

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)。

これらの生活習慣病コホート、および感染時期がほぼ特定されているHCV多発地域コホートにおいて、HCV感染による病態進展に関わるウイルス要因を次世代シーケンサーにより探索し、診断に有用な新規のマーカーを見出すことを分担研究の目的としている。

C. 研究結果

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 ≥ 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。

D. 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。

E. 結論

インターフェロン治療歴のない住民ベースのコホートにおいて、HCV 抗体陽性率、発がん状況やウイルス陰性化、生命予後について情報収集を行った。次年度以降、一般住民コホート(生活習慣コホート)および C 型肝炎多発地域コホートにおける、発がんや線維化進展に関わるウイルス側因子を次世代シーケンサーを用いて解析していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) Saito T, Sugimoto M, Igarashi K, Saito K, Shao L, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Tomita M, Ueno Y, Soga T. Dynamics of serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: A metabolomics analysis. *Metabolism* 62 (11): 1577-1586, 2013.
- 2) Sato C, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, Ueno Y, Kawata S. Impaired mitochondrial β -oxidation in patients with chronic hepatitis C: relation with viral load and insulin resistance. *BMC Gastroenterol* 13: 112-119, 2013.
- 3) Ishii R, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, Ueno Y, Kawata S: Serum prolactin levels and prolactin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 85 (7): 119-1205, 2013.
- 4) 奥本和夫、斎藤貴史、勝見智大、富田恭子、

佐藤智佳子、阿蘇里佳、西瀬雄子、渡辺久剛、上野義之:アポ型 ALT により ALT が異常低値を示した C 型肝炎慢性肝炎に対して抗ウイルス療法を行った一例. *肝臓* 54 (8): 543-547, 2013.

5) 渡辺久剛、斎藤貴史、石橋正道、新澤陽英、河田純男:地域コホート研究からみた C 型肝炎ウイルス持続感染者の自然史。「コホート研究からみたウイルス性肝炎の解明」(佐田通夫、田中榮司、田中英夫、長尾由実子編)、p130-139、*メディカルレビュー*、大阪、2013.

6) 渡辺久剛、上野義之: B 型肝炎の自然予後(無治療住民検診での長期予後) 肝胆膵疾患;「予後」の変遷. *肝胆膵* 66(3):399-407, 2013.

2. 学会発表

- 1) 渡辺久剛、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之: Telaprevir (TVR) 3 剤療法での TVR 用量別治療効果と安全性. 第 17 回日本肝臓学会大会、東京;2013 年 10 月.
- 2) 西瀬雄子、斎藤貴史、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、奥本和夫、渡辺久剛、今井康陽、堀田博、上野義之: C 型肝炎ウイルス 1b の NS3 領域蛋白質 2 次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連に関する前向き研究 第 3 報 第 49 回日本肝臓学会総会、東京;2013 年 6 月.
- 3) 西瀬雄子、渡辺久剛、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、奥本和夫、斎藤貴史、上野義之: 高齢者 C 型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性と予後 第 99 回日本消化器病学会総会、鹿児島;2013 年 3 月.

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

DAA 耐性ウイルスの頻度と臨床像の検討

分担研究者:黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

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: C 型肝炎治療は直接ウイルス阻害薬(DAA)により治療効果が向上する反面、治療失敗による新たな薬剤耐性の惹起が今後の大きな問題となる。本研究では DAA 治療歴のない C 型慢性肝炎 466 症例において、NS3 阻害剤に対する耐性ウイルス、NS4A 阻害剤に対する耐性ウイルスの存在頻度、関連する臨床像を検討した。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。D168 変異は 1.5%において認めたが、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 HCV 変異 Core70、NS5A-ISDR は 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 Y93 変異は 19.1%存在し、その 95%が高度耐性を呈する Y93H であった。Y93H 変異と 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($p < 0.01$)。

