

201320019A

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

次世代シーケンス技術を駆使したウイルス  
ゲノム解析による  
C型肝炎の病態解明と臨床応用

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成26(2014)年3月

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

次世代シーケンス技術を駆使したウイルス  
ゲノム解析による  
C型肝炎の病態解明と臨床応用

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成26(2014)年3月

# 目次

## I. 総括研究報告

- 次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析によるC型肝炎の  
病態解明と臨床応用 ..... 1  
榎本信幸（山梨大学医学部第一内科教授）

## II. 分担研究報告

- 次世代シーケンス技術を用いたC型ウイルスゲノムの多種性の解析 ..... 15  
上野義之（山形大学医学部消化器内科学教授）  
渡辺久剛（山形大学医学部消化器内科学講師）
- DAA 耐性ウイルスの頻度と臨床像の検討 ..... 18  
黒崎雅之（武蔵野赤十字病院消化器科部長）
- C型肝炎治療における次世代シーケンサーを用いた解析 ..... 20  
鈴木文孝（国家公務員共済組合連合会虎の門病院肝臓センター部長）
- 次世代シーケンス技術を用いたC型ウイルスゲノムの多種性の解析 ..... 25  
相崎英樹（国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長）
- C型肝炎患者におけるHLAクラスII領域SNPの検討 ..... 29  
中本安成（福井大学医学部第二内科教授）
- C型肝炎新規クラスDAA製剤の薬剤耐性と治療効果 ..... 31  
朝比奈靖浩（東京医科歯科大学教授）
- HCVゲノム変異解析プラットフォームの開発 ..... 36  
丸澤宏之（京都大学医学研究科消化器内科）
- 次世代シーケンサーによるDAA耐性ウイルスの検討 ..... 40  
今村道雄（広島大学病院消化器・代謝内科助教）
- 次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析によるC型肝炎の  
病態解明と臨床応用 ..... 42  
須田剛生（北海道大学大学院医学研究科・消化器内科分野）

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 45

## IV. 研究成果の刊行物・別冊 ..... 61



# I. 総括研究報告

## 次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析による

### C 型肝炎の病態解明と臨床応用

研究代表者 榎本信幸 山梨大学医学部第一内科 教授

#### 研究要旨:

●HCV は、遺伝子変異を高頻度を起こし宿主体内において複雑な変異体の集合を形成して宿主反応と相互作用し、C 型肝炎の治療経過・病態の多様性の基盤なっていることからウイルス側因子の解明は HCV の制御に不可欠と考えられる。しかしこれまでの研究は宿主体内の HCV 変異体集団の代表的なウイルス遺伝子を部分的に解析した概要情報の集積であり、宿主内の変異ウイルス集団の遺伝情報の全体像と臨床像、宿主遺伝子情報との統合的な理解は全く進んでいないことから多くの潜在的な診断および治療標的が見逃されていると考えられる。

●本研究では、革新的な次世代シーケンス技術を用いて C 型肝炎ウイルス遺伝子を多数例で網羅的に解析すると同時に、変異ウイルス動態と治療抵抗性・耐性、病態、宿主ゲノム変異、自然免疫系、miRNA などの変動を対比し、変異ウイルス蛋白機能解析、ウイルス変異と宿主因子の相互作用の解明、臨床・遺伝子情報のデータマイニングにより治療抵抗性・感染持続・病態進展・肝発癌の分子機構など広範な領域で革新的な情報を得て慢性 C 型肝炎の病態を解明し新規診断・治療法開発へ展開することを目標とする。これによって、本年度は以下の成果を得た。

#### (1)ウイルス変異情報を用いた個別化治療の構築

本年度の検討により、NS3 阻害剤については、高度耐性の HCV が当初より存在する可能性は低く、わずかな NS3 阻害剤の耐性が臨床的な耐性に発展する可能性は低いことが考えられた。一方、deep sequence からは NS3 阻害剤耐性が出現後も長期間にわたり、NS3 阻害剤耐性 HCV が宿主に残ることが示され、臨床的耐性と結びつくのかは今後の検討が必要であった。NS3 阻害剤とは異なり、NS5A 阻害剤耐性 HCV は治療前から一定の頻度で存在し、また宿主の IL28B とも関連することが示された。

#### (2)次世代シーケンス技術による新規治療法開発への基盤構築

HCV 全長にわたる HCVquasispecies の検討する手法を確立した。住民コホートにおいて HCV による肝発癌、ウイルス陰性化、生命予後肝発癌の関連を明らかとした。HCV 慢性肝炎の組織中における欠損型 HCV の存在と意義について明らかとした。HLA クラス II 領域 SNP と病態進展・肝発癌の関連を示した。

#### A. 研究目的

●本研究では近年の次世代シーケンス技術の驚異的かつ急速な進歩を利用して、多数の臨床症例よりこれまでにない膨大な C 型肝炎ウイルス遺伝子および宿主遺伝子情報を得て宿主内 HCV 変異体(quasispecies)の全

貌と臨床像との関係を明らかとして病態解明、治療効果予後予測に応用するとともに、その機序の基礎的解析から治療標的を解明して新規治療の開発へ展開することを目的とする。

●HCV は遺伝子変異を高頻度を起こし宿

主体内において複雑な変異体の集合を形成して宿主反応と相互作用し、C 型肝炎の治療経過・病態の多様性は HCV 遺伝子および宿主遺伝子の多様性を背景としていることからウイルス側因子の解明は HCV の制御に不可欠と考えられる。しかしこれまでの研究は宿主体内の HCV 変異体集団の代表的なウイルス遺伝子を部分的に解析した概要情報の集積であり、宿主内の変異ウイルス集団の遺伝情報の全体像と臨床像、宿主遺伝子情報との統合的な理解は全く進んでいないことから多くの潜在的な診断および治療標的が見逃されていると考えられ、近年のシーケンス技術の革新に応じて重点的に取り組む必要がある課題である。

●本研究では次世代シーケンス技術を用いてC型肝炎ウイルス遺伝子を多数例で網羅的に解析する(H25)と同時に、変異ウイルス動態と治療抵抗性・耐性、病態、宿主ゲノム変異、自然免疫系、miRNA などとの変動を対比し(H26)、変異ウイルス蛋白機能解析、ウイルス変異と宿主因子の相互作用の解明、臨床・遺伝子情報のデータマイニングにより治療抵抗性・感染持続・病態進展・肝発癌の分子機構など広範な領域で革新的な情報を得て慢性 C 型肝炎の病態を解明し新規診断・治療法開発へ展開することを目標とする(H27)。

