

学位論文要旨（本申請用）

氏 名 _____ 田所 健一 _____

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した
感染症ならびに造血器腫瘍診断法の基盤構築とその技術応用

研究指導者 氏 名 _____ 山口 敏和 _____

所属・職位 _____ 株式会社ビー・エム・エル 総研第三検査部 部長 _____

（注）和文 4000 字以内、もしくは英文 2000words 以内でまとめること

フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構を利用した

感染症ならびに造血器腫瘍診断法の基盤構築とその技術応用

株式会社ビー・エム・エル

田所 健一

フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構（インバーダー法）はヒトゲノムにおける一塩基多型（SNPs）を判定するための方法として 2000 年に Lyamichev らによって報告された。本学位論文では、インバーダー法を基盤とした感染症あるいは造血器腫瘍などの疾病診断法確立について述べた。

第 I 章-1 は HBV 遺伝子型判定法の確立についてまとめた。HBV は 8 つの遺伝子型 (A-H) に分類されており、A 型および B 型についてはそれぞれ二つの亜型が報告されている。本章では、HBV の遺伝子型判別法構築にかかる研究成果を示した。完全長 HBV ゲノムを比較し、同じ遺伝子型内で保存されているが、異なる遺伝子型間では DNA 配列が異なる領域をコアタンパク質コード領域、S タンパク質コード領域から選び、遺伝子型依存的に得的なインバーダー反応のシグナルが得られるようにオリゴ DNA を設計した。計 505 例の B 型慢性肝炎患者の血清検体を用いて、モノクローナル抗体を用いた EIA 法および GSPA 法と遺伝子型判定結果を比較し、EIA 法では単一遺伝子型と判定された 165 例中 162 例 (98.2%)、GSPA 法では、343 例中 333 例 (97.1%) で PCR-インバーダー法による判定と一致した。GSPA 法で判定不能となった 10 例については、ダイレクトシーケンス解析により PCR-インバーダー法で判定された遺伝子型が確認された。

第 I 章-2 では薬剤耐性との関連が報告されている HBV ポリメラーゼ RT ドメインにおける 6 コドンの変異を検出する HBV 薬剤耐性変異検出法について述べた。野生型と変異型の PCR 産物を組み込んだプラスミドを用いた測定感度の検討では 2% の変異型を検出可能であった。核酸アナログをラミブジンからエンテカビルに変更した 75 例の臨床検体についてダイレクトシーケンスの結果と比較した。ダイレクトシーケンスで検出した変異は全て PCR-インバーダー法でも検出可能であった。さらに、インバーダー法では、ダイレクトシーケンスでは検出されない微小な変異も検出可能であった。特に S202G 変異についてはダイレクトシーケンスでの変異検出率は 4.0% であったのに対して PCR-インバーダー法では 34.7% であり、有意に高感度で検出可能であった。

第 II 章ではインバーダー法を利用した定量解析について記した。第 II 章-1 では蛍光強度比を用いた簡易定量法による *BCR/ABL* キメラ mRNA に認められる ABL 遺伝子キナーゼドメインアミノ酸 T315I 変異の相対比率算出による治療効果予測法について述べた。本章では、*BCR/ABL* キメラ mRNA 中の T315I 変異クローンを相対定量解析 (1-100%) する

方法について検討した。野生型と変異型の PCR 産物を組み込んだプラスミドを用いたインベーター法による測定感度の検討では、1%の変異型を検出可能であった。T315I 変異陽性となった 2 症例の時系列検体を用いてダイレクトシーケンス、定性 ASO-PCR および PCR-インベーター法と結果を比較した。2 検体（8.3%、14.3%）については定性および定量 ASO-PCR、PCR-インベーター法では T315I 変異を検出したが、ダイレクトシーケンスでは検出できなかった。PCR-インベーター法は変異率 8.3～60.6%において定量 ASO-PCR と高い相関性を示した（決定係数 $R^2=0.951$ ）。

