

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19594

研究課題名(和文) 薬剤耐性水痘・帯状疱疹ウイルスの迅速な診断系の開発

研究課題名(英文) Establishment of rapid diagnosis system of acyclovir resistant varicella zoster virus

研究代表者

藤井 ひかる (Fujii, Hikaru)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・流動研究員

研究者番号：10734444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2種類のアプローチにより、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)のチミジンキナーゼ(TK)遺伝子変異に起因するアシクロビル(ACV)耐性VZVの迅速な診断系の開発を目指した。1つ目は、in vitroでVZV TKによるACVリン酸化能の定量可能な系を作出し、ACVリン酸化能を測定することでACV感受性が決定可能な系を作出する。

2つ目は、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)についてそのTK遺伝子を欠損し、代わりにVZV TK遺伝子を搭載したウイルスをACV存在下で培養することで、ACV耐性変異を誘導し、責任変異についてのマッピングを行った。

研究成果の概要(英文)： We aimed to establish rapid diagnosis system of acyclovir (ACV) resistant varicella zoster virus (VZV) which is result of mutation on VZV thymidine kinase (TK) gene in two different ways. First, we established system to determine ACV sensitivity by quantifying the phosphorylation level of ACV by VZV TK in vitro.

Secondly, we constructed herpes simplex virus 1 (HSV-1) which was deleted its own TK gene and instead, inserted VZV TK gene. This newly constructed virus was incubated under the pressure of ACV, which resulted in inducing ACV resistant mutation. And, we mapped the mutations which was responsible to ACV resistance.

研究分野：ウイルス学

キーワード：水痘・帯状疱疹ウイルス 単純ヘルペスウイルス チミジンキナーゼ DNAポリメラーゼ 薬剤耐性 アシクロビル

1. 研究開始当初の背景

水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) 感染症は、通常は発疹、発熱を主とした症状が出現するものの、重症例に至るケースは少ない。しかし、免疫不全状態にある患者においては、細胞性免疫が抑制されるためワクチンは効果が発揮できず、全身感染によりしばしば重篤な症状を引き起こす。また、免疫抑制状態の小児に水痘ワクチンを接種してしまった際には、本ワクチンは弱毒生ワクチンであるため、これが原因で重篤な症状を引き起こすことがある。このような際には抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル (ACV) 投与による治療を行うのだが、長期にわたる投与はしばしば薬剤耐性ウイルスの出現を招く。薬剤耐性株出現時には、早期発見により他の抗ヘルペスウイルス薬へ迅速に切り替えることが予後の決定に重要だ。よって、VZV 感染症の重症例に関しては薬剤耐性の迅速な診断が求められる。

VZV の薬剤耐性の診断に際して、病変からウイルス分離をし、これについて ACV 感受性を半数阻害濃度 (IC_{50}) 測定により判定する方法が用いられてきた。しかし、VZV は細胞外へ放出されるウイルスが少ないため、水痘からのウイルス分離は 20-43%と低く、更に同一クローンを経験することも困難である。また、ウイルス増殖に数週間要することからも、同じヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) と比較してウイルス分離による薬剤耐性の解析は困難である。近年、より迅速に薬剤耐性 VZV の診断を行う系として遺伝子型による判定が登場した。しかし、本診断系は既知の薬剤耐性遺伝子型のデータベースに照合することで判定するため、報告がないものについて判定することができないという問題点がある。

2. 研究の目的

ACV 耐性は ACV の作用機序から、ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) または DNA ポリメラーゼ遺伝子に変異が生じることによって生じるが、TK 遺伝子変異に起因するものが 95%と大部分を占める。

そこで、VZV の TK 遺伝子変異により薬剤耐性を獲得したウイルスの迅速かつ簡便な診断系を樹立することを第一の目的とした。また、樹立した診断系を応用して網羅的に VZV TK 遺伝子において薬剤耐性獲得に関与するアミノ酸変異のマッピングを行い、データベースを築くことを第二の目的とした。

3. 研究の方法

2種類のアプローチにより VZV TK 遺伝子変異に起因する VZV 薬剤耐性株の迅速な診断系の樹立を目指した。

一つ目は、VZV TK 遺伝子変異による薬剤耐

性の獲得はその ACV リン酸化能消失に起因するため、迅速かつ簡便に ACV リン酸化能を定量化し、これを指標とすることで迅速に薬剤耐性の診断可能な系の確立を目指した。In vitro で基質となる ACV、キナーゼである VZV TK、ATP を混合することで ACV をリン酸化し、消費された ATP 量を測定することで ACV リン酸化能を定量化した。ACV リン酸化能と ACV 感受性の相関を調べることで、ACV リン酸化能を測定することで ACV 耐性の有無を決定可能にする。

二つ目は、網羅的に ACV 耐性獲得に重要な TK におけるアミノ酸変異を探索し、データベース化することで薬剤耐性 VZV の迅速な診断系の確立を目指した。VZV と同じヘルペスウイルス亜科に属し、クローニングが比較的容易く、且つウイルス増殖が VZV よりも速い HSV-1 について、BAC system を用いて HSV-1 TK を欠損し、代わりに VZV TK を搭載したキメラウイルスを作製した。本キメラウイルスを ACV 存在下で培養することで、ACV 耐性株を作出し、VZV TK 遺伝子配列および HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子配列を決定することで、ACV 耐性責任変異のマッピングを行った。

