の同定

増幅されたHBV DNA precore-core領域は8%アクリルアミドゲル中を電気泳動させ、目的とする639b.p.のバンドを切り出しTE中で溶出させた。得られたDNAをプラスミドベクターのpTZ-19R(TOYOBO社製)にサブクローニングした結果、それぞれのサンプルから5個から10個のクローンが得られた。各々のクローンのDNAを等量混合しdideoxy法で塩基配列を決定した。一回のシーケンス反応で200b.p.の塩基配列の判読が可能のためC1, C2以外にもcore領域内に

C3 (nt 1957-1975), C4 (nt 2125-2141), C5 (nt 2285-2303) の各プライマーを合成し, precore-core 領域全域のシークエンスを行った. また precore 領域のコドン28 (nt 1896) は e 抗体陽性例では点突然変異が高頻度に発生するため⁸⁾⁹⁾, さらに anti-sense の C7 (nt 1912-1931) を用いて precore 領域の塩基配列を確認した. precore-core 領域におけるプライマーの位置は Fig. 1 に, プライマーのシークエンスは Table 1 に示した.

結 果

B 型慢性肝炎 e 抗体陽性例 4 例について各々肝機能増悪期, 正常期の precore-core 領域の塩基配列を比較検討した. 4 症例の HBV subtype はすべて adr であった.

増悪期では 4 例とも precore 領域のコドン28 で, TGG (トリプトファン) から TAG (停止コドン) に変異している precore 変異株であった. また増悪期では 4 例とも core 領域にアミノ酸変異を伴う点突然変異を 2 から 4 カ所に認め, Case 1 ではコドン74 (セリンからグリシン), 97 (イソロイシンからロイシン), 147 (スレオニンからアスパラギン) のアミノ酸変異が見られ, Case 2 ではコドン49 (セリンからスレオニン), 97 (イソロイシンからロイシン) のアミノ酸変異が認められた. Case 3 ではコドン87 (セリンからグリシン), 97 (イソロイシンからロイシン) のアミノ酸変異が見られ, Case 4 ではコドン49 (セリンからスレオニン), 87 (セリンからグリシン), 97 (イソロイシンからロイシン), 113 (スレオニンからセリン) のアミノ酸変異を認めた (Table 3). core 領域のコドン97の ATC (イソロイシン) から CTC (ロイシン) への変異は 4 例に共通して存在した (Table 3, Fig. 3). さらに Kyte-Doolittle の方法¹⁰⁾を用いて, core 領域のアミノ酸変異による corepeptide の hydrophilicity value の変化を検討した. コドン49, 74, 87, 113, 147, で認められたセリン, スレオニン, グリシン, アスパラギン間の変異は同じく親水性のアミノ酸間の変異であり, コドン97のイソロイシンからロイシンの変異は疎水性アミノ酸間の変異であった (Fig. 4). 正常期の

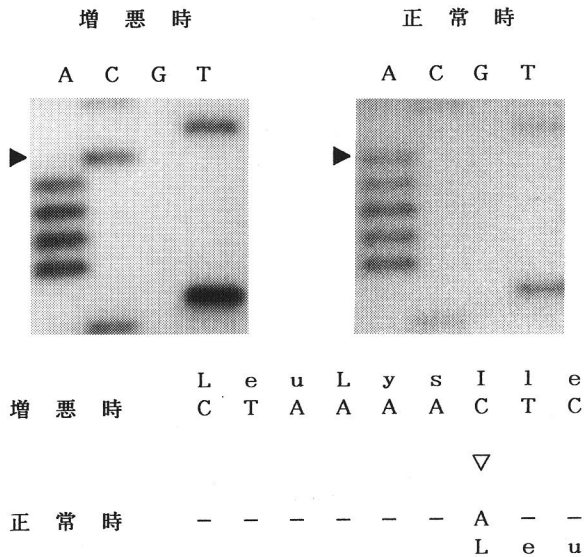


Fig. 3 core 領域コドン97のシークエンス
コアヌクレオチド2189番目の C (cytosine) が A (adenine) に点突然変異することによりコドン97のイソロイシンはロイシンに変化する.

