

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790367

研究課題名(和文)高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法によるC型肝炎ウイルス遺伝子型の同定研究課題名(英文) Identification of genotype of hepatitis C virus using high-sensitivity *in situ* hybridization

研究代表者

塩竈 和也 (Shiogama, Kazuya)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：10387699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ロックド核酸/DNAキメラプローブとチラミド増感法を組み合わせた高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法により、ホルマリン固定パラフィン切片上でのHCV-RNAの検出に成功した。ヒト肝臓型HCV感染キメラマウスおよび慢性C型肝炎の9/11例(98%)で陽性シグナルが認められた。慢性B型肝炎、脂肪肝、自己免疫性肝炎および肝細胞癌では、いずれも陰性だった。ネステッド逆転写PCR法では、8/11例(73%)でHCV-RNAが確認された(1b型6例、2a型2例)。高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法によるHCV遺伝子型の同定は、HCV遺伝子型間での交差反応が生じたため鑑別困難だった。

研究成果の概要(英文)：We were successful to detect HCV-RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of liver by using high-sensitivity *in situ* hybridization (ISH) combined with LNA-modified oligonucleotide probe and biotin-free tyramide amplification system (CSAII). HCV-RNA was demonstrated in HCV-infected liver tissues from both chimeric mice and 9 (82%) of 11 patients with HCV infection. HCV-RNA was not identified in chronic hepatitis B, fatty liver, autoimmune hepatitis, and hepatocellular carcinoma. Nested RT-PCR confirmed the genotype in 8 (73%) of 11 liver (type 1b: 6 lesions and type 2a: 2 lesions). HCV genotyping could be detected by nested RT-PCR, while high-sensitivity ISH technique occurred cross reaction among the HCV genotypes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード： *in situ*ハイブリダイゼーション法 C型肝炎ウイルス locked nucleic acid ビオチンフリーチラミド増感法 ヒト肝臓型HCV感染キメラマウス

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスは、プラス鎖 RNA をゲノムとする約 9,600 塩基の一本鎖 RNA ウイルスである。現在、C型肝炎ウイルスは 6 種類の遺伝子型 (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b) に分類され、我が国の C型肝炎患者の約 70% は 1b 型、約 20% は 2a 型、約 10% は 2b 型で構成される。通常、C型肝炎ウイルスは宿主内に少量しか存在しないため、C型肝炎ウイルスの検出は、血液材料を用いた逆転写 PCR 法などの分子生物学的手法を用いる。一方、肝組織における C型肝炎ウイルスの局在を同定するための手段は、組織切片上の C型肝炎ウイルスタンパクあるいはゲノムを可視化する組織化学的・分子病理学的手法に頼る以外にない。C型肝炎ウイルス感染による肝組織のメカニズムを解析するためには、C型肝炎ウイルスゲノムの局在をその場で検出することが要求される。現在までに、多くの研究者によって、免疫染色、*in situ* ハイブリダイゼーション法および *in situ* 逆転写 PCR 法による C型肝炎ウイルスの検出が行われてきたが、報告者によっては、陽性細胞率と血清ウイルス量の関係や、局在パターンにおいて異なる結果が生じており、C型肝炎ウイルスの組織化学的・分子病理学的検出法が十分に確立したとは言い難い。*In situ* 逆転写 PCR 法は切片上で増幅した C型肝炎ウイルスを検出できる優れた手法であるが、専用機器を使用しなければならないこと、標本間のムラが生じやすい等の問題点が挙げられ、現段階では一般的な手法として用いられるまでに至っていない。再現性高く、かつ簡便に C型肝炎ウイルスを組織切片上で検出する技術が求められる。本研究で行うロックド核酸/DNA キメラプローブとピオチンフリーチラミド増感法を組み合わせた高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法は、通常の *in situ* ハイブリダイゼーション法と同様に複雑な作業工程がないにもかかわらず、*in situ* 逆転写 PCR 法に匹敵する検出感度を持ち合わせた非常に効率的な方法である。ロックド核酸は、現在注目されている架橋型ヌクレオチドであり、DNA・RNA への高い結合親和性を有する。本研究技術を用いることによって、C型肝炎ウイルスの証明に限らず、分子病理学的アプローチによる切片上の C型肝炎ウイルス遺伝子型の同定も実現可能である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、われわれが推奨するロックド核酸/DNA キメラプローブとピオチンフリーチラミド増感法を組み合わせた高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、今まで技術的に検出困難だった組織切片における C型肝炎ウイルスゲノムを簡便に検出すること、分子生物学的手法でしか実現できなかった C型肝炎ウイルス遺伝子型を組織切片上で証明することにおく。高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法は、今後さらに発

