



令和 4 年 4 月 4 日

**B 型肝炎ウイルスの肝細胞の核内に存在する排除不能な  
ウイルス遺伝子 cccDNA の正確な測定法を開発**  
～ 治療の正確な評価が可能に ～

**論文掲載****【本研究成果のポイント】**

- B 型肝炎ウイルス（HBV）感染により、肝細胞核内に形成される、治療によっても排除ができない cccDNA (covalently closed circular DNA) を正確に測定できる方法を開発した。
- これまでの測定方法では不可能であった、測定誤差の要因となるウイルス複製中間体の不完全な環状の 2 本鎖 DNA を、新しい発想(直線化)により排除して測定することができるようになったことが正確な測定を可能にした。
- 肝細胞に残存する少量の cccDNA を正確に定量することにより B 型肝炎ウイルスの増殖のより深い理解が可能となり、治療効果の正しい評価につながる。

**【概要】**

広島大学大学院医系科学研究科 ハイブ・ネルソン准教授、茶山一彰医療イノベーション共同研究講座教授、広島大学大学院医歯薬保健学研究科博士課程 神谷直洋大学院生（当時）らは、田辺三菱製薬株式会社、広島大学大学院医系科学研究科医療人大学院教育・研究センター、消化器・代謝内科学との共同研究により、B 型肝炎ウイルス（HBV）感染に伴い、肝細胞内に形成され、あらゆる治療によっても取り除くことができない cccDNA の正確な測定方法を開発しました。

本研究成果は、2022 年 2 月 7 日（日本時間）に欧州微生物学会の機関紙である「Journal of General Virology」電子版に掲載されました。

**【発表論文】**

- ・掲載誌：Journal of General Virology
- ・論文タイトル：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
- ・著者名：Naohiro Kamiya, Takahiko Sugimoto, Hiromi Abe-Chayama, Rie Akiyama, Yasunori Tsuboi, Akira Mogami, Michio Imamura, C Nelson Hayes, Kazuaki Chayama
- ・DOI: 10.1099/jgv.0.001591
- ・URL：

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001591>

**【背景】**

世界では約 2 億 5 千万人の人々が B 型肝炎ウイルス（HBV）に感染しています。B 型慢性肝炎患者においては、インターフェロン製剤や核酸アナログ製剤を用いた抗ウイルス治療により、ウイルス増殖を抑え、肝疾患の進展を防ぐことが可能です。

しかし、このウイルスが感染した肝細胞では、ウイルスの DNA が cccDNA という非常に安定な形状になって存在し続け、あらゆる治療を行っても取り除くことができません(図 1 参照)。B 型急性肝炎にかかって、治療して中和抗体(HBs 抗体)が陽性になった人でも、この cccDNA が存在し続けるために、免疫抑制剤、抗がん剤などの治療をするとウイルスが再活性化して重篤な肝炎を起こすことがあることが知られています。この cccDNA は正確に測定することがこれまでできていませんでした。それは、B 型肝炎ウイルスの複製の際に形成される relax circular DNA という複製中間体と区別がしにくかったからです。

cccDNA を正確に定量することは、治療の評価をする上で重要です。特に最近治療の大半を占めている核酸アナログによる治療を終了できるかどうかの評価が難しかったため、患者さんは基本的には一生薬を服用し続ける必要がありました。

### 【研究成果の内容】

Bst 2.0 DNA polymerase (BsDP) という酵素を作用させ、環状である rcDNA を直線化することにより relax circular DNA を直線化し、さらに制限酵素で切断することにより relax circular DNA 由来の PCR 産物ができることをほとんど無くするくらいに抑制することができました。さらに、高感度で簡便な測定を可能にするように digital PCR による増幅を行い、cccDNA 由来の PCR 産物と rcDNA 由来の PCR 産物が区別できるようにしました。こうすることにより cccDNA を正確に定量することができるようになりました。

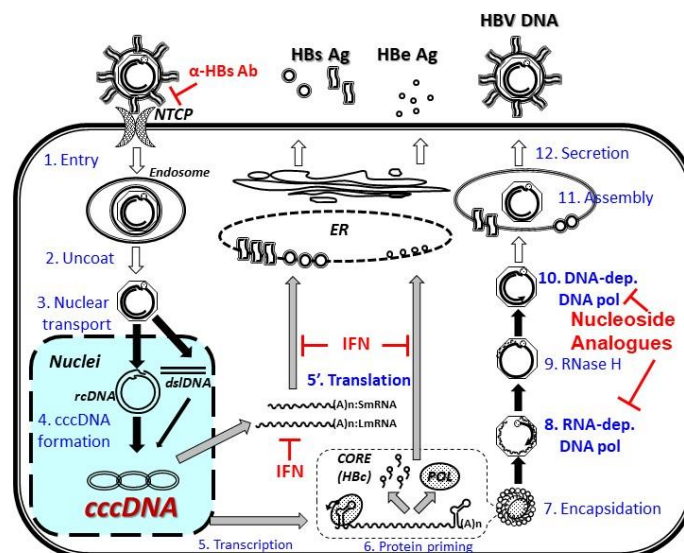
### 【今後の展開】

cccDNA の定量が正確にできるようになったことから、IFN や核酸アナログの治療を行った後の肝細胞に残存するウイルスの評価ができるようになり、核酸アナログの治療の中止の時期の判断などが正確に行うことができるようになることが期待されます。