A. 研究目的

C 型肝炎治療は直接ウイルス阻害薬(DAA)により治療効果が向上する反面、治療失敗による新たな薬剤耐性の惹起が今後の大きな問題となる。経口 HCV 薬の国内臨床試験において、治療開始前に存在する NS5A 阻害剤に対する耐性変異が治療効果を規定すること、また治療失敗により NS3 と NS5A に多剤耐性多重変異が出現することが示された。今後、C 型肝炎患者に対する治療は DAA を含む治療が主流になってゆくと、DAA に対する耐性変異の有無を確認することが治療戦略の構築上重要になる。本研究では DAA 治療歴のない症例における DAA に対する耐性ウイルスについて検討した。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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

($p < 0.01$)。

D. 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。

E. 結論

今 HCV の治療に DAA を用いる場合、耐性変異に注意を払う必要がある。DAA 耐性変異が存在する症例では、インターフェロンを併用することで、DAA 耐性変異に影響されることなく、治療効果が期待できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

Itakura J, Kurosaki M, et al. Naturally occurring hepatitis C virus variants that are resistant to direct acting antivirals: their prevalence and response to interferon based therapy. APASL 2014

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

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

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

分担研究者: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

研究要旨: C型慢性肝炎症例(genotype 1b、高ウイルス量)に対する telaprevir (TVR)と PEG-IFN+RBV 併用療法が保険適応となり、治療が開始されている。さらに2013年12月より第二世代のプロテアーゼ阻害剤である simeprevir (SMV)と PEG-IFN/RBV の3者併用療法も開始されている。3者併用療法にて sustained virological response (SVR)が得られなかった症例ではC型肝炎ウイルス(HCV)の NS3 領域に耐性ウイルスの出現が認められるが、耐性ウイルスが投与開始前より存在するかどうか、さらにその後の耐性ウイルスの推移について次世代シーケンサーを用いて解析した。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週間投与を施行したが、SVRに至らなかった(non-SVR)17例とSMV++PEG-IFN+RBV3者併用24週間投与を施行したが、SVRに至らなかった(non-SVR)6例を対象とした。TVR投与例の検討では、開始時次世代シーケンサーで17例中6例(35%)で耐性ウイルスが検出された。(T54S,3例、V36A,2例、V170A,1例)この6例中、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。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。治療後に出現したこれらのTVR耐性ウイルスを治療終了後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投与例では、6例中5例で検出された。(Q80L,2例、Q80R,2例、R155Q,1例)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。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。同様にこれらのSMV耐性ウイルスを治療終了後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。C型慢性肝炎に対する新規薬剤であるTVRまたはSMVとPEG-IFN+RBVの3者併用療法24週間投与の治療効果は高いが、開始時の遺伝子解析では耐性ウイルスの出現や効果を予測できなかった。またその後2年で多くの症例で血中から耐性ウイルスの消失が認められた。

A. 研究目的

従来 C 型慢性肝炎の治療の主体は、Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)の併用療法であったが、本邦で多い genotype 1b 型、高ウイルス量症例に対する48週間投与の完全著効(SVR)率は、40-50%であり、十分な治療効果を得ていなかった。2011年より新規治療薬であるプロテアーゼ阻害剤の telaprevir (TVR)と PEG-IFN+RBV 併用療法が保険適応となり、治療が開始されて

いる。しかし貧血や皮膚症状などの副作用が認められることや、IL28B の遺伝子型、HCV Core のアミノ酸置換の有無などから効果が低い症例も依然認められる。3者併用療法にて sustained virological response (SVR)が得られなかった症例ではTVR耐性ウイルスの出現が認められるが、耐性ウイルスが投与開始前より存在するかどうか詳細は不明である。さらにTVR投与後出現した耐性ウイルスの治療後の推移についても明らかになっていない。今回

TVR/PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した症例での耐性ウイルスの存在を高感度の測定系である次世代シーケンサーを用いて解析した。

また 2013 年 12 月より第二世代のプロテアーゼ阻害剤である simeplevir (SMV) と PEG-IFN/RBV の 3 者併用療法も開始されている。当院での SMV/PEG-IFN/RBV 併用療法における SMV 耐性ウイルスについても次世代シーケンサーを用いて解析した。

B. 研究方法

虎の門病院にて C 型慢性肝炎 (genotype 1b 型高ウイルス量症例) で、TVR+PEG-IFN+RBV 3 者併用 24 週間投与を施行したが、SVR に至らなかった (non-SVR) 17 例を対象とした。3 者併用療法開始時と治療中及び投与終了後の TVR 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。

