

論文内容要旨

※ 整理番号		(ふりがな) 氏名(自署)	松田 秀哉	印
論文題目	Deep sequence analysis of serum hepatitis B virus RNA (ディープシーケンスによる血清B型肝炎ウイルスRNAの解析)			
論文内容要旨				
(研究の目的) B型肝炎に対して現在の標準的な治療は核酸アナログの投与であるが、治療効果を維持するためには長期間の投与が必要であり、また投与していても肝発癌やウイルスの薬剤耐性変異の出現を完全に防ぐことはできない。その原因の一つはHBVの生活環で形成されるcccDNAという極めて安定な環状二重鎖構造にある。核酸アナログの投与中もcccDNAは肝細胞内に長期に残存し、RNAへの転写、ウイルス蛋白の合成は行われ続ける。肝発癌や薬剤耐性変異出現のメカニズムを明らかにするためにはcccDNAの解析が重要と示唆されるが、肝生検などの侵襲を伴う処置が必要であるため、核酸アナログ投与下での肝発癌や薬剤耐性変異などの病態とHBV-cccDNAゲノムとの関連は殆ど解析されていない。 以前より核酸アナログ投与中でHBV-DNAが検出できない状態でもHBV由来のRNAが検出できることが報告されていた。2016年に血中に検出されるHBV-RNAは大部分がpregenomic RNAであることが報告された。pregenomic RNAはcccDNA全長の転写産物であるため、核酸アナログ投与下のHBVゲノム解析に有用である可能性がある。しかし血清HBV-RNAとB型肝炎の病態との関連や、核酸アナログ投与下でのHBV-RNAの動態は全く明らかにされていない。 今回の実験で、血清中のHBV-RNAの検出方法を確立し、HBV-RNAとB型肝炎の病態との関連を検討した。さらに核酸アナログに対して薬剤耐性変異を来した症例を対象として血清HBV-RNA、DNAのDeep sequenceを行い、核酸アナログ投与中のHBVゲノムの動態を解析した。 (方法)、 B型肝炎患者186名の保存血清を対象に血清HBV-RNAを測定した。測定方法は、血清からスピнкаラム法で核酸を抽出、DNase処理、ランダムプライマーによるcDNA作成、既存のHBV-DNA測定キットでcDNA定量の手順で行った。定量コントロールとして、HBVゲノムを含むプラスミドからHBV-RNAをin vitro合成し希釈系列を作成して同様にcDNAに転写して定量した。 また核酸アナログに対して薬剤耐性変異によるウイルス学的ブレイクスルーを来した4名の患者の保存血清を研究対象に、治療開始前、ブレイクスルー直前、ブレイクスルー時、核酸アナログ追加投与によるブレイクスルー収束後の4点についてHBV-RNAおよび-DNAのDeep sequenceを行った。シーケンスは核酸アナログ耐性にかかわるHBVポリメラーゼ領域を対象とした。				

備考

- ※印の欄には記入しないこと。
- 論文題目が外国語の場合は、カッコを付し和訳を付記すること。
- 論文題目が日本語の場合は、カッコを付し英訳を付記すること。
- 論文内容要旨は、(研究の目的)、(方法)、(結果)、(考察)、(結論)の順に日本語(2,000字程度)もしくは英語(半角5,000字程度)でまとめ、タイプ等で印字すること。(文字数を記載してください。)

論文内容要旨 (続紙)

(ふりがな)
氏名(自署)

松田 秀哉

印

(結果),

血清 HBV-RNA は全症例 186 例のうち 47 例 (25%) に検出された。病期ごとに検討すると、免疫寛容期、急性増悪期では全例で HBV-RNA 陽性、非活動性キャリア期では 3 例 (5%) のみが HBV-RNA 陽性、s 抗原陰性期では全例で血清 HBV-RNA 陰性であった。慢性肝炎症期では 37 例 (35%) で血清 HBV-RNA 陽性であった。病期による血清 HBV-RNA 値の差は有意であった ($P < 0.001$)。

慢性肝炎期の血清 HBV-RNA 値は他の病期と異なり未検出から 9.1 logcopies/ml と広く分布していたため、さらに血清 HBV-RNA 検出に関連する他の因子を解析した。慢性肝炎症期

で、核酸アナログ未投与の患者では 21 例 (48%) で血清 HBV-RNA が検出され、血清 HBV-DNA 量、血清 HB コア関連抗原量と強い相関がみられた。核酸アナログ投与された患者では血清 HBV-RNA が 8 例 (16%) に検出され、血清 HB コア関連抗原量と正の相関がみられた。

薬剤耐性変異によるウイルス学的ブレイクスルーを来した 4 症例の Deep sequence 解析では全ての症例で核酸アナログ導入前からブレイクスルー直前まで薬剤耐性変異は検出されなかった。ブレイクスルー時は血清 HBV-DNA はほぼ全て薬剤耐性変異を有する配列である一方、血清 HBV-RNA はすべて核酸アナログに耐性変異を有しない配列であった。核酸アナログ add-on 後ブレイクスルーが収束した時点での血清 HBV-RNA の耐性変異率はそれぞれ 0%, 3%, 14%, 100% と症例により異なっていた。ブレイクスルーから add-on までの期間が長いほど、またその間の HBV-DNA 量が多いほど、核酸アナログ add-on 後の血清 HBV-RNA の耐性変異率が多い傾向にあった。それらの積と血清 HBV-RNA には強い相関がみられた ($R^2 = 0.9708$)。

(考察),

この研究で確立した方法で血清 HBV-RNA が検出可能であり、検出率は HBV の増殖活動性が高い病期ほど有意に高かった。核酸アナログ投与下で血清 HBVDNA が定量感度以下に低下している症例でも、HB コア関連抗原量が高い症例では血清 HBV-RNA が検出されやすかった。

HB コア関連抗原は cccDNA の転写活性を反映していると報告されている。血清 HBV-RNA も同様に核酸アナログ内服下での cccDNA の転写活性を反映する可能性が示唆された。

核酸アナログに対して耐性変異を来した症例の Deep sequence による解析では、ブレイクスルーの期間の長さや HBV-DNA 量に応じて血清 HBV-RNA の薬剤耐性変異の割合は増加していた。cccDNA が維持される仕組みとして、HBV 感染細胞から放出されたウイルス粒子が再び他の肝細胞に感染して新たな cccDNA 形成する機序がヒト肝細胞キメラマウスの実験では報告されていた。ブレイクスルー時に一過性に増加し放出された HBV 粒子は、同様に別の肝細胞に感染し新たな cccDNA を形成して、それが核酸アナログ追加後の HBV-RNA に検出された耐性変異配列の由来となった可能性が高い。これらの結果により、血清 HBV-RNA のシーケンスにより cccDNA の動態を間接的に観察できる可能性が示唆された。

(結論)

血清 HBV-RNA は核酸アナログ投与下において cccDNA の転写活性を反映するマーカーであった。またそのシーケンスによる解析は、これまで明らかでなかった核酸アナログ投与下の cccDNA の動態解析に有用であった。

(2085文字)