●申請者らはこれまでに通常型シーケンサーを用いて多数例の肝炎ウイルス遺伝子解析を施行、治療反応性および病変進展に関与する遺伝子変異を同定、宿主因子との相互作用を軸として機能解析を進めてきた。その結果、ペグインターフェロン・リバビリン治療には NS5A 領域の ISDR 変異・IRRDR 領域および core 蛋白 70 番変異が影響を与えていることを解明、さらに core 蛋白 70 番アミノ酸変異がインターフェロン耐性のみならず肝病変の進展・発癌に関連することを見出している。

●本研究グループは新規 DAA 耐性などの変異 HCV の培養細胞系およびキメラマウスによる解析、遺伝・臨床情報データベースマイニング、自然免疫攪乱機構の解明、次世代シーケンサーによる肝炎ウイルス遺伝子解析、miRNA 解析などを国内外で他に先駆けて成

功しており本研究を遂行するための技術的基盤は確立している。さらに国内最大規模の C 型肝炎治療症例、複数回肝生検症例などの長期経過観察症例、住民コホート、肝癌症例、肝移植症例などを有する臨床施設で構成されている。本研究はこれらの研究基盤と成果に基づき次世代シーケンス技術を駆使してこれまでとはまったく異なる次元での遺伝子解析による C 型肝炎病態解明を行う独創的なものである。

●したがって、本研究は以下の目的で実施する。

(1)ウイルス変異情報を用いた個別化治療の構築

(2)次世代シーケンス技術による新規治療法開発への基盤構築とする。

## B. 研究方法 C. 研究結果 D. 考察

(1) ウイルス変異情報を用いた個別化治療の構築

Deep sequence を用いた DAA 耐性変異 HCV の検討(榎本)

### 【方法】

(1) NS5A 領域の daclatasvir 耐性変異の検討: Daclatasvir 未投与の genotype 1b HCV 110 症を対象とし(IFN 無治療症例 59 例、PEG-IFN/RBV 併用療法後 relapser30 例、null-responder21

例)、NS5A 領域の daclatasvir 耐性変異を deep sequencer を用いて解析した。

(2) NS3領域の daclatasvirDAA 耐性変異の検討: TVR3 剤併用療法を導入した genotype 1b、高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者 34 例。男性/女性=16/18 例、平均年齢 56.7 歳、初回治療/再治療=20/14 例、core70 変異 R/nonR=24/10 例、IL28B:TT/TG or GG=25/9 例。治療前、治療後の血清を用い deep sequence を行った。

### 【結果】

(1) NS5A 耐性変異として知られている Y93H と L31M/V/F 耐性変異を有意に認めた症例は、全体では 13/110(11.8%)、

34/110(30.9%)であった。Y93H と L31M/V/F 耐性変異を同時に持つ頻度は deep sequence の結果、4/110(3.6%)であった。これらの NS5A 耐性の臨床的因子との関連性を調べたところ、Y93H は単変量解析で IFN 治療効果と関連がある core aa70、IRRDR、IL28B SNP と有意に関連があった。また、多変量解析の結果、IL28B SNP major type(TT)では NS5A 93 番耐性変異を有意に多く認めた (p=0.042)。

(2) 34 例中 SVR を達成しなかったのは 8 例 (23.5%)であった。うち訳は、副作用中止 3 例、breakthrough1 例、再燃 2 例、NVR2 例であった。non-SVR8 例中 5 例 (62.5%)で明らかな耐性変異を有したと考えられた。2 例で治療前に耐性に関与したと考えられる変異を認め (T54A:2 例)、ウイルス増加時にその変異率が増加し、4 例で経過中に新たな耐性変異が出現した (V36C、T54A、A156F、A156S 各 1 例)。

耐性変異が同定できた 5 例中 3 例 (T54A: 2 例、A156F:1 例)では TVR 投薬終了後耐性変異の比率は減少傾向となったが、2 例 (V36C、A156S 各 1 例)では 3 か月以上高度に耐性変異の比率が持続した。

系統樹解析では 8 例中全例で治療前にマイナークローンであったものが治療介入によってメジャークローンになっていた。そのうち 7 例はその後も遺伝的系統を維持しており、1 例は治療前のメジャークローンに戻っていた。

#### 【考察】

NS5A 阻害剤において、Daclatasvir 未投与症例では NS5A 93 番変異が多く混在することが明らかになった。また変異例において IL28B SNP major type が有意に多く、PEG-IFN/RBV 併用療法効果の高い IL28B SNP major type において daclatasvir 耐性が出現しやすい可能性が示唆された。NS3 阻害剤においては、治療終了後耐性変異が長期に残存する例も存在し、治療介入でメジャークローンが変わりその系統が維持される傾向にあった。今後の DAA 治療の影響を与える可能性があり、導入に際しては考慮する必要があると考えられた。

C型肝炎治療における次世代シーケンサーを用いた解析(鈴木)

#### 【方法】

C型慢性肝炎 (genotype 1b 型高ウイルス量症例) で、TVR+PEG-IFN+RBV3者併用24週間投与 non-SVR)17 例、SMV+PEG-IFN+RBV3者併用24週間投与 non-SVR 6 例を対象とし、耐性ウイルスについて次世代シーケンサーを用いて解析した。

#### 【結果】

TVR+PEG-IFN+RBV3者併用療法症例

17 例中治療開始時に direct sequence 法で TVR 耐性ウイルスが検出されたのは、1 例(6%)であった(T54S)。次世代シーケンサーでは 17 例中 6 例(35%)で検出された。(T54S,3 例、V36A,2 例、V170A, 1 例)次世代シーケンサーで治療開始前に耐性ウイルスが検出された 6 例では、1 例のみが開始時認められた T54S 変異が breakthrough 時に増加していた。(0.2% → 99.9%)そのほかの 5 例では、再燃時または breakthrough 時に開始時認められた耐性ウイルスとは違うウイルスの増加が認められた。(① T54S,0.2% → A156S,50.2%; ② V36A,0.2% → V36C,97.2%;③ V170A,0.4% → A156T,99.6%; ④ V36A,0.2% → T54A,27.7%, R155Q,0.4%, A156T,0.3%, V36A,0.2%; ⑤ T54S,99.9% → T54S,99.9%, R155K,96%, V36C,5.6%)。治療後に出現したこれらの TVR 耐性ウイルスのその後の推移を治療終了後 2 年後まで測定した。17 例から 35 種類の耐性ウイルスが検出されたが、1 例で認めた V36C の耐性ウイルス以外すべて 2 年後の時点で次世代シーケンサーで検出されなかった。

