

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21日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591392

研究課題名（和文）ガンシクロビル耐性ヒトサイトメガロウイルス UL97 遺伝子変異に関する研究

研究課題名（英文）Genetic variability of human cytomegalovirus UL97 gene which associated with resistance to ganciclovir

研究代表者

堤 裕幸（Tsutsumi Hiroyuki）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80217348

研究成果の概要（和文）：1983～2010年までの期間に免疫健全者から得られたサイトメガロウイルス（CMV）株を61株を対象とし、ガンシクロビル耐性に関係するUL97遺伝子の遺伝子多型を調べた。ガンシクロビル耐性を与えるM460V、M460I、A594V、L595S、L595F、C603Wなどの変異は観察されなかった。一方、D605E変異が61株中56株91.8%以上という高率で検出された。この変異は欧米にても報告されているが、その頻度は10%前後と低く、日本、東アジアに流布しているCMV株の遺伝子マーカーとなるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：UL97 codons 439 to 645 from 61 CMV isolates from 61 immunocompetent Japanese infants and children were sequenced directly. No known GCV resistance mutations were found, meaning that the UL97 mutation had resulted from the use of GCV. On the other hand, a mutation at codon 605 (D to E) was frequently identified (56/61: 91.8%). This could be a genetic marker for HCMV in East Asian countries, because of its low prevalence in the strains of HCMV circulating in Western countries.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ヒトサイトメガロウイルス、UL97遺伝子、ガンシクロビル

1. 研究開始当初の背景

ヒトCMVは普遍的なウイルスであり、先天感染（胎内感染）の最も頻度の高い原因ウイルスとしても知られているが、その感染の多くは小児期の無症候性のものである。一方、他のヒトヘルペスウイルスと同様に、初感染後に持続感染を成立させ、生涯に亘り潜伏感染するウイルスでもある。更に、CMVは臓器移

植や血液幹細胞移植の患者を初めとした免疫不全者において、初感染、あるいは再活性化による日和見感染症として肺臓炎、肝炎、網脈絡膜炎などを引き起こし、時に致死的な経過を取る。これらCMV感染症に対して、CMV抗原血症（アンチゲネミア法）による診断を速やかに行い、DNAの複製を阻害する抗ウイルス薬であるガンシクロビルを予防・治療に

用いることが 1990 年代後半から行われ、現在では一般的な治療法となっている。ガンシクロビルは CMV の UL97 産物によりリン酸化され抗ウイルス効果を発揮するが、汎用されるにつれ、UL97 遺伝子に様々な変異を生じたガンシクロビル耐性株が出現し、問題となってきた。しかし、本邦においては免疫健全者、そして免疫不全者を含め、このガンシクロビル耐性株の出現の実際については検討されておらず、不明である。

我々は 1980 年代前半から現在まで 25 年以上に亘って、免疫健全児、免疫不全児を問わず、先天性、後天性のサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 感染症患児の尿より CMV 分離を続けており、分離ウイルス株を保存している。つまり、ガンシクロビルが汎用される以前の約 15 年間、そして以後の 10 年以上にわたる CMV 株を分離保存している。この間、本邦における CMV の分子疫学を *a* sequence、*UL144* gene、gB genotype における変異を用いて明らかにし、欧米における分子疫学と相同性のあることを初めて示した (Tanaka K et al. J Med Virol 2006)。更に real-time PCR 法により、妊婦の膣拭い液 800 検体余りを用いて、CMV の存在が流産のリスクファクターであることを初めて示した (Tanaka K et al. J Med Virol 2006)。

この二つの論文においては免疫正常児 (者) から分離された CMV 株を用いた研究を発表することができた。一方、原発性、あるいは続発性の免疫不全者から分離された CMV 株は数が限られており、更に、ガンシクロビルを使用された個体からの分離株は今まで得ることが出来ていない。しかし、免疫正常者からの CMV 分離株とはいえ、長期間に亘って分離保存された多数の CMV 株を有している研究室は他にはないと考えられるため、非常に貴重である。

2. 研究の目的

1990 年代後半から、免疫不全者におけるサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 感染症に対する特異的な治療法としてヌクレオシド系 DNA 合成阻害剤であるガンシクロビル (商品名、デノシン) が汎用されるようになってきているが、昨今、CMV の構造蛋白である UL97 に様々な変異を生じたガンシクロビル耐性株の出現が問題になってきている。本研究では過去 30 年に亘って保存された CMV 株における UL97 の遺伝子変異について経年的な解析を行い、本邦におけるガンシクロビ

ル耐性株の現状について明らかにする。本邦におけるガンシクロビル耐性 CMV 感染症の疫学について明らかにすることは生物学的な意味で意義があるが、過去、25 年以上と言う長期間に渡る多数の CMV 臨床分離株、つまりガンシクロビルの登場を跨いだ長期間における臨床分離株を用いた解析は本邦には無く、世界でも稀である。一方、本研究は CMV 感染症の治療につながる側面がかなり大きい。つまり、昨今、拡大の一途をたどる臓器・血液幹細胞移植医療の際に頻繁に生じる CMV の日和見感染症については、CMV 抗原血症によりモニターされ、陽性の場合には、通常抗ウイルス薬ガンシクロビルの、予防・治療投与が行われるが、本研究において、本邦におけるガンシクロビル耐性 CMV 株の流布の状況が確認された場合には、第一選択薬としてホスカネットなど他の抗 CMV 薬の投与を考慮する、あるいは早めにガンシクロビルから他の抗 CMV 薬にスイッチするなどの選択肢なども生まれてくるであろう。

