

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08466
研究課題名(和文) ゲノム解析による潰瘍性大腸炎のサイトメガロウイルス薬剤耐性株再活性化の治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for reactivation of drug-resistant cytomegalovirus strain in ulcerative colitis by genomic analysis

研究代表者
大澤 恵 (Osawa, Satoshi)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10397391
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎の腸管サイトメガロウイルス(CMV: cytomegalovirus)の再活性化は重症化のリスクで抗ウイルス薬治療が必要となるが薬剤耐性CMV感染率は未解明であった。本研究ではガンシクロビル(GCV)耐性に関するUL97遺伝子変異頻度をGCV投与歴のない22症例(潰瘍性大腸炎15例、非潰瘍性大腸炎7例)を対象としゲノム解析で明らかにした。UL97遺伝子変異はN68D(100%)、I244V(100%)、D605E(86.4%)が同定されたが、薬剤耐性遺伝子変異は同定されなかった。GCV投与歴のない日本人のUL97遺伝子変異は潰瘍性大腸炎の有無に関係なく極めて少ないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、潰瘍性大腸炎患者におけるサイトメガロウイルス(CMV)感染におけるガンシクロビル(GCV)耐性に関するUL97遺伝子変異頻度の実態が非潰瘍性大腸炎患者との比較とともに明らかとなった。日常診療では抗ウイルス薬治療として一律にGCVが選択されているが、GCV-naive症例でのUL97遺伝子変異は極めて少ないことから、妥当であると考えられた。D605E変異は過去の報告と同様で日本人で高率であり、東アジア人に多くみられる遺伝子多型と考えられた。今後はGCV治療抵抗症例でのUL97遺伝子変異同定が、抗ウイルス薬選択のオーダーメイド化のため、さらなる検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Cytomegalovirus (CMV) reactivation in the colon is common in patients with severe ulcerative colitis (UC). Ganciclovir (GCV) resistance conferring CMV UL97 gene mutations have been reported. In this study, we investigated the prevalence of CMV UL97 gene mutations in patients with colonic CMV infection associated with or without UC. Twenty-two GCV-naive patients with colonic CMV infection, 15 with UC and 7 with other diseases, were enrolled. Frozen biopsy samples or formalin-fixed paraffin-embedded samples were used for sanger DNA sequencing. Polymorphisms were frequently detected in codons N68D (100%), I244V (100%), and D605E (86.4%). However, no known GCV resistance mutations were found. There was no difference between the ratio of polymorphisms in patients with and without UC. In conclusions, we did not detect UL97 gene mutations associated with GCV resistance in GCV-naive patients with or without UC. D605E polymorphism may be used as a genetic marker for CMV in East Asian countries.

研究分野：消化器内科学

キーワード：薬剤耐性サイトメガロウイルス 潰瘍性大腸炎 ガンシクロビル UL97遺伝子 サイトメガロウイルス 腸炎 ゲノム解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ステロイド治療抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の原因の一つに腸管サイトメガロウイルス(CMV: cytomegalovirus)の再活性化に伴う CMV 腸炎合併がある^{1,2}。的確な診断のもと重症例では抗ウイルス療法選択が必要となるが、実臨床では抗ウイルス療法抵抗例が存在するにも関わらず、これまで ganciclovir 耐性株に代表される薬剤耐性 CMV 診断の試みがなく、潰瘍性大腸炎患者における薬剤耐性 CMV 感染率は未だ不明であった。

CMV 感染症にはこれまで HIV 患者での検討、移植後患者での検討などから薬剤耐性株が存在し、ganciclovir (GCV)耐性は、AIDS の CMV 網膜炎の検討では 25 ~ 30%、臓器移植後での CMV 薬剤耐性率は 5 ~ 10%程度と言われ、GCV 耐性は UL97 遺伝子変異と UL54 (DNA polymerase) 遺伝子変異が報告されているが、中でも GCV 耐性臨床株の 90%以上は UL97 遺伝子変異によることが報告されていた³⁻⁵。

現在、実臨床において重症および劇症潰瘍性大腸炎において腸管サイトメガロウイルス腸炎の合併がある場合の抗ウイルス薬は、一律に GCV が投与されている。臓器移植領域や HIV の治療領域では、薬剤耐性 CMV 株を診断しオーダメイド治療の戦略が存在するため⁷、特に手術適応となる可能性がある重症および劇症潰瘍性大腸炎では時間的猶予がなく、薬剤耐性を予測した治療戦略が重要性である。