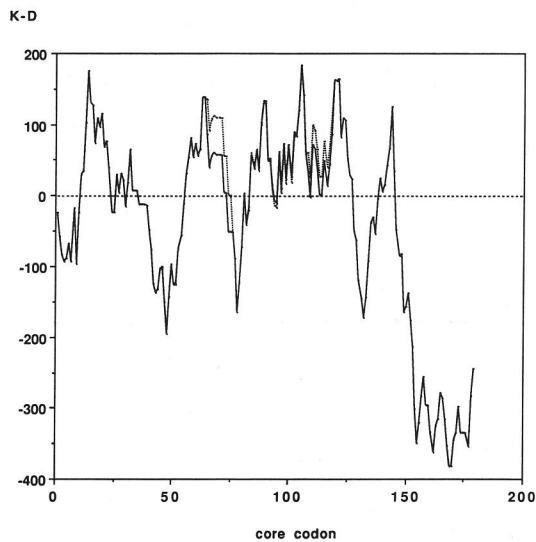


Fig. 4 The hydrophilicity values
core 領域のアミノ酸変異により増悪期には破線に示すように変化する.

precore 領域は, 4 例中 1 例が precore 領域のコドン28に停止コドンを持つ precore 変異株であり, 残りの 3 例は precore 領域に変異のない野性型であった. また正常期の core 領域にはアミノ酸

Table 3 precore-core 領域のアミノ酸配列

	Precore →	Core →
precore-core codon→	MQLFHLCLII SCSCPTVQASKLCLGWLWGMDDIPYKEFGASVELLSFLPSDFFPPIRDLLDTASALYREA	(28)
CASE 1-(1)	2-(1)-----	
正常期	3-(1)-----	
	4-(1)-----	
CASE 1-(2)	2-(2)-----	
増悪期	3-(2)-----	
	4-(2)-----	
	(49)	(74)
	LESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFG	(87)
CASE 1-(1)	2-(1)-----	
正常期	3-(1)-----	
	4-(1)-----	
CASE 1-(2)	2-(2)-----	
増悪期	3-(2)-----	
	4-(2)-----	
	(113)	(147)
	RETVLEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC	
CASE 1-(1)	2-(1)-----	
正常期	3-(1)-----	
	4-(1)-----	
CASE 1-(2)	2-(2)-----	
増悪期	3-(2)-----	
	4-(2)-----	

アミノ酸は一文字省略法で表記した。
 A,アラニン; C,システイン; D,アスパラギン酸; E,グルタミン酸; F,フェニルアラニン; G,グリシン; H,ヒスチジン; I,イソロイジン; K,リジン; L,ロイジン; M,メチオニン; N,アスパラギン; P,プロリン; Q,グルタミン; R,アルギニン; S,セリン; T,スレオニン; V,バリン; W,トリプトファン; Y,チロシン;
 precore 領域コドン28の空白は停止コドンであることを示す。

変異は認められなかった。

考 察

B型慢性肝炎の多彩な臨床経過は、宿主の免疫応答の差によるものと考えられてきた。一方分子生物学的検討によりHBV DNAの変異が肝炎の病態と関連していることが明らかにされてきた。HBVは増殖に際しRNA virusのようにウイルスの遺伝情報がRNAからDNAに写される過程があり、この過程のためHBVはDNAウイルスであるにもかかわらず変異を起こしやすい性質をもつ。このことからB型慢性肝炎のprecore-core領域の点突然変異によりnucleocapsidのアミノ酸の変異が生じ、新たにCTLの標的として認識されることが考えられた。