3. 研究の方法

(1) 1980 年代前半からの CMV の保存株、約 100 株を HEL 細胞、あるいはヒト皮膚線維芽細胞による組織培養を用いて再分離を行う。これら感染細胞より DNA の抽出を行う。再分離ができなかった場合は CMV の保存液より直接 DNA の抽出を行う。また、このこれら CMV 株が検出された患者のクリニカルレコードの詳細な調査を行う。

(2) それら DNA を用いて PCR 法にて UL97 遺伝子の 618bp (コドン 439 - 645) を増幅し、その PCR 産物の遺伝子配列を、オートシーケンサーをもちいて解析する。それらを CMV の標準株である AD169 株を基準として遺伝子変異の有無 (ヌクレオチドの変異、アミノ酸の変異) を詳細に検討する。遺伝子変異の程度に付き経年的な解析を行う。

(3) それら UL97 遺伝子の変異の有無、変異の程度に付き経年的な解析を行う。また、それらとクリニカルレコードとの突合せを行い、関連の疑われる因子 (年齢、性別、基礎疾患、治療、CMV 感染の病型と重症度など) に付き関係を探り、場合により統計学的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 1983~2010 年までの期間、免疫健全児、免疫不全児を問わず、先天性、後天性のサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 感染症患児の尿より分離した CMV の株数は 70 株余りとなった。これは、ガンシクロビルが

導入される以前の約 15 年間、そして以後の 13 年にわたる CMV 分離株であるが、実際にガンシクロビルを長期間投与された後に CMV 感染が生じ、CMV が分離された例は無かったので、これ以後の CMV の遺伝子解析は、ガンシクロビル使用歴の無い健常児から分離された CMV 株を用いて行うこととした。

(2) これらの CMV 株には、ガンシクロビル耐性を与えると報告されている M460V、M460I、A594V、L595S、L595F、C603W などの変異は観察されなかった。このことは、これら UL97 のガンシクロビル耐性変異は、あくまでもガンシクロビルの長期使用によって誘発される変異であることを強く示唆している。一方、D605E 変異が 90%以上という高率で検出された。この変異は欧米にても報告されているが、その頻度は 10%前後と低く、この変異とガンシクロビル耐性については無関係とされている。ところが中国においては移植患者から分離された CMV であるが、D605E 変異が本研究と同様に高率に検出されている。この D605E 変異はアジアに流布している CMV 株の遺伝子マーカーとなりうるものかもしれない。

この D605E 変異の役割について、いくつかの検討がなされている。UL97 遺伝子に存在する変異であるものの、ガンシクロビル耐性には無関係であるとされた。むしろ逆に、他の M460V、M460I、A594V、L595S、L595F、C603W などの変異によってもたらされるガンシクロビル耐性を補う役目もあるのではないかとする検討もみられたが、最終的にはガンシクロビルの耐性、感受性については無関係という結論が出されている。欧米の CMV 株に少なく、アジアの CMV 株に多い変異である理由については、更なる検討が必要である。

(3) G503G(60/61)、G598G(60/61)、P525P(43/61) に高頻度でサイレントな遺伝子変異を認めた。これらの遺伝子変異が持つ意味についても今後の検討が必要と考えられる。(表 1)

表 1 UL97 mutations of 61 specimens detected from 61 Japanese immunocompetent children.

| Mutation | No | Frequency (%) |
|----------------------|----|---------------|
| Amino acid mutations | | |
| D605E | 56 | 91.8 |
| Silent mutations | | |
| H454H | 5 | 8.2 |

| | | |
|----------------------|----|------|
| D456D | 4 | 6.6 |
| G500G | 2 | 3.3 |
| G503G | 60 | 98.4 |
| T504T | 12 | 19.7 |
| P525P | 43 | 70.5 |
| L553L | 4 | 6.6 |
| R570R | 2 | 3.3 |
| G579G | 4 | 6.6 |
| G598G | 60 | 98.4 |
| G624G | 4 | 6.6 |
| L629L | 3 | 4.9 |
| S631S | 2 | 3.3 |
| L634L | 5 | 8.2 |
| Single mutation | | |
| R476R, T502T, A524A, | | |
| L532L, C549C, C563C, | | |
| C592C, H599K, L634L | 9 | 1.6* |

*, the number indicates the frequency for each single mutation.

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)

1. Nagaoka Y, Tatsumi M, Tsugawa T, Yoto Y, Tsutsumi H. Phylogenetic and computational structural analysis of VP7 gene of group a human rotavirus G1P[8] strains obtained in Sapporo, Japan from 1987 to 2000. J Med Virol (査読あり) 84:832-838, 2012

2. Tanaka K, Hori T, Yoto Y, Hatakeyama N, Yamamoto M, Suzuki N, Tsutsumi H. Human cytomegalovirus UL97 D605E polymorphism has a high prevalence in immunocompetent Japanese infants and children. Microbiol Immunol (査読あり) 55:328-330, 2011

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 裕幸 (Tsutsumi Hiroyuki)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：80217348

(2) 研究分担者

要藤 裕孝 (Yoto Yuko)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：10404659
堀 司 (Hori Tsukasa)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20398324

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