また、Error-prone PCR 法を用いて VZV TK 遺伝子にランダムに変異を導入したものをクローニングし、これを培養細胞に導入した後 TK 遺伝子欠損 HSV-1 を ACV 存在下、非存在下で培養することで IC_{50} を算出し、ACV 感受性の決定を行った。本結果をもとに、ACV 耐性責任変異および自然多型についてマッピングを行う。

4. 研究成果

まず、ACV リン酸化能を定量化し、これを指標とすることで迅速に薬剤耐性の診断可能な系の確立の研究成果について記載する。VZV TK を特異的に PCR 増幅し、ウサギ網状赤血球を用いて VZV TK 蛋白を迅速に発現可能な系を作製した。作製された VZV TK 蛋白を ACV および ATP 存在下でインキュベートし、消費された ATP を定量する系が確立された。

次に、網羅的に ACV 耐性獲得に重要な TK におけるアミノ酸変異を探索し、データベース化することで薬剤耐性 VZV の迅速な診断系の確立の研究成果について記載する。HSV-1 について、BAC system を用いて HSV-1 TK を欠損し、代わりに CMV プロモーター下に VZV TK を搭載したものを導入したキメラウイルスを作製した。作製したウイルスの感染細胞ライセートについて、SDS-PAGE、及び HSV-1 TK 抗体、VZV TK 抗体を用いたウェスタンブロットにより、HSV-1 TK の欠損、VZV TK の発現を確認している。また、本キメラウイルスは、野生型 HSV-1 と同等の増殖性を示し、ACV 感受性については野生型 HSV-1 の 5~10 倍程度であり、VZV のそれと同程度であった。

本キメラウイルスについて、ACV 濃度を段

階的に上げながら継代をすることで、ACV 耐性株を作出した。作出された ACV 耐性株について、その VZV TK 遺伝子および HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子の配列を決定することで、ACV 耐性責任変異について解析した。結果、いずれのクローンも VZV TK 遺伝子には変異が導入されておらず、HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子上に変異が導入されていた。得られた変異の中で、5 種類についてはこれまでに知られていない新規のアミノ酸変異であり、さらにこの中で 3 種類については、これまでに報告のないポジションにおける変異であった。

キメラウイルスを用いた解析では、当初予定していた VZV TK 遺伝子における ACV 耐性遺伝子変異についてのマッピングはできなかったが、VZV TK 遺伝子同様 ACV 耐性遺伝子変異についてのデータが少ない HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子における ACV 耐性遺伝子変異についてはマッピングすることができた。また、本結果より、VZV TK 遺伝子には HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子よりも変異が導入されにくく、それゆえ ACV 耐性 VZV の臨床報告が比較的少ないのではないかということが推察された。今後、本現象が部位特異的なものである可能性、CMV プロモーターによる恒常的発現が影響した可能性を考慮するために、VZV TK 遺伝子の挿入部位やプロモーターを変更したウイルスを複数作製することで検証を行いたい。

今回キメラウイルスを用いた解析では残念ながら VZV TK 遺伝子上の ACV 耐性責任変異についてマッピングすることはできなかったが、一方で効率的に HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子上に ACV 耐性薬剤変異を導入することができた。すなわち、本キメラウイルスを用いて HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子上の薬剤耐性変異を効率的にマッピングする系については確立することができた。HSV-1 DNA ポリメラーゼ遺伝子上の薬剤耐性変異についての報告も発生頻度が 5%程度であることから限られたデータのみであったが、本系を用いてマッピングすることにより、データ量を効率良く大幅に増やせる可能性が示唆された。

また、既存の VZV 薬剤耐性診断系は、薬剤耐性遺伝子型データベース上にない変異については時間と労力を要するウイルス分離による薬剤耐性の判定を行う必要があり、判定までに要する時間から実際には臨床的対応が困難であるという問題があった。本研究において確立された ACV リン酸化能測定系を用いることで、データベース上にない TK 遺伝子変異についても ACV 耐性の診断が可能となった。また、診断するにあたり、ウイルス分離を必要としないため、費やす労力と時間が軽減される。更に本系は、ACV 以外にもヘルペスウイルスのキナーゼによりリン酸化される抗ウイルス薬の耐性診断に応用可能で

ある。

近年国内外問わず、増殖傾向にあるエイズ発症時や造血幹細胞移植患者などの免疫抑制状態患者においては、VZV をはじめとするヘルペスウイルスは再活性化し、重症化するリスクが高いことから、これらの患者において薬剤耐性で誘導されるが、これらの患者は近年、国内外問わず増加傾向にあることから、これらの患者における薬剤耐性ヘルペスウイルス出現への対策は非常に重要な位置を占める。本研究の成果はこれらの問題の対策に貢献可能であると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：西條 政幸

発表表題：DNA ポリメラーゼ変異によるアシクロビル耐性 HSV-1 を特異的に誘導するためのシステム開発

学会名：第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会

発表年月日：2017 年 5 月 19 日

発表場所：くまもと県民交流館パレア
(熊本県熊本市)

〔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

藤井 ひかる (FUJII, Hikaru)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・流動
研究員
研究者番号：10734444

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()