

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25461004

研究課題名（和文）肝組織に存在する4種類のB型肝炎ウイルスRNA定量測定系の開発

研究課題名（英文）Development of method to detect four mRNAs of hepatitis B virus in liver tissue

研究代表者

藤原 圭（FUJIWARA, Kei）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70635804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：今回、B型肝炎ウイルス（HBV）が細胞内で複製する際に転写される複数のmRNAを定量的に検出する新しい測定系を作成するため検討を行った。リアルタイムPCRを行うために各mRNAに対するプライマー、プローブの設定、実験条件の設定を行い、いくつかの定量手法から安定性、定量性に優れている方法を検索し確認した。反応を行う際の基質となる核酸についても純化、濃縮化を行い、それとともに検出感度を高めるためのpre-amplificationによる予備的な遺伝子増幅法を開発した。今後血清マーカー、臨床病態との関連を検討してゆく。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel method to quantify four different mRNA of hepatitis B virus (HBV) was searched. To perform real-time PCR, sets of primers and probes were designed, and the conditions for real-time PCR was determined, and then the most stable and better methods for quantification of HBV mRNAs were searched and determined. Then, methods to purify and concentrate nucleic acid which were substrate for real-time PCR reaction were developed. Furthermore, pre-amplification PCR to improve the sensitivity was developed. The relationship of HBV mRNAs and serological marker of clinical disease will be analyzed.

研究分野：B型肝炎

キーワード：HBV RNA

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は垂直感染、水平感染、性行為、血液を介した感染で広がってゆく。HBV感染による慢性肝炎、肝硬変といった慢性肝疾患により肝不全や肝細胞癌といった重篤な状態をきたす。HBVの感染状態を示すHBs抗原陽性者の頻度は世界的な平均で3.6%と言われており、おおよそ2億5千万人が感染状態にあると言われており、HBV感染による肝炎、肝硬変、肝癌により世界で年間50万から120万人が死亡しており、そのうち肝細胞癌単独でも毎年32万人が死亡していると推定される。したがってHBV感染は世界的な公衆衛生上の問題の1つである。

現在、HBVに対する抗ウイルス薬の長期内服により疾患の進行は抑制できるものの、根治的治療法は開発されていない。最近では臨床的に治癒したHBV既往感染患者に対して抗がん剤、免疫抑制剤、生物学的製剤を投与することにより肝臓内に潜在性感染を起こしているHBV既往感染患者でHBV再活性化が起こり、時に致死的で重篤な肝障害をきたすことが分かってきており問題とされている。

B型慢性肝疾患患者では自然経過もしくはペグインターフェロンや核酸アナログ製剤といった治療介入によりHBe抗原からHBe抗体へのセロコンバージョンやHBV DNAの低下、HBs抗原の低下が起こるが、それらがどのように制御されているのかはよく分かっていない。

我々は過去にHBV遺伝子変異、HBV複製メカニズム、HBV遺伝子型に関する研究、および薬物療法による治療成績に関する検討を行っており、HBVのウイルス学的特徴や臨床像につき高度な知識を持っている。今回複雑な複製メカニズムを持つHBVのRNA転写機構に関する検討をし、病態や臨床像との関連を明らかにすることを目標に検討を行った。

2. 研究の目的

(1)本研究では過去に報告のないHBVが肝細胞内で自己複製および構造、非構造蛋白生成のために転写する異なる4種類のmRNAについてそれぞれをリアルタイムPCR法を用いて定量的に測定する新しい実験系を開発する。

(2)各mRNAの転写は独立したプロモーター領域が存在するため、各mRNAは各病態でそれぞれが異なる活性状態にあると考えられる。それらがHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのセロコンバージョンやHBV DNA、HBs抗原と関連する可能性があり、また各mRNAの転写亢進あるいは低下が潜在性HBV感染を含む異なる病態に特有な状態を示している可能性がある。またhepatocyte nuclear factor 1, 4といった肝細胞特異的転写因子、各種薬剤がHBV転写に

