

学 位 論 文 題 名

Mannose-Binding Lectin Polymorphisms
in Patients with Hepatitis C Virus Infection

(C型肝炎患者における, Mannose-Binding Lectin 遺伝子の多形性)

学位論文内容の要旨

「目的」

HCV 持続感染は肝硬変、肝癌を招来する。しかしながら、さまざまな自然経過を決定する宿主の要因についてはほとんど知られていない。Mannose binding lectin (MBL)は肝で合成される血清レクチンで、4つのドメイン構造からなり、その糖認識領域を介して微生物やウイルスの表面糖鎖であるマンノースや N-アセチルグルコサミンなどと結合し、直接中和する他、オプソニンとしても作用する。また、異物の表面糖鎖と結合した後、MBL associated serine protease (MASP)が活性化され、更に、補体経路が活性化されることにより異物排除に働くと考えられている。従って、MBL 欠損症は小児期において易感染性を示し、成人においても重篤な感染症を引き起こすことが報告されている。近年、白人で HBV の持続感染と MBL の Exon1 codon 52 変異との関連が報告された。本研究は HCV 感染およびその進展と MBL 遺伝子変異多形性の関連を日本人の HCV 感染患者で明らかにすることを目的とした。

「対象と方法」

患者背景

北海道大学医学部附属病院通院中の 52 人の HCV 抗体陽性患者(男性 16 人、女性 36 人)を対象とした。平均年齢は 60 才で、平均罹患期間は 9 年であった。平均血清 AST, ALT レベルはそれぞれ、50IU/ml, 54IU/ml であった。患者の肝病変進展度は Chronic inactive hepatitis(CIH)8 人、Chronic active hepatitis (CAH) 32 人、Liver cirrhosis (LC)13 人であった。50 人の健康人(HCV 抗体(-)、HBs 抗原(-)、正常 AST/ALT)を正常 control とした。

MBL 遺伝子の解析

末梢血リンパ球より genomic DNA を精製し、MBL 遺伝子の解析を行った。MBL 遺伝子は Madsen らの方法に従い以下の 4つの allele に分類した。allele A : wild type、allele B : codon 54 変異(glycine から asparatic acid)、allele C : codon 57 変異(glycine から glutamic acid)、allele D : codon 52 変異(arginine から cysteine)。これらの変異は polymerase chain reaction(PCR)-restriction fragment length polymorphism(RFLP)法にて解析した。まず、PCR 法により genomic DNA をテンプレートとして、MBL 遺伝子の Exon 1 codon 52 から codon 57 を含む部分を増幅した。この際、allele A, B, C と allele D の判別には allele A, B, C は HhaI に、allele D は MluI により切断されるよう Site-directed mutagenesis-polymerase chain reaction(SDM-PCR)をおこなった。PCR 産物と制限酵素による分解産物は 4%アガロース

ゲルにての電気泳動で確認した。Allele A, B, C の分類には通常の PCR を行い、BanI にて切断されるものを allele A、MboII で切断されるものを allele C とした。PCR 産物および制限酵素による分解産物は 2% アガロースゲル電気泳動にて確認した。PCR-RFLP 法の妥当性は一部の検体のシーケンスの決定、および後述の血中 MBL 濃度の測定により確認した。

固層酵素抗体法による MBL 濃度の測定

血清 MBL 濃度は 2 種の抗 MBL 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。

統計解析

Fisher exact test および Student t test による統計解析を行った。

「結果」

MBL の genotype と肝炎の活動性

すべての sample において allele C (codon 57 変異) および allele D (codon 52 変異) は認めず、これらの allele は日本人において稀もしくは存在しないと考えられた。一方、allele B (codon 54 ヘテロ変異) は全体の 37% にみられ、全体として genotype AA, AB, BB のみが認められた。Genotype AB は control の 42%、HCV 患者の 32% に認められたが、有意差は認められなかった。Genotype BB は LC 患者 1 人のみで認められた。Allele B の allele frequency は control で 21%、患者で 18% であったが、有意差は認めなかった。また血清 AST, ALT レベルは genotype AA で genotype BB よりも高い傾向にあったがやはり有意差は認められなかった。HCV-RNA レベルも genotype AA と BB で特に差を認めなかった。肝炎の活動性とこれらの genotype (AA, AB, BB) の関係が検討したところ、genotype AA の 34 人の患者のうち 8 人が CIH であったのに対し、genotype AB, BB の患者全員が CIH にとどまらず、CAH, LC へ進展していた ($P=0.0395$, Fisher exact test)。更に、genotype AB の患者は genotype AA の患者と比較し有意に CAH, LC への進展率が高かった。 ($P=0.045$, Fisher exact test)

血清 MBL 濃度と MBL genotype および肝障害の関係

HCV 患者の MBL 濃度はサンドイッチ ELISA にて測定した。平均 MBL 濃度は genotype AA で $1.23 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ 、genotype AB で $0.21 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ 、genotype BB で $<0.03 \mu\text{g/ml}$ であり、MBL 遺伝子 codon 54 にヘテロもしくはホモの変異をもつ患者では MBL 濃度は明らかに低下していた。血清 MBL 濃度と肝障害との関係について検討したところ、CAH, LC の患者は CIH の患者と比較し血清 MBL 濃度は低下していた。 ($P=0.0479$, Mann Whitney U test)