SMV+PEG-IFN+RBV3者併用療法症例

6 例中治療開始時に direct sequence 法で SMV 耐性ウイルスが検出されたのは、1 例であった(Q80L)。次世代シーケンサーでは 6 例中 5 例で検出された。(Q80L,2 例、Q80R,2 例、R155Q, 1 例)次世代シーケンサーで治療開始前に耐性ウイルスが検出された 5 例では、1 例のみが開始時認められた Q80L 変異が breakthrough 時に増加していた。(1.2% → 76%)そのほかの 4 例では、再燃時または breakthrough 時に開始時認められた耐性ウイ

ルスとは違うウイルスの増加が認められた。  
(①R155Q,0.2%→D168V,77.4%,R155Q,0.4%;  
② Q80R,0.2%→D168V,1.0%, Q80R,0.2%; ③  
Q80L,99.8%→Q80L,99.9%, D168G,61.3%,  
R155Q,2.4%; ④Q80R,0.3%→D168V/E,99.8%,  
Q80R,0.4%)

治療後に出現したこれらのSMV耐性ウイルスのその後の推移を治療終了後2年後まで測定した。6例から12種類の耐性ウイルスが検出されたが、1例で認めたV168Eの耐性ウイルス以外すべて2年後の時点で次世代シーケンサーで検出されなかった。

#### 【考察】

C型慢性肝炎(genotype 1b、高ウイルス量)に対する現在治療の標準治療はプロテアーゼ阻害剤とPEG-IFNとRBV併用療法24週間投与である。プロテアーゼ阻害剤であるTelaprevir (TVR)とPEG-IFN+RBVの3者併用療法は、高いSVR率を認めている。しかしTVR+PEG-IFN+RBVの3者併用療法でもSVRに至らなかった症例ではTVR耐性ウイルスの出現が報告されている。このような治療不成功例でのTVR耐性ウイルスの存在を治療開始時および治療中、終了時で高感度の測定系である次世代シーケンサーを用いて検討した。治療不成功例(non SVR例)では、治療中または治療終了後に多くの症例でTVR耐性ウイルスが検出されたが、治療開始時の検討では1例のみが治療前認めた耐性ウイルスの増加を認めた。同様に第二世代のプロテアーゼ阻害剤であるSMVにおいても治療開始前の解析ではnon-SVR例6例中1例のみ検出された。このことから、治療開始時の検討では次世代シーケンサーを用いてもTVRおよびSMV耐性ウイルス出現による治療効果の予測が難しいと考えられた。

一方、これらの耐性ウイルスは、次世代シーケンサーを用いた解析で2年後にはほとんどの耐性ウイルスが血中から消失していた。このことは、プロテアーゼ阻害剤により出現した耐性ウイルスの増殖力は弱いため、血中から消失していくものと考えられた。ただし、一部症例で耐性ウイルスが残存する場合があります、さらに長期的な推移の観察が必要である。また

今後のDAAsに対する反応性も今後の課題である。

DAA耐性ウイルスの頻度と臨床像の検討  
(黒崎)

#### 【方法】

C型慢性肝炎466症例を対象とした。血清からRNAを抽出し、NS3、NS5A領域をPCR法で増幅し、Direct sequencing法でNS3、NS5A領域の薬剤耐性変異を検出した。全体の10%以上を占める場合には変異陽性と判定した。

#### 【結果】

NS3のQ80変異は20.1%に認めた。そのうち76%はQ80Lであり、DAAに対して耐性のない変異であった。テラプレビルに対して耐性を示すV36,T54変異はそれぞれ1.5%、2.6%に認めた。DAAに対する高度耐性を示すR155およびA156変異はなかった。D168変異は1.5%において認めたが、D168EあるいはD168T変異であり、高度耐性のD168Vはなかった。インターフェロン治療効果と関連する既知のHCV変異であるCore70、NS5A-ISDR変異と、NS3変異とは関連がなく、またIL28Bとも関連がなかった。一報、NS5Aの変異は、Y93変異は19.1%、L31変異は2.8%存在した。Y93変異の95%が高度耐性を呈するY93Hであった。L31変異はすべてL31Mであった。Y93H変異とCore70、NS5A-ISDR変異とは関連がなかったが、IL28Bとは関連を認め、IL28BがTTでは27%にY93H変異があったのに対し、IL28B TG/GGでは7%であった( $p<0.01$ )。

#### 【考察】

DAA治療歴がない症例でも、高頻度にDAA耐性を呈するHCVが存在した。インターフェロンを含まないDAAだけの治療では、耐性変異の有無が治療効果の規定因子であり、治療開始前にDAA耐性を測定する意義は大きい。



## (2)次世代シーケンス技術による新規治療法開発への基盤構築

住民コホートでの HCV キャリアの長期予後に関わるウイルス因子についての次世代シーケンサーを用いた解析(上野)

### 【方法】

#### 1, コホート 1:T 町 study

2003 年から 2006 年まで生活習慣に関する一時調査が行われ、3,540 名が受診した。このうち HCV 抗体陽性者は 59 名 (1.7%) であった。2009 年からは二次調査が行われ、対象 2,100 名中 1,570 名が受診した。HCV 抗体陽性者は 17 名であった。

山形県地域がん登録情報と照らし合わせ、コホート 1 における発がん状況を HCV 抗体価で層別化し、検討した。

また住民基本台帳および死亡個票と照合し、本コホートにおける生命予後調査を行った。

さらに肝線維化進展につき、Fibrosis probability index (FPI) を算出し、HCV 感染者の FPI の推移を非感染者と比較した。

#### 2, コホート 2:R 町 study

山形県南に位置する R 町(人口 15,364 人)は、1967 年から数年間、急性肝炎が流行したことが当時の新聞でも報道されている。そこで 1991 - 1995 年まで、地域全体 (6 歳以上: 4,655 人、30 歳以上:10,709 人)の HCV 感染調査を行ったところ、受診者 7,925 名の HCV 抗体陽性者数は 1,078 名 (HCV 抗体陽性率 13%) に上った。とくに急性肝炎多発地区の HCV 抗体陽性率は 20%に達し、そのうち 40 歳以上では 32.4%の高い HCV 抗体陽性率であった。

このうちベースライン調査で HCV 抗体陽性であった 1,078 名について、関連自治体と連携し、1996 年から現在まで HCV RNA 陽性者をコホート追跡し、HCV 感染の疫学や HCV 自然経過に関わる因子の解析を行ってきた (J Epidemiol 1996, Liver 1999, Tohoku J Exp Med 1999, J Med Virol 2003, Biochem Biophys Res Commun 2004)。