どのように影響を与えているか評価することができる。それによって今までわかっていない病態の理解につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1)肝組織、血液から効率的に核酸抽出を行い、また核酸の純化、濃縮を行う。各mRNAに関する定量PCRを行う。潜在性HBV感染等では検体中のウイルス核酸が少量であるため、高感度の定性的検出が必要となるためpre-amplificationによる予備増幅後にリアルタイムPCRを行う。

(2)Pre-amplificationのPCRについてはサーマルサイクラ(ABI 2720 Thermal Cycler)を用いて行い、1ステップリアルタイムRT-PCR、リアルタイムPCR/短時間型リアルタイムPCRについてはABI 7900HT Fast Real-Time PCR Systemもしくは7500 Fast Real-time PCR Systemを用いて測定した。

4. 研究成果

(1)各mRNA定量を行うリアルタイムPCRのためのプライマー、プローブの設定を行った。HBVは遺伝子配列における変異が高頻度であり、各遺伝子型間の遺伝子相違も大きく、プライマー、プローブの設定は実験系の感度や定量性に大きな影響を与えるため重要である。世界的に分布する遺伝子型A型からH型までの全遺伝子型に汎用可能なプライマーセットを設定することを検討したが、今回のような複数領域のmRNAを測定する際には、ウイルス変異によりプライマー等として使用できる塩基配列領域に強い制限がかかることから、全遺伝子型での汎用は困難と判断し、まずは本邦のHBVで約90%を占める遺伝子型C型にしばって設定を行った。過去の文献的報告やデータベースに登録されているHBV遺伝子配列から、プライマー設定ソフトを用いてもっともよいセットを検索し、候補配列セットを作成した。最初の計画ではpre-S1領域、S領域、X領域、3.5kbのプリゲノムRNAそれぞれの領域に特異的な4種類のプライマー、プローブセットを作成する計画を立てたが、実際のHBV遺伝子配列のアライメント解析、ソフトウェアを用いたプライマー、プローブ設定を行った際に、pre-S1領域でフォワードプライマー、リバースプライマー、プローブの3か所の塩基配列をこのDNA領域で保存され変異がみられない部分で設定することが著しく困難であり、さらにアニーリング温度、PCRをかける塩基配列の距離を考慮して良好なプライマー、プローブセットを設定することが不能となったため、pre-S1領域を除いた3領域でRNAを測定する方法で行うこととした。そのセットを使用し、ウイルス量が確認されているスタンダード検体を用いて実際のリアルタイムPCRを行い、プライマー・プローブセットの感度、定量性を確認した。プライマー、プローブのアニーリング温度設定についても予備実験を繰り返

返し行い、最適化を行った。遺伝子型C型特異的なプライマーセットで実験を行った後に本邦において10%未満で存在する遺伝子型B型、C型といった異なる遺伝子型に対するプライマーセットの設定を行った。

(2) 肝組織、血清からの核酸抽出方法については最も効率性、作業性がよい方法を調査し、純度の高い核酸が抽出できることを確認し、RNA測定におけるDNA分解によるRNAの純化、また逆にDNA測定のためのRNA分解について各核酸分解酵素を用いて実験を行った。最終的な基質となる純度の高い核酸を得るために核酸抽出後にさらに purification kit を用いた核酸の濃縮についても検討を行い、それ以降のRT-PCR、PCRを阻害することがない範囲での核酸濃縮方法を確立した。

