

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360408

研究課題名（和文） HIV薬剤耐性検査のためのパイロジェノタイピング手法の開発

研究課題名（英文） Development of a pyrosequence-based technique for HIV drug-resistance diagnosis

研究代表者

竹山 春子（TAKEYAMA HARUKO）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60262234

研究成果の概要（和文）： HIV 内での多様な変異を効率的に検出するパイロシーケンスを基盤とした一分子解析手法の確立と HIV の quasispecies 形成の機構解明をシーケンスによって検討した。結果、10 コピー以下の cDNA 分子の個別増幅が可能なシステム構築が達成でき、かつ quasispecies 形成を解析する基礎となるプロウイルス DNA のサブタイプ分類や Gag, PR が共進化を辿っていることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）： The aim of this research is to develop a single-cell analytical technique based on pyrosequencing to accurately identify diverse mutations within HIV and to conduct sequence-based elucidation of the mechanisms related to HIV quasispecies formation. As a result, we were successful in the establishment of a system for measuring cDNA molecules to as low as 10 copies. Furthermore, we were also successful in tracing the coevolution between the subtypes of HIV quasispecies-related proviral DNA, Gag and PR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：pyrosequencing、HIV、quasispecies、同時並列個別増幅、一分子計測

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は後天性免疫不全症候群（AIDS）の病原ウイルスである。

現在の抗 HIV 治療には現在多剤併用療法が導入されているが薬剤耐性の出現が治療効果を軽減することから、耐性検査が臨床研究

として実施され、HIV 感染者/AIDS 患者が適切な治療薬を選択し効果的な治療を進めるうえで、薬剤耐性検査は欠かせない検査である。同一 HIV 内での多様な変異だけでなく、変異の蓄積様式が異なる多様な HIV が、同一患者に存在し、それらの割合が薬剤投与の状況に合わせて変化する。現在は、その優占種となる HIV をシーケンスで同定しているが、非優占種の同定も次の薬剤耐性の予測には非常に重要となっている。このような状況を踏まえ、未だに様々なジェノタイプ薬剤耐性検査法が開発され続けている。

また、HIV 急性感染期には自然免疫、ウイルス中和抗体（液性免疫）、そして細胞傷害性 T 細胞、CTL（細胞性免疫）などの獲得性免疫応答が複合的に感染阻止に働くにも関わらず、HIV の慢性持続感染は成立する。これは、HIV が感染成立後に多様なウイルス準種 (quasispecies) を生み出して宿主の免疫応答を凌駕して免疫機構から逃避するためである。感染成立後の HIV の quasispecies 成立の動向を網羅的に解析した研究は行われていない

HIV では、ターゲットとなる逆転写酵素やプロテアーゼにおいて少なくとも多様性解析が必要な変異部位が 30 箇所程度存在し、どのような変異を持つ HIV が優占種で、非優占種ではどのような変異があり、それらがどのような割合で共存しているかなどを同時に網羅的に解析することが望まれていることより、シーケンスを基本とした新しい手法の開発が必要とされている。パイロシーケンススペースの大規模遺伝子解析は、サンガー法をベースとしたキャピラリーシーケンスを遙かにしのぐ解析パフォーマンスを有するものとして実用化している。しかしながら、調整した遺伝子断片それぞれの配列決定という面では歩留まりは非常に低い。一方、最近細胞解析を 1 細胞レベルで行う技術開

発が進みつつある。特に、DNA (mRNA) の一分子解析手法が次世代シーケンス解析とともに進みつつある。HIV の様に多様な遺伝子変異や quasispecies の解析へは、これらの技術は非常に有効である。