### 【結果】

#### 1. 住民コホートにおける検体および付帯

## 情報の収集

今年度はまず、関連する二つの住民コホートの検体と臨床情報の追加収集を行った。

#### 2. コホート 1:T 町 study

ベースライン調査で HCV 抗体測定を行った 3,511 名中、HCV 抗体陽性者は 59 名 (1.7%) であり、HCV 抗体価  $\geq 6.7$  Unit を示す高力価陽性者が 32 名、 $1.0 \text{ Unit} < \text{HCV 抗体価} \leq 6.6 \text{ Unit}$  を示す低力価陽性者が 27 名であった。

コホート全体の発がん状況を調べると、HCV 抗体陰性者および低力価陽性者には原発性肝癌の発生を認めなかったが、高力価陽性者 32 名中 2 名 (6.3%) に肝がんの発生を認めた。

住民基本台帳照合により HCV 抗体陽性者 59 名中、8 名の死亡が確認された。HCV 抗体陽性者の原死因は肝がん 2 名、白血病 1 名、アルツハイマー病 1 名、壊死性血管炎 1 名、不明 3 名であった。一方、HCV 抗体陰性者では 213 名の死亡が確認されたものの、肝がんが原死因となった者はいなかった。

インスリン抵抗性、脂質異常および飲酒量をモデルに加えた肝線維化進展マーカーである FPI を用いて、肝線維化進展 ( $\Delta \text{FPI} = \text{追跡検診受診時 FPI} - \text{初回検診受診時 FPI}$ ) を評価すると、HCV 抗体高力価陽性者 ( $\Delta \text{FPI}: 0.77$ ) では陰性者 ( $\Delta \text{FPI}: 0.44$ ) に比べて、自然経過における FPI スコアが有意 ( $P < 0.01$ ) に上昇していた。

#### 3. コホート 2:R 町 study

本コホートにおけるウイルス血症の自然治癒について調査したところ、3.7%に HCV RNA 自然陰性化を認め、人年法による陰性化率は 1 人年あたり 0.5%と推測された。ウイルス自然陰性化に寄与する因子は ZTT 低値と腹部超音波所見であった。

また 2012 年度調査をもとに、インターフェロン無治療の HCV 持続感染住民 470 名における肝発がん状況を調べると、これまでその 40 名に肝発がんを認めた。

### 【考察】

一般住民コホート(生活習慣コホート)における 5 年間の追跡調査では、HCV 抗体高力

価陽性者にのみ肝がんの発生を認めた。また FPI の推移からみると、他の肝線維化マーカーを用いた多くの報告と同様、HCV 抗体陰性者に比べて高力価陽性者において、肝線維化マーカーの上昇が認められた。

一方 HCV 多発地域住民コホートでは、これまでさまざまなデータが蓄積されており、また感染時期がほぼ明らかであることから、感染暴露後の期間がほぼ均一な集団として貴重である。今後、線維化進展や肝発がんに関わるウイルス側因子につき、次世代シーケンサーによる網羅的解析を進めることで、病態進展に関与するウイルス側因子が明らかにする予定である。

しかしこれらのコホートは一般住民をコホート対象としているため、飲酒や生活習慣等の背景因子が多様であることが予想され、今後、対照を適切に設定した上で解析する必要があると考えている。

HCV ゲノム変異解析プラットフォームの開発(丸澤)

#### 【方法】

##### 1. 対象;

2006 年 5 月から 2008 年 9 月の間に、非代償性 C 型肝硬変に対して生体肝移植術が行われた genotype 1b HCV 陽性日本人成人レシピエント 5 例の感染 HCV を検討対象とした。

血清検体は、5 例それぞれ肝植前及び移植後 1 ヶ月、またさらに 1 例のみ肝移植後 22 ヶ月の計 11 検体の血清サンプルの検討を行った。同時に、手術時に採取された 4 例の肝組織も解析対象とし、計 15 検体の検体から RNA を抽出し、次世代シーケンスを行った。

##### 2. 方法;

各症例の移植前血清を用い、HCV 全長の RT-PCR (primer は 5' 非翻訳領域と 3' 非翻訳領域に設定)を行った後、5' 側ウイルスゲノムの前半部分 (~5,000bp: primer は 5' 非翻訳領域と NS3 に設定)と 3' 側ウイルスゲノム後半部分 (~4,500bp: primer は NS3 と 3' 非翻訳領域に設定)に分けそれぞれ、ウイルス配列を増幅した。その後、電気泳動後の gel extraction

により PCR 産物を精製し、Direct Sequence を行い決定された代表塩基配列を、各検体の次世代シーケンサー解析時のリファレンス配列として決定した。

また、欠損型 HCV クローンの塩基配列を同定するために、以下の 2 種類の primer を作成し、特異的な RT-PCR 増幅を行った。5' -CGCCGACCTCATGGGGTACA-3' (Core) and 5' -TGGTGTACATTTGGGTGATT-3' (NS3) for first RT-PCR (HCV-P1: 2919 bp)、5' -TGCTCTTTCTCTATCTTCCT-3' (Core) and 5' -GTGATGATGCAACCAAGTAG-3' (NS3) for the second PCR (HCV-P2: 2618 bp)。

得られた amplicon を電気泳動し、gel extraction kit により PCR 産物を精製、Direct Sequence を行い、決定された代表塩基配列をリファレンス配列と比較し、欠損型 HCV クローンの欠失領域の前後の配列を同定した。

遺伝子異常の解析には、最新の大量並列シーケンス・テクノロジーを活用した次世代シーケンサー (Life Technology 社 Ion Proton) を platform とした。この deep sequencing の特性を最大限に活用することにより、1 回のランあたりリード数は約 8,000 万、総解析塩基数は平均 5-10 Gb の遺伝子配列の決定と遺伝子発現プロファイル解析が可能となり、従来の方法では得ることができなかった飛躍的な遺伝子情報量を解析することが実現した。これらのゲノム解析基盤を用いて、以下の検討を行った。遺伝子多様性の統計学的解析は、Shannon entropy index を用いて行った。

#### 【結果】

非代償性 C 型肝硬変に対する生体肝移植術前と肝移植後 1 ヶ月の HCV RNA の中央値は、それぞれ 5.5 log IU/ml (4.6~6.6 log IU/ml)と 5.9 log IU/ml (5.8~6.4 log IU/ml)で、有意差は無かった。これらの臨床検体を対象とした HCV ゲノム特異的な deep sequencing を実施したところ、平均 coverage は 1,548-fold であった。

Shannon entropy により表される全体のウイルス多様性、その分布パターンは、同一症例

の肝及び血清検体間で類似していた。また、既知のインターフェロン感受性関連コア変異領域やプロテアーゼ・ポリメラーゼ阻害薬に対する耐性変異領域での変異の存在頻度は、同一症例の肝組織と血清で類似していた。