### 【図の説明】

(図 1) : B 型肝炎ウイルスの生活史と肝細胞核内における cccDNA の形成

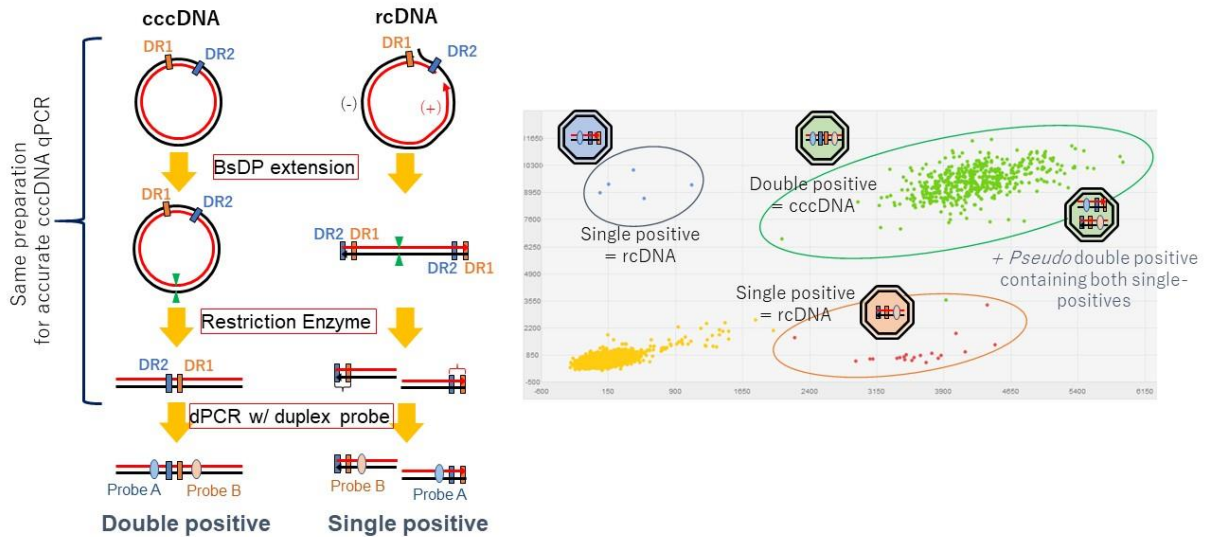
血液中の B 型肝炎ウイルスは rcDNA(relaxed circular DNA)の形の DNA をウイルス粒子の中に持っていますが、ウイルスが肝細胞に侵入すると、1 本鎖部分が伸長され、完全な 2 本鎖になり、さらにそれがよじれた形の cccDNA という形になります。これを鋳型にしてウイルスの RNA が転写され、ウイルスの増殖が開始されます。IFN(interferon)や核酸アナログ(NA: nucleoside analogue)によりウイルスの増幅は抑制されますが、これらの薬剤は cccDNA に対して直接作用するものではないため、治療を強力に長期間行っても cccDNA は肝細胞内に存在し続け、治療を終了するとまたウイルスが増えてしまう原因となっています。



(図 1) B型肝炎ウイルスのライフサイクルと cccDNA

(図 2) : cccDNA の正確な定量方法の開発

relaxed circular DNA(rcDNA)は構造がcccDNAと非常によく似ているため、これをcccDNAと分けて正確に測定することはこれまでできていませんでした。私たちは Bst 2.0 DNA polymerase (BsDP) という酵素を作用させることにより、環状であるrcDNAを直線化することを発想しました。さらに制限酵素(restriction enzyme)で切断すると、rcDNAとcccDNAに由来するDNAは全く異なる形状となることに注目し、digital PCRという、一分子のDNAの増幅を行ってその形状を区別することができるPCRを行うことにより、cccDNAの定量が正確にできることを示すことができました。



(図2)rcDNAを区別する方法

左、rcDNAをBst 2.0 DNA polymerase (BsDP) による直線化と切断  
 右、digital PCRによるcccDNAとrcDNA由来のPCR増幅産物の区別

【お問い合わせ先】

広島大学大学院医系科学研究科 医療イノベーション共同研究講座  
 茶山 一彰  
 Tel : 082-257-2022  
 E-mail : chayama@hiroshima-u.ac.jp

発信枚数 : A4版 3枚 (本票含む)