

## 厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究経費）

### 分担研究報告書

#### 構造生物学的手法等を用いた B 型肝炎治療薬の開発に関する研究

分担研究者 棚橋 俊仁 神戸薬科大学医療薬学研究室 准教授

#### 研究要旨

ヒト B 型肝炎ウイルス（HBV）は、宿主の免疫応答から回避し、宿主内で感染を持続させるため、その遺伝子に高頻度に変異をきたす。このウイルスゲノム上の遺伝子変異により、HBV は抗ウイルス剤への耐性を示す。しかし、従来の遺伝子解析法では、ウイルス遺伝子に当初から薬剤への耐性を示す自然耐性変異が存在していたのか、あるいは治療後にウイルス遺伝子に変異し耐性を獲得したのか、評価することは困難であった。核酸アナログ製剤による慢性 B 型肝炎の治療前後に採取したヒト患者血清から、HBV ゲノムを抽出し、次世代シーケンサーにより全ウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、薬剤応答別に HBV 遺伝子の全塩基配列をカタログ化する。

#### A. 研究目的

ヒト B 型肝炎ウイルス（HBV）感染者の血液中に、塩基配列が異なる複数クローンの HBV 株の存在が報告されており、単一宿主内での HBV 株の遺伝的不均一性が示されている。この HBV 株の遺伝的不均一性の度合いが、抗ウイルス治療の効果に関連することが示されている。しかし、従来の遺伝子解析法では、HBV 遺伝子に、当初から薬剤耐性を示す自然耐性変異が潜在的に存在していたのか、あるいは感染後に HBV 遺伝子がヒト体内で変異し耐性を獲得したのか、評価することは困難であった。

次世代シーケンサー（NGS）は高速かつ大量塩基配列解読装置であり、短時間に膨大なウイルス遺伝子塩基配列情報を得ることが可能である。予備検討では、2 万クローンに至る HBV 株の解析が可能であった。今回の研究では、核酸アナログ製剤による治療前後に、慢性 B 型肝炎患者から HBV 遺伝子を抽出し、NGS によりウイルスゲノムのウルトラディープシーケンスを行い、クローン数別に HBV 株のカタログ化を実施する。

このウイルス塩基カタログ情報は、核酸アナログ製剤などの抗ウイルス剤を投与する際に、合理的な事前予測として役立つ。

ち、不適切な抗ウイルス剤の投与に伴う耐性ウイルスの出現を抑制し、不要な医療費の削減効果をも期待出来るため、厚生労働行政上、有益をもたらす。

## B. 研究方法

**1. HBV ゲノム逆転写酵素配列 (694 bp) の PCR・ウルトラディープシーケンス**  
予備検討として、HBV ゲノムのコア領域で逆転写酵素をコードしている 694 bp 配列を PCR 法で部分的に増幅し、イルミナ社 MiSeq を用いて、4 ウイルス検体のウルトラディープシーケンスを実施した。平均収得リード数は、72 万 6 千リードあり、すべての検体でウイルスゲノムの各塩基部位に 2 万リード以上の配列情報が得られた。原理的には、2 万クローンに至る HBV 株の解析が可能、と考えられた。

## 2. HBV ゲノム全配列(3215 bp)の PCR・ウルトラディープシーケンス

環状である全ウイルスゲノムを増幅するプライマー配列 P-1 と P-2 を設計し、HBV 全ゲノム配列の増幅を実施した。全ゲノム配列に由来する PCR 産物のウルトラディープシーケンスを実施し、適切なリード数と適切なデプスの評価を行った。さらに、全ゲノム配列をカバーするより適切なプライマー配列として、W-1、W-2、W-3 の設計を実施した。また、適切なコントロール配列を有する検体の構築を実施した。

## 3. PCR 法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンス

ウイルスゲノムの増幅を必要とせず、感染者血清から HBV ゲノムを直接採取し、ダイレクト・ウルトラディープシーケンス法の確立を試みた。この方法の確立により、PCR 法による増幅効率の不均一に起因する実験誤差が回避可能となり、また多数検体処理も実施し得る。

## C. 結果

### 1. プール検体数の検討

エンテカビルが投与予定、あるいは投与されているヒト患者血清から、HBVゲノムを抽出した。環状である全ウイルスゲノムを増幅するプライマー配列P-1とP-2を設計し、PCR法でHBV遺伝子全長を増幅した。まず、2検体でPCR・ウルトラディープシーケンスを実施した。平均収得リード数は826万4千リードあり、ウイルスゲノムの各塩基部位に14万リード以上の配列情報が得られた。2検体では、過剰な情報量となり、また多検体での運用では非効率となるため、解析検体数を増加させることとした。

5検体のPCR・ウルトラディープシーケンスでは、平均収得リード数は254万5千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に6万リード以上が得られた。4検体のディープシーケンスにおいても、平均収得リード数は207万2千リード、ウイルスゲノムの各塩基部位に4万5千リード以上の配列情報が得られた。原理的に、4万クロー

ン以上のHBV株の解析が可能であり、4検体をプールしたディープシーケンスの実施が、運用上適切であると考えられた。

## 2. マルチプレックスPCRライブラリーの構築

プライマー配列であるP-1とP-2部位は取得リード数が減少するため、リード数の減少を補う目的で新たなプライマー配列W-1、W-2、W-3を設計した。3種類のPCR産物によるマルチプレックスPCRライブラリーを構築し、PCR・ウルトラディープシーケンスを実施し、HBV遺伝子全長に一樣なリード数の確保が可能であった。