肝移植前と移植後 1 ヶ月の血清間での比較では、平均 coverage がそれぞれ 1,284-fold、1,141-fold であり、HCV 多様性は移植前後で大きく異なっていた。また、平均 Shannon entropy はそれぞれ 0.056、0.029 (P=0.043) であり、高度な HCV 多様性を示した肝移植前と比較し、肝移植 1 ヶ月後には血清中の HCV 多様性は有意に減少していることから、グラフト肝への HCV 再感染早期に特定の HCV クローンが選択的に再感染・増殖していることが示唆された。肝移植後の HCV 多様性の減少傾向は全領域を通じて認められたが、特に NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 領域において顕著であった。しかしながら、5 例に共通する特定の塩基配列との関連性は認められなかった。

次世代シーケンサー解析における HCV 各領域の coverage (各塩基が読まれた回数) を比較したところ、肝移植前の肝組織及び血清中 HCV 検体において、HCV の構造領域 (core から NS2 の中間にかけて) の遺伝子配列に局限した coverage の減少を認めた。この構造領域の coverage の減少は、移植後 1 ヶ月の検体においては認められず、肝移植前特異的な構造領域欠損型 HCV の存在が推測された。また、全長型 HCV と欠損型 HCV の両者を検出するプライマーを用いた RT-PCR 法による解析の結果、5 例中 4 例において、移植前血清中に欠損型 HCV が全長型 HCV と共に検出された。欠損型 HCV の遺伝子配列解析の結果、いずれの症例においても E1 領域から NS2 領域までの遺伝子欠損を認めたが、欠損領域の 5' 側並びに 3' 側の境界は各症例で異なっていた。検出された欠損型 HCV は全てインフレーム欠失であり、残存領域がフレームシフトすることなく翻訳され、機能的な HCV タンパク質が産生されると推定された。興味深いことに、肝移植 1 ヶ月後の血清においては欠損型 HCV は検出されず、全長型 HCV のみが検出された。この結果より、

肝移植直後には全長型 HCV が選択的にグラフト肝組織内で増殖しており、欠損型 HCV は全長型 HCV と比較して新規感染の成立時には増殖能力が低いことが示唆された。さらに、1 例においては、移植 22 ヶ月後に移植前と同一の欠損型 HCV の再増殖が確認された。移植後慢性肝炎の段階で HCV の多様性が再増加して再構築されることも確認され (Shannon entropy; 移植前 0.056, 移植後 1 ヶ月 0.022, 移植後 22 ヶ月 0.069)、この過程で肝移植前と同一の欠損型 HCV が再増殖することが明らかとなった。

#### 【考察】

次世代シーケンサー解析を駆使することにより、C 型慢性肝炎症例の血清ならびに肝組織中には、欠損型 HCV の感染病態がダイナミックに変動していることが明らかとなった。我々の以前の検討結果からは、この欠損型 HCV の共感染の有無により、インターフェロン治療への反応性が異なっていることが示唆されている。すなわち、欠損型 HCV が完全長ウイルスとともに併存するかどうか、抗ウイルス療法の治療効果に関与している可能性が想定された。今後、インターフェロンとともに経口抗 HCV 薬を加えた治療戦略の中で、欠損型 HCV の果たす役割の解明が必要であるものと考えられる。

次世代シーケンサーによる DAA 耐性ウイルスの検討 (今村)

#### 【方法】

DAA 未治療の genotype 1b 型 C 型慢性肝炎患者に対し Daclatasvir (DCV) (NS5A 阻害剤: 10 または 60mg/日 内服) + PEG-IFN/RBV 併用療法 24 週間を行った 7 例、および DCV (60mg/日 内服) + asinaprevir (ASV) (プロテアーゼ阻害剤, 400 または 1,200 mg/日 内服) 併用療法を行った 10 例を解析対象とした。治療前の HCV NS3 領域 (aa155, 156, 168) および NS5A 領域 (aa31, 93) のアミノ酸配列を次世代シーケンサー (Illumina Genome Analyzer II) を用いた deep sequence にて解析し、治療効果との関連を検討した。平均 929,061 reads/症例 (NS3) および 1,239,491 reads/症例 (NS5A)

を解析し、HCV plasmid を用いた検討から 0.2%以上検出されたものを有意なアミノ酸変異とした。

#### 【結果】

DCV+PEG-IFN/RBV 併用療法 7 例のうち、治療前、NS5A aa31 には耐性変異は 1 例も検出されなかったが Y93H 変異が 4 例 (57%) に検出された。これら 4 例を含む 5 例 (全例初回治療あるいは前治療 partial responder) において開始 4 週後に血中 HCV RNA は陰性化し SVR が得られた。一方、前治療 null responder の 2 例では、治療前に aa31 および aa93 に変異が検出されなかったにも関わらず、治療中 L31I/M+Y93H または L31V/I/M+Y93H 変異が出現し breakthrough を生じた。

DCV+ASV 併用療法 10 例のうち、治療前、NS3 aa168 には耐性変異は 1 例も検出されなかったが R155L (0.2%) が 1 例、A156V (0.3%) が 1 例に検出され、NS5A Y93H (0.2-71.4%) が 3 例、L31V/M/S (0.2-1.0%) +Y93H (0.2-99.5%) が 3 例で検出された。全例で血中 HCV RNA は陰性化し、治療前に L31V (1.0%) +Y93H (99.5%) が検出された 1 例を含めた 8 例 (80%) において SVR が得られた。一方、治療前に L31M (0.7%) +Y93H (32.3%) が検出された 1 例において治療後、NS3 R155Q/L + A156S + D168A + NS5A L31M+Y93H による HCV の再燃、治療前に L31S (0.2%) +Y93H (99.4%) が検出された 1 例で治療中、NS3 D168V+NS5A L31M/V/I +Y93H による breakthrough を生じた。

#### 【考察】

次世代シーケンサーを用いた解析により NS5A 領域には治療前、NS5A 阻害剤耐性変異を有する症例が多く存在していることが明らかとなった。例えわずかな耐性変異を有していても DCV+PEG-IFN/RBV 療法によって多くの症例で血中 HCV の陰性化が得られるが、PEG-IFN/RBV 抵抗性の症例 (前治療 null responder) では、耐性変異が出現する危険性が高いことが示された。また DCV+ASV 併用療法では、NS5A aa31 および aa93 のいずれにも耐性変異を有している症例は、SVR failure となる可能性が高くなるものの、SVR が得られ

る症例も存在していた。

次世代シーケンス技術を用いた C 型ウイルスゲノムの多種性の解析 (相崎)

