

研究発表 わが国の HIV 感染者における慢性腎臓病の有病率と予後に関する研究

研究代表者

柳澤 如樹（東京都立駒込病院感染症科 医員）

原著論文による発表

欧文

- 1) Yanagisawa, N., Ando, M., Tsuchiya, K., and Nitta, K. Impact of cystatin C elevation and albuminuria on probability of adverse outcomes in HIV-infected men receiving HAART. *Clin Nephrol* 2012; Dec 20. DOI 10.5414/CN107668
- 2) Yanagisawa, N., Ando, M., Tsuchiya, K., and Nitta, K. HIV-infected men with an elevated level of serum cystatin C have a high likelihood of developing cancers. *J Antivir Antiretrovir* 2012;4(2):38-42.

和文

- 1) 柳澤如樹、味澤篤、安藤稔. HIV 感染者における慢性腎臓病. *日本エイズ学会誌* 2013; in press.

口頭発表

海外

- 1) Yanagisawa, N., Ando, M., Ajisawa, A., Tsuchiya, K., and Nitta, K. Low-grade levels of albumin excretion should be considered significant in an HIV-infected population. *American Society of Nephrology Kidney Week 2012 Annual Meeting*. November 1-4, 2012, San Diego, USA.
- 2) Yanagisawa, N., Ando, M., Ajisawa, A., Tsuchiya, K., and Nitta, K. Increased urinary albumin level within the normal range has an impact on adverse outcomes in HIV-infected individuals. *American Society of Nephrology Kidney Week 2012 Annual Meeting*. November 1-4, 2012, San Diego, USA.
- 3) Yanagisawa, N., Muramatsu, T., Yamamoto, Y., Nitta, K., Ajisawa, A., Fukutake, K., and Ando, M. Application of a risk category system combining albuminuria and estimated glomerular filtration rate to HIV-infected individuals. *The Infectious Diseases Society of America ID Week*. October 17-21, 2012, San Diego, USA.
- 4) Yanagisawa, N., Ando, M., Ajisawa, A., Tsuchiya, K., and Nitta, K.. Risk category system combined glomerular function with albuminuria has better ability to predict adverse outcomes in HIV-infected men. *49th ERA-EDTA Congress*. May 24-27, 2012, Paris, France.

国内

- 1) 柳澤如樹、安藤稔、菅沼明彦、今村顕史、味澤篤. HIV 感染者における CGA 分類を用いた慢性腎臓病と予後の解析. 第 26 回日本エイズ学会学術集会総会、2012、横浜.

研究分担者

村松 崇（東京医科大学臨床検査医学科 助教）、山元 泰之（東京医科大学臨床検査医学科 准教授）、味澤 篤（東京都立駒込病院感染症科 部長）、安藤 稔（東京都立駒込病院腎臓内科 部長）、新田 孝作（東京女子医科大学腎臓内科 主任教授）

原著論文による発表

欧文

- 1) Ando, M., Tsuchiya, K., and Nitta, K. How to manage HIV-infected patients with chronic kidney disease in the HAART era. *Clin Exp Nephrol*. 2012 Jun;16(3):363-72.

和文

- 1) 村松崇、柳澤如樹、近澤悠志、清田育男、四本美保子、大瀧学、尾形享一、萩原剛、鈴木隆史、菅沼明彦、今村顕史、天野景裕、山元泰之、新田孝作、味澤篤、福武勝幸、安藤稔. 本邦の HIV 感染者における慢性腎臓病の有病率 -2 施設での調査結果-. *感染症学雑誌* 2013; in press.

口頭発表

海外

- 1) Muramatsu, T., Yanagisawa, N., Fukutake, K., Yamamoto, Y., Ajisawa, A., Tsuchiya, K., Nitta, K., and Ando, M. Classification of HIV-infected patients with chronic kidney disease by a combination of albuminuria and estimated glomerular filtration rate. 49th ERA-EDTA Congress. May 24-27, 2012, Paris, France.

