

論 文 内 容 要 旨

Untying relaxed circular DNA of hepatitis B virus
by polymerase reaction provides a new option for
accurate quantification and visualization of
covalently closed circular DNA

(ポリメラーゼ反応による B 型肝炎ウイルスの非結紮
環状 DNA の直鎖化による共有結合結紮型環状 DNA
の正確な定量と可視化の新たな手法)

Journal of General Virology, 2021, in press.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：田中 信治教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：Hayes Clair Nelson 准教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

神谷 直洋

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】 B型肝炎ウイルス (HBV) は、核内で episomal に存在する約 3200 塩基対の共有結合結紮型環状 DNA (cccDNA) を鋳型としてプレゲノム RNA を転写し、逆転写酵素で非結紮環状の娘ゲノム DNA (rcDNA) を複製する。HBV キャリアの真の根治には cccDNA の駆除が必要であるが、体内で cccDNA が維持される分子メカニズムは解明されていない。感染細胞中の cccDNA は rcDNA と比べ非常に少ないため、両者を分別する可視化手段としてサザンブロットが信頼され用いられてきた。しかし、マイクロプレート培養の cccDNA 量はサザンブロットの検出下限未満であり、ハイスルーブット化のための高感度検出法が課題であった。定量 PCR (qPCR) による微量検出では、前処理で塩基配列が同一の rcDNA のみを選択的に分解する必要があり、種々のヌクレアーゼを用いて検討されてきたが、不十分な rcDNA 分解、又は非特異的な cccDNA 分解等により、再現性の高い手法の確立に至っていない。更に、微量検体中の rcDNA と cccDNA を分別し可視化するための検討は、ほとんど報告がない。

【正確な cccDNA 定量】 Plasmid-Safe ATP-dependent DNase (PSAD) は、cccDNA 検体の qPCR 前処理で 15 年以上の実績があるが、ほぼ全長まで伸長した rcDNA (mature rcDNA) を分解できない。この mature rcDNA は、二本鎖 DNA の +鎖と -鎖の両 5' 端にて約 250 塩基の突出末端で相補鎖を形成し、環状構造をとっている。この構造に着目し、鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いた 3' 端の伸長反応で、直鎖状二本鎖 DNA (dsDNA) に構造変化できると考えた。本仮説を立証すべく、HBV 産生細胞株 T23 から抽出した HBV コア粒子の rcDNA を PSAD で分解し、得られた mature rcDNA を用いて検討した。その中で Bst 2.0 DNA polymerase (BsDP) による伸長反応後、PSAD で分解したところ、mature rcDNA が 1/100 以下に減少した。PSAD への感受性の変化が仮説通り dsDNA への変換によることを、サザンブロットによって確認した。すなわち BsDP 伸長反応後の産物は、HBV ゲノム全長より 250bp 長い 3.5kbp の断片として検出された。本法を cccDNA 定量に応用すべく、T23 から抽出した episomal DNA を用いて検討した。近年の報告では PSAD に代わり T5 exonuclease (T5exo) の使用が増えたため、PSAD 又は T5exo で前処理後、本法を組み合わせる各段階で qPCR した。全ての検体で HBV DNA 量は、BsDP による伸長反応で変化せず、続く PSAD によって 1/10~1/100 に分解された。更に cccDNA を制限酵素切断すると、興味深いことに T5exo で前処理した検体のみ切断後の定量値が約 10 倍の増加を示し、PSAD で前処理した検体の定量値とも一致した。本結果は、T5exo による前処理によって cccDNA が熱変性しにくくなり、制限酵素切断無しでは qPCR 増幅が遅れるためと考えられた。T5exo の方が cccDNA 以外の DNA 分解活性は高かったが、正確な cccDNA 定量には制限酵素切断が必要と結論し、cccDNA 正確定量の至適条件を決定した。本条件で、6 匹の HBV 感染ヒト肝キメラマウスの肝組織のそれぞれ 3 小片について、独立した 2 回の cccDNA 定量実験を行い、良好な再現性を確認した。

【rc/ccc の微量可視化】 微量検体中で rcDNA と cccDNA を区別して可視化するため、2 色のプローブを用いた digital PCR (dPCR) 系を構築した。すなわち、前述の cccDNA 正確定量用の制限酵素切断後の検体にて、cccDNA 由来断片を 2 色、及び rcDNA 由来断片を各 1 色で検出するため、rcDNA 伸長後の dsDNA の両端側にそれぞれ Taqman プローブを設計した。dPCR の

定量原理であるポアソン分布に従った数式シミュレーションで検討したところ、1000 コピー前後の検体中で cccDNA の割合が 40%を超えると 2 色スポットの数が支配的となるため、2 色スポットの割合で cccDNA 純度を見積もれると考えられた。cccDNA 及び rcDNA 伸長後の dsDNA を模した DNA 断片を用いて実際の dPCR にかけたところ、500~2000 コピーの範囲で 1 色及び 2 色スポット数はシミュレーションの結果とよく一致し、2D プロット上で rc/ccc を分別可能であった。先のキメラマウス肝の正確定量用検体を希釈し、本 dPCR 法で評価したところ、cccDNA 純度は 95%以上と考えられた。更に、検体を集めサザンブロットで可視化したが、cccDNA 以外の断片は検出されなかった。以上より、本研究の手法で cccDNA が単離できていることを確認した。

【アッセイへの応用】正確定量法を初代ヒト肝細胞培養(PHH)のマイクロプレート HBV 感染系に応用した。同細胞系で 40 日以上 HBV 持続感染を確認したが、上清中 HBV DNA 量と cccDNA 量は感染価に依存した。また、核酸系抗 HBV 剤 2 剤、及びコア粒子アロステリック調節剤である HAP-A を感染と同時に 12.5 μ M で添加したところ、28 日後の cccDNA 量は HAP-A 処置のみ 1/100 以下であった。これらの結果より、PHH の HBV 持続感染系で cccDNA プールの増幅は起こりにくいと考えられた。宿主 DNA を内部標準とした相対定量のため、episomal から全核 DNA に変更し検討した。HAP-A 処置した PHH 感染系において、100~1000 個の核を proteinase K で処理し、検体の一部でヒト内部標準遺伝子 (RNase P 及び TERT) の Cq 値を決定した。残検体は cccDNA 単離操作後に HBV の Cq 値を決定し、 Δ Cq 相対定量の結果、HAP-A の cccDNA 減少を再現できた。またキメラマウス肝から抽出した核画分にて、検量線による定量値を核カウントで標準化した場合と、相対定量値を比較した。両結果はよく一致し 1 細胞あたりの cccDNA 量は 0.01~1 コピーと考えられた。

【結語】本研究で樹立した手法によって、マイクロプレートレベルの HBV 感染系で cccDNA 量を再現性高く正確に定量できるため、cccDNA に作用する薬剤評価のハイスループット化が見込まれ、高純度の cccDNA 単離法は ChIP 及び bisulfate シークエンス等のエピジェネティック解析に応用可能と考える。また、cccDNA 形成に重要な結紮前後の rc/cccDNA の可視化が微量検体で可能になるため、感染細胞で cccDNA が形成、維持される分子メカニズムの解明にも利用が広がることを期待する。