

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型肝炎の治療法に関わる遺伝子変異の検討

研究分担者 坂本 穰 山梨大学医学部附属病院肝疾患センター センター長・准教授

研究要旨：C型肝炎に対する抗ウイルス療法は近年急速に進歩している。とくにNS3 protease阻害剤とNS5A阻害剤の経口2剤併用療法は、きわめて近い将来使用可能となり、治療ガイドラインに盛り込まれる可能性が高い。しかし、これらの薬剤未投与例であっても自然獲得薬剤耐性変異が一定の確率で存在することが明らかになり、しかもこれらは本来、IFN併用療法の有効性が高いと考えられる、PEG-IFN+RBV再燃例やIL28B TT症例に多い傾向にあった。一方、PEG-IFN+RBV+TVR治療失敗例で出現するTVR耐性変異は、少なくとも24週間持続する症例も存在し、今後の治療の支障になる可能性もあることから治療前にはこれら薬剤耐性変異を測定することが望ましいと考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎に対する治療法は急速に進歩し、C型肝炎ウイルス（HCV）に直接作用する抗ウイルス剤（Direct acting antivirals: DAA）の開発が進んでいる。とくにNS3 protease阻害剤とNS5A阻害剤の組合せによる経口2剤併用治療法は極めて近い将来可能となり、わが国の治療ガイドラインに盛り込まれる可能性が高い。しかし、この治療法は極めて高い抗ウイルス効果を示す反面、薬剤耐性ウイルスの出現・誘導が問題となる。しかもこれら薬剤未使用例における、自然獲得耐性変異（naturally-occurring resistant HCV）の存在も知られている。そこで本研究では、これらの臨床的意義につき検討するとともに、治療による薬剤耐性変異につき検討し、新規治療法選択に必要な情報に資することを目的とする。

B. 研究方法

（検討1）NS3 Protease阻害剤およびNS5A阻害剤未投与例における、自然獲得NS3およびNS5A阻害剤耐性変異の検討

当科で経過観察中のHCV持続感染者110例（genotype1b、PEG-IFN+RBV未治療例59例、再燃30例、無効21例）を対象とし、Roche GS Juniorを用いて、既知のNS3 protease阻害剤およびNS5A阻害剤耐

性変異を含む領域のアミノ酸配列について検討し、臨床的因子との関連を検討した。

（検討2）PEG-IFN+RBV+Telaprevir（TVR）投与例における薬剤耐性変異の検討

2011年から当科で導入したPEG-IFN+RBV+TVR症例34例を対象とし、治療前および治療中のTVR耐性変異の出現を検討した。

（倫理面の配慮）

研究については目的・方法・副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利・保護等に関し十分に説明し、文書で同意を取得し研究をおこなった。なお、これらの研究の実施計画については、山梨大学医学部倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

（検討1）NS3領域の耐性変異は、変異率0.1%を基準とし検討すると、110例中21例（19%）に認め、この内訳は未治療15例（25%）、再燃6（20%）であったが、無効例では1例も認めず、PEG-IFN+RBV無効例で有意にNS3耐性変異が少なかった（ $p < 0.05$ ）。また、IL28B別では、TTでは71例中17例（24%）で耐性変異を認めたのに対し、TG+GGでは39例中4例（10%）であった。

しかし、高度耐性変異として知られている R155Q、A156T、D168A/V/T/H、V170A の耐性変異は稀であった。一方、NS5A 阻害剤耐性変異は、Y93H を、未治療・再燃・無効例で、それぞれ 21 (36%)、10 (33%)、3 (14%) に認めた。同様に L31M/V/F 変異は、8 (14%)、4 (13%)、1 (5%) に認め、いずれも無効例に比して、未治療例や再燃例で変異が多い傾向にあった。とくに Y93H 変異に関連する因子につき検討すると、IL28B TG+GG、コア R70Q、IRRDR 変異数 5 と関連した。