また、SMV++PEG-IFN+RBV 3 者併用 24 週間投与を施行したが、SVR に至らなかった (non-SVR) 6 例を対象とし、同様に併用療法開始時と治療中及び投与終了後の SMV 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。次世代シーケンサーは Ion PGM-TM (Life Technologies, Japan) を使用し、HCV Plasmid DNA の変異出現率を基準に 0.2% 以上を有意な変異とした。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について説明し同意を文章または口頭にて取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) TVR+PEG-IFN+RBV 3 者併用療法症例での TVR 耐性ウイルスの検討

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。

(2) SMV+PEG-IFN+RBV 3 者併用療法症例での SMV 耐性ウイルスの検討

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。(① R155Q, 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%; ④ Q80R, 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。

D. 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。

E. 結論

C 型慢性肝炎に対する新規薬剤である TVR または SMV と PEG-IFN+RBV 治療例において次世代シーケンサーを用いた TVR および SMV 耐性ウイルスの存在の検討を行った。治療開始時の TVR 耐性ウイルスまたは SMV 耐性ウイルスの存在例を認めたが、必ずしも治療後の耐性ウイルスとは一致しなかった。また多くの症例で治療後 2 年で血中から耐性ウイルスの消失を認めた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Utility of Telaprevir-Resistant Variant Detection for Prediction of Treatment Efficacy in HCV Genotype 1. *J Clin Microbiol.* 2014 in press.
- 2.Kawakami Y, Suzuki F, Karino Y, Toyota J, Kumada H, Chayama K. Telaprevir is effective given every 12 hours at 750 mg with peginterferon-alfa-2b and ribavirin to Japanese patients with HCV-1b IL28B rs8099917 TT. *Antivir Ther.* 2014 in press.
- 3.Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Impact of virus clearance for the development of hemorrhagic stroke in chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2014;86:169-75.
- 4.Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Correlation between hepatitis B virus surface antigen level and alpha-fetoprotein in patients free of hepatocellular carcinoma or severe hepatitis. *J Med Virol.* 2014;86:131-8.
- 5.Hara T, Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Kumada H. A pilot study of triple therapy with telaprevir, peginterferon and ribavirin for elderly patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2013;85:1746-53.
- 6.Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with

- hepatitis C virus genotype 1. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2862-8.
7. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol.* 2013;85:1028-36.
8. Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virological response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat.* 2013;20:167-73.
9. Suzuki F, Suzuki Y, Sezaki H, Akuta N, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Watahiki S, Kobayashi M, Nakayasu Y, Tsuda H, Aoki K, Yamada I, Kumada H. Exploratory study on telaprevir given every 8 h at 500 mg or 750 mg with peginterferon- α -2b and ribavirin in hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 2013;43:691-701.
10. Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hu W, Eley T, McPhee F, Hughes E, Kumada H. Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol.* 2013;58:655-62.
11. Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F, Kumada H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol.* 2013;58:646-54.
12. Tadokoro K, Kobayashi M, Suzuki F, Tanaka C, Yamaguchi T, Nagano M, Egashira T, Kumada H. Comparative quantitative analysis of hepatitis C mutations at amino acids 70 and 91 in the core region by the Q-Invader assay. *J Virol Methods.* 2013;189:221-7.
13. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy and anticarcinogenic activity of ribavirin combination therapy for hepatitis C virus-related compensated cirrhosis. *Intervirology.* 2013;56:37-45.
14. Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2013;57:964-73.
15. Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2013;56:13-21.

2. 学会発表

1. 鈴木文孝、芥田憲夫、熊田博光。
パネルディスカッション 4: C型慢性肝炎の治療とIL28B およびITPA geneの遺伝子多型の関係、第99回日本消化器病学会総会、鹿児島、2013.3.23.
2. 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光。シンポジウム 1: C型慢性肝炎に対するtelaprevir3剤併用療法のTVR用量別の治療効果と安全性の比較、第99回日本消化器病学会総会、鹿児島、2013.3.22.
3. 芥田憲夫、鈴木文孝、熊田博光。
ワークショップ 1: 肝発癌/薬剤耐性リスクを考慮したtelaprevir併用難治例の治療選択—次世代 deep sequencer を用いた耐性変異の

検討一、第 99 回日本消化器病学会総会、鹿児島、2013.3.21.