今回の実験では、B型慢性肝炎e抗体陽性例でトランスアミナーゼが正常で推移しているにも拘らず突然肝炎の再燃を認める症例において、増悪期のprecore-core領域とその直後正常に復した時期でのprecore-core領域の塩基配列を比較検討した。その結果、増悪期では4例ともcore領域にアミノ酸変異を伴う点突然変異が複数個認められた。これらの変異はcore蛋白のhydrophilicityを変化させその抗原性も変化していることが推測された。今回のhydrophilicityの変化は、アミノ酸変異が疎水基、親水基間の変異であったため、core peptideの立体構造を変化させるものではなかったが、点突然変異で生じた同じ極性のアミノ酸変異でもCTLの標的抗原として認識されることが報告されている¹¹⁾。一方で正常期のcore領域にはアミノ酸変異を伴う点突然変異は存在しなかった。これらのことよりcore領域に変異をもつHBVの増殖が宿主CTLの肝細胞障害性を誘導して一過性の肝細胞障害を惹起し、その変異ウイルスがCTLによって排除されることによりCTLの標的となりえないウイルスが残留することが考えられた。

EHataらは、B型活動性慢性肝炎患者と無症候性キャリアーのcore領域の塩基配列を比較し、B型活動性慢性肝炎患者のcore領域コドン84-101にアミノ酸変異を多く認めることを報告している。この報告の中で最も高頻度にアミノ酸変異の

認められるコドンは97で、すべてイソロイシンからロイシンへの変異であった⁶⁾。

Wakitaらは、B型慢性肝炎のcore領域に無症候性キャリアーにはない塩基の欠損を認めており、core領域nt 2150-2254(コドン84-118)が共通して欠損していた。これらの遺伝子の欠損を持つ症例は多くがやがてセロコンバージョンしており、core領域の変異がB型慢性肝炎の臨床像を変化させることを報告している⁵⁾。

またNonakaらは、submassive hepatic necrosisを発症した2例のB型肝炎の発症前後でprecore-core領域の塩基配列を比較しcore領域にアミノ酸変異があることを確認している⁷⁾。

これらの報告と合わせ、今回の実験から確認されたように、core領域中央のコドン97近傍のアミノ酸変異がB型慢性肝炎の臨床像に影響し、肝炎を悪化させている可能性が考えられた。

precore領域はcore領域の上流に位置する29コドンからなるORFでその翻訳されるpolypeptideはN末端に疎水性に富むアミノ酸配列を持ちHBe抗原蛋白の分泌に関与している^{12)~14)}。HBe抗体陽性の患者血清中には、precore領域28番目のコドンが停止コドンとなるためe抗原を産生しないprecore変異株が存在することが報告されている⁸⁾⁹⁾。臨床例を用いて検討した報告では、このprecore変異株がe抗体陽性のB型活動性慢性肝炎の原因となる可能性を示した報告がある^{14)~16)}。また、precore変異株が劇症肝炎と関連していることを示唆している報告があり注目されているが^{17)~20)}、一方でprecore変異株自体には肝障害性がないと示唆している報告もあり²¹⁾、劇症肝炎においても、precore変異株と関連のない例も報告されている²²⁾。さらに、in vitroの実験系でもprecore変異株と劇症肝炎の関連も検討されており²³⁾、現在ではprecore領域の変異に加え他の点突然変異も劇症肝炎発症に重要と考えられている。以上のようにprecore変異株も肝炎の病像を変化させる因子として議論されているが、今回の実験においても増悪期では4例ともprecore変異株が認められており、正常期にはprecore領域に変異のないHBVが優位に存在していることが

ら、precore 変異株も肝炎再燃の一原因となっている可能性が示唆された。precore 領域の変異は多くは core 領域に変異を持つ HBV DNA に見られた。このことは、標的抗原である core 領域変異株を CTL に認識し難くするため e 抗原としての分泌のできない precore 変異株に変異している可能性を示唆していると考えられる。正常期には肝炎を再燃させた変異株が消失した結果、その直後には元来血中に少量残存していた野性型の HBV が PCR で増幅されたものと考えられた。

点突然変異によって core 領域の一部が CTL の標的となることが考えられたが、実際に CTL の過剰な反応の原因となり得るか更なる検討が必要と思われる。

結 論

肝炎増悪期には precore 変異株が高頻度に存在した。また、core 領域にはアミノ酸変異を伴う点突然変異が見られ、特にコアコドン97の変異は4例に共通して認められた。この precore-core 領域の変異が肝炎を悪化させている可能性が考えられた。