厚生労働省「科学的根拠に基づくウイルス性肝炎診療ガイドラインの構築に関する研究」

C型肝炎の治療法選択に関わる遺伝子変異の検討

PEG-IFN+RBV+TVR未投与例における耐性変異の割合

NS5A

PEG+R成績 N	Naïve 59	Relapse 30	Null 21	Total 110
L31M/V/F	8 (14%)	4 (13%)	1(5%)	13(12%)
P32L	0	0	0	0
Y93H	21(36%)	10(33%)	3(14%)	34(31%)
L93M/V/F-Y93H	4	0	0	4
Total	29(49%)	14(47%)	4(19%)	47(19%)

GS juniorを用いた検討で変異率0.1%以上の症例数の割合

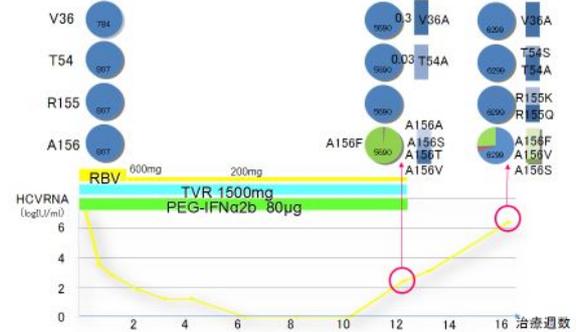
(検討 2) PEG-IFN+RBV (24W) +TVR (12W) の治療成績は、SVR 79% (30/38) であったが、非SVR 例 8 例 (副作用中止 3 例、再燃 2 例、breakthrough[BT] 1 例) の薬剤耐性変異につき検討した。BT 例は TVR 投与中にウイルスが再出現し、ウイルス増殖時には A156F/A/S/T/V 変異が出現していた。しかし時間とともに耐性ウイルスは減少し野生型の比率が増加した。このほか、ウイルス増殖時には V36A、T54A、A156V/T などの変異が出現したが、一定の傾向はなかったが治療 24 週後にも耐性変異が主体をなっている症例も存在していた。

厚生労働省「科学的根拠に基づくウイルス性肝炎診療ガイドラインの構築に関する研究」

C型肝炎の治療法選択に関わる遺伝子変異の検討

PEG-IFN+RBV+TVR無効例における耐性変異の出現と推移

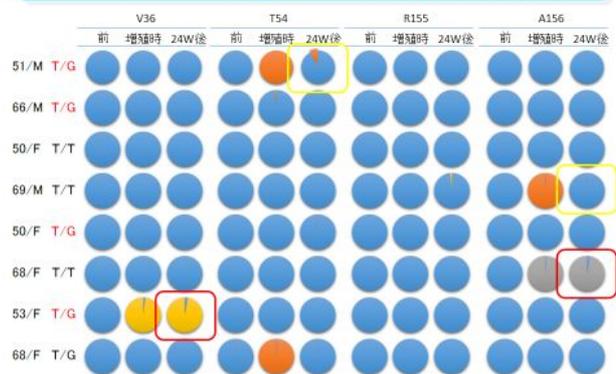
69歳男性、前治療無効、IL28B T/T、ITPA C/C
7.3 log/ml、ISDR 0/IRRDR 3、コア70R



