



# Early changes in quasispecies variant after antiviral therapy for chronic hepatitis B

Liang, Yujiao

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7148号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007148>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Early changes in quasispecies variant after antiviral therapy for chronic hepatitis B

慢性B型肝炎に対する抗ウイルス療法における次世代シーケンサーを用いたウイルス  
多様性の初期変化の検討

## 論文の要旨

B 型肝炎に対する核酸アナログ治療は、ウイルスポリメラーゼの阻害作用にもとづくものであることが知られている。次世代シーケンサーを用いて、治療開始後初期のウイルス多様性の変化を全ゲノムレベルで検討することにより、これまで知られていない薬剤感受性の高い領域や治療抵抗性に関与する可能性のある領域を同定することを目的とした。11 例の核酸アナログ製剤による治療を受けた B 型肝炎患者を対象とした。治療前および治療後早期の B 型肝炎ウイルスの全ゲノムの多様性を次世代シーケンサーにて解析し、治療後に変化が見られた領域の検討を行った。ウイルス変異に伴って予想されるウイルス蛋白の構造変化は Lasergene Protean v14.1 ソフトウェアを用いて検討した。その結果、ウイルス多様性は治療前に比べて治療後には有意に増えていること ( $3.08\% \pm 1.28\%$  vs.  $3.51\% \pm 1.47\%$ ,  $P<0.008$ )、特に RT 領域に有意であること ( $3.76\% \pm 1.25\%$  vs.  $4.52\% \pm 1.37\%$ ,  $P<0.012$ ) が確認された。また HBs 抗原のドメインにおいても治療後には多様性の増加が認められた ( $6.81\% \pm 3.26\%$  vs  $7.81\% \pm 3.26\%$ ,  $P<0.040$ )。治療前後の多様性変化が見られたアミノ酸変異部位の多くは RT 領域 (RT1 モチーフ) と Small S 領域であった。蛋白構造変化に関わる変異はコア領域の I97L と P130T に認められた。治療早期におけるウイルス多様性の変化、アミノ酸変化については、長期投与後のウイルス感受性や耐性にも関与する可能性があることが示唆された。

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

病理病態学

(指導教員：林 祥剛 教授)

梁 玉姣

## 背景と目的

B型肝炎ウイルスは、感染既往を含めると全世界では20億人、約2億5700万人が現在も持続感染しているとされ、肝硬変から肝細胞癌につながるウイルスである。ウイルス学的には約3200塩基長の不完全二本鎖DNAウイルスであり、ポリメラーゼ、Surface、コア、Xの4つの重なり合う領域から構成されている。慢性B型肝炎に対しては、DNAポリメラーゼ活性を抑えてウイルス複製を抑制する核酸アナログ製剤が広く用いられている。核酸アナログ製剤は有効な治療ではあるが、HBs抗原の完全な排除がなされて臨床的治癒に至ることは稀である。また長期投与に伴って薬剤耐性の出現も認められていることがある。

薬剤耐性ウイルスは、通常PCRと直接塩基配列決定にて同定されていた。近年次世代シーケンサーを用いたultra-deep sequence法では一度に数万単位の多様なウイルスを解析することが可能であり、さまざまな病態や薬剤耐性に関わるウイルス変異を検討することが可能となった。

本研究では、B型慢性患者における核酸アナログ製剤による治療前後でのウイルス多様性を、次世代シーケンサーを用いたdeep-sequenceにより解析し、核酸アナログ製剤治療におけるウイルス感受性領域を検討し、既知の薬剤耐性領域との関連についても考察した。

## 対象と方法

対象はB型慢性肝炎にて抗ウイルス治療を開始された11例である。AST、ALTといった一般生化学検査とともに、ルミパルスHBs抗原-HQを用いてHBs抗原を定量的に測定した。またHBV-DNAはコバスTaq-Manキットにより、血中HBV-DNA定量を行った。ついで患者血清からウイルスDNAを抽出した後、PCR法によりウイルス断片の増幅を行い、直接シーケンシング法により塩基配列を確認し、系統樹解析法により遺伝子型を決定した。次いでPCR産物をイルミナ社のマイセックによりディープシーケンスを行い、Genomic Workbench software ver 6.0.1によりウイルス多様性を解析した。ウイルス多様性については、アミノ酸変異が認められた変異とし、変異量については各塩基配列において得られたマッピングリードに対する変異塩基の割合から算出した。ウイルス多様性については、次世代シーケンサーによって得られたアミノ酸変異のうち1%以上の多様性を有意とし、10%以上のMajor populationと1~10%のMinor populationに分類した。塩基配列の変異に伴うポリメラーゼ蛋白とHBs抗原性の変化については、Jameson-Wolf Antigenic Index Prediction algorithm in Lasergene Protean v14.1 softwareをもちいて、アミノ酸置換に伴う2次構造変化の予測を行った。

