



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1501号
学位記番号	第1073号
氏名	林 佐奈衣
授与年月日	平成 27 年 7 月 24 日
学位論文の題名	Characterization of Novel Entecavir Resistance Mutations (新規エンテカビル耐性株 (rtI163V/A186T) の同定とその特徴) Journal of Hepatology, 2015 Mar 24, Epub ahead of print
論文審査担当者	主査： 岡本 尚 副査： 城 卓志, 田中 靖人

論文内容の要旨

現在、B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染者に対して治療で使用される核酸アナログ（NAs; nucleos(t)ide analogues）は、HBVの逆転写酵素（rt; reverse transcriptase）を阻害することでHBVの複製を抑制する効果的な治療薬であるが、一方でNAs耐性株の出現による治療不応が懸念される。

本研究では、臨床で用いられる代表的なNAsであるラミブジン（LAM）からエンテカビル（ETV）治療へ切り替え後、viral breakthrough（VBT）を来したB型慢性肝炎1例より新規ETV耐性変異を同定し、そのウイルス学的特徴を解析したので、報告する。

はじめに、ETV治療下でVBTを起こしたNAs不応の機序を明らかにするため、ETV治療前およびVBT時の血清中に含まれる、HBVゲノムのポリメラーゼrt領域に対してダイレクトシーケンス解析を行い、NAs耐性変異の有無を検証した。その結果、VBT時では既知LAM耐性変異（rtL180M/M204V）及び新規2変異（rtI163V/A186T）の4変異を同定した。次に、この新規変異（rtL180M/M204V/I163V/A186T）の特徴を明らかにするため、1.24倍長HBV genotype Ceクローンに対してsite-directed mutagenesis法によりこれらの変異を挿入し、*in vitro*におけるETV感受性試験とHBV複製効率の比較を行った。Huh 7細胞へ各クローンをトランスフェクションし、ETV添加72時間後の細胞内HBV複製量をサザンブロットング法により測定した。ETVに対する各クローンのIC₅₀を算出した結果、野生株では9.0 nM、新規耐性株の163/186/LAM、186/LAMでは>1000 nMと、野生株と比較して111.1倍以上のETV耐性能を有し、既知ETV耐性株（rtS202G/L180M/M204V）と同程度の耐性能であることが明らかとなった。また、163/186/LAM、186/LAMの複製効率は野生株より低値を示したが（ $p < 0.01$ ）、163/LAMと野生株に差はみられなかった。以上の結果より、A186T変異はETV耐性に寄与するがHBV複製効率を減弱させ、I163V変異は186/LAMの複製能を補うことが示唆された。

さらに、VBT時の患者血清をヒト肝細胞キメラマウスへ感染させ、ETVを0.02 mg/kg/dayで14日間連続投与し、*in vivo*におけるETV感受性試験を行なった。その結果、コントロールとして設けたHBV野生群ではETV投与3日後より血中HBV-DNAは有意に低下したが、患者血清を感染させたVBT群では血中HBV-DNAの変動は認められずETV耐性能を示した。そこで、VBT群のETV投与前/中/後におけるHBVクローン含有率を次世代シーケンス法により解析した結果、HBV株の含有率はETV投与前/中/後とも163/186/LAMが優勢を示し（78.4%/85.6%/91.7%）、次いで163/LAM、野生株、186/LAMの順に検出された。以上より、*In vivo*において、VBT時の血清中に含まれるHBVはETV耐性能を有し、ETV治療下において163/186/LAMは生存能が高いことが示唆された。

最後に、3D docking simulationにより新規耐性変異（rtI163V/A186T）を保有する逆転写酵素と、ETVの結合性評価を行った。シミュレーション解析を行った結果、163/186/LAM、186/LAMは、既知ETV耐性株と同程度のBinding potentialを示した。以上より、A186T変異は、ETVと逆転写酵素の結合能力を低下させることにより、ETV耐性能を示す可能性が示唆された。

本研究は、新規に同定されたHBV変異株（rtL180M/M204V/I163V/A186T）のウイルス学的解析を行った結果、A186T変異はETV耐性能を有し、I163V変異はHBV複製能を補うことでETV耐性株として複製しうることで世界で初めて証明された。

