

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590753

研究課題名（和文）薬剤耐性肝炎ウイルスにおける単塩基変異株の定量測定系の開発

研究課題名（英文）The development of a quantitative assay of a single-nucleotide mutant of drug-resistant hepatitis virus.

研究代表者

髭 修平 (HIGE SHUHEI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：70261295

研究成果の概要（和文）：

B型肝炎治療に用いられる核酸アナログ製剤の臨床上の問題は、耐性変異ウイルスが出現して肝炎の再燃を起こすことである。生体内には複数の変異株が混在している事が多いが、これまで、個々の変異ウイルスを正確に測定する事は困難であった。今回、複数の変異ウイルスが混在した状態でも、1カ所の塩基が変異しているウイルス株を個別に、高感度に定量することのできる新しい方法を開発した。本測定系は、他の変異株測定にも応用可能な方法である。

研究成果の概要（英文）：

The most serious problem for patients with chronic hepatitis B who are administered with nucleotide analogues is the emergence of a resistant mutant virus and the occurrence of breakthrough hepatitis. Since hepatitis virus exists in a mixed population with multiple mutant strains, it has been difficult to measure each mutant strain accurately so far. In this study, a new sensitive method for quantification of a single-base mutant within the mixed population has been developed. This assay raised the possibility to have versatility as a sensitive method for the quantification of a single nucleotide mutation in a heterogeneous population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝炎ウイルス、薬剤耐性、変異株、変異株定量、核酸アナログ、MGBプローブ、ペプチド核酸、real-time PCR

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス（HBV）またはC型肝炎ウイルス（HCV）に起因する慢性肝疾患（慢性肝炎、肝硬変）あるいは肝癌発生は、わが国においては重要な国民病のひとつであり、肝疾患関連死亡者を減少せしめることは喫

緊の課題である。その中で、HBVあるいはHCVのウイルス量定量は、肝炎の病態、活動性、抗ウイルス治療の評価・判定などにおいて臨床的に最も重要な臨床検査である。近年、ウイルス学的研究の進歩により、肝炎ウイルスにおける様々な遺伝子変異の存在が

明らかにされてきた。肝炎に罹患した患者体内は様々に変異したウイルスの混在 (quasispecies) 状態にあると推測されている。さらに、わが国で 2000 年から B 型肝炎患者の治療の保険適応となった lamivudine (LAM) 治療における臨床上的最大の問題点が耐性変異株の高率な出現であり、投与開始後 3 年間で 50~60% の症例に耐性株の出現が確認されている。この変異株の定量的測定について、real-time PCR 法を応用した方法が報告された。我々は、既に LAM 治療における HBV ポリメラーゼ領域変異の経時的変化について報告した。さらに、MGB(minor groove binder)プローブを用いた定量法を臨床化し、一塩基多型を高感度に検出することを可能とした。しかし、その後の解析で、複数の変異株が混在する場合は特異性・定量性が低下することも明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、上記の欠点を克服し、複数の変異ウイルス株混在下において測定対象株のみの選択的定量を可能とさせるため、ペプチド核酸 (PNA) を測定系に導入し、その、基礎的検討、臨床的有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) ウイルス量定量のための各種変異の標準用株の作成。

- ① B 型肝炎患者血清から、ダイレクトシーケンセンス法による HBV 遺伝子配列の測定。
- ② 各種変異株と野生株を有する検体の同定。
- ③ クローニングにて、各種変異株のライブラリー作成。
- ④ 濃度を調整し、定量測定目的の標準サンプルを作成。

HBV-DNA 定量時の内部標準用に、ダイレクトシーケンセンスで塩基配列を特定済みの B 型肝炎患者血清から HBV プラスミドを作成した。pGEM[®]-T Easy Vectors を使用し、YMDD と LLAQ モチーフを含む 813bp の HBV-DNA フラグメントをベクターにライゲーションした。このベクターをコンピテントセル E. coli XL-1 に組込み 37°C で 24 時間培養し、クローニングを行った。培養液を遠心分離後して得たペレットからモノクローナル HBV プラスミドを精製し、標準用サンプルとした。標準用 HBV プラスミドは YMDD、LLAQ の各野生株・変異株毎に作成した。各株のプラスミドを 10 log copies / ml に調整し、10 から 1 log copies / ml まで 10 倍毎に希釈した系列を内部コントロール用テンプレートとした。

HBV ポリメラーゼ領域の rt204 を含む野生株 YMDD モチーフとその変異株である YIDD-1、YIDD-2、YVDD の 3 株を、rt180 を含む野生株 LLAQ モチーフとその野生株である LMAQ 株を、