統計学的にはSPSS ver 24.をもちいてt検定あるいはWilcoxon rank testにより解析を行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意として判定した。

## 結 果

患者背景と血液生化学検査、ウイルス検査についてはTable Iにまとめている。ウイルス学的には全例遺伝子型C2であった。今回検討された検体では、核酸アナログ治療開始後のHBV-DNAは有意に低下し、ALT値は有意に低下していた。シーケンス読み取り深度

(depth)と平均カバー率は十分解析に足りる結果であった。

Figure 1では多様性を有する塩基の割合をについて、HBVウイルスの領域およびドメイン別に検討した。その結果、核酸アナログ治療開始後におけるMajor populationの割合は、Polymerase領域、なかでもRTドメインとSurface領域のSmall Sドメインにおいて、多様性が高くなっていた。多様性の変化が認められる領域についてのアミノ酸置換についてTable IIに一覧とした。その結果、変化の認められた領域の多くはポリメラーゼ遺伝子とS遺伝子の重なり合う領域(overlapping region)で、とくにRTドメインであった(Figure 2)。

今回多様性変化が認められたアミノ酸変異の中で、HBV蛋白の構造変化が予想された領域はTable IIIに示している。いずれの領域も過去の文献で変異の臨床的意義が示されている領域であった。

## 考 察

慢性B型肝炎に対する核酸アナログの薬剤耐性領域としては、ポリメラーゼ領域のM204V/I変異のほかA181T/V、N236TやM250Vが知られているが、その他多くのアミノ酸変異が薬剤耐性に関わっているとされる。今回の検討では、核酸アナログ治療開始後には既知の薬剤耐性のアミノ酸変異は認められていなかった。今回検討した症例ではすべてHBV-DNAの低下が認められていたことから、治療開始初期に薬剤耐性変異が出現するものではないことが伺えた。

今回の検討は次世代シーケンサーを用いて、治療後の核酸およびアミノ酸多様性変化を詳細に検討したものである。ポリメラーゼ領域のRT1モチーフとHBs領域のSmall S領域が特に治療後の変化の大きかった領域であった。治療開始後の変化が長期的な薬剤耐性に繋がるかどうかは今後引き続き検討していく必要がある。特に治療開始後に変異の多く認められたrtH55Q、rtN238H、rtS317A、sG44Eについては、核酸アナログ製剤長期投与後の経過観察が必要になると思われる。

ウイルス蛋白構造変化に関与するアミノ酸変化については、核酸アナログ製剤投与後のコア領域におけるI97LとP130T低下が顕著であった。これらの変異はMHC class IIを制御する領域であり、HBc抗原産生低下を通じて肝細胞癌発癌に関与する変異である。核酸アナログ製剤による治療が、これらのウイルス変異を通じてHBc抗原の抗原性変化、免疫回避機構の変化から肝発癌を抑制していることも予想され、興味深い変異である。

## 結 語

慢性B型肝炎に対する核酸アナログ治療において、治療早期におけるウイルス多様性の変化、アミノ酸変化については、長期投与後のウイルス感受性や耐性にも関与する可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2771号	氏 名	梁 玉姣
論文題目 Title of Dissertation	Early changes in quasispecies variant after antiviral therapy for chronic hepatitis B  慢性B型肝炎に対する抗ウイルス療法における次世代シーケンサーを用いたウイルス多様性の初期変化の検討		
審査委員 Examiner	主 査 勝 = 郁夫 Chief Examiner 副 査 藤 江 子 Vice-examiner 副 査 西尾久英 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

【研究の背景と目的】

B型肝炎ウイルスは、感染既往を含めると全世界では20億人、約2億5700万人が現在も持続感染しているとされ、肝硬変から肝細胞癌につながるウイルスである。ウイルス学的には約3200塩基長の不完全二本鎖DNAウイルスであり、ポリメラーゼ、Surface、コア、Xの4つの重なり合う領域から構成されている。慢性B型肝炎に対しては、DNAポリメラーゼ活性を抑えてウイルス複製を抑制する核酸アナログ製剤が広く用いられている。核酸アナログ製剤は有効な治療ではあるが、HBs抗原の完全な排除がなされて臨床的治癒に至ることは稀である。また長期投与に伴って薬剤耐性の出現も認められていることがある。薬剤耐性ウイルスは、通常PCRと直接塩基配列決定にて同定されていた。近年次世代シーケンサーを用いたultra-deep sequence法では一度に数万単位の多様なウイルスを解析することが可能であり、さまざまな病態や薬剤耐性に関わるウイルス変異を検討することが可能となった。本研究では、B型慢性患者における核酸アナログ製剤による治療前後でのウイルス多様性を、次世代シーケンサーを用いたdeep-sequenceにより解析し、核酸アナログ製剤治療におけるウイルス感受性領域を検討し、既知の薬剤耐性領域との関連についても考察した。