国内

- 1) 安藤稔、柳澤如樹、土谷健、新田孝作. CKD リスクカテゴリーを用いた HIV 男性患者の予後予測. 第 55 回日本腎臓学会、2012、横浜.
- 2) 安藤稔、柳澤如樹、村松崇、福武勝幸、土谷健、新田孝作. KDIGO 2009 CKD カテゴリー分類による本邦 HIV 患者の CKD 有病率. 第 55 回日本腎臓学会、2012、横浜.
- 3) 原正樹、土谷健、新田孝作、安藤稔. HIV 合併維持透析患者 8 例の臨床病像、合併症、予後の検討. 第 57 回日本透析学会学術集会・総会、2012、札幌.
- 4) 村松崇、天野景裕、四本美保子、大瀧学、尾形享一、萩原剛、福武勝幸. テノホビルからアバカビルを含むレジメンに変更した HIV 症例の検討. 第 86 回日本感染症学会総会、2012、長崎.

研究課題：HIV陽性者における進行性多巣性白質脳症に対する高精度検査技術の開発および診断への応用

課題番号：H24-エイズ-若手-002

研究代表者：中道 一生（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）

研究分担者：（研究代表者が単独で実施）

1. 研究目的

進行性多巣性白質脳症(Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, PML)は、ポリオマウイルス科のJCウイルス(JCV)に起因する脱髄疾患であり、患者の約30～50%をHIV陽性者が占める。JCVは多くの成人に持続感染しており、免疫抑制に伴って変異型ウイルスが出現し、大脳等を破壊する。治療がなされない場合、ほぼ全ての患者が発症から6ヶ月以内に死に至る。PMLの診断では脳脊髄液を用いたJCVゲノムDNAのPCR検査が有効である。また、近年では国内外の研究グループおよび民間企業らによって高感度な定量的リアルタイムPCRを用いた検査系が数多く開発され、PMLの診断技術の主流を占めている。しかし、この手法は持続感染型JCVの混入もしくは検体間の汚染によって、偽陽性を生じる危険性を有している。より確実な診断や治療のためには、偽陽性の有無を迅速に調べるための検査系が必要である。本研究は、JCVのゲノムDNAに生じるランダムな変異を標的として、ウイルスの亜型を迅速に同定するためのスキニング技術を開発し、PMLの高精度診断技術へと応用することを目的とする。目的を達成するために、JCVゲノムの配列の相違を検出するための検査系の開発、および参照DNAや臨床検体を用いた検査系の評価を体系的に行う。

2. 研究方法

健常人に持続感染しているJCVのゲノム配列は安定しているが、PMLを引き起こすJCVではゲノムの転写調節領域(以後、調節領域)においてランダムな変異が生じる。本検査系は、調節領域をリアルタイムPCR法を用いて増幅した後、増幅されたDNA断片の配列の相違(融解温度の差異)を高解像度融解曲線分析(High-Resolution Melting analysis, HRM)法によって測定することを原理としている。まず最初に、JCVの調節領域を対象とした*in silico*解析によって、持続感染型およびPML型の双方において保存されている塩基配列を検索した。得られた配列情報を元に、6種類のプライマーDNAを設計した。JCVの実験室株のゲノムDNAおよび上記のプライマー、HRM対応のリアルタイムPCR機器等を用いて、検出条件(温度および時間、サイクル数、プライマーの組合せや配列の微調整等)

の至適化を行った。次に、健常人の尿もしくはPML患者の脳脊髄液に由来するJCVのDNAクローン(約100種類)を対象として、上記のリアルタイムPCR-HRMを実施し、①持続感染型およびPML型のゲノムを判別しうるか否か、②様々なPML型JCVの亜型間にみられる変異パターンの相違を検出しうるか否か、を解析した。加えて、臨床検体中に極微量のJCVゲノムしか存在していない場合を想定し、標的DNAを前増幅することでリアルタイムPCR-HRMによる変異の検出が可能か否かを解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を受けた後、適切な配慮のもとに実施された。