4.瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光。C 型慢性肝炎線維化進行例に対するテラプレビル 3 剤併用療法の宿主因子および薬剤投与量を加味した治療効果予測、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.6.

5.芥田憲夫、鈴木文孝、熊田博光。

ワークショップ 3: C 型肝炎難治例における Ultra-deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異の検討、

第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.6.

6.鈴木文孝、林 紀夫、熊田博光。ゲノタイプ 1 型 C 型肝炎に対するシメプレビル(TMC435) のペグインターフェロン α -2b 及びリバビリン併用療法(CONCERTO-4 試験)、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.6.

7.鈴木文孝、芥田憲夫、熊田博光。

シンポジウム 7: C 型慢性肝炎に対する DAA 製剤の治療成績、

第 17 回日本肝臓学会大会、JDDW、東京、2013.10.10.

8.瀬崎ひとみ、鈴木文孝、福島泰斗、原 祐、川村祐介、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、鈴木義之、斉藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光。C 型慢性肝炎線維化進行例に対するテラプレビル 3 剤併用療法の治療効果予測、第 17 回日本肝臓学会大会、JDDW、東京、2013.10.10.

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

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:相崎 英樹 国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究要旨:これまでのC型肝炎ウイルスの研究では、各塩基について優位に存在する塩基をつなげたコンセンサス配列が一般的に用いられてきた。しかし、実際にコンセンサス配列を有するウイルスが患者血清内に存在するかどうか、また、コンセンサス配列がそのウイルスの病原性や薬剤耐性解析に適しているかどうか、検証されていない。本研究では次世代シーケンス技術を従来のPCR法と組み合わせ、全長配列を決定した。この手法を用いて、一人の患者血清中に共存するウイルスゲノム全長の配列を経時的に決定し、多種性を解析したので報告する。

A. 研究目的

患者血清中に共存する複数のウイルスゲノムの全長配列を決定する技術を確立すると共に、その手法を用いてHCVの持つ多種性(quasispecies)を解析する。さらに、従来のコンセンサス配列と比較検討する。

B. 研究方法

(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) コンセンサス配列の決定

コンセンサス配列は常法に従い、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。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

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core70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。

D. 考察

HCV研究ではこれまでコンセンサス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。

E. 結論

次世代シーケンスを従来の PCR 法と組み合わせることで全長配列を決定する手法を開発した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep*. 2013;22:3243.
- 2) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440:515-20.
- 3) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol*. 2014;95:60-65.
- 4) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog*.

2013;9:e1003589.

5) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PLoS One*. 2013;18;8(7):e68992.

6) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology*. 2013;145:447-55.

7) 相崎英樹、HCV 感染と代謝異常(脂質・エネルギー)、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、東京、2013;245:666-667.

2. 学会発表

- 1) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Dynamics of the cellular metabolome during hepatitis C virus infection: Regulation of the lipoprotein metabolisms by hepatic lipase, 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne, Australia, 2013.10.6-10.
- 2) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T, Identification of a natural product inhibiting the transcriptional activity of liver X receptor and reducing the production of infectious HCV, 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne, Australia, 2013.10.6-10.
- 3) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T, Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system, The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of

Bioactivity, Yokohama, 2013.10.28-29.

4) Suzuki R, Konishi E, Ishikawa T, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. Keystone Symposia, Positive Strand RNA Viruses, Boston, U.S.A. 2013.4.28-5.3

5) Aizaki H, Dynamic metabolomics change in HCV-infected cells, The 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links", Italy 2013.10.20-21.

6) Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Hmwe SS, Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T, Wake K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules, International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, Osaka, 2013.9.23-25.

7) Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Yaguchi S, Matsumoto M, Shirouzu M, Yokoyama S, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Kojima S, HCV NS3 protease plus TNF- α promotes liver fibrosis via stimulating expression and activation of TGF- β type I receptor, 第 20 回肝細胞研究会, Osaka, 2013.9.26-27.