## 2. 研究の目的

本申請ではこのようなパイロシーケンス、ビーズテクノロジーを利用した精密デジタル解析手法をより精度を高め、HIV-ジェノタイプ判別に適用可能な迅速なプロトコルを開発すること、さらには、HIV 感染者において、免疫応答や抗 HIV 薬剤による選択、そして HIV 遺伝子間の共進化、という 3 つの因子が個体内における HIV の quasispecies 形成にどのように関与しているか、シーケンススペースに解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) パイロシーケンスのための効率的一分子増幅を目的として、微量コピー数でも効率よく検出でき、シーケンスサンプルに供与できるシステムを構築した。キャピラリープレート (CP:  $3.6 \times 10^5$  ポア、各ポアの直径が 25  $\mu\text{m}$  (容積: 約 490 pL) を用いた cDNA 一分子レベルで増幅、さらにはそれらの定量解析可能なデジタルカウント手法の開発を行った。さらに、パイロシーケンスの条件検討も行った。

(2) 免疫応答による選択として、HIV の envelope、その中でも CTL と中和抗体のエピトープが存在する C2V3 領域を、治療による選択として抗 HIV 薬剤の標的であるプロテアーゼ、逆転写酵素そしてインテグラーゼをコードする pol 遺伝子の配列解析を次世代シーケンサーを用いて行なった。さらに、遺伝子間の相互干渉・共進化の解析には protease とその基質である Gag 間における相互干渉について連鎖不平衡解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 一分子解析のための一分子PCR :

フォスファチジルコリンでコートしたCPを用い、PCR溶液の導入後ミネラルオイル内でPCRを行うことで、遺伝子増幅が可能であることを確認した。検出限界を検証するために、HIV *env*遺伝子をターゲットとして、CP-PCRを行い、増幅されたPCR産物はリアルタイムPCRを用いて定量した。その結果、プラスミドDNA分子数とCPのポア数の相関性が示され、5コピーまでのDNA検出が可能出ることが示された。

更に、上記と同時に、HIV-1モデルウイルスとしてEGFPを組み込んだレンチウイルスをコードするプラスミドCS-CDF-EG-PREおよびDsRedを組み込んだレンチウイルスをコードするプラスミドCSII-EF-MCS(-DsRed)をそれぞれ293T細胞にトランスフェクションすることでEGFPレンチウイルスとDsRedレンチウイルスを作成し、レンチウイルス、CS-CDF-EG-PREおよびCSII-EF-MCS(-DsRed)、それぞれをテンプレートとし、10コピーまでの検出・判別が可能であることを示した。

一方、本申請にて購入した小型パイロシークエンス装置を用いて遺伝子変異を含むシークエンス解析の条件検討を行い、プライマー塩基数、ターゲットの遺伝子サイズ、テンプレート量の最適化が可能であった。

(2) 免疫応答による選択解析では、459例中、RNAから393例、プロウイルスDNAから329例の解析に成功した。このうちサブタイプBと判定されたのは381例(RNA:326、DNA:268)で、未治療269例(同252、200)、既治療71例(同43、37)だった。X4型の割合はRNAでは未治療:既治療が6.3%:18.6%(FPR5%)、14.3%:27.9%(FPR10%)、26.2%:37.2%(FPR20%)だった。プロウイルスDNAではそれぞれ

11.0%:16.2%、18.0%:27.0%、28.5%:35.1%だった。既治療症例の方がX4型の割合が高いことから、MVCは未治療症例の方がより有効性が期待できると示唆された。

次に、治療4症例について次世代シーケンシングによる配列情報の収集を行った。配列情報を得ることには成功したものの、HIVは多様性に富み、通常解析ソフトウェアでは人工的なエラーと実際の置換の識別が困難なことから、解析を継続している。遺伝子間の連鎖不平衡解析では、合計163症例について解析を行った。その結果、132例と一番多かったSubtype Bについて連鎖不平衡解析を行った結果、新たな連鎖がいくつか確認された。その中でも、ウイルスのフィットネスが低下するような耐性変異を獲得した症例では、関連があると評価されたGag変異が多数観察された。さらに、遺伝子間の相互干渉として、薬剤耐性変異の獲得と投与薬剤との関連を詳細に解析するために、Gag、PR、およびRTの分子内、分子間の共進化解析を行った。129クローンの遺伝子配列解析より、8組の共進化ペアが見いだされた。このうち4組はGagとPol間の共進化であり残り4組はprotease内共進化であったGag、PRは独立して変異を獲得するのではなく、相互に干渉しながら共進化を辿っていることを指示する重要な知見を得た。