厚生労働省「科学的根拠に基づくウイルス性肝炎診療ガイドラインの構築に関する研究」

C型肝炎の治療法選択に関わる遺伝子変異の検討

PEG-IFN+RBV+TVR無効例における耐性変異の出現と推移



E. 結論

Deep sequencerでの検討では、DAA未治療例においても一定頻度でNS3 protease阻害剤およびNS5A阻害剤耐性変異を認めた。しかも、PEG-IFN+RBV未治療例や再燃例に多く、IL28B TT例に多く認め、本来PEG-IFN+RBV療法で効果が高いと思われる症例に、自然獲得耐性変異が多い傾向にあった。また、TVRで一旦耐性変異が出現すると、少なくとも24週間、耐性変異が持続する症例が存在することが明らかになった。したがって、治療法選択とくにNS3protease阻害剤+NS5A阻害剤による治療を行う際には、これら薬剤耐性変異を測定することが重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 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; 85(3): 449-58. Article first published online: 7 JAN 2013 | DOI: 10.1002/jmv.23497
 - 2) 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; 87: 12541-12551. Published ahead of print 14 August 2013, doi: 10.1128/JVI.00826-13
 - 3) Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the NS5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1n hepatitis C virus infection. Hepatol Res 2014 in press.
 - 4) 坂本穰、榎本信幸、C型肝炎治療における宿主因子とウイルス因子 実地診療での臨床応用のすすめかた、Medical Practice 30(2); 323-328、2013
 - 5) 坂本穰、榎本信幸、慢性肝炎・肝硬変(C型)、治療過程で一目でわかる消化器薬物療法 STEP 1・2・3(一瀬雅夫、岡政志、持田智編集)、174-178、2013、メジカルビュー社、東京
 - 6) 坂本穰、榎本信幸、C型肝硬変における抗ウイルス療法、Modern physician 33(4) 454-458、2013
 - 7) 辰巳明久、坂本穰、榎本信幸、メタボ肝癌とファイブロスキャン、メタボ肝癌(小俣政男編集)、163-168、2013、アークメディア、東京
 - 8) 坂本穰、榎本信幸、ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン療法の治療成績と発癌リスクを考慮した新規治療法への展望、消化器内科 56(4)、437-442、2013
 - 9) 小松信俊、坂本穰、榎本信幸、透析患者に対する薬の使い方 疾患別・病態別[消化器] 549-552
 - 10) 坂本穰、榎本信幸、発癌リスクと治療反応性を考慮したC型肝炎の最新治療、消化器内科 57(3)、379-384、2013
 - 11) 坂本穰、榎本信幸、C型肝炎診療 up-to-date、発癌リスクと新規治療法、診断と治療 101(9)、1277-1282、2013
 - 12) 坂本穰、榎本信幸、C型肝炎、カラー版消化器病学 基礎と臨床(浅香正博、菅野健太郎、千葉勉編)、1177-1188、2013
 - 13) 坂本穰、榎本信幸、C型肝炎の自然経過と発癌リスク、成人病と生活習慣病 43(11)、1310-1315、2013
 - 14) 坂本穰、榎本信幸、C型肝炎ウイルスと治療、HIV感染症とAIDSの治療 4(2)、55-59、2013
 - 15) 坂本穰、榎本信幸、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異と意義、肝胆膵 67(6)、893-898、2013
 - 16) 坂本穰、B型肝炎のインターフェロン治療: sequential therapy を含めて、Phama Medica 31(12)、49-52、2013
- ### 2.学会発表
- 1) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. 発癌リスクと治療反応性を考慮したC型肝炎の最新治療、第99回日本消化器病学会総会(シンポジウム)、2013.3.22、鹿児島
 - 2) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. C型慢性肝炎の病態における肝脂肪化とPNPLA3およびIL28B遺伝子多型の意義の検討、第99回日本消化器病学会総会(シンポジウム)、2013.3.22、鹿児島
 - 3) 辰巳明久、進藤邦明、田中佳祐、津久井雄也、佐藤光明、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. 肝硬度における肝