#### 【方法】

##### (1) ウイルスゲノム全長配列の決定

ライブラリー作成に配列特異的な PCR を要しない illumina を用いて多様な HCV をリスト化した後、変異を含まない領域に Primer を設計して 454 のライブラリー作成を行い、変異の組み合わせを決定する。決定した組み合わせをもとに、各 species 特異的な増幅を可能とするプライマーを設計し、その PCR 産物を direct sequencing 法で決定し、illumina、454 のデータと合わせて、各 species のゲノム全長配列を決定する。

##### (2) コンセンサ配列の決定

コンセンサ配列は常法に従い、全ての塩基について major に存在する塩基をつなげて構成する。

#### 【結果】

血清中に存在する HCV ゲノム配列を全長にわたり決定する手法を開発した。これを用いて HCV 陽性患者の血清を経時的に解析し、それぞれ 3 種類の独立したウイルスゲノム配列を決定した。インターフェロンに対する治療感受性予測因子として報告されている core 70 番のアミノ酸と NS5A に存在する IRRDR 領域について、感受性予測因子が同一のウイルスゲノム上に共存することを確認した。近縁な HCV ゲノム配列をデータベース上から選択し併せて系統樹を作成したところ、患者由来の全ての配列が単一のクラスターを形成したことから、複数回感染の機会があったわけではないことが示唆された。その中でインターフェロンに対する感受性予測因子を持つゲノム配列あるいは持たないゲノム配列は、それぞれ単一のクラスターを形成した。感受性株と非感受性株が、患者内で独立して進化している可能性が示唆された。

#### 【考察】

HCV 研究ではこれまでコンセンサ配列が一般的に用いられて来た。しかし、本研究では、各塩基の major な配列をつなげたコンセ



ンサス配列が必ずしもウイルスの最も優位な配列ではないことを示唆する結果となった。従来の手法を用いたコンセンサス配列ではHCVのような強い多様性を有するウイルスではPCRによる偏りが大きく影響し、優位に存在する配列を把握できないものと考えられた。したがって、これまでコンセンサス配列の変化として解釈されてきたウイルスの変異の出現や薬物感受性株の存在比の変化についての解析はより詳細な検討が必要と考えられた。

C型肝炎患者におけるHLAクラスII領域SNPの検討(中本)

#### 【方法】

HLAクラスII遺伝子領域で報告されているSNPの中でも、その多型によって実際に関連する遺伝子発現の変化をきたすことが確認されているSNPについて肝疾患に関わらず広く検索し、23個の対象SNPを決定した。また、それらのSNPを短時間で効率よく単点解析するため、TOYOBO社製の遺伝子自動解析装置であるGENECUBEを用いた解析の実験設定を行った。その後、コントロール症例9例、C型肝炎患者21例(合計30症例)を対象として各々23個のSNP解析を行い、従来から報告されている日本人SNPデータベース(Hap-MapJPTやHGVB)との比較を行った。また、各症例の臨床背景として年齢、性別、ウイルス変異、肝臓の有無、検査データ(ALT、血小板数、PT-INR、AFP、PIVKAI)との関連を検討した。

#### 【結果】

1) HLAクラスII遺伝子領域の23個のSNPについて、GENECUBEを用いて、迅速に行うことができた。GENECUBEは1回のRUNが1時間で16のSNP解析が可能であり、23個のSNP、30症例分すなわち690反応が43時間で可能であった。

2) 今回の検討したC型肝炎患者21症例における各SNPのアリル頻度を検討したところ、日本人SNPデータベース(Hap-MapJPTやHGVB)との比較で6個のSNPで有意な違いがみられた。また、健常コントロール9症例との比較では1個のSNPで統計学的に有意

な違いがみられた。

3) 今回検討した21例のC型肝炎患者における各SNPと臨床背景との比較検討では、rs2071025と性別、rs3135363とcore70番変異、rs9275319とALT、血小板数、PT-INR、AFP、rs9272105とALT、PT-INR、AFPとの間で統計学的に有意なアリル頻度の違いがみられた。

#### 【考察】

C型肝炎は現在、本邦において約200万人が罹患しており、肝臓の主な原因として非常に重要な疾患である。本研究ではC型肝炎における持続感染の成立、肝硬変への進展、肝臓の発生といった重要なイベントと宿主獲得免疫のKey PlayerであるHLA-class II分子との関連について、同遺伝子領域の一塩基多形(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)を解析することによって明らかにすることを目的とした。今回の結果、HLA-class II領域の特定のSNP解析が遺伝子自動解析装置(GENECUBE)にて迅速・簡便に行うことが可能であることが判明した。さらにはC型肝炎患者において、性別やウイルス変異、炎症・病態進展・腫瘍マーカーなどの違いによってアリル頻度に有意な違いがみられるSNPが同定された。これらは新たな治療開発の足掛かりとなるのみならず、既存の治療への反応性や予後予測などにも応用できる可能性があり、極めて意義深いと考える。

C型肝炎新規クラスDAA製剤の薬剤耐性と治療効果(朝比奈)

#### 【方法】

テラプレビル(TVR)またはシメプレビル(SMV)3剤併用療法を施行したC型慢性肝炎234例(TVR/SMV=226/8)を対象とし、宿主・ウイルス及び治療因子と治療効果との関連を解析した。また、20例(TVR/SMV=12/8)においてNS3及びNS5A耐性プロファイルをdirect及びdeep sequenceにより解析し治療効果との関連を検討した。

#### 【結果】

TVR3剤併用療法は65歳以上が23%、F3が25%を占め比較的発癌リスクの高い症例が

多かったが、SVR 率は 84%(135/160)と良好で、65 歳以上でも 65 歳未満と同等であった(78% vs. 84%,  $p=0.39$ )。前治療再燃例や partial responder における SVR 率はそれぞれ 87%、80%と高率であったが、前治療 null responder では低率であった。また IL28B TT の SVR 率は 87%であったのに対して、TG 67%、GG 43%と IFN 応答性不良症例では治療効果が乏しかった。SVR 関連因子は単変量解析で、前治療歴、F 因子、 $\gamma$  GTP、IL28B 及び 3 剤それぞれのアドヒアランスが有意で、多変量解析では IL28B ( $p=0.03$ , OR 15.3)、TVR のアドヒアランス 40%以上 ( $p=0.01$ , OR 13.4)が抽出された。特に前治療無効例では薬剤アドヒアランスが大きく影響した。SMV 3 剤併用療法の無効例における SVR 率は 30%であったが partial responder では IL28B TG でも全例で SVR が得られ、安全性のプロファイルは良好であった。Deep sequence では治療前に NS3 耐性変異を 85%(direct sequence では 20%)、NS5A 耐性変異を 87%(同 14%)の症例に認めた。初回治療および前治療再燃例( $n=13$ )では、NS3 および NS5A 耐性変異を治療前にそれぞれ 10 例(77%)に認めたが、11 例(85%)で SVR が得られた。一方、前治療無効例( $n=7$ )では NS3 耐性変異を全例に、NS5A 変異を 5 例(71%)に認め、SVR は 2 例(29%)のみであった。治療後再燃した症例において耐性変異の経時的変化を検討すると、治療開始後早期に A156S 変異株が優勢となり、再燃後も優勢株となった症例が 2 例あった。また治療前に認めた NS5A 耐性変異は再燃後も direct sequence において変化がなかった。

