

Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants and evolution of HBV sequences during adefovir dipivoxil therapy

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 文孝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/380

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 441号	学位授与年月日	平成19年 4月20日
氏名	鈴木文孝		
論文題目	Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants and evolution of HBV sequences during adefovir dipivoxil therapy (アデフォビル・ディピボキシル投与中のラミブジン耐性変異のウイルス量の変化と HBV 遺伝子配列の進展)		

博士(医学) 鈴木文孝

論文題目

Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants and evolution of HBV sequences during adefovir dipivoxil therapy

(アデフォビル・ディピボキシル投与中のラミブジン耐性変異のウイルス量の変化とHBV遺伝子配列の進展)

論文の内容の要旨

[はじめに]

B型肝炎患者の治療の目標はB型肝炎ウイルス(HBV)の増殖を持続的に抑制し、病気の進展を抑え、改善させることである。ラミブジンはHBVの増殖を抑制し、肝機能や肝組織像の改善をもたらすが、投与中に耐性ウイルスが出現し肝炎の再燃を来することが問題点となっている。アデフォビル・ディピボキシル(ADV)には、ラミブジン耐性ウイルスに対して、ウイルス学的、生化学的效果が認められることが臨床研究で示されている。最近、3種類のラミブジン耐性ウイルス(reverse transcriptase[rt]M204I, rtM204V, rtL180M)をそれぞれ高感度に定量測定できるreal-time polymerase chain reaction (RT-PCR)法が報告された。一方ラミブジンは、HBVのプレコア(nucleotide[nt] 1896)、コアプロモーター(nt 1762, 1764)の変異型への効果が高いことが報告されている。しかしラミブジン耐性ウイルスに対するADV投与の効果は不明である。さらにADVを単独投与した場合には、HBVのポリメラーゼのrt領域(nt 130-1161)に、ADV耐性に関係するアミノ酸変異の出現が報告されているが、ラミブジン耐性ウイルスに対してADVとラミブジンを併用投与した場合のこの領域のアミノ酸の変化についても不明である。本研究では、ラミブジン耐性ウイルスに対するADVの効果として、各耐性ウイルス量の変化、プレコア、コアプロモーター領域およびrt領域の変化について検討した。

[症例および方法]

2002年11月から2004年6月までにラミブジン耐性ウイルスによる肝炎を認め、ADV治療を開始した39例を対象とした(グループ1)。また同様の症例に対してインターフェロン療法を施行した9例(グループ2)を比較対照とした。ラミブジン耐性ウイルス量は、Puniaらの方法を基にRT-PCR法にて経時的(開始時、2、4、8、12週目、一部症例では24、52週目)に測定した。またADV投与症例15例ではHBV DNAのプレコア、コアプロモーター領域及びrt領域の遺伝子配列を、ラミブジン開始時、ADV開始時、ADV投与1年後でPCRによる直接塩基配列決定法にて測定した。

[結果]

グループ1のADV投与群39例において、開始時から12週目までのDNA減少量を各耐性ウイルスで測定すると、統計学的には有意差を認めないものの、rtM204IとrtL180Mの減少量がrtM204Vよりも多かった。またHBe抗原陰性例のrtM204IのDNA減少量が最も多かった。グループ2のインターフェロン投与9例では、rtM204VがrtM204IよりもDNAの減少量が多かったが、統計学的有意差はなかった。グループ1のADV投与39例中52週目の時点でDNA量が2.6 Log copy/ml以上であった症例は11例であった。このうちADV開始時rtM204IとrtM204Vの混合型は6例であった。この混合型で開始時rtM204IとrtM204Vのウイルス量の差が10

倍以内であった3例では、52週目にrtM204Vが主要ウイルスとなっていた。

グループ1の15例においてプレコアおよびコアプロモーターの推移を測定した。ADV開始時にプレコア変異(A1896)は15例中9例に認められたが、1年後には3例で野生型(G1896)に変化し、1例は変異型から混合型(野生型と混在)に変化した。従って測定可能であった8例中3例に変異を認めた。コアプロモーターはADV開始時全例に変異(T1762, A1764)を認めたが、1例は1年目に野生型(A1762, G1764)となった。rt領域の遺伝子配列の推移を検討すると、ラミブジン開始時と比較してADV開始時では、測定可能であった7例全例で新たな遺伝子変化を認めた。この内5例ではADV1年目の配列がADV開始時と近似していたが、2例ではrtM204I/Vが野生型(rt204M)に変化し、rt領域内の遺伝子変化はADV開始時よりも少なくなるとともに新たな変化が認められた。

[考察]

RT-PCR法による測定系を用いて各耐性ウイルス量の変化を測定したところ、ADVはrtM204Iに対してより効果的に作用すると考えられた。*in vitro*の研究では、ADVはrtM204IとrtM204Vに同等に作用したと報告されており、我々の*in vivo*の結果と違いを認める。ADVの効果については、今後更なる研究が必要である。ラミブジン耐性ウイルスに対するADV治療においても、プレコア変異型は野生型のウイルスに置き換わる症例が認められた。このことは核酸アナログ製剤がプレコア変異型により効果的に作用している可能性を示唆している。ラミブジン耐性ウイルスに対するADV投与時におけるrt領域の変化の検討では、ADV開始時と1年目ではアミノ酸の変化は少なかった。ただし治療効果の高い症例ではrtM204I/Vが野生型へ変化しており、ラミブジン耐性ウイルスを選択的に強力に抑えているものと考えられた。