3. 研究結果

一般的に、リアルタイムPCR-HRMは、特定かつ小規模の変異を有するDNAを標的として、配列の相違を検出する目的で使用される。しかし、ランダムな変異を有する配列を標的とした実施例は少なく、単一の検出系のみで全領域のスキランに対応しうるか否かは不明であった。そのため、調節領域の全長、および同領域を3分割した断片を標的とした計4系統のリアルタイムPCR-HRMを確立し、バリデーションにおいて適性や用途を評価することとした。JCVの実験室株のゲノムDNAを用いた解析の結果、各検出系はPML型実験室株のゲノムにおける配列の欠損や重複を検出することが可能であった。次に、臨床検体に由来するJCVのDNAクローンを用いて、上記の反応系が様々な変異を識別しうるか否かを解析した。全長を標的とした1系統のリアルタイムPCR-HRMのみによって、調節領域の変異の有無を包括的にスキランすることが可能であった。また、調節領域の部分的な配列を標的とした3系統のリアルタイムPCR-HRMを用いることで、変異が生じている部分の位置やパターンをより精緻に把握することが可能であった。また、これらを一組の検査系として用いることで、各患者に特徴的な調節領域の変異パターンを特定すること、および約10塩基欠失といった小規模の相違であっても識別することが可能であった。加えて、調節領域の上下流に対するプライマーを用いた標的配列の前増幅(短時間、短サイクルのPCR)

とリアルタイムPCR・HRMとを組み合わせることで、微量のJCVゲノム(20分子程度)の変異を検出することが可能であった。

4. 考察

PML患者から採取された脳脊髄液には、複数のJCV変異体が含まれており、ダイレクトシーケンシングによる配列解析が適用できない場合が多い。そのため、PCR検査において偽陽性が疑われた場合には、ウイルスゲノムの調節領域をプラスミドにクローニングした後、多数の候補クローンの塩基配列を決定し、ランダムに生じた変異部分を解読する必要がある。しかし、この工程には、煩雑かつ長期間の作業、および大きな経済的コストを要するため、ルーチン検査での実施は困難である。研究開始初年度では、これらの課題を克服するための新たな検出技術の開発を行った。標的となるゲノム領域は、ランダムな変異が生じる部位であるため、プライマー配列自体が欠失している状況を想定して、複数の反応系を確立した。これらの反応系は同一の温度プログラムにおいて実施することが可能であり、①検出されたJCVが変異型であるか否か、②その変異がどの領域に生じているか、③どのような変異パターンであるか、を約1時間で数値化することが可能である。従来のクローニングによる偽陽性判定と比較した場合、これら4系統の反応系を一組として検査を実施したとしても、その高速化および大幅なコスト削減に繋がる。また、用途に応じて反応系を選択することも可能である。加えて、本検査系のスクーニング能力を鑑みた場合、臨床検体において複数の変異体が存在している場合においても、それぞれの変異パターンを確実に検出することが期待できる。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度は検査系の確立および参照DNA(クローン化したJCV-DNA)を用いたバリデーションを目標としており、計画通りに研究を実施していると判断した。また、検査系の早期の実用化、および技術的トラブルによる研究の遅滞のリスクを考慮し、次年度以降の研究計画の一部を先行して実施した。具体的には、実際のJCV検査で数多く経験し、一般的なリアルタイムPCR・HRM法では適用が困難な微量の標的DNAを対象とした変異検出のための手法を確立した。実用化における大きな課題を解決したことで、次年度以降の円滑な研究の推進が期待できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

多くのウイルス検査では、定量的リアルタイムPCRが導入され、その迅速化および高感度化が果たされている。その一方で、本法の最大のリスクである偽陽性を迅速に調べるためのpost-hoc検査系の開発は十分になされていない。また、流行把握等を目的としたウイルスのゲノム型レベルでの検査系は多数報告されているが、検体レベルで偽陽性を識別するほどの解像度は備えていない。本年度の研究では、異なる患者に由来するJCVを個人レベルで判別することに成功している。本研究におけるアプローチおよび基盤的なデータは、検査技術の向上に寄与する。また、本検査系の実用化に向けて歩を進めたことは、実際の医療の場において大きな意義を有している。

3) 今後の展望について

本年度では、臨床検体に由来するJCVのDNAクローンを用いて本検査系の有用性を確認した。次年度以降では、PML患者から採取された脳脊髄液検体を用いて、本検査系のパフォーマンスを評価する。具体的には、①臨床検体中に様々な濃度で存在するJCVゲノムを確実に捕捉するだけの感度を有すること、②検体中に複数のJCV変異体が混在した状態であっても、ウイルスDNAをクローニングすることなく、患者に特有の変異パターンを同定すること、を到達目標とする。また、従来のリアルタイムPCR検査と比較した場合、HRMは特異的プローブを用いないため、非特異的な増幅によるノイズの影響を受けやすい。本年度における研究では、非特異的な増幅が生じない条件を至適化したが、実際の臨床検体においてもその可能性を評価しておく必要がある。そのため、上記①と②に追加して、③JCV陰性の脳脊髄液を用いて検査を実施した際に非特異的な増幅が認められないことを確認する。