2. 研究の目的

- (1) 潰瘍性大腸炎患者における大腸の CMV 感染について、GCV 耐性 CMV に関連する UL97 遺伝子変異の本邦での頻度およびその変異株の種類を初めて明らかにすることを主目的とした。
- (2) 潰瘍性大腸炎患者と非潰瘍性大腸炎患者の大腸の CMV 感染症における UL97 遺伝子変異の頻度を比較することとした。

3. 研究の方法

浜松医科大学医学部附属病院通院中の潰瘍性大腸炎患者患者で、大腸内視鏡を行い潰瘍性大腸炎の活動性部位より採取した大腸生検サンプルにて、CMV 感染が確認された GCV 治療歴のない患者および比較のために非潰瘍性大腸炎で同様に活動性炎症部位の大腸生検サンプルにて CMV 感染が確認された GCV 治療歴のない患者を対象とした。

大腸 CMV 感染の定義は、ウイルス核内封入体、免疫染色、PCR 法のいずれかでウイルスが同定される場合とした。

GCV 耐性に関与する UL97 遺伝子について、凍結された生検サンプルあるいはホルマリン固定された生検サンプルのいずれかより nested PCR 法にてウイルス DNA を増幅し、サンガー法によるシーケンスを行った。First PCR および second PCR の Primer の位置および塩基配列を図 1 と表 1 に示した。

UL97 遺伝子変異については、GCV-sensitive AD169 野生株をコントロールとして比較検討した。

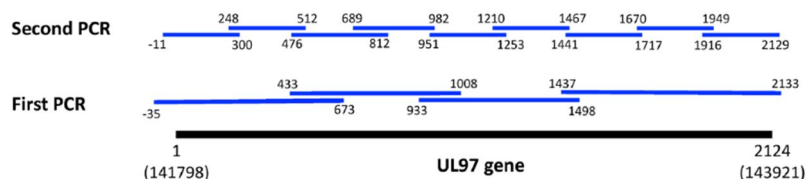


図 1) Nested PCR 法の Primer の UL97 遺伝子の位置設定

表 1) Nested PCR 法の Primer 塩基配列

Primer name	Sequence (5'-3')		Nucleotides	Product length (bp)
	Forward	Reverse		
1st round PCR				
UL97_N1	GTGCAGCCCTAGGAACA	CGTTTCTTCGAGCACC	-35 to 673	708
UL97_N2	GGTTACCACGGCTTGC	GCGGTAGCTCTCGTTCG	433-1008	575
UL97_N3	GGTCTACGTGCCAAAGA	GAAAGACGGCCACACAG	933-1498	565
UL97_N3	GTGGGATTACAGCCTCAG	GCGTCCAGGTTACTCG	1437-2133	696
2nd round PCR				
UL97_1	CTGTGCGCACTATGTCCTCC	GAACGCATGCGGAAAAAGTC	-11 to 300	311
UL97_2	CCACTTTGACCACCCTGAGT	GTGAAGAGAGCGCGCGTA	248-512	264
UL97_3	CGTTTCGAGTACGATCGCGAC	GTCGTTGGAACAGGTGCAAT	476-812	336
UL97_4	CGGAAAGTCAGGACAGCG	CTCGTCCGTCATGTCCAC	689-982	293
UL97_5	GGACGATTTTGGCCACAAGA	CCACTGGTCGTGATGAAACA	951-1253	302
UL97_6	CTGCTGCACAACGTCACGGT	CACAGCGCTCGTTGTAATCC	1210-1467	257
UL97_7	GATTACAGCCTCAGCGAGCC	CATGCGCACCTCGTCCAG	1441-1717	276
UL97_8	GTAACGTGCTGGGCTTTTGC	GCAITCGTGGTAGAAGCGGC	1670-1949	279
UL97_9	CCAAGATGTCCTCGTGTGCG	CCAGGTTACTCGGGGAACAG	1916-2129	184

4. 研究成果

(1) 患者背景

潰瘍性大腸炎 15 症例、非潰瘍性大腸炎 7 症例を検討対象とした。平均年齢は 59.5 歳で、CMV 感染診断は、全例が PCR 法陽性、86.4%が免疫染色陽性であった。詳細を以下の表 2 にした。