それぞれ測定対象株として準備した。

(2) MGB プローブを用いた real-time PCR 法における変異ウイルス定量性の検討：MGB プローブを単独で用いた場合の定量性の評価。

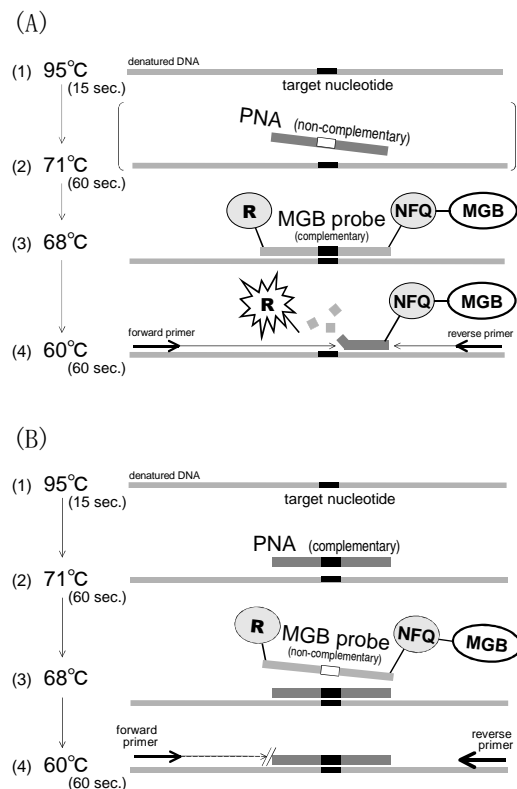
- ① MGB プローブに相補的な株のみの検体における定量性 (感度・特異度) の解析。
- ② 非相補的な株に対する特異性の解析。
- ③ 複数株混在下の個別 MGB プローブ法の特異性の検討。

Real-time PCR の条件は、95°C、10 分に続き、denature を 95°C で 15 秒、annealing を 60°C で 1 分、extension を 50°C で 1 分とし、50 サイクル施行した。

10 倍毎に希釈した標準用プラスミドの測定対象株に一定濃度の混在株を加え、MGB プローブ単独で real-time PCR を行った場合の定量性を検討した。

(3) ペプチド核酸 (PNA) を追加した測定系の検討：一塩基変異に対応するペプチド核酸を追加した測定系の定量性の基礎的検討。

※ 測定法の原理 (図 1)



上図 (A) のように、測定対象株を相補的な MGB プローブを用いて測定した場合には反応が進行し、レポーター色素がプローブから離れて発光する。この場合には、非相補的な PNA は反応系に影響しない。(B) の場合、対象株

に相補的な PNA がプローブとの結合温度よりも高温環境で結合することにより、その後の MGB プローブの非特異的な結合（ミスマッチ）は阻止される。

- ①相補的ウイルス株に対する PNA の結合強度の解析（抑制度）。
- ②非相補株に対する PNA の非特異的結合性の解析。
- ③MGB プローブと PNA 併用下の相補的・非相補的ウイルス株単独の測定性の解析。
- ④複数株混在下の個別株の定量性（感度・特異度）の解析。

PNA のクランピング効果を確認するため、一定濃度の標準検体を (a)相補的 PNA、(b)非相補的 PNA とそれぞれ混合して real-time PCR を施行し、PNA を加えないコントロールと比較した。

次に、MGB プローブと PNA を併用した real-time PCR を、単独株（相補的・非相補的）、混在株に対して施行した。

(4) 新規定量測定系を用いた臨床検体の測定：MGB プローブと PNA を併用した新規測定系により患者血清の測定を行い、臨床的な有用性の検討を行う。

4. 研究成果

(1) MGB プローブを用いた real-time PCR による標準検体の測定性。

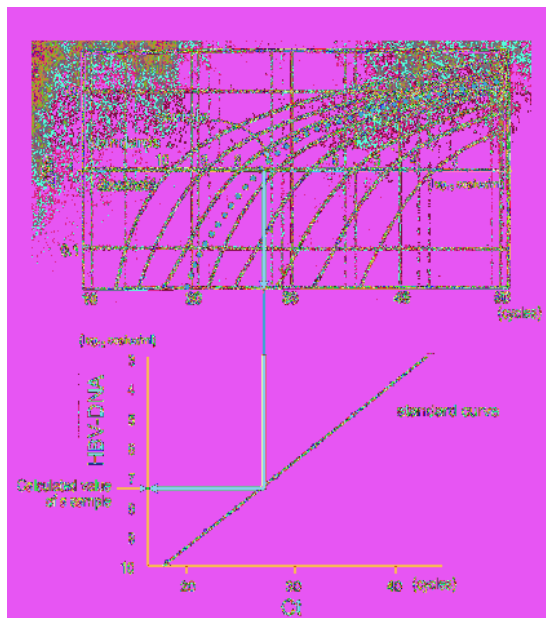


図 2. Real-time PCR 法による算出法

上図のように、標準用 HBV プラスミドを 10 倍毎の希釈系列で測定すると、いずれの変異

株も 3.0~10.0 log copies/ml の範囲で直線性を認め、内部コントロールとして使用可能である事を確認した。

(2) MGB プローブ単独による real-time PCR 法による混在株の定量性。

10 倍毎に希釈した標準用プラスミドの測定対象株 (8~4 log copies / ml) に 6 log copies / ml の混在株を加え、MGB プローブ単独で real-time PCR を行った。対象株が優位である 8、7、6 log copies / ml の検体では定量性を認めたが、非対称株が優位となる 5、4 log copies / ml レベルの検体では定量性を認めなかった。複数株が混在する検体では、MGB プローブ単独では優勢株のみが定量測定可能であり、非優勢株を定量することができなかった。

