

学位論文題名

PNA-MGB 法による変異株別 HBV-DNA の定量

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 B型肝炎ウイルスは急性肝炎を引き起こし、慢性化して慢性肝炎、肝硬変、肝癌と病期を進行させる。ラミブジンは強い抗ウイルス効果から病期の進展を抑制し得るが、長期投与による薬剤耐性が問題となっている。ラミブジン耐性には、ポリメラーゼ領域の reverse transcriptase (rt) 180 と 204 番の遺伝子変異が関与しており、L180M, M204I, M204V などのアミノ酸変異が出現することが明らかにされてきた。これらの変異を早期に検出し、定量的に評価することは治療上有益であるが、複数株の存在下で特定株の高感度な定量測定をすることはできなかった。単一株の変異株定量については、リアルタイム PCR 法により高感度測定が可能となったが、複数株混在下での特定の株の正確な定量測定は困難であり、測定系の改良が必要であった。minor groove binder (MGB) は標的配列へのアニーリングを安定化する作用を持つ分子であり、リアルタイム PCR 用プローブの 3'末端に MGB を結合させることにより相補鎖への結合能が改良され、測定系の感度・特異度が高められた。peptide nucleic acid (PNA) はペプチド骨格を持つ DNA 類似化合物であるが、相補鎖にハイブリダイズしても DNA ポリメラーゼによる伸長反応を起こさない特徴を持つ。そこで本研究では複数株の混在下で特定の株の定量測定を行うことを目的に、PNA と MGB プローブを用いたリアルタイム PCR を測定原理とする PNA-MGB 法を開発したので報告する。

【対象と方法】 HBs 抗原陽性の B 型慢性肝疾患患者から採取され、遠心分離後-30℃で凍結保存されている血清サンプルを使用した。HBV-DNA のポリメラーゼ領域 B ドメインに位置する LLAQ モチーフ (rt179~182) と C ドメインに位置する YMDD モチーフ (rt203~206) の野生株 (LLAQ 株, YMDD 株) と変異株 (LMAQ 株, YIDD 株, YVDD 株) の各株を測定するため PNA と MGB プローブを株毎に設計した。YIDD 株測定用の PNA と MGB プローブは、rt204I の対応コドンが ATC である YIDD1 株用と ATT である YIDD2 株用の 2 組を作成した。各野生株・変異株毎にモノクローナル HBV プラスミドを精製し標準用サンプルとした。各株のプラスミドを 10 log copies/ml に調整し、10 から 1 log copies/ml まで 10 倍毎に段階希釈した系列を内部コントロール用プレートとした。リアルタイム PCR の各反応には、測定対象株に相補的な MGB プローブと、そのモチーフの測定対象株以外の株には特異的で対象株には非相補的なすべての PNA を用い、定量測定を行った。PCR の条件設定は、50℃で 2 分、95℃で 10 分に続き、95℃15 秒、71℃1 分、60℃1 分のセットを 50 サイクルとした。各サイクルの最後に蛍光シグナルを自動計測し、シグナル増加量の直線領域に閾値を設定した。閾値に達したサイクル数 (Ct) と、標準用サンプルの測定で作成した検量線から測定検体の HBV-DNA 量を計算した。

【結果】 10 から 1 log copies/ml まで 10 倍毎に段階希釈した各株の標準用 HBV プラスミドを測定したところ、プラスミドの対数濃度と Ct は強い負の相関を示し、その回帰直線を検量線とした。