表 2) 患者背景

	Overall	UC	Non-UC	Statistical analysis
Number of patients, n	22	15	7	
Sex, men/women	13/9	9/6	4/3	NS
Age; mean ± SD (range), years	59.5 ± 16.0 (17–81)	56.1 ± 17.8 (17–81)	66.9 ± 8.4 (53–76)	NS
Height, cm, mean ± SD	161.0 ± 8.7	160.9 ± 8.3	161.4 ± 10.0	NS
Weight, kg, mean ± SD	52.8 ± 8.6	52.7 ± 9.9	52.9 ± 5.5	NS
Body mass index, mean ± SD	20.4 ± 3.1	20.3 ± 3.1	20.5 ± 3.5	NS
Serum albumin, g/dl, mean ± SD	3.11 ± 0.77	3.42 ± 0.65	2.46 ± 0.59	<i>P</i> < 0.01
Serum CRP, mg/dl, mean ± SD	2.43 ± 2.21	2.15 ± 2.45	3.01 ± 1.59	NS
Hemoglobin, g/dl, mean ± SD	11.9 ± 2.4	12.3 ± 2.6	11.0 ± 1.7	NS
Total cholesterol, mg/dl, mean ± SD	163 ± 45	157 ± 36	171 ± 56	NS
Triglyceride, mg/dl, mean ± SD	121 ± 50	106 ± 39	140 ± 60	NS
Treatment, n (%)				
Oral or intravenous steroids	8 (36.4)	5 (33.3)	3 (42.9)	NS
Immunosuppressive agents	9 (40.9)	7 (46.7)	2 (28.6)	NS
Anti-TNF agents	5 (22.7)	5 (33.3)	0 (0)	NS
5-ASA	10 (45.5)	10 (66.7)	0 (0)	<i>P</i> < 0.01
Immune checkpoint inhibitor	1 (4.5)	0 (0)	1 (14.3)	NS
Other	8 (36.4)	5 (33.3)	3 (42.9)	NS
Diagnosis of CMV infection, n (%)				
Histological H&E staining	4 (18.2)	0 (0)	4 (57.1)	<i>P</i> < 0.01
Histological IHC staining	19 (86.4)	13 (86.7)	6 (85.7)	NS
Tissue CMV DNA PCR	22 (100)	15 (100)	7 (100)	NS
Sample, n (%)				
Frozen sample	7 (31.8)	5 (33.3)	2 (28.6)	NS
FFPE sample	15 (68.2)	10 (66.7)	5 (71.4)	

(2) UL97 遺伝子変異頻度について

UL97 遺伝子変異は wild-type の AD169 株を比較対象とした場合、N68D (100%)、I244V(100%)、D605E (86.4%)が高頻度の多型として確認された。さらに 7 つの多型が 10%未満の低頻度で確認された (表 3)。

表 3) UL97 遺伝子変異頻度の結果

Amino acid changes	Overall		UC		Non-UC		Statistical analysis
	No. of strains	% of strains	No. of strains	% of strains	No. of strains	% of strains	
A53S	1	4.5	1	6.7	0	0	NS
N68D	22	100.0	15	100.0	7	100	NS
R137C	1	4.5	0	0	1	14.3	NS
A140V	1	4.5	1	6.7	0	0	NS
G188S	1	4.5	0	0	1	14.3	NS
L228P	2	9.0	1	6.7	1	14.3	NS
I244V	22	100	15	100	7	100	NS
D263G	2	9.0	1	6.7	1	14.3	NS
D605E	19	86.4	14	93.3	5	71.4	NS
A674T	1	4.5	0	0	1	14.3	NS
T675A	1	4.5	1	6.7	0	0	NS

図 2 に本研究で同定された遺伝子変異(上段)と過去に報告されている薬剤耐性遺伝子(下段)をまとめて示した。本研究で同定された変異は D605E を除きいずれも kinase domain には該当しないものであり、薬剤耐性には関係しないものであった。検討症例からは過去に報告されている薬剤耐性に関与する遺伝子変異は同定されず、潰瘍性大腸炎とそれ以外の患者との差異も認められなかった⁸。