展・注目される技法であり、C型肝炎ウイルスに限らず諸種ターゲットに対して応用される組織切片におけるゲノム証明のための代表的技法となりうる。

### 3. 研究の方法

(1) 材料: 陽性コントロールとして、ヒト肝臓型 C型肝炎ウイルス感染キメラマウスのホルマリン固定パラフィン包埋ブロック計 13 例 (非感染マウス 3 例、1a 型感染マウス 3 例、1b 型感染マウス 4 例、2a 型感染マウス 3 例) を用いた。ヒト肝臓型 C型肝炎ウイルス感染キメラマウスは、東京都医学総合研究所の小原道法教授より提供していただいた。臨床材料として、慢性 C型肝炎の肝生検 11 例を用いた。陰性対象は、慢性 B型肝炎、脂肪肝 (B型肝炎ウイルスおよび C型肝炎ウイルス陰性) および自己免疫性肝炎の肝生検を各 1 例ずつ、B型肝炎ウイルスあるいは C型肝炎ウイルス感染肝細胞癌の手術材料を各 1 例ずつ用いた。各対象症例における血清中の C型肝炎ウイルス RNA 量は、逆転写 PCR 法によって測定し、C型肝炎ウイルス遺伝子型は、ネステッド逆転写 PCR 法で同定した。

(2) ロックド核酸/DNA キメラプローブ: C型肝炎ウイルス共通プローブは、ウイルス株間で塩基配列が保存されている 5' 側非翻訳領域をターゲットとした。C型肝炎ウイルス遺伝子型同定プローブは、塩基配列レベルで相同性が低い非構造領域 4、5A および 5B をターゲットとした。ロックド核酸の比率を 1/3 にすることを考慮して、ロックド核酸の組み込む位置が異なるプローブをそれぞれ 2 種類ずつ作製した。いずれもプローブの長さを 50 塩基程度に設定した。

(3) 高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法: 核酸露出処理の検討 (プロテイナーゼ K 濃度、反応温度、反応時間)、ハイブリダイゼーション条件の検討 (プローブ濃度、反応温度、反応時間)、洗浄条件の検討 (内部緩衝液濃度、反応温度、反応時間) に重点をおいて、最良の組み合わせを選出した。

(4) ヒト肝臓型 C型肝炎ウイルス感染キメラマウスにおけるサイトケラチン 8/18 免疫染色: ヒト特異的サイトケラチン 8/18 マウスモノクローナル抗体 (MP バイオケミカル社) を用いて、マウス肝組織とヒト肝組織の染め分けを行った。マウス肝組織に対する非特異反応を除去するために、マウスステインキット (ニチレイ社) を用いた。

(5) ネステッド逆転写 PCR 法による C型肝炎ウイルス遺伝子型の同定: 各 25 μm ずつ (5 枚 × 5 μm) パラフィンブロックを削り取って、RNA 抽出キット (アプライドバイオシステム社) を用いてトータル RNA を抽出した。使用直前までマイナス 80 °C で保存したのち、

Shiogama (研究代表者)らが報告したネステッド逆転写 PCR 法を用いて、C 型肝炎ウイルス遺伝子型の同定を行った (Shiogama K, et al. *J Med Virol.* 82: 556-561, 2010.)