「考察」

本研究において最も興味深いことは、allele B をもつ患者はすべて CAH, LC へ進展していたことである。一方、genotype AA の患者のうち 8 人は CIH にとどまっていた。これらの結果により血中 MBL が HCV 感染に対する免疫防御システムにおいて重要な働きを果たしている可能性が示唆された。MBL 遺伝子の変異により血中 MBL 濃度の低下している患者においては免疫能の低下により HCV 感染後、活動性肝炎や LC に進展しやすい可能性が考えられる。このことは、単に C 型肝炎の病態生理を考えるうえで興味深いだけにとどまらず、実際に MBL 遺伝子のタイピングを行うことにより HCV 感染患者のうち CAH, LC への進展のリスクが高い患者を選別し、早期の加療へと導く一助となりうる。MBL 遺伝子の変異と血清濃度測定の臨床的意義をさらに詳細な検討により確立するべきだと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Mannose-Binding Lectin Polymorphisms in Patients with Hepatitis C Virus Infection

(C型肝炎患者における, Mannose-Binding Lectin 遺伝子の多形性)

本研究は、自然免疫を担う生体防御レクチンである Mannose-binding lectin(以下 MBL)の遺伝子多形性とC型慢性肝炎の進展との関係を明らかにしたものである。

MBL は肝で合成される血清レクチンで、微生物やウイルスの表面糖鎖であるマンノースや N-アセチルグルコサミンなどと結合し、直接中和する他、オプソニンとしても作用する。また、異物の表面糖鎖と結合した後、MBL associated serine protease (MASP)を活性化することにより、補体のカスケードと平行して補体の活性化を導くことが明らかになっている。MBL は、N 末端領域、コラーゲン様領域、ネック領域、糖認識領域の 4 つのドメインより構成されるが、コラーゲン様領域をコードする Exon1 に 3 つの遺伝子変異 (codon52, 54, 57)があることが知られており、近年その遺伝子多形性と様々な疾患との関連が示され注目されている。

C型慢性肝炎患者 52 名、健常人 50 名を検体として用い、PCR-RFLP 法にて MBL genotype の決定およびサンドイッチ ELISA 法による血中 MBL 濃度測定を行った。結果として、すべての検体において codon 57 変異および codon 52 変異は認めず、これらの変異は日本人において稀もしくは存在しないと考えられた。一方、codon 54 ヘテロ変異は全体の 37% と高頻度に認められた。全体として wild type、codon54 ヘテロ変異、ホモ変異のみが認められた。Codon54 ヘテロ変異は健常人の 42%、C型慢性肝炎患者の 32%に認められたが、有意差は認められなかった。Codon54 ホモ変異は肝硬変の患者 1 名のみ認められた。肝炎の活動性とこれらの genotype の関係を検討したところ、wild type の 34 人の患者のうち 8 人が慢性非活動性肝炎であったのに対し、codon54 ヘテロもしくはホモ変異の患者全員が慢性活動性肝炎もしくは肝硬変へ進展していた(P=0.0395, Fisher exact test)。更に、codon54 ヘテロ変異の患者は wild type の患者と比較し有意に慢性活動性肝炎、肝硬変への進展率が高かった(P=0.045, Fisher exact test)。平均 MBL濃度は wild type で $1.23 \pm 0.34 \mu\text{g/ml}$ 、codon54 ヘテロ変異で $0.21 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ 、codon54 ホモ変異で $<0.03 \mu\text{g/ml}$ であり、MBL 遺伝子 codon54 にヘテロもしくはホモの変異をもつ患者では MBL 濃度は明らかに低下していた。血清 MBL 濃度と肝障害との関係について検討したところ、慢性活動性肝炎、肝硬

変の患者は慢性非活動性肝炎の患者と比較し平均血清 MBL 濃度は低下していた(P=0.0479, Mann Whitney U test)。

これらの結果により血中 MBL が C 型肝炎ウイルス感染に対する免疫防御システムにおいて重要な働きを果たしている可能性が示唆された。MBL 遺伝子の変異により血中 MBL 濃度の低下している患者においては免疫能の低下により C 型肝炎ウイルス感染後、活動性肝炎や肝硬変に進展しやすい可能性が考えられた。

公開発表に際し、副査の小林教授から MBL の遺伝子多形性と B 型肝炎との関連、日本人における MBL 遺伝子多形性の特徴、C 型肝炎ウイルス量や感染経路などの患者背景の相違と MBL 遺伝子多形性の関連、MBL 遺伝子ホモ変異における患者の特徴についての質問があった。続いて主査の浅香教授から、C 型肝炎進展における MBL 遺伝子多形性の関連、肝繊維化もしくは炎症抑制における MBL の役割、C 型肝炎患者のステージ分類、HCV genotype と MBL 遺伝子多形性との関連についての質問があった。最後に副査の小池教授から、成人における MBL 遺伝子多形性と感染症の関連、宿主の感染防御における MBL の生体内での役割、他のウイルス感染症と MBL との関連についての質問があった。これらの質問に対し申請者は概ね適切な解答した。又、本研究の臨床応用に向けての展望を述べ、質疑応答を終了した。

この研究は、C 型肝炎の進展と MBL 遺伝子多形性の関係を明らかにした点で高く評価され、今後、MBL 遺伝子のタイピングを行うことにより C 型肝炎感染患者のうち慢性活動性肝炎、肝硬変への進展のリスクが高い患者を選別し、早期加療へ導くことに貢献するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。