

京都大学	博士（医学）	氏名	大鶴 繁
論文題目	Dynamics of Defective Hepatitis C Virus Clones in Reinfected Liver Grafts in Liver Transplant Recipients: Ultradeep Sequencing Analysis (肝移植レシピエントにおけるグラフト肝への再感染に伴う構造領域欠損 C 型肝炎ウイルスの動態 —次世代シーケンサー解析—)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>C型肝炎ウイルス(HCV)は感染患者内で遺伝子的に均一なクローンの集合体としてではなく、様々な変異を有した多様なクローンの集合体(quasispecies)として存在している。HCV陽性肝移植レシピエントにおいて、HCVは肝移植後直ちにグラフト肝に再感染して複製・増殖を開始し、血清中のHCV量は急速に移植前の10~20倍にまで増加する。従来の遺伝子解析法ではHCV感染の全体像を把握することができず、肝移植に伴うHCVクローンの動態を明らかにすることは困難であった。</p> <p>本研究では、次世代シーケンサー解析の技術を用い、非代償性C型肝炎に対して生体肝移植術が行われたHCV陽性成人レシピエント5例より得られた摘出肝組織及び移植前後血清中のHCVクローンの全塩基配列の解析を行い、移植前後でのウイルス多様性の変化について検討した。さらに、HCV遺伝子の構造領域に欠損を生じた欠損型HCVクローンの感染像に関して検討を行った。</p> <p>次世代シーケンサー解析により、各検体において平均1,548クローンのHCV塩基配列が決定された。肝移植前のHCVは極めて高度な多様性を示し、そのウイルス多様性及び薬剤耐性変異株の存在頻度は、同一症例の肝組織と血清で類似していた。高度なHCV多様性を示した肝移植前と比較し、肝移植1ヶ月後には血清中のHCV多様性は有意に減少しており、グラフト肝へのHCV再感染早期に特定のHCVクローンが選択的に再感染・増殖していることが示唆された。肝移植後のHCV多様性の変化は特にNS4A, NS4B, NS5A, NS5B領域において顕著であったが、5例に共通する特定の塩基配列との関連性は認められなかった。</p> <p>次世代シーケンサー解析におけるHCV各領域のcoverage(各塩基が読まれた回数)を比較したところ、肝移植前の肝組織及び血清中HCV検体において、HCVの構造領域の遺伝子配列に局限したcoverageの減少を認めた。この構造領域のcoverageの減少は、移植後1ヶ月の検体においては認められず、肝移植前特異的な構造領域欠損型HCVの存在が推測された。全長型HCVと欠損型HCVの両者を検出するプライマーを用いたRT-PCR法による解析の結果、5例中4例において移植前血清中に欠損型HCVが全長型HCVと共に検出された。欠損型HCVの遺伝子配列解析により、いずれの症例においてもE1領域からNS2領域までの遺伝子欠損を認めたが、欠損領域の5'側並びに3'側の境界は各症例で異なっていた。検出された欠損型HCVは全てインフレーム欠失であり、残存領域がフレームシフトすることなく翻訳され、機能的なHCVタンパク質が産生されると推定された。肝移植1ヶ月後の血清においては欠損型HCVは検出されず、全長型HCVのみが検出された。この結果より、肝移植直後には全長型HCVが選択的にグラフト肝内で増殖しており、欠損型HCVは全長型HCVと比較して増殖能力が低いことが示唆された。さらに、1例においては移植22ヶ月後に移植前と同一の欠損型HCVの再増殖が確認された。移植後慢性肝炎の段階でHCVの多様性が再増加して再構築されることも確認され、この過程で移植前と同一の欠損型HCVが再増殖することが明らかとなった。</p>			

以上の結果より、肝移植前のHCVゲノムは極めて高度な多様性を示し、肝移植後にこの多様性が減少することが明らかとなった。肝移植後の構造領域欠損HCVクローンの動態変化は、これらのクローンがHCVの生活環の中で重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

従来の遺伝子解析法では、多様性を有するC型肝炎ウイルス(HCV)感染の全体像を把握することができず、肝移植に伴うHCVクローンの動態は解明困難であった。申請者は次世代シーケンサー解析技術を用い、HCV陽性生体肝移植レシピエントにおける感染クローンの全塩基配列の解析を行い、移植前後でのウイルス多様性の変化及び欠損型HCVクローンの感染像に関して検討を行った。

次世代シーケンサー解析の結果、肝移植前のHCVは極めて高度な多様性を示し、ウイルス多様性及び薬剤耐性変異株の存在頻度は同一症例の肝組織と血清で類似していることが明らかとなった。HCV多様性は、肝移植前と比較し、肝移植1ヶ月後の血清において有意に減少しており、特定のHCVクローンが選択的に再感染・増殖していることが示唆された。さらに、移植前血清並びに肝組織中にHCV遺伝子の構造領域が広範に欠損した欠損型HCVが検出された。移植1ヶ月後の血清では欠損型HCVは検出されず、全長型HCVが選択的に増殖していた。1例では移植22ヶ月後に移植前と同一の欠損型HCVの再増殖が確認された。この結果より、構造領域欠損HCVクローンがHCVの生活環の中で重要な役割を担っている可能性が示唆された。

以上の研究はC型肝炎ウイルス感染症における感染クローンの多様性並びにその動態の解明に貢献し、肝移植後C型肝炎の病態理解の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成26年4月18日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降