(3) 実験系の安定性、感度に関する検討として核酸抽出後に1ステップで配列特異的なプライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法による測定、2ステップでランダムプライマーを用いた逆転写を第一段階として用い、その後 cDNA を使用しリアルタイム PCR を行い定量する手法を比較した。最初は1ステップで配列特異的なプライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法が、特異性、コンタミネーションの予防、実験ステップの短縮という点で優れていると考えていたが、2ステップでリアルタイム PCR を行う方法が、再現実験における安定性がよいことを確認した。さらに通常のリアルタイム法で陰性や、測定感度下限域となり、再現性が得られない検体について、測定感度を高めるために pre-amplification により予備的な遺伝子増幅を行い、その後リアルタイム PCR による測定を行うことで検出感度を高める方法について検討を行った。定性としての陽性、陰性の判断を行うため有用かつ、半定量的な直線的な定量域を維持できる実験条件、PCR のサイクル数を調べてゆき、15~20サイクルの PCR を行うことで一定の定量域が維持できることを確認した。今後微量検体や、潜在性 HBV 感染といった検体中のウイルス量がわずかである際の検出に有効であると考え。研究の初期段階ではリアルタイム PCR を行う際の実験時間短縮のため短時間型リアルタイム PCR の導入についても検討を行い、試薬濃度、PCR を行う際の温度設定等の実験条件の確認を行い最適な実験条件を設定した。

(4) 定量スタンダードとして使用する DNA に関して当初はスタンダード血清から核酸抽出した DNA を用いて行ったが、保存の状態、経時的に変化が起こる可能性があるため、各領域でプライマー、プローブ配列を含む HBV の人工合成 DNA を作成し、スタンダード血清から抽出した全長 DNA と同等な定量性が得られるかを調べ、人工合成 DNA がスタンダード血清から抽出した DNA と同等な定量性、感度が得られるため、保存による耐久性、長期的な同一条件のスタンダードを常に使用できる点から人工合成スタンダードを用いるこ

ととした。実際に各領域の合成スタンダードを用いて短時間型リアルタイム PCR を行うと S 領域では $20 \sim 2 \times 10^6$ /assay で安定した定量性が得られ、X 領域では $50 \sim 2 \times 10^6$ /assay, プリゲノム RNA 測定用領域で $20 \sim 2 \times 10^6$ /assay で定量性が得られ、アニーリング温度を微調整しながら定量、感度の安定性を確認し 60 で統一して測定することで問題なく定量の安定性が得られた。またプローブにはいずれのプローブにも 5' の蛍光色素として FAM を用いて 3' のクエンチャーは TAMRA を使用して統一した。

(5) 今後さらに各 mRNA と HBs 抗原、HBe 抗原/抗体、HBV DNA といった血清マーカー、発癌、肝疾患の進行といった臨床病態との関連について実験を継続し、データ解析を行うべく。

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 7 件)

Iio E, Shimada N, Takaguchi K, Senoh T, Eguchi Y, Atsukawa M, Tsubota A, Abe H, Kato K, Kusakabe A, Miyaki T, Matsuura K, Matsunami K, Shinkai N, Fujiwara K, Nojiri S, Tanaka Y. Clinical evaluation of sofosbuvir/ledipasvir in chronic hepatitis C genotype 1 with and without dalcatasvir/asnaprevir therapy. *Hepatol. Res.* 査読有, 印刷中, 2017, DOI 10.111/hepr.12898.

Nojiri S, Fujiwara K, Shinkai N, Iio E, Joh T. Effects of branched-chain amino acid supplementation after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: A randomized trial. *Nutrition.* 査読有, 33, 2017, 20-27, DOI 10.1016/j.nut.2016.07.013

Iio E, Ocho M, Togayachi A, Nojima M, Kuno A, Ikehara Y, Hasegawa I, Yatsuhashi H, Yamasaki K, Shimada N, Ide T, Shinkai N, Nojiri S, Fujiwara K, Joh T, Mizokami M, Narimatsu H, Tanaka Y. A novel Glycobiomarker *Wisteria floribunda* agglutinin macrophage colony-stimulating factor receptor, for predicting carcinogenesis of liver cirrhosis. *Int J Cancer.* 査読有, 138, 2016, 1462-1471, DOI 10.1002/ijc.29880.

Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, onomoto K, Fujita K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Influence of genes suppressing effects in peripheral blood mononuclear cells during triple antiviral therapy for

chronic hepatitis C. Plosone, 査読有、2015, 10, e0118000. DOI 10.1371/journal.pone.0118000.

Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsunami H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M, ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. J Viral Hepat. 査読有, 2014, 21, 466-474, DOI 10.1111/jvh.12171

日下部篤宣、田中靖人、飯尾悦子、村上周子、松浦健太郎、新海登、宮木知克、藤原圭、野尻俊輔、折戸悦朗、城卓志、B型・D型肝炎ウイルス重複感染による肝障害に対してペグインターフェロンが有効であった1例. 肝臓, 査読有、2014年、55、653-660

Nojiri S, Kusakabe A, Fujiwara K, Shinkai N, Matsuura K, Iio E, Miyaki T, Joh T. Noninvasive evaluation of hepatic fibrosis in hepatitis C virus-induced patients using ethoxybenzyl-magnetic resonance imaging. J Gastroenterol Hepatol, 査読有, 2013, 28, 1032-9, DOI 10.1111/jgh.12181.

〔学会発表〕(計 14 件)

藤原圭、新海登、飯尾悦子、松波加代子、野尻俊輔、B型肝炎ウイルスにみられる Complex structural variation の解析、第20回日本肝臓学会大会、2016年11月3日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

松波加代子、飯尾悦子、藤原圭、野尻俊輔、田中靖人、当院のB型肝炎患者におけるテノホビルの治療成績、第20回日本肝臓学会大会、2016年11月3日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

藤原圭、新海登、飯尾悦子、松波加代子、野尻俊輔、HBVの新しい遺伝子変化"Complex structural variation"に伴うHBX蛋白変異、第52回日本肝臓学会総会、2016年5月19日、ホテルニューオータニ幕張(千葉県千葉市)

松波加代子、飯尾悦子、藤原圭、新海登、田中靖人、当院のB型肝炎患者におけるテノホビル(TDF)治療の現状、第41回日本肝臓学会西部会、2015年12月3日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

藤原圭、新海登、野尻俊輔、B型肝炎ウイルスの新しい遺伝子変異、第51回日本肝臓学会総会、2015年5月22日、熊本ホテルキャッスル(熊本県熊本市)

松波加代子、新海登、藤原圭、野尻俊輔、田中靖人、B型肝炎に対する核酸ア

ナログ治療における次世代シーケンサーを用いた耐性変異の検討、第51回日本肝臓学会総会、2015年5月22日熊本ホテルキャッスル(熊本県熊本市)

野尻俊輔、藤原圭、城卓志、肝癌治療における分岐鎖アミノ酸製剤投与の有用性(無作為前向き試験)、第51回日本肝臓学会総会、2015年5月22日、熊本ホテルキャッスル(熊本県熊本市)

藤原圭、日下部篤宣、折戸悦朗、腎移植後C型肝炎患者の自然経過および抗ウイルス療法の治療成績について、第50回日本肝臓学会総会、2014年5月30日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

松波加代子、藤原圭、新海登、野尻俊輔、田中靖人、当院のB型肝炎に対するテノホビルの使用経験、第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

野尻俊輔、藤原圭、新海登、飯尾悦子、城卓志、EOBプリモビストMRIを使用したC型肝炎の発がん予想、第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

村山麻子、藤原圭、脇田隆字、加藤孝宣、C型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価、第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

藤原圭、新海登、飯尾悦子、野尻俊輔、高齢者C型肝炎に対するTelaprevir/PEG-IFN/RBV三剤併用療法、第40回日本肝臓学会西部会、2013年12月6日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

Fujiwara K, Shinkai N, Nojiri S, Iio E, Joh T, Analysis of novel complex structural variants in hepatitis B virus, 64th annual meeting of the AASLD, Nov03 2013, Walter E. Washington Convention Center (USA)

藤原圭、日下部篤宣、林克己、野尻俊輔、新海登、腎移植後C型肝炎患者に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法、第17回日本肝臓学会大会、2013年10月9日、グランドプリンス新高輪(東京都港区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ncu-shotai.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 圭 (FUJIWARA, Kei)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70635804

(2)研究分担者

新海 登 (SHINKAI, Noboru)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究
員
研究者番号：30543988

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

加藤 孝宣 (KATO, Takanobu)