稿を終えるに臨み、本研究のテーマを与えて頂きました小幡 裕主任教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御指導、御校閲を賜りました、山内克巳助教授、長原 光先生、長谷川 潔先生に深謝致します。

文 献

- 1) **Yamauchi K, Nakamura T, Obata H**: Possible role of pre-S2 peptides presented by MHC class I antigen in pathogenesis of chronic hepatitis. *B J Hepatol*: in press, 1992
- 2) **Vento S, Hegaty KE, Williams R et al**: T lymphocyte sensitization to HBsAg and T cell-mediated unresponsiveness to HBsAg in hepatitis B virus related chronic liver disease. *Hepatology* 5: 192-197, 1985
- 3) **Mondelli M, Vergani GM, Williams R et al**: Specificity of lymphocytes cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: Evidence that T cell are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 129: 2773-2778, 1982
- 4) **Ferrari C, Penna A, Chisari FB et al**: Intrahepatic nucleocapsid antigen-specific T cell in chronic active hepatitis B. *J Immunol* 139: 2050-2058, 1987
- 5) **Wakita T, Kakumu S, Morishima T et al**: Detection of pre-C and core region mutants of hepatitis B in chronic hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 88: 1793-1801, 1991
- 6) **Ehata T, Omata M, Ohto M et al**: Variations in codon 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 89: 332-338, 1992
- 7) **Nonaka T, Onji M, Ohta y et al**: Mutation of the core region of HBV-DNA and submassive hepatic necrosis in patient with anti-HBe-positive chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 473-480, 1992
- 8) **Carman WF, Jacyna MR, Thomas HC et al**: Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patient with chronic hepatitis B infection. *Lancet* ii: 588-591, 1989
- 9) **Okamoto H, Yotsumoto S, Mayumi M et al**: Hepatitis B virus with precore region defect prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 64: 1298-1303, 1990
- 10) **Kyte J, Doolittle RF**: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-132, 1982
- 11) **Nancy LL, Tevethia MJ, Tevethia SS et al**: Cytotoxic T lymphocytes (CTL) against a transforming gene product secreted for transformed cells with point mutation with sequence encoding CTL recognition epitopes. *J Exp Med* 176: 449-457, 1992
- 12) **Uy A, Bruss V, Thomssen R et al**: Precore sequence of hepatitis B e antigen in the serum. *Virology* 155: 89-96, 1986
- 13) **Stranding DN, Ou JH, Rutter WJ et al**: A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigen in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8405-8409, 1988
- 14) **Akahane Y, Yamanaka T, Mayumi M et al**: Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against e antigen in the serum: Disturbed synthesis and secretion of e antigen from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. *Gastroenterology* 99: 1113-1119, 1990
- 15) **Tong S, Li J, Trepo C et al**: Active hepatitis B replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variant containing an

- inactive pre-C region. *Virology* 176 : 596-603, 1990
- 16) **Brunetto MR, Giarin MM, Bonino F et al:** A new type hepatitis B strain patient with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 10 : 258-268, 1990
 - 17) **Liang T, Hasegawa K, Ben-Porath B et al:** A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 324 : 1705-1709, 1991
 - 18) **Omata M, Ehata T, Ohto M et al:** Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patient with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 324 : 1699-1704, 1991
 - 19) **Kosaka Y, Takase K, Mayumi M et al:** Fulminant hepatitis B: Induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* 100 : 1087-1094, 1991
 - 20) **Hasegawa K, Huang J, Liang TJ et al:** Association of hepatitis B viral precore mutation with fulminant hepatitis B in Japan. *Virology* 185 : 460-463, 1991
 - 21) **Rossanna MR, Giarin MM, Verme G et al:** Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 4186-4190, 1991
 - 22) **Hasegawa K, Shapiro CN, Liang TJ et al:** Lack of an association of hepatitis B virus precore mutation with fulminant hepatitis B. *Hepatology* 14 : 78, 1991
 - 23) **Hasegawa K, Huang JK, Ben-Porath E et al:** In vitro characterization of HBV mutants associated with fulminant hepatitis. *Hepatology* 14 : 206A, 1991