論文審査の結果の要旨

B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者に対して治療で使用される核酸アナログ (NAs; nucleos(t)ide analogues) は、HBV の逆転写酵素 (rt; reverse transcriptase) を阻害することで HBV 複製を抑制するが、NAs 耐性株の出現による治療不応が懸念される。本研究では、ラミブジン (LAM) からエンテカビル (ETV) 治療へ切り替え後、viral breakthrough (VBT) を来した B 型慢性肝炎 1 例より新規 ETV 耐性変異 (rtI163V/A186T) を同定し、そのウイルス学的特徴を解析した。

本研究では HBV Genotype Ce に持続感染した ETV 不応の 34 歳男性を対象としてウイルス遺伝子解析から得られた変異株を元にウイルス学的検討を行った。ETV 治療前および VBT 時の血清中に含まれる HBV ゲノムの rt 領域に対してダイレクトシーケンス解析を行った。1.24 倍長 HBV genotype Ce クローンに対して VBT 時に検出された rt 領域変異を挿入し、ETV 感受性試験と複製効率をサザンブロット法により解析した。VBT 時の患者血清を感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて ETV 感受性試験を行い、ETV 投与前/中/後の HBV クローン含有率を次世代シーケンサーを用いて解析した。また、3D docking simulation を用いて逆転写酵素と ETV の結合性の *in silico* での評価を行った。

VBT 時では 2 種の既知 LAM 耐性変異 (rtL180M/M204V) と新規 2 変異 (rtI163V/A186T) の 4 変異を同定した。ETV に対する IC₅₀ を求めた結果、新規耐性株の 163/186/LAM、186/LAM では野生株と比較して 111.1 倍以上の ETV 耐性能を有し、既知の ETV 耐性株と同程度の耐性能であった。また、163/186/LAM、186/LAM の複製効率は野生株より低値 ($p < 0.01$) を示したが、163/LAM と野生株に差はみられなかった。また、*in vivo* 試験では、HBV 野生株を感染させたコントロール群で ETV 投与による血中 HBV-DNA の有意の低下を確認したが、患者血清由来のウイルスを感染させた VBT 群では変動は認められず ETV 耐性能を示し、HBV 株の含有率は ETV 投与前/中/後とも 163/186/LAM が優勢を示した。*In silico* 解析の結果、163/186/LAM、186/LAM は既知 ETV 耐性株と同程度の結合活性を示した。

本研究では、新規 HBV 変異株 (rtL180M/M204V/I163V/A186T) のウイルス学的解析を行った。その結果、新規 A186T 変異は ETV 耐性能を有することが世界に先駆けて証明された。今回の知見は、ETV 不応例に対する治療方針に貢献することが期待される。

審査委員会では、主査の岡本教授より、rtI163V/A186T 変異が ETV 耐性能を有することを証明した方法論、ドッキングシミュレーションの方法、薬剤耐性変異を獲得する法則性、LAM/ETV 耐性変異が ETV 抵抗性を示す分子メカニズム、など論文の背景、方法、結果、考察に関する 15 項目の質問、第一副査の城卓志教授より、*in vitro* で用いたクローンと HBV 構造の意義について、RT 領域以外の変異と薬剤耐性に与える影響、ユニバーサルワクチネーションと HBV 駆逐への展望、など研究方法と臨床との関係に関して 5 項目の質問があった。また指導教授である第二副査の田中靖人教授より、HBV レセプター、HBV 再活性化の特徴、肝炎ウイルスとその特徴、B 型肝炎に対する創薬研究の現状と今後の展望、など専門領域に関する 4 項目の質問があったが、おおむね良好な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野に関する知識を習得しているものと判断された。本研究では、ETV 不応患者より同定された新規 ETV 耐性変異 (rtI163V/A186T) の解析を行った結果、核酸アナログ治療のモニタリングに貢献することが期待され、臨床的にも意義のある研究と考えられた。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚 教授 副査 城 卓志 教授、田中 靖人 教授