##### 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2件)

Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H. Within-host Co-evolution of gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case, *Antiviral Res*, 査読有, 90, 2011, p33-41

Yoshino T, Nishimura T, Mori T, Suzuki S,

Kambara H, Takeyama H, Matsunaga T. Nano-sized bacterial magnetic particles displaying pyruvate phosphate dikinase for pyrosequencing, *Biotechnol. Bioeng*, 査読有, 11, 2009, p130-137

[学会発表] (計 18 件)

Suzuki M, Mori T, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Takeyama H. Development of a capillary-plate-based digital counting system for single-cells and its application in HIV analysis, German-Japanese Joint Symposium for Diamond Researchers on Sustainable Life Science Innovation and Biomedical Research, Bonn, Germany. 2011.12

Takeyama H. Application of environmental genome resources and the single cell based technology. The 7th International Forum On Post-Genome Technologies, Chongqing, China. 2011.10

モリテツシ、鈴木基臣、岡村好子、竹山春子. 単一細胞内の分子定量に向けたキャピラリープレート PCR 法の開発. 第 63 回日本生物工学会大会, 東京農工大学、東京、2011.9

Okamura Y, Kambara H, Matsunaga T, Takeyama H. Development of Single Template PCR Technology with Capillary Plate toward single-cell analysis. PACIFICHEM 2010, (Hawaii, USA), 2010.12

岡村好子、神原秀紀、松永是、竹山春子. 単一細胞内遺伝子発現デジタル解析に向けた 1 分子 cDNA の検出. 第 50 回化学センサ研究発表会、神奈川工科大学、神奈川県、2010.9

Takeyama H. Challenge for single cell analysis from microbes to mammalian cells. 7th Joint Symposium between Waseda University and the University of Bonn, Bonn, Germany, 2010.1

柴田潤子、杉浦 互. Within-host coevolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance. Richmond, USA. 2009.11

柴田潤子、杉浦 互. Within-host coevolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly

protease inhibitor-exposed HIV-1 case. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、2009.11

Okamura Y, Shirai M, Kajiyama T, Kambara H, Matsunaga T, Takeyama H. Development of single template amplification and product immobilization on a single bead. The 6th International Forum On Post-Genome Technologies, Beijing, China. 2009.9

岡村好子、竹山春子、白井正敬、梶山智晴、神原秀紀、松永 是. パイロシーケンスに向けた 1 分子 cDNA 増幅集積技術の開発. 第 3 回日本化学会関東支部大会, 東京都、2009.9

[図書] (計 2 件)

竹山春子、モリテツシ、庄子習一, マイクロ流体デバイスのバイオ計測への応用 「ナノ融合による先進バイオデバイス」 民谷栄一監修, シーエムシー出版, 2011

竹山春子、岡村好子、吉野知子、神原秀紀, 一細胞からの mRNA をデジタル計測するための要素技術開発: 「シングルセル解析の最前線」 松永是・神原秀紀・植田充美監修, シーエムシー出版, 2010

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹山 春子 (TAKEYAMA HARUKO)  
所属:早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 60262234

### (2)研究分担者

杉浦 互 (SUGIURA WATARU)  
所属: (独)国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター感染免疫研究部・部長  
研究者番号: 70300936  
(H21 → H23)

岡村 好子 (OKAMURA YOSHIKO)  
所属: 広島大学・先端物質科学研究科・准教授  
研究者番号: 80405513  
(H21 → H22)

モリ テツシ (MORI TETSUSHI)  
所属: 早稲田大学・理工学術院・助教  
研究者番号: 00590100  
(H23)