#### 【考察】

Deep sequence では治療前に NS3 または NS5A 耐性変異を高頻度に認めたが、IFN 応答性のある症例ではプロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の治療効果は高い。一方 IFN 応答性の乏しい症例で治療前に NS5A 変異が存在すると、SVR が得られない場合 NS3 及び NS5A 双方の多剤耐性変異を生じる可能性がある。

次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析による C 型肝炎の病態解明と臨床応用(須田)

#### 【方法】

Molecular dynamics を用いた NS5A 阻害剤の作用部位、耐性機構を予測し独自に樹立した DAAs 耐性 HCV 培養系・患者血清を用い耐性機構の解析を行う。

#### 【結果】

薬剤耐性 HCV 培養系を樹立した

DAAs 治療前の DAAs 耐性ウイルスの存在様式を明らかにし、治療効果との関連性を評価した。

MD にて、NS5A と NS5A 阻害剤の結合予測候補部位を同定した

#### 【考察】

IFN と DAAs の併用療法においては IFN 感受性のより症例においては治療前の耐性ウイルスの存在は問題とならない可能性がある。

治療中断例においては、高率に耐性ウイルスが出現し今後の治療の問題となりうる。

#### 《倫理面での配慮》

本研究の遂行においては各所属研究機関において倫理委員会等に必要な申請を行い、各種倫理指針を遵守して施行している。

#### E. 結論

●本年度の検討により、次世代シーケンサーを用いてウイルスゲノムの混在状態を詳細に検討することが可能であることが明らかとなった。

●NS3 阻害剤については、高度耐性の HCV が当初より存在する可能性は低く、わずかな NS3 阻害剤の耐性が臨床的な耐性に発展する可能性は低いことが考えられた。

●一方、NS3 阻害剤耐性は出現後一定期間、宿主に残存することが示されたが、臨床的耐性との関連はさらなる検討が必要と考えられた。

●NS3 阻害剤とは異なり、NS5A 阻害剤耐性 HCV は治療前から一定の頻度で存在し、また宿主の IL28B とも関連することが示された。

●HCV 全長にわたる HCVquasispecies を検討する手法を確立した。

●住民コホートにおいてHCVによる肝発癌、ウイルス陰性化、生命予後肝発癌の関連を明らかとした。

●HCV 慢性肝炎の組織中における欠損型HCV の存在と意義について明らかとした。

●HLA クラスII 領域 SNP と病態進展・肝発癌の関連を示した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1.Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Enomoto N, et al. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013.

2.Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Enomoto N, et al. alpha-fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;58:1253-1262.

3.Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Enomoto N, et al. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;43:865-875.

4.Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Enomoto N, et al. 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;85:449-458.

5.Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Enomoto N, et al. 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.

6.Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa S, Sano K, Ichikawa T, Enomoto N. Association of splenic MR elastographic findings with gastroesophageal varices in patients with chronic liver disease. *J Magn Reson Imaging* 2013.

7.Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa T, Sano K, Ichikawa S, Araki T, Enomoto N. MR-based measurements of portal vein flow and liver stiffness for predicting gastroesophageal varices. *Magn Reson Med* 2013;12:77-86.

2013;23:156-162.

8.Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, et al. Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon-alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology* 2013.

9.Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Enomoto N, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One* 2013;8:e82299.

10.Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Enomoto N, et al. IL-28B (IFN-lambda3) and IFN-alpha synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepat* 2013;20:281-289.

11.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;49:163-164.

12.Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Enomoto N, et al. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoteric acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatology* 2014.

13. Ichikawa S, Ichikawa T, Motosugi U, Sano K, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, et al. Presence of a hypovascular hepatic nodule showing hypointensity on hepatocyte-phase image is a risk factor for hypervascular hepatocellular carcinoma. *J Magn Reson Imaging* 2014;39:293-297.
14. Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Enomoto N, et al. Deep Sequencing Analysis of Variants Resistant to the NS5A Inhibitor Daclatasvir in Patients with Genotype 1b Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2014.
15. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Enomoto N, et al. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepatol Res* 2014;44:319-326.
16. Tsuchiya K, Asahina Y, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Enomoto N, et al. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2014;120:229-237.
17. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Enomoto N, et al. 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:e48685.
18. 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  
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), 2013
19. 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎診療の up-to-date. *診断と治療* 101(9), 2013
20. 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):397-384, 2013
21. 坂本 穰, 榎本信幸. 特集 C型肝炎治療 2014:経口抗ウイルス薬時代の到来 プロテアーゼ阻害剤に対する体制変異と意義. *肝胆膵* 67(6), 2013
22. 坂本 穰, 榎本信幸. 特集 ウイルス性肝炎の最近の話題(B型肝炎、C型肝炎を中心に) 2.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), 2013
23. 坂本 穰, 榎本信幸. 診療ガイドライン up-to-date 2014-2015 C型慢性肝炎・C型肝炎硬変 2013
24. 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎の診療を極める～基本から最前線まで～ III 治療編 1. C型肝炎の治療目標 「Hepatology Practice」シリーズ第3巻
25. 坂本 穰, 榎本信幸, 最新の有効な実地診療の実際 C型肝炎 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 文光堂* 30(2):323-328, 2013
26. 坂本 穰, 榎本信幸. Overview 近年の研究の進歩 C型肝炎診療 up-to-date、発がんリスク評価と新規治療法(解説/特集) *診断と治療* 101(9):1277-1282, 2013
27. 坂本 穰, 榎本信幸. 専門医に聞く C型肝炎ウイルスと治療 別冊 HIV感染症とAIDSの治療 4(2): 55-59, 2013
28. 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎の自然経過と発癌リスク 特集ウイルス肝炎の話題—B型・C型肝炎を中心に *成人病と生活習慣病* 43 巻 11号 2013
2. 学会発表
- 1) 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(パネル) 2013.3.21 鹿児島
- 2) 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) 2013.3.22 鹿児島
- 3) Shinya Maekawa, Mika Miura, Nobutoshi Komatsu, Akihisa Tatsumi, Yukiko Asakawa,