- 線維化、発癌リスク評価、第 99 回日本消化器病学会総会、2013.3.22、鹿児島
- 4) Shinya Maekawa, Mika Miura, Nobutoshi Komatsu, Akihisa Tatsumi, Yukiko Asakawa, Shinichi Takano, Mitsuaki Sato, Kuniaki Shindo, Fimitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Nobuyuki Enomoto. An Association between Quasispecies Nature of Hapatitis C Virus Core Region and Disease Progression Analysis by Deep Sequencing. The 2nd JSGE International topic conference. 2013.3.23, Kagoshima
 - 5) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. 発癌リスクと治療反応性を考慮した最新の C 型肝炎治療、第 49 回日本肝臓学会総会（シンポジウム）、2013.6.7、東京
 - 6) 小松信俊、坂本穰、榎本信幸、EOB-MRI 肝細胞相を用いた新しいサーベイランスの可能性 ~ clean liver からの発癌経過、第 49 回日本肝臓学会総会（パネルディスカッション）、2013.6.7、東京
 - 7) 佐藤光明、坂本穰、榎本信幸、肝癌と鑑別が必要な肝良性腫瘍の画像診断の実際、第 49 回日本肝臓学会総会（ワークショップ）、2013.6.7、東京
 - 8) 前川伸哉、三浦美香、辰巳明久、小松信俊、佐藤光明、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、C 型肝炎の病態進展に対する MICA、DEPDC5 遺伝子多型の意義の検討、第 49 回日本肝臓学会総会（ワークショップ）、2013.6.7、東京
 - 9) 辰巳明久、進藤邦明、田中佳祐、津久井雄也、佐藤光明、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. 肝硬度における肝線維化、発癌リスク評価、第 49 回日本肝臓学会総会、2013.6.7、東京
 - 10) 三浦美香、前川伸哉、高野伸一、小松信俊、辰巳明久、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた NS5A 阻害剤耐性変異の検討、第 49 回日本肝臓学会総会、2013.6.7、東京
 - 11) 三浦美香、前川伸哉、高野伸一、小松信俊、辰巳明久、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた NS5A 阻害剤耐性変異の検討、第 23 回ウイルス療法研究会、2013.6.14、東京
 - 12) 辰巳明久、前川伸哉、三浦美香、小松信俊、田中佳祐、津久井雄也、佐藤光明、雨宮史武、進藤邦明、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸. 次世代 deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異株の検討、第 23 回ウイルス療法研究会、2013.6.14、東京
 - 13) 坂本穰、発癌リスクと治療反応性からみた 3 剤併用療法 Y-PERS から、第 7 回東京肝疾患研究会（PERFECT）、2013.6.29、東京
 - 14) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、発癌リスクと宿主・ウイルス遺伝子からみた C 型肝炎治療、第 17 回日本肝臓学会大会（JDDW）（シンポジウム）、2013/10/10、東京
 - 15) 坂本穰、井上泰輔、榎本信幸、B 型肝炎治療における疾患進展と発癌に関わるウイルスマーカー、第 17 回日本肝臓学会大会（JDDW）（パネルディスカッション）、2013/10/10、東京
 - 16) 坂本穰、渡邊真里、柏木賢治、榎本信幸、肝疾患コーディネーターとインターネットを用いた診療支援システムの構築、第 17 回日本肝臓学会大会（JDDW）、2013/10/9、東京
 - 17) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、C 型肝炎発癌における MICA、DEPDC5、IL28B 遺伝子多型の意義の検討、第 17 回日本肝臓学会大会（JDDW）（ワークショップ）、2013/10/10、東京
 - 18) 三浦美香、前川伸哉、高野伸一、小松信俊、辰巳明久、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代シーケンサーを用いた HCV NS5A 阻害剤耐性変異の検討、第 17 回日本肝臓学会大会（JDDW）、2013/10/10、東京
 - 19) 雨宮史武、早川宏、津久井雄也、小林祥司、門倉信、山口達也、大塚博之、進藤邦明、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、初発肝細胞癌の臨床背景検討、第 17 回日本肝臓学会大会（JDDW）、2013/10/10、東京

- 20) 辰巳明久、進藤邦明、加藤亮、倉富夏彦、佐藤光明、小松信俊、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、肝硬度による慢性肝疾患の肝癌リスク評価、第 17 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、2013/10/10、東京
- 21) 辰巳明久、佐藤光明、前川伸哉、鈴木雄一郎、広瀬純穂、小松信俊、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代シークエンサーにて耐性変異を確認した telaprevir を含む 3 剤併用療法で breakthrough をおこした 1 例、第 53 回日本消化器病学会甲信越支部例会、2013/11/23

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし