

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)
(分担) 研究報告書(平成23~25年度)
創薬と新規治療法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

次世代シーケンサーを用いた肝病態進展と抗ウイルス治療効果と関連する
ウイルス遺伝子変異の解析

研究分担者 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：肝炎ウイルスは宿主内で多様な quasispecies を形成することにより、肝病態進展・肝発癌・抗ウイルス治療反応性に関与することが考えられてきたが、病態形成における quasispecies の関与を詳細に検討することは技術的に従来困難であった。このような中、次世代シーケンサーを用いた deep sequencing 技術を導入することによって詳細な quasispecies 解析が可能となったことから、本研究班ではウイルス性肝炎における quasispecies と病態との関連を検討した。

H23 年度は HCV 感染における core aa70 変異・野生型の混在状態と病態進行・肝発癌との関連について、H24 年度は HCV の core aa70 の解析に加えて HBV 感染における preS 領域の変異と欠失の混在状態と病態進展について、H25 年度は DAA(direct antiviral agents)治療における DAA 耐性変異 HCV の混在状態と治療反応性の関連について検討を行った。その結果、各病態形成における quasispecies の重要な関与が明らかとなった。

共同研究者氏名

榎本信幸

山梨大学医学部第一内科 教授

A. 研究背景・目的

肝炎ウイルスは宿主内で多様なウイルスゲノムの混在状態、すなわち quasispecies を形成することにより、肝病態進展・肝発癌・抗ウイルス治療反応性に関与することが考えられている。一方、病態形成における quasispecies の関与を詳細に検討す

ることは技術的に従来困難であった。

このような中、次世代シーケンサーを用いた deep sequencing 技術を導入することによって詳細な quasispecies 解析が可能となったことから、本研究班ではウイルス性肝炎における quasispecies と病態との関連を検討した。

B. 研究方法

(2011 年度)

次世代シーケンサー Roche GS

Junior を用いた deep sequence により genotype1b HCV 82 例(HCC 群 27 例、LC 群 30 例、CH 群 25 例)を対象とし、コア aa70 の配列をダイレクトシーケンスと Roche GS Junior Sequencer を用いた Deep sequencing により比較検討した。

(2012 年度)

(1)HCV コア aa 70 野生型と変異型が大きく(5%以上)混在する 9 症例において、70 番アミノ酸残基と、コア全域配列がどのように関連するのか、系統樹を用いて検討した。

(2)病態の大きく異なる HBV 感染患者 (inactive carrier 12 症例 vs. HCC 12 症例)において、PreS/S 領域を次世代シーケンサーによって deep sequence を行い、肝病態との関連を検討した。

(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

(2011 年度)

HCV-1b 持続感染 82 例における検討において、コア aa 70 はダイレクトシーケンスでは R または Q あるいは H として判定された。一方、deep sequence によって、コア aa 70 のアミノ酸に混在を 5% 以上に認めるものは、13.4%(11/82)であった(HCC:3/25、LC:5/30、HCC:3/27)。しかしバックグラウンド以上に有意な混在を示すものは 80/82(97.5%)に上り、コア aa 70 は、大部分の症例において混在状態であった。

(2012 年度)

(1)コア 70 番アミノ酸残基を含むコア全体配列の系統樹解析により、一人の患者に多数存在する HCV クロームは 70 番アミノ酸残基(野生型か変異型か)によって大きく 2 群に分別されることが示された。すなわちコア領域全体の配列はコア 70 番の配列に強く関連することが明らかとなった。

(2)Inactive carrier 12 症例と HCC12 症例における PreS/S 領域を次世代シーケンサーによって詳細に検討すると、特に PreS2 の大きな欠失と PreS2 の開始コドンの quasispecies に顕著な違いが認められ、inactive carrier においては、殆ど認められなかったのに比べて HCC 症例では多数例においてこれらの変異や欠失の population が有意に多かった。またこれらの HBs 抗原量は PreS/S 領域の変異が多くなるにつれて、低下する傾向を示した。

(2013 年度)

(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

本研究により、一方、C型慢性肝疾患において、コアaa70の混在状態と経時的变化はG-GTP等の臨床背景因子とともに肝発癌と密接に関連していることが明らかとなった。

HBVにおいてはPreS/S領域における変異・欠失のquasispecies populationと肝病態、HBs抗原量が密接に関連していることが考えられた。

DAA治療においては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。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた deep sequence 解析は宿主体内における quasispecies を正確にかつ短時間で解析する優れた方法であることが示された。また実際に同方法を用いた解析により、ウイルス性肝炎における様々な病態、すなわち肝炎進展・肝発癌・抗ウイルス治療反応性において、ウイルス quasispecies は重要な関与をしていることが明らかとなり、肝炎研究において必須の解析技術であることが明らかとなった。

F. 研究発表論文発表 1 . 論文発表

1. Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
2. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Kadokura M, Sueki R, Miura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S,

- Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
3. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24514. Epub 2011 Sep 15.
 4. Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011 Nov 15;19(22):6892-905. Epub 2011 Sep 16.
 5. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int.* 2011 Mar 20.
 6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):439-48.
 7. Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. *J Med Virol.* 2012 Sep;84(9):1360-8.
 8. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of Both Protease and Helicase Activities of Hepatitis C Virus NS3 by an Ethyl Acetate Extract of Marine Sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One.* 2012;7(11):e48685.
 9. Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection. *Hepatology.* 2012 May 10.
 10. Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda

- Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar Drugs*. 2012 Apr;10(4):744-61.
11. 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 gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepat*. 2013 Apr;20(4):281-9.
 16. 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.
 17. 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.
- 1 . 学会発表
1. 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤

邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 . ワークショップ : 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 第 47 回 日本肝臓学会大会 . 東京 . 平成 23 年 6 月 2 日
6 月 3 日

2. 三浦美香、前川伸哉、末木良太、門倉信、小馬瀬一樹、進藤浩子、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 . ポスター : 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析 第 15 回 日本肝臓学会大会 . 福岡 . 平成 23 年 10 月 20 日
10 月 21 日 .

特許権等知的財産権の取得及び申請状況:
なし。