Shinichi Takano, Mitsuaki Sato, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Nobuyuki Enomoto. AN ASSOCIATION BETWEEN QUASISPECIES NATURE OF HEPATITIS C VIRUS

CORE REGION AND DISEASE PROGRESSION ANALYZED BY DEEP SEQUENCING. 99th JSGE 2013.3.23, Kagoshima

4)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 2013.6.6 東京

5)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 2013.6.6 東京

6)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型慢性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 2013.6.6 東京

7)渡辺貴子, 前川伸哉, 中川美奈, 柿沼晴, 三浦美香, 辰巳明久, 榎本信幸, 坂本直哉. 次世代シーケンサーを用いたプロテアーゼ阻害薬耐性変異株の解析と治療予後の関連についての検討. 第49回日本肝臓学会総会 2013.6.6 東京

8)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

9)小松信俊, 前川伸哉, 辰巳明久, 三浦美香, 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HBV Pre-S領域の遺伝子学的検討. 第23回抗ウイルス療法研究会総会 2013.6.14 東京

10)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回抗ウイルス療法研究会総会 2013.6.14 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回抗ウイルス療法研究会総会 2013.6.14 東京

12)佐藤光明, 進藤邦明, 田中佳祐, 鈴木雄一朗, 廣瀬純穂, 小松信俊, 辰巳明久, 三浦美香, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 非B非C型肝細胞癌発症に関し線維化と糖尿病は重要なファクターである. 第49回肝癌研究会 2013.7.11 東京

13)廣瀬純穂, 中山康弘, 鈴木雄一朗, 坂本 穰, 佐藤光明, 小松信俊, 辰巳明久, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. MRI 拡散強調画像で超高信号である肝細胞がんに対する治療にはラジオ波焼灼療法は相対的非適応である. 第49回肝癌研究会 2013.7.11 東京

14)中山康弘, 坂本 穰, 鈴木雄一朗, 廣瀬純穂, 佐藤光明, 小松信俊, 辰巳明久, 進藤邦明, 三浦美香, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 雨宮秀武, 松田政徳, 岡田大樹, 荒木拓次, 藤井秀樹, 榎本信幸. TACE 併用ラジオ波焼灼療法は30mm以下の症例に対しても有効か. 第49回肝癌研究会 2013.7.11 東京

15)小松信俊, 本杉宇太郎, 佐藤光明, 辰巳明久, 三浦美香, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 市川智章, 榎本信幸. EOB-MRI 肝細胞相を用いた肝乏血性腫瘍の有無による治療戦略. 第49回肝癌研究会 2013.7.11 東京

16)高野伸一, 深澤光晴, 佐藤 公. 次世代シーケンサーによる膵液癌関連遺伝子変異の検出. 第44回膵臓学会大会 2013.7.25 仙台

17)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21回日本消化器関連学会週間

(JDDW) (シンポ) 2013.10.10 東京  
18) 井上泰輔, 辰巳明久, 田中佳祐, 津久井雄也, 佐藤光明, 小松信俊, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸. 肝硬度測定を用いた高齢 C 型肝炎の検討. 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) (パネル) 2013.10.10 東京  
19) 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 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) (ワーク) 2013.10.9 東京  
20) 小松信俊, 前川伸哉, 辰巳明久, 三浦美香, 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 HBV Pre-S 領域の遺伝子学的検討. 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2013.10.9 東京  
21) 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策. 第 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2013.10.9 東京  
22) 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 21 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2013.10.9 東京

#### 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

## II. 分担研究報告

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)  
分担研究報告書  
次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析による  
C型肝炎の病態解明と臨床応用

次世代シーケンス技術を用いたC型ウイルスゲノムの多種性の解析

分担研究者:上野義之 山形大学医学部消化器内科学 教授  
研究協力者:渡辺久剛 山形大学医学部消化器内科学 講師

分担研究課題:住民コホートでの HCV キャリアの長期予後に関わるウイルス因子についての次世代シーケンサーを用いた解析

**研究要旨:**隣接する二つの住民コホート(コホート1:T町 study、コホート2:R町 study)を用いて、HCV 感染に伴う肝病態進展に関わるウイルス側因子を解析することを目的に、今年度は自然予後に関するコホート臨床情報の収集を行った。コホート1ではHCV抗体陽性率が1.7%であったが、山形県地域がん登録情報および住民基本台帳に基づく予後調査を行ったところ、肝がん発生例はすべてHCV抗体高力価陽性者であり、HCV抗体陰性者では肝がんを原死因とするものはみられなかった。一方、コホート2はHCV抗体陽性率が13%に上る地域であり、無治療自然経過観察例からの肝発癌例は直近の調査ではおよそ40名であった。HCV RNA 自然陰性化は3.7%に認められた。次年度はこれらのコホートにおける肝病態進展に関わるウイルス側因子につき、次世代シーケンサーによる網羅的解析を進めていく予定である。

## A. 研究目的

病態の進展や肝発癌に関わる宿主要因については近年報告が散見されるが、住民コホートを基にしたウイルス側因子の解析結果についてはほとんど明らかにされていない。住民検診基盤のコホート研究である Yamagata Study は、肝機能など一般検診項目のほか、平成25年2月現在、コホートサンプル13,487検体に及ぶ血清、DNA 検体を保管している。コホート全体ではHCV抗体陽性率は0.68%であり、これらを用いた肝病態進展、肝発癌の分子機構を次世代シーケンサーを用いて進めていくことを分担研究の目的とした。

本研究班では、これまで自然経過による自然治癒例、肝発癌例に関する先行データの蓄積がある、隣接する二つの住民コホート(コホート1:T町 study、コホート2:R町 study)を用いて、HCV 感染に伴う肝病態進展に関わるウイルス側因子を解析する予定である。これらのコホートは人口移動が少なく、長期観察の定着性に優れていることから、HCV 感染

の自然経過を解析するのにふさわしいコホート集団と考えられる。

## B. 研究方法

### 1. コホート1:T町 study

2003年から2006年まで生活習慣に関する一時調査が行われ、3,540名が受診した。このうちHCV抗体陽性者は59名(1.7%)であった。2009年からは二次調査が行われ、対象2,100名中1,570名が受診した。HCV抗体陽性者は17名であった。

山形県地域がん登録情報と照らし合わせ、コホート1における発がん状況をHCV抗体価で層別化し、検討した。

また住民基本台帳および死亡個票と照合し、本コホートにおける生命予後調査を行った。

さらに肝線維化進展につき、Fibrosis probability index (FPI) を算出し、HCV感染者のFPIの推移を非感染者と比較した。

### 2. コホート2:R町 study