

論文の内容の要旨

氏名：高橋 央

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：Analysis of full-length hepatitis B virus genome from chronic hepatitis B-patients with higher alanine aminotransferase elevation

(ALT 上昇を来した慢性 B 型肝炎患者の HBV ゲノム全長解析)

B型肝炎ウイルス(HBV)は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などさまざまな肝疾患の原因となるウイルスである。慢性B型肝炎患者において、経過中に血清ALT値とHBV-DNAの上昇を認めることがあり、HBV急性増悪や再活性化やウイルス学的ブレイクスルーなどと呼ばれている。免疫抑制剤による治療を受けた際にHBV再活性化が起きる可能性があることは知られているが、特に誘因がなくとも生じることもある。また核酸アナログによる治療を受けていても、薬剤耐性株の出現によってウイルス学的ブレイクスルーが生じる。これらの病態は重症化する場合があります、慢性B型肝炎患者の生命を脅かす脅威の一つである。本研究では、急性増悪を来した慢性B型肝炎患者血清より分離抽出したHBV-DNAについて全長ゲノム解析を行い、急性増悪の機序について検討することを目的とした。

コントロール症例として慢性B型肝炎患者3例(C1、C2、C3)、特に誘因なく急性増悪を来した1例(Case1)、核酸アナログ投与中にウイルス学的ブレイクスルーが生じた1例(Case2)の計5症例を用いた。すべてGenotype C型である。採取検体よりQIAmp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNA回収を行い、下記の方法でシングルステップPCRを行った(94°C 120秒、98°C 10秒-50°C 10秒-68°C 120秒を45サイクル、4°C)。プライマーは既報を参考にし、HBVゲノム X領域を中心に作成した。Taq polymeraseはKOD FX Neo(Toyobo Life Science, Osaka, Japan)を用いた。PCR産物をQIA quick Spin Kit(Qiagen)を用いて精製した。シークエンスプライマーは既報を参考に設計し、BigDye Terminator version3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)を用いてダイレクトシークエンスを行い、得られた塩基配列はGenBankに登録されているAB014376(HBV Genotype C)と比較した。

X領域について、K130M/V131Iの二重変異をCase1とCase2で認め、Case1およびCase2でそれぞれL123S、G22Eを認めた。Core領域について、Case1とCase2含め、HBe抗原陰性例で全てPrecore領域にストップコドンをも認めた。アミノ酸変異では、I97LがCase1とCase2に共通であり、コントロール症例には認められない変異であった。またS74G、L84A、L100I、E113D、P130T、V149IはCase1でのみ、S87G、E180GはCase2のみで認められた。S領域についてpre-S1領域 R10K、pre-S2領域 M1T、F22L、P23Del、I45T、S領域 F19Y、T47A、K122R、V190A、P203RがCase2のみで認められた。ラミブジン耐性であるL180M、M204VをC2とCase2で認めた。エンテカビル耐性であるL180M、M204V T184I、S202GはCase2のみで認められた。またBasal core promoter領域の二重変異とPrecore領域のストップコドン変異をCase1とCase2の共通変異として認めた。S領域はPolymerase領域とオーバーラップしており、核酸アナログ投与によりPolymerase領域に耐性変異が入ることで、S領域にも変異が生じる。そのため核酸アナログ投与によってS領域にワクチンエスケープ変異が生じることがあり、同変異がCase2に認められた。Core蛋白やS蛋白は細胞障害性T細胞の標的となり得るため、その変異は免疫から逃れる機構の可能性がある。ウイルス学的ブレイクスルーが生じた時点の検体解析において、pre-S2領域、S領域のほかにPolymerase領域内のSpacer領域にも変異の集積を認めた。以上からPrecore領域、Core領域、pre-S1領域、pre-S2領域、S領域の変異が急性増悪と関連している可能性があると考えられる。しかし今回の結果を一般化するには症例数が少ないため、今後も症例を蓄積し、これらの機能解析を行うなど検討を重ねていくことが必要である。