

京都大学	博士（医学）	氏 名	西島 規浩
論文題目	Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing (核酸アナログ治療に伴ったB型肝炎ウイルスクロンの多様性変化の大規模遺伝子解析)		
(論文内容の要旨)			
B型肝炎ウイルス（HBV）は、感染者の体内で遺伝子的に均一なクロンの集合体として存在するのではなく、様々な変異を有した多様なウイルスクロンの集合体 (quasispecies) として存在している。しかしながら、従来の遺伝子解析法では、quasispecies を構成する HBV 感染の全体像を把握することは困難であるとともに、低頻度で存在するマイナークロンの拾い上げにも限界があった。 本研究では、新しく開発された ultra deep sequencing の技術を用い、B型慢性肝炎19症例について、抗ウイルス療法（核酸アナログ製剤）前の14症例と抗ウイルス療法後の5症例の肝組織中に検出される感染 HBV クロンの全塩基配列の同定・解析を行い、病態と関連した変異クロンや薬剤耐性変異クロンの存在比率について解析した。また、14症例の抗ウイルス療法前後の血清を用いて、変異クロンの動態変化について検討した。 Ultra deep sequencing により、一検体あたり平均 1,765 クロン、計 5,674,519 塩基を解読し、HBV 遺伝子全域にわたって極めて多彩な遺伝子変異を持つウイルスクロンが多数共存することが明らかとなった。 従来より、HBV 遺伝子配列中 1896 番目の G が A に変異することが、HBe 抗原の産生低下と HBe 抗体の出現(セロコンバージョン)に関与していると推定されており、HBe 抗原陰性症例の多くは G1896A 変異クロンを有するものと考えられてきた。今回の解析でも各症例の肝組織において、野生型クロンと G1896A 変異クロンが様々な割合で共存していることが確認されたが、核酸アナログ製剤治療中の慢性 B 型肝炎 5 症例中 4 症例は HBe 抗原陰性であるにも関わらず G1896A 変異クロンの存在頻度が極めて低く (0.0%, 0.0%, 0.1%, 1.1%)、G1896A 変異クロンは野生型クロンに比べて核酸アナログ製剤への感受性が極めて高いことが示唆された。 次に、核酸アナログ製剤に対する 9 種類の薬剤耐性変異の潜在頻度についての検討を行った。過去に薬剤投与歴のない 14 症例の肝組織には、全例においていずれかの薬剤耐性変異クロンを 0.3-30.0% の割合で有しており、特にラミブジン耐性に関与する M204VI 変異クロンは 14 症例中 9 症例 (64.3%) に、エンテカビル耐性に関与する M250VI 変異クロンは 14 症例中 11 症例 (78.6%) に認められた。また、核酸アナログ製剤投与前後のペア血清の比較検討からは、5 症例 (35.7%) において薬剤投与後に M204VI 変異クロンの割合の増加を認め、核酸アナログ製剤投与は潜在的な薬剤耐性変異クロンの相対的な増加を誘導する可能性が示唆された。 Ultra deep sequencing を用いた HBV ゲノム解析により感染ウイルスゲノムの多様性が明らかになるとともに、薬剤投与前後の変異クロンの動態についての詳細な検討が可能となった。本研究により、HBe 抗原の消失や劇症肝炎の発症などさまざまな病態に関与するとされている G1896A 変異クロンが核酸アナログに高感受性であること、抗ウイルス剤投与により薬剤耐性変異クロンが潜在的に増加してくることが明らかとなった。Ultra deep sequencing を用いたウイルスゲノム解析が HBV 感染の病態解明や治療法の選択に有用なツールとなりうる可能性が示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） B型肝炎ウイルス（HBV）は、感染者の体内で遺伝子的に均一なクロンの集合体として存在するのではなく、様々な変異を有した多様なウイルスクロンの集合体(quasispecies)として存在している。申請者は、新しく開発された ultra deep sequencing の技術を用い、B型慢性肝炎患者における感染クロンの全塩基配列の同定・解析を行い、病態と関連した変異クロンや薬剤耐性変異クロンの存在比率と抗ウイルス療法前後の動態変化について検討した。 Ultra deep sequencing により、HBV 遺伝子全域にわたって極めて多彩な遺伝子変異を持つウイルスクロンが多数共存することが明らかとなった。HBe抗原の産生低下に関与しているとされるG1896A変異クロンの解析では、核酸アナログ製剤治療中のB型慢性肝炎患者の大部分はHBe抗原陰性であるにも関わらずG1896A変異クロンの存在頻度が極めて低く、G1896A変異クロンは核酸アナログ製剤への感受性が極めて高いことが示唆された。 核酸アナログ製剤に対する薬剤耐性変異クロンの潜在頻度および動態変化についての検討では、治療前に既に薬剤耐性変異を有するクロンが肝組織中に様々な割合で潜在することが明らかになった。また、核酸アナログ製剤投与は潜在的な薬剤耐性変異クロンの相対的な増加を誘導する可能性が示唆された。 以上の研究はB型肝炎ウイルス感染症における感染クロンの解明に貢献し、今後の抗ウイルス治療を含むB型肝炎診療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24年11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			