#### 4. 研究成果

(1) C 型肝炎ウイルス共通プローブによる高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法の確立: 40 µg/ml プロテイナーゼ K 溶液による核酸露出処理を施行したのち、0.01 µg/L ジゴキシゲニン標識 C 型肝炎ウイルス共通プローブを滴下して、95 °C ホットプレートで 5 分間、さらに 37 °C 一晩ハイブリダイゼーションさせた。翌日、1x SSC 緩衝液で 50 °C 30 分間洗浄したのち、100 倍希釈した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識ジゴキシゲニン抗体 (ロシュ社) を反応させて、FITC 標識チラミドによる増感を行った。最終的に、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識 FITC 抗体により増幅産物を検出した。ロックド核酸を組み込む位置を変えたプローブ間では、ほとんど染色性の差は認められなかった。ビオチンフリーチラミド増感法に限って、陽性シグナルを検出することができた。

(2) ヒト特異的サイトケラチン 8/18 免疫染色: 抗原性賦活化処理は、1 mM エチレンジアミン四酢酸溶液 (pH 8.0) によって最も明瞭な染色像を得ることができた。100 倍希釈で一晩反応させたのち、2 ステップポリマー法であるノボリンク (ノボカストラ社) により検出することで、より明瞭なシグナルが得られた。

(3) ヒト肝臓型 C 型肝炎ウイルス感染キメラマウスにおける C 型肝炎ウイルス RNA の局在: HE 染色において、マウスの肝臓部分は、濃いエオジン好性の細胞質を示したが、キメラ化されたヒト肝臓の細胞質は、弱い染色性を示し、C 型肝炎ウイルス感染の特徴である多くの脂肪小滴の沈着が認められた。C 型肝炎ウイルス感染マウス 10 例および非感染マウス 3 例のいずれにおいても、サイトケラチン 8/18 の陽性シグナルは、ヒト肝細胞部分においてのみ確認された (図 1)。C 型肝炎ウイルス RNA は、高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法によって、サイトケラチン 8/18 が陽性を示すヒト肝臓部分に限局して存在することが証明され、いずれの C 型肝炎ウイルス感染キメラマウスにおいても、ヒト肝臓部分にびまん性に分布していた。非感染マウスは、いずれも陰性を示した (図 1)。C 型肝炎ウイルスの陽性シグナルは、DNA 分解酵素処理後のハイブリダイゼーションでは全く変化しなかったが、RNA 分解酵素処理後のハイブリダイゼーションでは完全に消失した (図 2)。

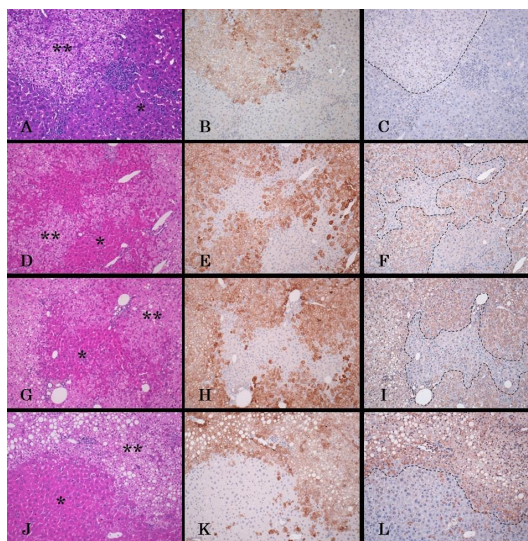


図 1: 高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法による C 型肝炎ウイルスの証明. (A-C) 非感染、(D-F) 1a 型感染、(G-I) 1b 型感染、(J-L) 2a 型感染、(A, D, G, J) HE 染色、(B, E, H, K) サイトケラチン 8/18 免疫染色、(C, F, I, L) 高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法、(\*) マウス肝組織、(\*\*) ヒト肝組織. C 型肝炎ウイルス RNA は、キメラ化されたヒト肝臓の細胞質にびまん性に認められた。