【対象と研究方法】

対象はB型慢性肝炎にて抗ウイルス治療を開始された11例である。AST、ALTといった一般生化学検査とともに、ルミパルスHBs抗原-HQを用いてHBs抗原を定量的に測定した。またHBV-DNAはコバスTaq-Manキットにより、血中HBV-DNA定量を行った。

ついで患者血清からウイルスDNAを抽出した後、PCR法によりウイルス断片の増幅を行い、直接シーケンシング法により塩基配列を確認し、系統樹解析法により遺伝子型を決定した。次いでPCR産物をイルミナ社のマイセックによりディープシーケンスを行い、Genomic Workbench software ver 6.0.1によりウイルス多様性を解析した。ウイルス多様性については、アミノ酸変異が認められた変異とし、変異量については各塩基配列において得られたマッピングリードに対する変異塩基の割合から算出した。ウイルス多様性については、次世代シーケンサーによって得られたアミノ酸変異のうち1%以上の多様性を有意とし、10%以上のMajor populationと1~10%のMinor populationに分類した。塩基配列の変異に伴うポリメラーゼ蛋白とHBs抗原性の変化については、Jameson-Wolf Antigenic Index Prediction algorithm in Lasergene Protean v14.1 softwareをもちいて、アミノ酸置換に伴う2次構造変化の予測を行った。

統計学的にはSPSS ver 24をもちいてt検定あるいはWilcoxon rank testにより解析を行い、 $p<0.05$ を統計学的に有意として判定した。

【結果】

患者背景と血液生化学検査、ウイルス検査についてはTable Iにまとめている。ウイルス学的には全例遺伝子型C2であった。今回検討された検体では、核酸アナログ治療開始後のHBV-DNAは有意に低下し、ALT値は有意に低下していた。シーケンス読み取り深度(depth)と平均カバー率は十分解析に足りる結果であった。

Figure 1では多様性を有する塩基の割合をについて、HBV ウイルスの領域およびドメイン別に検討した。その結果、核酸アナログ治療開始後における Major population の割合は、Polymerase 領域、なかでも RT ドメインと Surface 領域の Small S ドメインにおいて、多様性が高くなっていた。多様性の変化が認められる領域についてのアミノ酸置換について Table II に一覧とした。その結果、変化の認められた領域の多くはポリメラーゼ遺伝子と S 遺伝子の重なり合う領域 (overlapping region) で、とくに RT ドメインであった (Figure 2)。

今回多様性変化が認められたアミノ酸変異の中で、HBV 蛋白の構造変化が予想された領域は Table III に示している。いずれの領域も過去の文献で変異の臨床的意義が示されている領域であった。

#### 【考察】

慢性 B 型肝炎に対する核酸アナログの薬剤耐性領域としては、ポリメラーゼ領域の M204V/I 変異のほか A181T/V、N236T や M250V が知られているが、その他多くのアミノ酸変異が薬剤耐性に関わっているとされる。今回の検討では、核酸アナログ治療開始後には既知の薬剤耐性のアミノ酸変異は認められていなかった。今回検討した症例ではすべて HBV-DNA の低下が認められていたことから、治療開始初期に薬剤耐性変異が出現するものではないことが伺えた。

今回の検討は次世代シーケンサーを用いて、治療後の核酸およびアミノ酸多様性変化を詳細に検討したものである。ポリメラーゼ領域の RT1 モチーフと HBs 領域の Small S 領域が特に治療後の変化の大きかった領域であった。治療開始後の変化が長期的な薬剤耐性に繋がるかどうかは今後引き続き検討していく必要がある。特に治療開始後に変異の多く認められた rtH55Q、rtN238H、rtS317A、sG44E については、核酸アナログ製剤長期投与後の経過観察が必要になると思われる。

ウイルス蛋白構造変化に関与するアミノ酸変化については、核酸アナログ製剤投与後のコア領域における I97L と P130T 低下が顕著であった。これらの変異は MHC class II を制御する領域であり、HBc 抗原産生低下を通じて肝細胞癌発癌に関与する変異である。核酸アナログ製剤による治療が、これらのウイルス変異を通じて HBc 抗原の抗原性変化、免疫回避機構の変化から肝発癌を抑制していることも予想され、興味深い変異である。

#### 【結語】

慢性 B 型肝炎に対する核酸アナログ治療において、治療早期におけるウイルス多様性の変化、アミノ酸変化については、長期投与後のウイルス感受性や耐性にも関与する可能性がある。

本研究は慢性 B 型肝炎に対する核酸アナログ治療において、次世代シーケンス解析法で解析した結果、治療早期におけるウイルス多様性の変化、ポリメラーゼ領域や S 抗原領域にアミノ酸変化が起り、ウイルスの薬剤耐性に関与することを明らかにした。これらの結果から、核酸アナログ治療の早期ウイルスゲノム変化が耐性変異に重要であるという知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。