いずれの株も 3 から 10 log copies / ml の範囲で直線性を認め、単独株の定量範囲は 3 から 10 log copies / ml であった。一方、複数株の標準用プラスミドが混在する場合、MGB プローブ単独では優勢株のみ定量可能であり、非優勢株を定量的に測定することができなかった。しかし PNA を用いた複数株混在下での優勢株の測定では単独株の測定と比較し定量性に変化はなく、非優勢株の測定では優勢株から 4 log copies / ml、すなわち 0.01% まで定量測定が可能であった。ラミブジンを投与した B 型慢性肝炎症例の HBV-DNA 量を PNA-MGB 法により経時的に測定した(症例提示)。ラミブジン開始後、すべての株のウイルス量はリアルタイム PCR で測定感度以下に抑えられていたが、ラミブジン開始 16 ヶ月後、LLAQ 株と YIDD2 株が同時期に測定可能となり、ウイルス量は増加した。LLAQ 株と YIDD2 株が 7 log copies / ml に達した頃に、総ウイルス量には著変がないまま LMAQ 株が出現し、続いて YVDD 株が出現した。LMAQ 株と YVDD 株それぞれが、LLAQ 株と YIDD2 株に代わり優勢となった時、肝炎が再燃した。

【考察】ラミブジン耐性獲得には rt180, rt204 が関与しており、wild/M204I → L180M/M204I → L180M/M204V の順に変異が出現し、肝炎が再燃する。ラミブジンに続きアデホビルやエンテカビルなどの核酸アナログが使用可能となったが、ラミブジン治療中に他剤への変更や追加を考慮する際には、変異株を検出し更に変異株別のウイルス量を定量することは臨床的に非常に有益である。従来 HBV-DNA 量の測定結果は各株の総量であり、混在する特定の株のみを個別に定量することはできなかった。リアルタイム PCR の測定法の一つである TaqMan[®]プローブ法は、レポーター色素とクエンチャー分子で両端をラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを使用する蛍光 5'ヌクレアーゼアッセイである。TaqMan[®]プローブの 3'末端に MGB を接合させた TaqMan[®]MGB プローブは、標的配列へのアニーリングをより安定化し、感度・特異度は更に改善された。しかし条件を調整してもなおミスマッチは阻止できず、変異株が混在する検体において非優勢株を定量測定することはできなかった。このミスマッチを減少させるため、PNA を反応系に導入した。HBV 野生株・変異株混在下で、変異株を定性検出する PNA クランピング法が報告されているが、これまで PNA を定量系に用いた報告はなかった。今回 PNA と MGB プローブを設計する際には、PNA の melting temperature (T_m) が MGB プローブの T_m よりも約 3℃ 高くなるように設定した。この温度差により複数株混在下でのリアルタイム PCR では、まず PNA が非測定対象株をクランプし、続いて MGB プローブが測定対象株にアニールする。その結果、プローブの非測定対象株へのミスマッチを大幅に減少させることが可能となった。提示した症例のように、治療中 HBV-DNA 量が増加し始めた場合の詳細なウイルス学的解析を、肝炎再燃前に行うことも可能となった。本法は汎用性が高いため、今後 HBV の新たな領域に変異が確認された場合にも応用可能であり、更には HBV に限らず広く一般の DNA における点突然変異体の定量測定への応用も可能と考えられる。

【結論】PNA-MGB 法により、3 から 10 log copies / ml までの測定範囲で 0.01% までの HBV 混在株を定量測定することが可能となり、変異株別の出現とその変化を経時的・定量的に観察することができた。ポリメラーゼ領域の変異株である M204I・M204V と同時に、L180M を検出し定量することは、治療評価と肝炎再燃の予測に有用と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 有 川 二 郎
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

PNA-MGB 法による変異株別 HBV-DNA の定量

B型肝炎ウイルス治療薬のラミブジンは、高い抗ウイルス効果を有する一方で耐性遺伝子変異の出現が問題となっている。DNA ポリメラーゼ阻害剤であるラミブジンの耐性獲得には、HBV-DNA のポリメラーゼ領域 rt180 と 204 番アミノ酸変異が関与していることが報告されている。変異株は定性検査での検出が可能であったが、変異出現初期での検出は困難であり、複数株の混在下で特定の株を定量測定するには、新たな測定系が必要であった。

