

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた  
肝炎ウイルス制御に関する研究  
分担研究報告書(平成25年度)

次世代シーケンサーを用いた DAA 耐性 HCV の検討

分担研究者: 前川 伸哉

山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨: 近年多数開発されている DAA(Direct acting antiviral agents)は、従来の非特異的抗ウイルス剤であるインターフェロンと比して、C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する強い抗ウイルス効果が示されている。本検討では、プロテアーゼ阻害薬 telaprevir(TVR)、また NS5A 阻害剤 daclatasvir(DCV)において、DAA 耐性 HCV の臨床的意義を明らかにすることを目的として deep sequence による HCV quasispecies の検討を行った。TVR に関して、IFN に感受性が低い IL28B minor type で変異ウイルス出現率が高い傾向あり、十分な薬剤投与が得られないと治療不成功に終わる可能性があると考えられた。また non-SVR 症例の一部では耐性 HCV の優位な状態が長く持続しており次世代 DAA 治療に対する注意が必要であった。DCV に関しては Y93H の頻度が高いことが確認され、治療導入に際して留意すべきことが考えられた。

## A. 研究背景・目的

近年多数開発されている DAA(Direct acting antiviral agents)は、従来の非特異的抗ウイルス剤であるインターフェロンと比して、C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する強い抗ウイルス効果が示されている。

一方で、一部の症例においては DAA 耐性 HCV が治療前から存在することが明らかになりつつあるが、これらが臨床的耐性にどのように関与するのか明らかとなっていない。さらに DAA 治療 non-SVR 症例において、non-SVR の原因となった DAA 耐性 HCV が宿主内でどのような動態を呈するのか、またこれらが次々世代の DAA 製剤への臨床的耐性に関与するのか明らかになって

はいない。

本検討では、既に上梓されているプロテアーゼ阻害薬 telaprevir(TVR)、また近い将来上梓されることが予想されている NS5A 阻害剤 daclatasvir(DCV)において、DAA 耐性 HCV の臨床的意義を明らかにすることを目的として deep sequence による HCV quasispecies の検討を行った。

## B. 研究方法(2013 年度)

(1)TVR を含む 3 剤併用療法(PEG-IFN/RBV/TVR)を施行した 21 症例において、治療前と治療開始後 12 時間後の TVR 耐性 HCV について、NS3 領域における deep sequence を行い臨床因子との関連を検討した。

(2) NS5A 阻害剤 DCV 無治療症例 110 症

例において、deep sequence を行い、DCV 耐性 HCV と関連する臨床的因子について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究成果

(1) TVR 治療開始前には僅かな耐性変異は殆どの症例に存在した(17/21, 81%)が、PEG-IFN/RBV/TVR 治療における SVR との明らかな関連は認めなかった。しかしながら治療 12 時間後に耐性変異はさらに増加し(20/21, 95%)、IL28TG/GG 症例において、耐性変異の増加をより強く認めた。

一方、non-SVR 症例の 5/8(62.5%)において、治療終了時に既知の TVR 耐性変異が優位となっていることが観察され、また 5 例中 2 例は治療終了後 1 年経過しても TVR 耐性変異の優位な状態が持続していた。

(2) DCV 未治療の対象 110 症例において、DCV 耐性変異 Y93H は deep sequence にて 30.9% (34/110) の症例に存在した。Y93H 症例はインターフェロン感受性関連因子であるコア番変異( $p=0.03$ )、IRRDR 変異数( $p=0.01$ )、IL28B SNP( $p=0.002$ )と関連したが、特に IL28B SNP は Y93H 変異と独立して関連していた。

## D. 考察

TVR に関して、IFN に感受性が低い IL28B minor type で変異ウイルス出現率が高い傾向あり、十分な薬剤投与が得られないと治療不成功に終わる可能性があると考えられた。また non-SVR 症例の一部では耐性

HCV の優位な状態が長く持続しており次世代 DAA 治療に対する注意が必要であった。

また DCV に関しては Y93H の頻度が高いことが確認され、治療導入に際して留意すべきことが考えられた。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用いた Deep Sequence によって、わずかな DAA 耐性変異ウイルスを高感度に検出することが可能となった。今後、さまざまな DAA 剤の登場が見込まれる状況において、Deep Sequence を用いた解析の重要性は高まっていく可能性が考えられた。

## F. 研究発表論文発表

### I. 論文発表

1. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoteric acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K.

- Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus.  
PLoS One. 2013 Dec 17;8(12):e82299.
3. Maekawa S, Enomoto N.  
Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C.  
J Gastroenterol. 2014 Jan;49(1):163-4.
4. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.  
Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression.  
J Virol. 2013 Dec;87(23):12541-51.
5. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.  
IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) and IFN- $\alpha$  synergistically inhibit HCV replication.  
J Viral Hepat. 2013 Apr;20(4):281-9.
6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N.  
Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.  
J Med Virol. 2013 Mar;85(3):449-58.
7. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.  
Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.  
Hepatol Res. 2013 Aug;43(8):865-75.

#### H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。