構築したマルチプレックスPCRライブラリーにより、エンテカビル投与前23検体、投与後7検体のPCR・ウルトラディープシーケンスを実施済みである。

## 3. コントロールゲノムAB246344の構築

日本における標準的なB型肝炎ウイルス遺伝子配列として、AB246344 (ジェノタイプC)が挙げられる (Hepatology 2006)。ゲノム変異解析の参照配列として用い、さらにシーケンスエラーを検出するため、大腸菌でAB246344配列を人工合成した。コントロールゲノムAB246344のウルトラディープシーケンスでは、平均取得リード数は271万3千リード、ゲノムの各塩基部位に5万リード以上が得られており、変異解析の参照配列として有用と

考えられる。

## 4. PCR法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンス

HBVゲノムはウイルスカプシドに包まれている。4検体を用いて、カプシド酵素処理の影響を検討した。カプシドの酵素処理が未実施であると、ウイルスゲノムの各塩基部位では、1千リード程度のカバレッジであり、ディープシーケンスは不可能であった。カプシド酵素処理に伴い、ウイルスゲノムの各塩基部位で1万リード以上のカバレッジが得られ、ダイレクト・ウルトラディープシーケンスによる解析が可能であった。但し、 $10^6$ コピー以下のウイルス量検体では、取得リードが少なく、解析不可能であった。

## D. 考察

ヒト体内においてHBVは、多様な変異体の集合として存在しており、抗ウイルス剤への耐性を示す自然耐性変異体の検出は、HBVゲノムの臨床的意義の解明へつながる。我々は、核酸アナログによる治療前後に、慢性B型肝炎患者からHBV遺伝子を抽出し、NGSによるウルトラディープシーケンスで、4万クローンに至るHBV株を、薬剤応答別にカタログ化し得ることを明らかにした。さらに、核酸アナログ製剤の投与前から潜在的に微量に存在する薬剤抵抗性ウイルスを検出し得る可能性を示した。今後は、解析検体を

増加させ、HBV 株各クローンの塩基カタログ化をより多数例で推進させる。エンテカビル投与前後のヒト患者血清から HBV 遺伝子を抽出し、PCR 法で HBV 遺伝子全長を増幅させている。エンテカビル投与後は、ウイルス量が減少するため、PCR 法での検出結果に影響を及ぼす。我々の検討では、 $10^{-6}$  コピー以下のウイルス量では、シングル PCR 法で、HBV 遺伝子全長の増幅が困難である点を見出している。この点を克服するため、PCR 法を必要としないダイレクト・ウルトラディープシーケンスの確立を試みた。カプシドの酵素処理に伴い、ウイルスゲノムの各塩基部位で十分なリード数が得られ、ダイレクト・ウルトラディープシーケンスによる解析が可能と考えられた。但し、血清ウイルス量が  $10^{-6}$  コピー以下の低値な検体は、取得リードが少なく、解析が不十分である。今後は、PCR あるいはダイレクト・ウルトラディープシーケンスにより、血清ウイルス量が  $10^{-6}$  コピー以下の検体の HBV 遺伝子全長をどの様にして検出するのか、検討課題としている。

## E. 結論

NGS によるウルトラディープシーケンスで、これまでになく膨大な塩基情報を、より高速で、より感受性高く同定し得ることが可能となりつつある。今回の PCR およびダイレクト・ウルトラディープシーケンスで、1 万クローン以上の遺伝子

多様性のある HBV 株を、エンテカビルの治療効果別にカタログ化することが可能である。この薬剤応答性のウイルス塩基配列情報を基盤とし、ウイルス蛋白の立体構造解析へと繋げ、抗ウイルス剤との親和性を検討する。これら統合的な解析により、将来の慢性 B 型肝炎の治療の更なる改善が期待される。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

論文発表

Widasari DI, Yano Y, Heriyanto DS, Utsumi T, Yamani LN, Rinonce HT, Wasityastuti W, Lusida MI, Soetjipto, Okada R, Murakami Y, **Tanahashi T**, Azuma T, Hayashi Y. A Deep-Sequencing Method Detects Drug-Resistant Mutations in the Hepatitis B Virus in Indonesians. *Intervirology*. 2014 Oct 31;57(6):384-392.

Iwamoto A, **Tanahashi T**, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, Murakami Y, Yang L, Yamamoto K, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathog*. 2014 Jun 26;6:27.

Horibe S, Matsuda A, **Tanahashi T**, Inoue J,

Kawauchi S, Mizuno S, Ueno M, Takahashi K, Maeda Y, Maegouchi T, Murakami Y, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dys-regulation of cell cycle associated proteins. *Life Sci.* 2015 Jan 24. [Epub ahead of print]

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

#### 学会発表

次世代シーケンサーを用いたヘリコバクターピロリ菌癌性蛋白 CagA に特徴的な変異の検出. 岩本彰、**棚橋俊仁**、岡田理菜、小川浩史、張菁芸、吉田優、東健. 第9回日本ゲノム微生物学会年会 2015年3月6-7日(神戸大学百年記念館、神戸)

次世代シーケンサーを用いた本邦におけるヘリコバクターピロリ菌 cagA 遺伝子の全ゲノム解析. 岩本彰、**棚橋俊仁**、楊林、山本幸司、東健. 第20回日本ヘリコバクター学会学術集会 2014年6月29日(東京ステーションコンファレンス、東京)

次世代シーケンサーによる肝発癌に関与する miRNA の網羅的解析. 村上善基、**棚橋俊仁**、田口善弘、豊田秀徳、熊田卓、榎本大、田守昭博、河田則文. 第100回日本消化器病学会総会 2014年4月24日(東京国際フォーラム、東京)

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

1.特許取得

なし