本研究ではラミブジン耐性株のウイルス動態を明らかにするため、リアルタイム PCR 法により rt180 と 204 の各野生株と変異株の HBV-DNA 量を測定した。感度・特異度を向上させるため 3 末端に MGB (minor groove binder) を付加した MGB プローブと、PCR において相補鎖に結合してアンチセンスとして機能する PNA (peptide nucleic acid) を測定に用いた。PNA と MGB を用いたリアルタイム PCR 法を PNA-MGB 法とした。PNA-MGB 法による単独株の測定では、測定可能域は 3~10 log copies / ml であった。複数株混在下における特定の対象株の測定限界は 0.01% であった。

この PNA-MGB 法により、ラミブジン投与例の肝炎再燃時と、ラミブジン耐性 HBV にも抗ウイルス活性を持つアデホビルを併用した時の変異株別ウイルス動態を臨床的に検討した。ラミブジン耐性変異は、rt180 / 204 の組み合わせが wild / wild から wild / YIDD、LMAQ / YIDD、LMAQ / YVDD の順に進行するが、変異パターン別に肝炎再燃時の状態を比較すると、ALT 値、HBV-DNA に量は有意差を認めないものの変異の進行と共に、より強い肝炎が引き起こされる傾向を認めた。また変異の各段階におけるウイルス動態を PNA-MGB 法の測定により解析し、症例を提示した。既に出現している変異株が高いウイルス量で安定している場合には、水面下で出現している新たな変異を従来の定性検査は捉えることができなかったが、本法では測定可能であった。アデホビル投与によるラミブジン耐性株の減少量は、LLAQ と YMDD モチーフの各株間において有意差を認めなかった。肝炎再燃前の直線的ウイルス増加部分から変異株別のウイルス増殖速度を計算すると、肝炎再燃時の肝障害が強い変異株ほど増殖速度が速いという結果であった。

発表後、副査有川教授から変異株と肝障害惹起の関係、変異株出現後の野生株の動態、どのような DNA 測定に応用可能かについて質問があり、申請者は以下の通り回答した。ラミブジン耐性に関与するポリメラーゼ領域の遺伝子はウイルス DNA の転写・複製に関与する領域であり肝細胞への直接作用は報告されていないが、今回の研究で強い肝障害を引き起こす変異株ほど増殖速度が速いという結果が得られたことから、変異株は肝障害を

起こす閾値ウイルス量に達するのが早いことが強い肝障害を引き起こすことに関与していると考えられる。変異株出現後の野生株は、LLAQモチーフ領域については変異出現前の水準で経過するケースと、減少して測定できなくなるケースの両者があった。応用可能なDNAとしては、ラミブジン以外の核酸アナログ剤耐性HBVの他、ポイントミューテーションが混在する場面として各種臨床検体中のウイルス・細菌DNAが考えられる。次に副査藤堂教授から本測定法の臨床応用と临床上の有用性についての質問があり、申請者は以下の通り回答した。ラミブジン投与中に本測定法で耐性株の出現・増加が確認されれば、肝炎再燃が懸念される。肝予備能不良症例では、肝炎再燃前にアデホビルを併用することで肝炎再燃リスクを軽減できる。またラミブジン投与中に、交叉耐性はあるが、より耐性の出現率が低いエンテカビルへの切り替えを考慮する場合に、本測定法での変異株検出は切り替えの可否を判断する指標となる。最後に主査浅香教授から研究の発想や過程、今後の展望についての質問があり、申請者は以下の通り回答した。変異株はPCR産物のダイレクトシーケンスや、検査キットにて定性検査を行っていたが臨床的に感度・特異度改善の必要性を感じ本測定法開発に至った。今後は症例を蓄積し、また異なる遺伝子変異株の測定も行いたいと考えている。申請者は方法論と、それに基づく測定結果から論理的に回答し、内容は適切と考えられた。

本研究はラミブジン耐性変異を分子生物学的に解析し、いくつかの新知見を得ることに成功しており、臨床におけるB型慢性肝炎の治療法選択やラミブジン以外の薬剤耐性HBV解析への応用が期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。