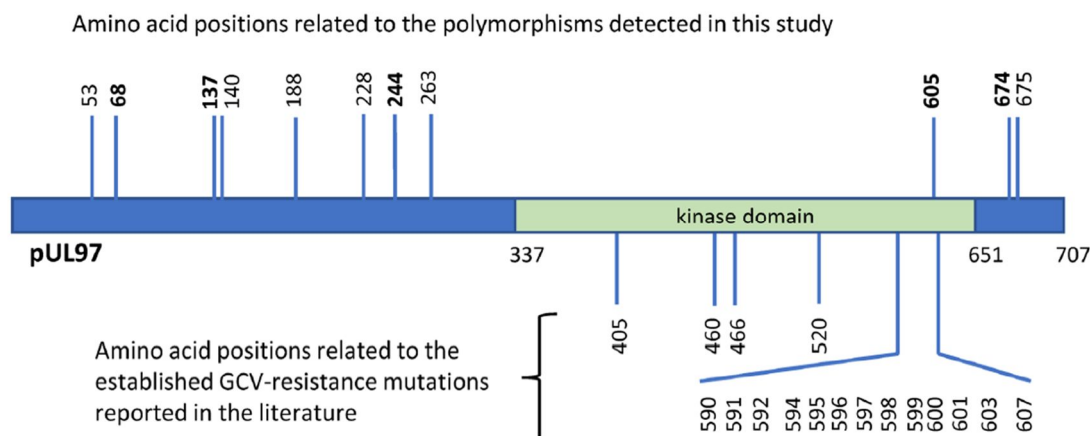


図2) UL-97 遺伝子における GCV 耐性遺伝子変異および遺伝子多型部位のシェーマ

下段が過去に報告されている GCV 薬剤耐性に関係する遺伝子変異の部位であり、337 から 651 の間のアミノ酸で構成される kinase domain に存在する⁸。本研究で同定された遺伝子変異および多型の部位は上段に示している。

(3) 考案と展望

本研究から、潰瘍性大腸炎患者における CMV 感染における GCV 耐性に関与する UL97 遺伝子変異頻度の実態が非潰瘍性大腸炎患者との比較とともに明らかとなった。日常診療では抗ウイルス薬治療として一律に GCV が選択されているが、GCV-naive 症例での UL97 遺伝子変異は極めて少ないことから、妥当であると考えられた。D605E 変異は過去の報告と同様で日本人で高率であり、東アジア人に多くみられる遺伝子多型と考えられた⁹。今後は GCV 治療抵抗症例での UL97 遺伝子変異同定が、抗ウイルス薬選択のオーダーメイド化のため、さらなる検討課題である。

<参考文献>

1. Mourad FH, Hashash JG, Kariyawasam VC, Leong RW, Ulcerative colitis and cytomegalovirus infection: From A to Z. *J. Crohns Colitis* 14, 1162-1171 (2020).
2. Clos-Parals A, et al. Prognostic value of the burden of cytomegalovirus colonic reactivation evaluated by immunohistochemical staining in patients with active ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* 13, 385-388 (2019).
3. Gilbert C, Boivin G, Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 873-883 (2005).
4. Chou, S, Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl. Infect. Dis.* 1, 105-114 (1999).
5. Chou S, et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J. Infect. Dis.* 185, 162-169 (2002).
6. Chou S, Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antivir. Res.* 176, 104711 (2020).
7. El Chaer F, Shah DP, Chemaly RF, How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* 128, 2624-2636 (2016).
8. Steingruber M, Marschall M, The cytomegalovirus protein kinase pUL97: Host interactions, regulatory mechanisms and antiviral drug targeting. *Microorganisms* 8, 515 (2020).
9. Tanaka K, et al. Human cytomegalovirus UL97 D605E polymorphism has a high prevalence in immunocompetent Japanese infants and children. *Microbiol. Immunol.* 55, 328-330 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamura S, Osawa S, Ishida N, Miyazu T, Tani S, Yamade M, Iwaizumi M, Hamaya Y, Kosugi I, Furuta T, Sugimoto K.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Prevalence of UL97 gene mutations and polymorphisms in cytomegalovirus infection in the colon associated with or without ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93168-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村 智、大澤 恵、他
2. 発表標題 サイトメガロウイルス腸炎における薬剤耐性遺伝子変異の解析
3. 学会等名 第17回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉本 健 (Sugimoto Ken) (20529507)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------