8) Aoyagi H, Aizaki H, Matsumoto Y, Matsuda M, Hmwe SS, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Miyamura T, Wakita T. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro, The 12th Awaji international forum on infection and immunity, 2013.9.10-13.

9) Nagamori S, Aizaki H, Matsumoto Y, Isozumi N, Wiriyasermkul P, Matsuura T, Kanai Y, Comprehensive and comparative proteomics reveals alterations of metabolomics between monolayer and three-dimensional cell cultures. 12th Human Proteome Organization World Congress 2013. 9.14-18. Yokohama.

10) Aoyagi H, Aizaki H, Matsumoto Y, Matsuda M, Hmwe SS, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Miyamura T, Wakita T. Regulation of Hepatitis C virus (HCV) release by phospholipase A2 and autophagy -Antiviral Activity of Glycyrrhizin against HCV, 日本分子生物学会第 36 回年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸.

11) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス産生系の確立. 日本分子生物学会第 36 回年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸.

12) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗. 細胞内発現抗体(イントラボディ)による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

13) 鈴木亮介、小西英二、石川知弘、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発. 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

14) 青柳東代、相崎英樹、藤本陽、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、宮村達男、脇田隆字. Phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御 -グリチルリチンによる抗 HCV 作用-, 日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

15) 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、C 型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化と Hepatic Lipase 発現制御、日本ウイルス学会第 61 回学術集会, 2013 年 11 月 10-12 日, 神戸.

16) 内田奈々子、渡士幸一、中嶋 翔、岩本

将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉 丈、脇田隆字、C 型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される、日本ウイルス学会第 61 回学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸。

17) 渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字:エンベロープペプチドを用いた HCV 感染に重要なアミノ酸領域の探索、日本ウイルス学会第 61 回学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸。

18) 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字、C 型肝炎ウイルス NS5A 結合タンパク質 ELAVL1 のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析、日本ウイルス学会第 61 回学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸。

19) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字、Liver X Receptor 転写活性および感染性 C 型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然有機化合物の同定、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸。

20) 相崎英樹、オートファジイにかかる治療戦略 2014、2013 年 2 月 15 日、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

C型肝炎患者におけるHLAクラスII領域SNPの検討

分担研究者:中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨:C型肝炎ウイルス感染の病態における免疫応答の関与について、HLAクラスII 遺伝子領域SNPを検討した。同領域の23個のSNPについて、遺伝子自動解析装置GENECUBEを用いて迅速・簡便に解析することができた。さらに、C型肝炎の病態を反映する臨床データ(性別、core70 番変異、ALT、血小板数、PT-INR、AFP)と統計学的に有意に関連するSNP(rs2071025、rs3135363、rs9275319、rs9272105)が同定された。これより、C型肝炎患者において、HLAクラスII 領域SNPの違いが病態の進展やがんの発生に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

ヒトがC型肝炎ウイルスに感染した場合、30%の患者ではウイルスは完全に排除され、一過性感染として治癒するが、残りの70%の患者ではウイルスは排除されず、持続感染することが知られている。この持続感染をきたした患者のうち20~30%が肝硬変そして肝癌へと進展するが、他は無症状のまま経過する。一方、ウイルス感染後の病態とウイルスに対する宿主免疫応答との関連についてはこれまでに多くの検討がなされている。本研究においてはHLAクラスIIとの関連を調べるため、C型肝炎患者における同遺伝子領域SNPを検討した。

B. 研究方法

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、肝癌の有無、検査データ(ALT、血小板数、PT-INR、AFP、PIVKAI)との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従うとともに、実施機関の「医学部倫理審査委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

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。

D. 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。

E. 結論

C型肝炎患者において、HLAクラスII 領域SNPの違いが病態の進展やがんの発生に関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. 論文発表

1) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase in CD14+HLA-DR⁻/low

myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013; 62: 1421-1430.

2) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 (in press).

3) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A, Nakamura M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H; Intractable Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan: Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology Res.* 2014 (in press).