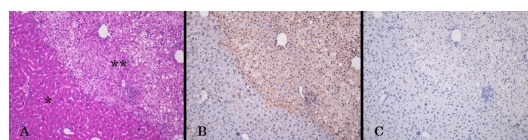
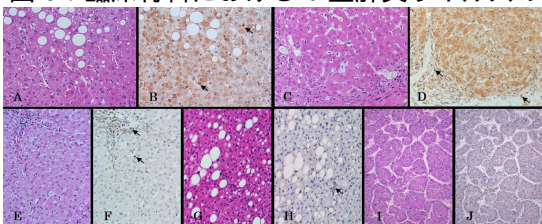


図 2: 高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法における特異性の検討. (A) HE 染色、(B) DNA 分解酵素処理施行 *in situ*ハイブリダイゼーション法、(C) RNA 分解酵素処理施行 *in situ*ハイブリダイゼーション法、(\*) マウス肝組織、(\*\*) ヒト肝組織. C 型肝炎ウイルス RNA は、DNA 分解酵素処理では陽性シグナルの変化はなかったが、RNA 分解酵素処理後では消失した。

(4) 臨床検体 (肝生検および手術材料) における C 型肝炎ウイルス RNA の局在: C 型肝炎ウイルス陽性患者は、いずれも血清中の C 型肝炎ウイルス RNA が高値 ( $1.9 \times 10^2$  KIU/mL 以上) を示したが、C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌では低値 (84 KIU/mL) だった。パラフィン切片から抽出したトータル RNA を用いて、ネステッド逆転写 PCR 法による C 型肝炎ウイルス遺伝子型の同定を行った結果、慢性 C 型肝炎の 8/11 例 (73%) で検出に成功し、いずれの陽性例においても血清解析における遺伝子型と一致した。高感度 *in situ*ハイブリダイゼーション法は、前述した C 型肝炎ウイルス感染マウスで設定した検出条件で明瞭な陽性像を得ることができた。慢性 C 型肝炎の 9/11 例 (82%) で陽性シグナルが確認され、そのうち 3 例はびまん性に陽性を示し

たが、6例は一部あるいは部分的に陽性だった(図3)。ネステッド逆転写PCR法で陰性だった3例のうち、1例は高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法も陰性、2例は高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法で一部あるいは部分的に陽性だった。ネステッド逆転写PCR法陽性かつ高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法が陰性だった症例は1例のみだった。陰性対象およびC型肝炎ウイルス関連肝細胞癌では、いずれもC型肝炎ウイルスRNAは検出されなかった。

図3：臨床材料におけるC型肝炎ウイルスの



証明。(A, B, C, D)慢性C型肝炎、(E, F)慢性B型肝炎、(G, H)脂肪肝、(I, J)HCV関連肝細胞癌、(A, C, E, G, I)HE染色、(B, D, F, H, J)高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法、(矢印)クッパー細胞およびリンパ球への非特異反応。C型肝炎ウイルス感染ヒト肝臓において、C型肝炎ウイルスRNAは、一部または部分的、あるいはびまん性に発現した。陰性対象では陽性シグナルは認められなかった。非特異的結合はクッパー細胞とリンパ球に生じた。

(5)高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法によるC型肝炎ウイルス遺伝子型の同定：非構造領域4、5Aおよび5Bに対するC型肝炎ウイルス遺伝子型鑑別プローブを用いた。ロックド核酸による *in situ* ハイブリダイゼーション法とAT tailing法\*を用いて検討を加えたが、陽性シグナルは検出できるものの、遺伝子型間での交差反応が生じるため、遺伝子型の鑑別には至らなかった。ロックド核酸による方法とAT tailing法の検出感度は、両者はほぼ同程度の染色性を示した。

\*オリゴプローブの3'末端のAT繰り返し配列を鋳型として、DNA合成酵素によりdATP、dTTPとともにハプテン標識16-dUTPを取り込ませながら伸長させる高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法の一つ