6. 結論

PMLの診断や治療では脳脊髄液中のJCVのゲノムDNAに対するPCR検査が有効であるが、非病原性の持続感染型ウイルスやサンプル間の汚染による偽陽性のリスクの排除が課題となっている。本年度では、研究計画に従って、JCVのゲノム配列の相違を迅速にモニターするための検査系(リアルタイムPCR・HRM法)を開発した。また、本検査系が、PMLの診断におけるpost-hoc検査において有用であることを明らかとした。次年度以降の研究においてさらに詳細なバリデーションを行うことで、本検査系の実用化が可能であることが示唆された。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし。

別紙

研究発表

研究代表者

中道 一生

原著論文による発表

欧文

- 1) Nagayama, S., Gondo, Y., Araya, S. I., Minato, N., Fujita-Nakata, M., Kaito, M., Nakanishi, M., Tanaka, K., Yamaya, H., Yokoyama, H., Nakamichi, K., Saijo, M., Okamoto, K., Toyoshima, Y., Kakita, A., Matsui, M. Progressive multifocal leukoencephalopathy developed 26 years after renal transplantation. Clin. Neurol. Neurosurg. (in press)
- 2) Nakamichi, K., Kishida, S., Tanaka, K., Suganuma, A., Sano, Y., Sano, H., Kanda, T., Maeda, N., Kira, J. I., Itoh, A., Kato, N., Tomimoto, H., Kurane, I., Lim, C. K., Mizusawa, H., Saijo, M. Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch. Virol. (in press)
- 3) Kobayashi, Z., Akaza, M., Numasawa, Y., Ishihara, S., Tomimitsu, H., Nakamichi, K., Saijo, M., Morio, T., Sanjo, N., Shintani, S., Mizusawa, H. Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. J. Neurol. Sci. 324:190-194, 2013.
- 4) Nukuzuma, S., Kameoka, M., Sugiura, S., Nakamichi, K., Nukuzuma, C., Takegami, T. Suppressive effect of PARP-1 inhibitor on JC virus replication in vitro. J. Med. Virol. 85:132-137, 2013.
- 5) Nakamichi, K., Mizusawa, H., Yamada, M., Kishida, S., Miura, Y., Shimokawa, T., Takasaki, T., Lim, C. K., Kurane, I., Saijo, M. Characteristics of progressive multifocal leukoencephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan. BMC Neurol.12:121, 2012.
- 6) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T. Exogenous human immunodeficiency virus-1 protein, Tat, enhances replication of JC virus efficiently in neuroblastoma cell lines. J. Med. Virol. 84:555-561, 2012.

口頭発表

国内

- 1) 中道一生、井上直樹、倉根一郎、林昌宏、西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析. 第17回日本神経感染症学会学術集会、2012年、京都.
- 2) 田中淳、小杉雅史、薬師寺祐介、雪竹基弘、中道一生、西條政幸、原英夫. HAART療法及びmefloquine投与が有効であった後天性免疫不全症候群(AIDS)患者における進行性多巣性白質脳症(HIV-PML)の一例. 第17回日本神経感染症学会学術集会、2012年、京都.
- 3) 田中こずえ、中道一生、大橋一輝、津田浩昌、西條政幸、岸田修二. 造血幹細胞移植後に発症した進行性多巣性白質脳症2症例に対するメフロキンの使用経験. 第17回日本神経感染症学会学術集会、2012年、京都.
- 4) 中道一生、林昌宏、西條政幸. 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出されたJCポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年、大阪.
- 5) 山口(木下)一美、中道一生、伊藤(高山)睦代、垣内五月、林昌宏、倉根一郎、西條政幸. LAMP法を用いたPML患者の脳脊髄液中のJCウイルスの検出および定量試験. 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年、大阪.

研究分担者 非該当 (研究代表者が単独にて実施するため)

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

エイズ対策研究事業の企画と評価に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 福 武 勝 幸
東京医科大学 臨床検査医学講座 主任教授

平成25年3月18日発行

印刷・製本 株式会社 創栄企画

事務局：〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1
東京医科大学病院 臨床検査医学講座
TEL: 03-3342-6111 FAX: 03-3340-5448