2. 学会発表

1) Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: Clinical evaluation of patency capsule system in high risk patients for video capsule endoscopy. *Japan Digestive Disease Week 2013 (Tokyo); 一般; oral: Oct. 12, 2013.*

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

C 型肝炎新規クラス DAA 製剤の薬剤耐性と治療効果

分担研究者:朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

研究要旨:【目的】プロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の治療効果に関わる因子と NS3 および NS5A 阻害剤の薬剤耐性を明らかとし、これらを考慮した治療適応を検討する。【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 型肝炎慢性肝炎 234 例を対象とし、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。【結果】SVR 率は 84%と良好であった。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。Deep sequence では治療前に NS3 耐性変異を 85%、NS5A 耐性変異 を 87%の症例に認めた。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 A156 変異株が優勢となり、再燃後も優勢株となった症例があった。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。

A. 研究目的

プロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の治療効果に関わる因子と NS3 および NS5A 阻害剤の薬剤耐性を明らかとし、これらを考慮した治療適応を検討する。

B. 研究方法

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 型肝炎慢性肝炎 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。

C. 研究結果

TVR 3 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、 γ 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%)に認められたが、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。

D. 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。

E. 結論

TVR3剤併用療法では、治療前に耐性ウイルスが存在していても、IFN応答性のある症例では治療効果が高い。IFN応答性と耐性ウイルス出現を考慮した治療戦略が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Yutaka Yasui, Atsushi Kudo, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Nobuharu Tamaki, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kotaro Matsunaga, Hiroyuki Nakanishi, Kaoru Tsuchiya, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Shinji Tanaka, Yasuhiro Asahina, Nobuyuki Enomoto, Shigeki Arii, Namiki Izumi. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study.

Oncology 86:53-62, 2014

2.Kaoru Tsuchiya, Yasuhiro Asahina, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Namiki Izumi. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. Liver Transplant 2013 in press.

3.Nobuharu Tamaki, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Yutaka Yasui, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kaoru Tsuchiya, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi. Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. J Gastroenterol 2013 in press

4.Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. Internal Medicine 52: 2701-2706, 2013.

5.Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. Hepatology 58:1253-1262,2013
doi: 10.1002/hep.26442.

6.Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraok M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J,

- Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013 Jul 17.
7. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2013; 43: 1-34.
8. Tsuchiya K*, Asahina Y*, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N.* These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 120:229-237, 2014
9. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α -2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol* 48: 382-390, 2013.
10. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57: 46-58, 2013.
11. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 57: 2502-2513, 2013.
12. Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virological response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat* 20: 167-173, 2013.
13. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N. Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 20: 72-76, 2013.
14. 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* 85: 449-458, 2013.
15. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near - infrared spectroscopy. *Hepatol Res* 2013 Apr 5. doi: 10.1111/hepr.12127.
16. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata

T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2013 Jun 6. doi: 10.1111/hepr.12179.

17. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. *JSH Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection: A 2014 Update for Genotype 1*. *Hepatol Res* 2014; 44: S59-S70.

18. Asahina Y, Hayashi N, Hiramatsu N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Kurosaki M, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tanaka E, Tanaka Y, Tsubouchi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. *Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection*. *Hepatol Res* 2014; 44: S1-S58.

2. 学会発表

1. Tsuchiya K, Yasui Y, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Monitoring of plasma vascular endothelial growth factor after sorafenib administration as predictor of survival in advanced hepatocellular carcinoma. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

2. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I.

The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

3. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wk, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashina M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analysis of HLA-DPA1, DOB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

4. Asahina Y, Nakagawa M, Taniguchi M, Kawai F, Fujiki J, Otani T, Yamanaka H, Murakawa M, Nitta S, Kitazume A, Watanabe T, Sakurai Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Serum interleukin-6 levels during treatment correlate with resistance to telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C. The 48th annual meeting of the European association for the study or the liver (EASL The International Liver Congress 2013), Amsterdam, Netherlands, April 24-28, 2013.

5. Azuma S, Asahina Y, Sakurai Y, Ootani H, Yamanaka H, Kawai F, Fujiki J, Nitta S, Kitazume A, Murakawa M, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M. Comparison between Gd-EOB-DTPA MRI and CTHA/CTAP for detection of hypervascular hepatocellular carcinoma: efficacy of diffusion weighing image and hepatobiliary phase. APASL Liver Week 2013 (Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver), Singapore, June 2013.

6.Asahina Y, Murakawa M, NittaS, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFNλ4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013),

Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

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