(3) PNA のクランピング効果

6 log copies / ml の HBV 検体を、5、25、50、100、200、300、500 pmol の、(a)相補的 PNA、(b)非相補的 PNA、と混合し、PNA を加えないコントロールと比較した。PNA の濃度が 100 pmol 以下では増幅への影響は軽度であった。

(4) 複数株混在下の個別株の定量性（感度・特異度）

複数株混在下で優勢株を測定するため、9~3 log copies / ml の段階希釈標準用 HBV プラスミドに、3 log copies / ml の混在株を加え測定を行った。優勢株の測定においては定量性に变化なく、単独株と同様に 3.0~9.0 log copies / ml の範囲で定量可能であった。複数株混在下で非優勢株を測定するため、9~3 log copies / ml の段階希釈標準用 HBV プラスミドの測定対象株に、9 log copies / ml の混在株を加え測定した。9~5 log copies / ml の範囲で対数濃度と Ct に直線的相関を認めた。この結果から、非優勢株の測定限界は、優勢株の 0.01%であった。

(5) 臨床検体における変異株測定の意義

核酸アナログ製剤投与中の B 型慢性肝障害患者について、本研究で開発した新規定量系を用いて、経時的な HBV-DNA 量、変異ウイルス量の測定を行った。その結果、血中の HBV-DNA 量には変化を認めず、変異株間での変化が生じたために breakthrough hepatitis を来した症例を明らかにし、臨床的にも有用であることが示された。

(6) 本研究の成績と考察

B 型肝炎患者に対する治療で、現在、最も高頻度で使用される薬剤が核酸アナログ製剤であるが、臨床上的最大の問題は耐性変異の出現にともなう肝炎の再燃である。一般臨床では、血中 HBV-DNA 量の上昇が参考にはなるものの、正確な変異株の評価は困難であった。変異株の検出に関しては、種々の測定系が開発され、定性的な検出感度は高まってきている。しかし、変異株の定量系に関しては、

これまでに十分な測定系は確立していない。

我々は、これまでに、HBV 変異株測定に MGB プローブを用いた real-time PCR を導入し、定量性の高い測定を開発してきた。(S. Yoshida, S. Hige et al. Ann Clin Biochem. 45: 59-64, 2008) しかし、実際に肝炎に罹患した患者体内は様々に変異したウイルスの混在 (quasispecies) 状態にあり、個々のウイルスの定量的測定は困難であった。特に、混在する非優勢株の定量に関しては、優勢株の影響により正確な測定が困難であることが、本研究で示された。

我々は、上記の問題を解決するために、real-time PCR の測定系にペプチド核酸 (peptide nucleic acid: PNA) を導入した。その結果、従来報告されてきた変異株定量法と比較して、高感度、かつ、特異性の高い測定を行う事が可能となった。

本研究の成果は、既報の測定法と比較して有意義な方法であることを明らかにしており、学術論文として受理、報告された。

本研究では、ラミブジン治療中の B 型肝炎患者における耐性変異株の測定を行ったが、今回開発された新規測定系の原理は、他の対象に応用可能であり、混在する単塩基株の高感度定量測定法として普遍的な意味を有していると考えられる。

ウイルス性肝炎の領域に限定しても、近年、ラミブジン以外の B 型肝炎治療用核酸アナログ製剤の開発、あるいは、C 型肝炎への新規治療としてプロテアーゼ阻害剤の開発、などが急速に進行しており、変異ウイルスの定量測定の臨床的必要性は、益々高まっている状態である。今後、本研究で開発された測定法の広範囲な領域での臨床的使用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Shuhei Hige, Yoichi Yamamoto, Shigeru Yoshida, Tomoe Kobayashi, Hiromasa Horimoto, Keiko Yamamoto, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Mitsuru Nakanishi, Makoto Chuma, Masahiro Asaka.

Sensitive Assay for Quantification of Hepatitis B Virus Mutants by Use of a Minor Groove Binder Probe and Peptide Nucleic Acids. Journal of Clinical Microbiology. 48:4487-4494. 2010 査読あり。

[学会発表] (計 1 件)

1) Shuhei Hige. Quantitative measurements of HBV mutants against lamivudine. USJMSCP- NIH-APASL Joint Symposium. 19th

Annual meeting of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2009. 2. 16. Hong Kong, China.

[その他]

北海道大学学術成果コレクション (略称: HUSCAP) ホームページ:

<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

髭 修平 (HIGE SHUHEI)

北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 70261295

(2) 研究分担者

中馬 誠 (CHUUMA MAKOTO)

北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 30360910

(3) 連携研究者

なし