第 II 章-2 ではリアルタイム PCR とインベーター反応を組み合わせた広範囲なダイナミックレンジを有する“リアルタイムモニタリング定量法”の開発について述べた。“リアルタイムモニタリング定量法”では PCR 増幅とインベーター反応は下記のように同時進行していく。①PCR 産物は熱変性により 1 本鎖となる。②ステプライマリープローブおよびインベーターオリゴ DNA が結合し、フラップエンドヌクレアーゼによりプライマリープローブの 5' -側からフラップ配列が切り離される。遊離したフラップ配列は蛍光標識された FRET カセットに結合し、フラップエンドヌクレアーゼにより、蛍光物質が遊離する（インベーター反応）。③テンプレート DNA あるいは PCR 産物にプライマーが結合する。④DNA ポリメラーゼにより相補鎖が合成される。本測定法の性能評価のためにヒトパピローマウイルス 16 (HPV16) の測定系を構築し、加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR と結果を比較した。HPV-DNA の希釈系列を測定した際の標準曲線の傾きは“リアルタイムモニタリング定量法”が-3.39、リアルタイム PCR が-3.33 であった。この結果から増幅効率“リアルタイムモニタリング定量法”が 97.24%、リアルタイム PCR が 99.66%となった。標準曲線の Y 切片は“リアルタイムモニタリング定量法”が 35.08、リアルタイム PCR が 41.96 となり、全てのポイントで 6～8 サイクル早い C_p 値が得られた。14 例の HPV 16 陽性検体における両法の定量値は累乗近似曲線における決定係数: 0.97 と良好な相関性を示した。

第 II 章-3 では“リアルタイムモニタリング定量法”を用いたハイリスク HPV14 遺伝子型の相対定量解析による子宮頸がんリスク評価方法の開発について述べた。HPV は、子宮頸癌リスクに基づいて低リスクウイルス遺伝子型あるいは高リスク遺伝子型に分類されている。少なくとも 14 の遺伝子型が高リスクに分類されており、高リスク HPV 遺伝子型を迅速に診断することは検診の成果を高め、治療方針を決める上で重要な情報を提供する。HPV は複数の遺伝子型が同時に感染する重複感染の頻度が高いことが報告されているが、病態との関連性については不明な点が多い。複数の遺伝子型が同時感染している場合、それぞれの遺伝子型の比率を測定することは困難であり、検討報告も少ない。ハイリスク群に属する上記 HPV の 14 種類の遺伝子型の相対定量解析による、子宮頸がんリスク評価方法の開発を目的として、“リアルタイムモニタリング定量法”を用いて検討をおこない、ダイレクトシーケンスと結果を比較した。前章の“リアルタイムモニタリング定量法”を改変し、2 種類の蛍光物質を用いて 7 ウェルで HPV の 14 種類の遺伝子型を相対定量解析

した。182例の子宮頸部擦過サンプルについて測定し、131例から HPV を検出した。このうち 104 例からは単一の遺伝子型、27 例から複数の遺伝子型を検出可能であった。一症例における混在する遺伝子型の最大数は 4 であった。単一の遺伝子型が検出された 104 例については L1C1/C2 プライマーを用いたダイレクトシーケンスで配列を決定し、本方法との整合性が確認された。

歯周病は数種類の口腔細菌によって引き起こされる。特に *P. gingivalis*, *T. denticola*, および *T. forsythensis* の 3 菌種は「Red complex」と呼ばれ、深刻な歯周病と関連し、その他の菌種についても歯周炎を引き起こすことが報告されている。第 II 章-4 では Red complex を含む 6 菌種の歯周病関連菌のリアルタイムモニタリング定量法を用いた定量解析について述べた。それぞれの細菌から抽出した DNA の希釈系列を用いた測定感度の検討では 10ng から 10fg までは濃度依存的に検出が可能であった。64 例のボランティア唾液検体を測定しリアルタイム PCR との良好な相関性を示した。

第 II 章-5 ではリアルタイムモニタリング定量法を用いた C 型肝炎ウイルス (HCV) コア領域アミノ酸 70・91 変異の相対定量解析による肝発がんリスク評価方法について述べた。HCV-1b コア領域のアミノ酸 70 変異および 91 変異はペグインターフェロン (PEG-IFN) およびリバビリン (RBV) 併用療法の治療成功率の低下と関連している。リアルタイムモニタリング定量法を用いたアミノ酸 70/91 変異の相対定量解析法の開発を目的として検討を行い、ダイレクトシーケンスおよび変異型特異的プライマーを用いた PCR と結果を比較した。変異型/野生型プラスミドを用いた検討では 1%のマイナー遺伝子型を検出し、算出した相対比率はテンプレートと一致した。123 例の臨床検体を用いた検討では、シーケンスで検出した全ての変異をリアルタイムモニタリング定量法で検出した。シーケンスで確認できなかった変異については遺伝子型特異的プライマーを用いた PCR で確認した。

以上、フラップエンドヌクレアーゼによる三重鎖核酸修復機構 (インバーダー法) は、感染症あるいは造血器腫瘍などの疾病診断に広く応用可能であることを示した。現在、流行している新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) も、点突然変異によるアミノ酸置換が、ワクチンからの逃避、新薬の効果低下につながる可能性もあり、迅速且つ高精度なバリエーションウイルスの検出が求められている。このようなケースにおいて、インバーダー法を導入するメリットは高く、今後、本方法の応用範囲は更に拡大していくと思われる。