

京都大学	博士（医学）	氏名	荒澤 壮一
論文題目	Evolutional transition of HBV genome during the persistent infection determined by single-molecule real-time sequencing		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染症例ではウイルスゲノムに多様な一塩基変異が存在すること、また数塩基から1,000塩基以上まで様々な長さの欠失を有するウイルスクローンが検出されることが知られている。しかし宿主体内のウイルス集団について、一塩基変異のみならず欠失やその他のゲノム構造異常（SV）を含めた包括的なゲノムの多様性の実態とその経時的変遷については未だに知られていない。そこで本研究では治療による人為的な選択圧の存在しない宿主の血清を用いて、ウイルス集団の進化的な変遷を、核酸の塩基配列を1分子単位で数万塩基にわたって連続的に決定できる1分子リアルタイムシーケンシング（SMRT）によって解析した。</p> <p>2年以上の未治療期間を経たHBV持続感染症例を対象とした。複数時点の血清からスピнкаラム法でDNAを抽出しポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で増幅した後、環状アダプタを付加し反復的にSMRTを行い、5回以上配列を決定できたリードを採用した。SMRTで検出されたSVは同じPCR産物を用いた従来型次世代シーケンシング（NGS）とアガロースゲル電気泳動（AGE）とにより存在を確認した。</p> <p>合計10症例25検体を解析し、合計797,352リードのHBV由来の塩基配列が決定された。SVはのべ1,736種類検出された。アレル頻度が0.1%以上のSVはのべ431種類で、うち欠失が407種類、挿入が22種類、重複が2種類であった。アレル頻度10%以上の代表的な欠失のうち5種類につきNGSを、2種類につきNGSとAGEとを行うといずれの欠失も検出された。次に全SVおよび欠失の数と肝炎活動性マーカーとの関係を調べると、HBe抗体陰性・HBe抗原陽性・アラニンアミノ基転移酵素（ALT）高値を呈する検体では有意に全SV・欠失ともに多く、肝炎活動性の高い状態でこれらのゲノム異常が生じやすいことが示唆された。領域別の検討では、PreS/S領域とC領域とにおいて特に多くの欠失が検出された。一方、HBeセロコンバージョンとの関連性が示唆されている既知の4種類の点突然変異（G1896A、G1899A、T1762A、A1764G）のアレル頻度とHBe抗原との関係を検討すると、G1896AおよびT1762AがHBe抗原陰性群にて有意に高頻度で検出され、変異解析におけるSMRTの有用性を裏付ける結果となった。欠失の有無とウイルスクローンの多様性の間に有意な相関は認められなかったが、同一症例で複数回検出された欠失に着目し、各検体における欠失を有するクローンの集団と有さないクローンの集団とを系統樹解析にて比較すると、時間経過とともに欠失を有する集団と有さない集団とが互いに独立してゲノム変異を獲得している様子が確認された。また既に欠失を有するクローンが、時間の経過とともに新たに別の欠失を獲得したと推測できる多重欠失クローンの存在も検出された。</p> <p>症例数や検体数の少なさによる精度の限界やPCRによるエラーの可能性を排除できないことなど、解析手段については今後さらなる検討を要するが、SMRTはウイルスゲノムのSVを解析する方法として有用であると考えられた。今回の結果より、HBVの未治療持続感染症例では肝炎の活動性が高い時期においてSVおよび欠失が高頻度に出現することが判明した。また欠失を有するクローンが単なるウイルス複製の副産物ではなく、長期間にわたって独自に進化し続けている可能性が示唆された。</p>			

（論文審査の結果の要旨）

B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染者では血清中のウイルスに様々なゲノム構造異常が認められることが知られているが、HBVのゲノムの構造が自然経過においてどのように変遷するかは不明である。そこでHBV未治療持続感染者の血清中のウイルスゲノムを1分子リアルタイムシーケンシングで解析することで、構造異常の観点からウイルスゲノムの多様性とその進化的変遷を検討した。

未治療のHBV持続感染者10症例25検体を用いたシーケンス解析の結果、431種類の構造異常が検出され、407種類は欠失であった。欠失の大きさは数塩基から2000塩基を超えるものまで様々であった。肝炎活動性の指標である血清アラニンアミノ基転移酵素濃度が高値、HBe抗原陽性、HBe抗体陰性の検体では、検出された構造異常・欠失の数が有意に多かった。進化系統樹解析では、欠失を有するウイルスクローンの中に数年にわたって独自の進化を遂げているものが認められたほか、自然経過中に新たに欠失を獲得したと考えられるクローンも認められた。

これらの結果より、ゲノム欠失を伴うHBVクローンは肝炎活動性の高い時期に出現しやすく、自然経過中に独自の進化を遂げながら長期間にわたって存在するものがあることが示唆された。

以上の研究はHBV持続感染の自然経過におけるゲノム構造異常の特徴の解明に貢献しHBVの自然史の理解に寄与するところが大きい。

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、令和5年6月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、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