[結論]

ADVは*in vivo*においてrtM204Iにより効果的に作用するとともに、プレコア変異型の増殖を抑制し、野生型のウイルスの出現を導きやすい。最も効果的な場合は、rt領域においてもrt204が野生型であるウイルスが再出現していた。

論文審査の結果の要旨

B型肝炎患者に対するラミブジン治療はB型肝炎ウイルス(HBV)の増殖を持続的に抑制し、肝機能や肝組織像の改善をもたらすが、投与中に耐性ウイルスが出現し肝炎の再燃を来することが問題点となっている。このようなラミブジン耐性ウイルスに対してアデフォビル・ディボキシル(ADV)を投与することにより、ウイルス学的、生化学的効果が認められることが臨床研究で示されている。そこで、申請者はラミブジン耐性ウイルスに対するADV投与後のラミブジン耐性ウイルス量の変化、プレコア、コアプロモーター領域およびreverse transcriptase領域の塩基変化について検討した。

2002年11月から2004年6月までにラミブジン耐性ウイルスによる肝炎に対し、ADV治療を開始した39例(グループ1)及びインターフェロン療法を施行した9例(グループ2)を比較検討した。3種類のラミブジン耐性ウイルス(reverse transcriptase[rt]M204I, rtM204V, rtL180M)をreal-time polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて経時的(開始時、2、4、8、12週目、一部症例では24、52週目)に測定した。またADV投与症例15例ではHBV DNAのプレコア、コアプロモーター領域及びrt領域の遺伝子配列を、ラミブジン開始時、ADV開始時、ADV投与1年後においてPCRによる直接塩基配列決定法にて測定し、以下の結果を得

た。

グループ1のADV投与群39例において、開始時から12週目まででは、統計学的には有意差を認めないものの、rtM204VよりもrtM204IとrtL180Mをもつウイルスが減少した。またHBe抗原陰性例のrtM204をもつウイルスの減少量が最も多かった。グループ2では、rtM204VをもつウイルスがrtM204Iをもつウイルスよりも減少量が多い傾向を認めた。グループ1では52週目の時点でウイルス量が2.6Log copy/ml以上であった症例は11例であり、ADV開始時rtM204IとrtM204Vの混合型は6例あった。この6例中、開始時のrtM204IとrtM204Vのウイルス量の差が10倍以内であった3例では、52週目にrtM204Vが主要ウイルスとなっていた。

グループ1の15例でプレコアおよびコアプロモーターの塩基配列の推移を測定した。ADV開始時にプレコア変異(A1896)は15例中9例に認められたが、1年後には3例で野生型(G1896)に変化し、1例は変異型から混合型(野生型と混在)に変化した。コアプロモーターはADV開始時全例に変異(T1762、A1764)を認めたが、1例は1年目に野生型(A1762、G1764)となった。rt領域の遺伝子配列の推移を検討すると、ラミブジン開始時と比較してADV開始時では測定可能であった7例全例で新たな遺伝子変化を認めた。この内5例ではADV1年目の配列がADV開始時と近似していたが、2例ではrtM204I/Vが野生型(rt204M)に変化し、rt領域内の遺伝子変化はADV開始時よりも少なくなるとともに新たな変化が認められた。

以上の結果から申請者は、(1)ADVは*in vivo*においてrtM204Iをもつウイルスにより効果的に作用するとともに、プレコア変異型ウイルスの増殖を抑制し、野生型のウイルスの出現を導きやすく、(2)最もADVが効果的な場合は、rt領域においてもrt204が野生型であるウイルスが再出現しており、ラミブジン耐性ウイルスを選択的に強力に抑えている、との結論に至った。

審査委員会では、薬物治療を行っているB型肝炎症例を対象として、最新のウイルスゲノムの塩基配列解析方法により、ラミブジン耐性ウイルスに対するADVの選択的抑制効果を初めて明らかにした点を高く評価した。さらにADV投与は野生型ウイルスの出現を導きやすいことを示したことは、今後のB型肝炎治療において極めて有用な知見であり、この点も高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ラミブジンの作用機序について
- 2) ラミブジン耐性ウイルス出現の経時的变化について
- 3) HBV感染の成立と肝細胞障害について
- 4) HBVの変異とbreak through hepatitisとの関係について
- 5) ラミブジンとADVの併用によるラミブジン耐性ウイルスの変異について
- 6) 薬剤投与中断によるラミブジン耐性ウイルスの変化について
- 7) rtM204Iに対する抑制効果の統計学的解析について
- 8) プレコア、コアプロモーター領域の変異と肝病変との関連について
- 9) プレコア、コアプロモーター領域の変異とHBe抗原蛋白の分泌について
- 10) プレコア、コアプロモーター領域の変異と薬剤の効果について
- 11) ラミブジン、ADVの副作用について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 今野 弘之
副査 三浦 直行 副査 梅村 和夫