(6)総括：われわれは、C型肝炎ウイルス検出のためのロックド核酸による高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション法の確立に成功した。本法は、おそらく *in situ* 逆転写PCR法に匹敵する検出感度であると考えられる。ピオチンフリーチラミド増感法による非特異反応(クッパー細胞やリンパ球に陽性)は、標本判定時に陽性所見から除外する必要が

あるが、本法は検査室レベルで行うことができる肝生検を対象としたルーチン染色として位置づけられる。本研究内容は、2013年のInternational Journal of Hepatologyに掲載された。

#### 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5件)

Shiogama K, Inaka KI, Kohara M, Teramoto H, Mizutani Y, Onouchi T, Tsutsumi Y. Demonstration of Hepatitis C virus RNA with *in situ* hybridization employing a locked nucleic acid probe in humanized liver of infected chimeric mice and in needle-biopsied human liver. Int J Hepatol. 249535, 2013. 査読有

Konno-Shimizu M, Yamamichi N, Inada K, Kageyama-Yahara N, Shiogama K, Takahashi Y, Asada-Hirayama I, Yamamichi-Nishina M, Nakayama C, Ono S, Kodashima S, Fujishiro M, Tsutsumi Y, Ichinose M, Koike K. Cathepsin E is a marker of gastric differentiation and signet-ring cell carcinoma of stomach: a novel suggestion on gastric tumorigenesis. PLoS One. 8 (2): e56766, 2013. 査読有

Shiogama K, Wongsiri T, Mizutani Y, Inada K, Tsutsumi Y: High-sensitivity epidermal growth factor receptor immunostaining for colorectal carcinomas, compared with EGFR PharmDxTM: A study of diagnostic accuracy. Int J Clin Exp Pathol. 6 (1): 24-30, 2013. 査読有

Mizutani Y, Matsuoka K, Takeda H, Shiogama K, Inada KI, Hayakawa K, Yamada H, Miyazaki T, Sawasaki T, Endo Y, Tsutsumi Y: Novel approach to identifying autoantibodies in rheumatoid synovitis with a biotinylated human autoantigen library and the enzyme-labeled antigen method. J Immunol Method. 387 (1-2): 57-70, 2013. 査読有

山口大、塩竈和也、竹内沙弥花、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤寛. 病理標本の伸展および乾燥条件が染色性に与える影響. 検査と技術 41 (8): 698-702, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

塩竈和也、水谷泰嘉、尾之内高慶、小川博久、馬原文彦、稲田健一、堤 寛. In situ hybridization AT-tailing 法による重症熱性血小板減少症候群ウイルスの証明. 第6回日本リケッチア症臨床研究会・第20回リケッチア研究会合同研究発表会. 2014年1月12日(大津市)

塩竈和也、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤 寛. 環境にやさしい染色法の確立: グロコット染色およびアザン染色の改良. 第45回藤田学園医学会. 2013年10月3日~4日(豊明市)

塩竈和也、北沢佳代、磯崎 勝、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤 寛. すぐに実践できる環境にやさしいグロコット染色とアザン染色. 第54回日本組織細胞化学会. 2013年9月27日~28日(東京都)

塩竈和也、寺本英己、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、牧野正直、堤 寛. 長期ホルマリン固定肝組織からの HCV ゲノムの証明. 第102回日本病理学会総会. 2013年6月6日~8日(札幌市)

塩竈和也、水谷泰嘉、尾之内高慶、稲田健一、堤 寛. 環境にやさしいグロコット染色の確立: 無水クロム酸に依存しない改良法の技術開発. 第102回日本病理学会. 2013年6月6日~8日(札幌市)

稲田健一、塩竈和也、小原道法、水谷泰嘉、堤 寛. HCV 感染モデルマウスを用いた高感度 in situ hybridization 法による HCV の検出. 第101回日本病理学会総会. 2012年4月26日~28日. 京王プラザ(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

塩竈和也、堤寛. 固定および包埋による抗原性の失活・流出. 免疫染色玉手箱、技術. ニチレイバイオサイエンス、東京、2013.

<http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩竈 和也 (SHIOGAMA, Kazuya)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号: 10387699

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし