

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性変異からみた C 型慢性肝炎の治療法に関する研究

担当責任者：坂本穰・山梨大学医学部附属病院肝疾患センター・准教授

研究要旨：C型慢性肝炎の治療法、特に最も難治とされる1b型HCVに対して、直性作用型抗HCV薬（Direct acting antivirals: DAAs）が開発され急速に進歩した。NS3-4 protease阻害剤のSimeprevir ないしはVaniprevir（VPV）をPEG-IFN+RBVに併用する3剤併用療法は、治療効果と安全性からIFN適格の初回治療例では第1選択であるが、治療効果はPEG-IFN+RBVの治療効果と関連し、前治療再燃例や初回例で有効性が高く、IL28B TT症例では有効性が高いことが明らかになった。また治療失敗例ではNS3耐性が生じるが、これは治療前から存在する微量なクローンから選択増殖されている可能性が示され、例え耐性変異が逆変異により野生型に戻っても耐性部位以外の変異は変化せず、異なる変異の集積をもつウイルスが主流となり、quasispecies構成自体が変化し維持されていることが示された。これは、薬剤耐性機序解明の手掛かりになるばかりか、今後の治療に影響を及ぼす可能性があることから重要な発見と考えられる。一方、わが国で初めて認可されたprotease阻害剤のAsunaprevir（ASV）とNS5A阻害剤のdaclatasvir（DCV）を併用する経口2剤治療の適応は、現在、IFN不適格未治療、IFN不耐容例、無効例に限られるが、治療効果は極めて高いことが判明した。また自然得耐性変異が存在することが知られているが、NS5A-Y93Hは、高感度測定法によれば早期の治療反応性と関連することが判明し、今後最終効果との関連について検討が必要である。さらにNS5A-Y93HはIFN感受性がむしろ高い集団に多く存在する可能性が高く、今後測定法も含め、治療方針を決定するうえで非常に重要であると考えられた。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する治療法は、インターフェロン（Interferon: IFN）に加え、直接作用型抗HCV薬（Direct acting antivirals: DAAs）を用いることで急速に進歩した。とくに1b型HCVに対するNS3-4 protease阻害剤のTalaprevir（TVR）Simeprevir（SMV）Vaniprevir（VPV）をPEG-IFNとリバビリン（Ribavirin: RBV）に併用する3剤併用療法は極めて高い治療効果を示した。このうちSMVやVPVは高い治療効果と安全性から3剤併用療法においては第1選択薬である（日本肝臓学会C型肝炎治療ガイドライン）。さらにprotease阻害剤のAsunaprevir（ASV）に

NS5A阻害剤のDaclatasvir（DCV）を併用する経口2剤治療も、わが国で初めて認可された。この治療法は極めて高い治療効果を示し、重篤な副作用もほとんどみられないが、平成27年2月現在の適応は、IFN不適格未治療もしくはIFN不耐容例、IFN治療無効例に限られている。従って、IFN適格未治療例は、PEG-IFN+RBV+（TVRまたはSMVまたはVPV）が第1選択である。またDAAには薬剤耐性ウイルスの問題が存在する。これは治療不成功例では薬剤耐性変異がみられるという点と、もともと自然獲得薬剤耐性変異の問題という2点を含んでいる。そこで本研究では、薬剤耐性変異につき、とくに検討し、現時点でのC型慢性肝炎の治療法を

検討することを目的とした。

B. 研究方法

山梨大学医学部附属病院で治療開始した、1b型C型慢性肝炎症例を対象とし、治療効果と薬剤耐性変異につき、宿主因子・ウイルス因子とともに検討した。

1) PEG-IFN+RBV+SMV 症例が 29 例に関しては治療効果と、治療不成功例の薬剤耐性変異につき Ultra-deep sequencing 法で詳細に検討した。
 2) ASV+DCV 療法 36 例は、治療選択の理由・治療効果につき検討し、NS5A-Y93H 変異と治療効果に関しては Direct sequencing 法と Invader 法による相違を検討した。また、Y93H については他のコホート集団での検出頻度等についても検討した。

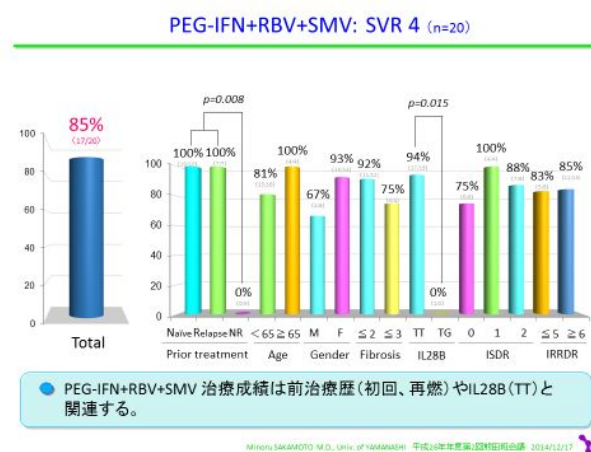
(倫理面への配慮)

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。

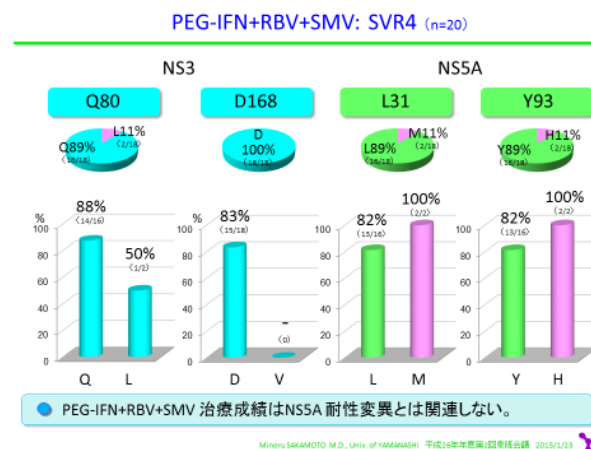
C. 研究結果

1) PEG-IFN+RBV+SMV 29 例の SVR4 は 85% (17/20) であった。治療効果規定因子につき SVR12 を用いて、治療因子 (初回治療、前治療効果 [再燃/無効])、宿主因子 (年齢、性別、肝線維化、IL28B SNPs)、ウイルス因子 (ISDR/IRRDR、コアアミノ酸変異) につき検討すると、初回治療/前治療再燃例と IL28B

major type (TT) のみが有意な因子であった。すなわち、前治療無効例では 1 例も SVR 達成しなかったが、初回治療例・前治療再燃では 100% の SVR 率であった ($p=0.008$)。また IL28B major type (TT) では、94% の SVR 率であるのに対し、minor type (TG または GG) では 1 例も SVR 率にならなかった ($p=0.015$)。



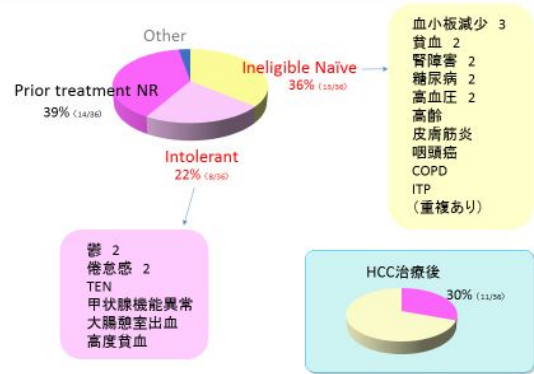
また、NS3-4 protease 阻害剤の耐性変異である Q80L、D168V について検討すると、D168V は存在せず、Q80L は 11% に認め、SVR4 は 50% であった。一方 NS5A 阻害剤の耐性変異である、L31M 変異と Y93H 変異を有する症例は 11% 存在したが治療効果とは関連しなかった。



しかし治療失敗例を検討すると、ウイルス再増殖時には NS3-4 protease 阻害剤の耐性変異である D168V 変異が出現していた。これを、Ultra-deep sequencing 法で詳細に検討すると、治療前からわずかながら耐性変異を持ったウイルスが存在することが明らかになった。しかし、耐性部位以外の変異を検討すると、ウイルス再増殖時に多数を占めるウイルスは、治療前に存在していたごく微量のウイルスを起源として選択・増殖している可能性が示唆された。しかも、数か月の経過で、耐性部位のアミノ酸が逆変異し野生型に戻っても、耐性部位以外の変異は変化せず、異なる変異の集積をもつウイルスが主流となり、quasispecies 構成自体が変化し、維持されていた。

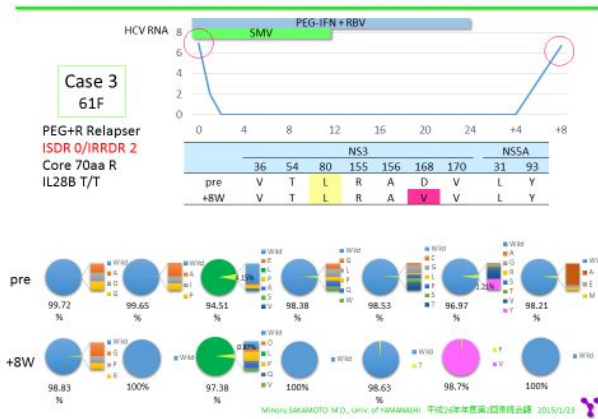
の導入理由は、IFN 不適格未治療 13 例 (36%)、IFN 不耐容 8 例 (22%)、前治療無効例 14 例 (39%) であった。

ASV+DCV: Reason for entry (n=36, Univ. of Yamanashi)

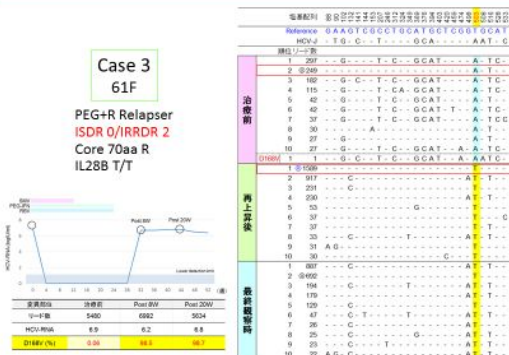


当院では direct sequencing 法を用いて NS5A 阻害剤の耐性変異を治療前に測定し耐性変異を有する症例は原則治療導入していない。しかし早期の治療効果を検討すると、2W でのウイルス陰性化 (<1.2 検出せず) あるいは <1.2 (検出) と Y93H の Invader 法の結果は相関した。

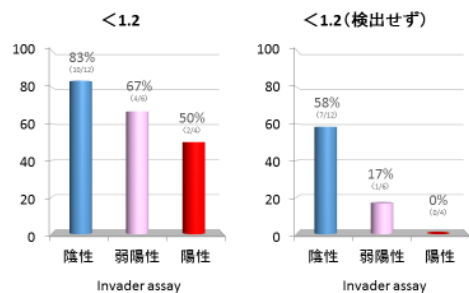
PEG-IFN+RBV+SMV: Change of amino acid (Relapse case)



PEG-IFN+RBV+SMV: Change of amino acid (Relapse case)



ASV+DCV (n=26, Univ. of Yamanashi)

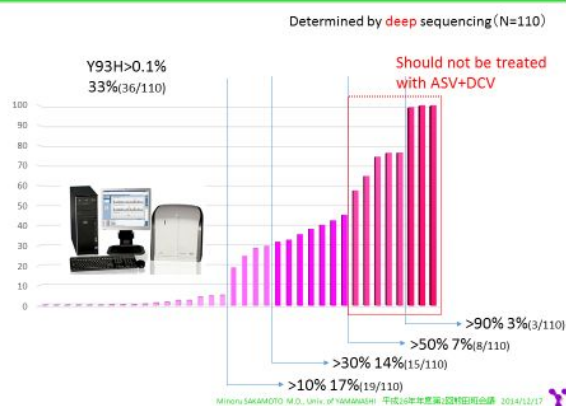


しかし、DAA 製剤未使用の Y93H 頻度を ultra-deep sequencing 法を用いて別の 110 例で検討すると検討すると、混在比率 50% 以上の頻度で検出される症例が 7%、0.1% 以上で検出される症例まで含めると 33% に認められた。この症例の特徴を多変量解析で検討すると、IL28B TT、コア 70 番アミノ酸 R (野生型)、IRRDR

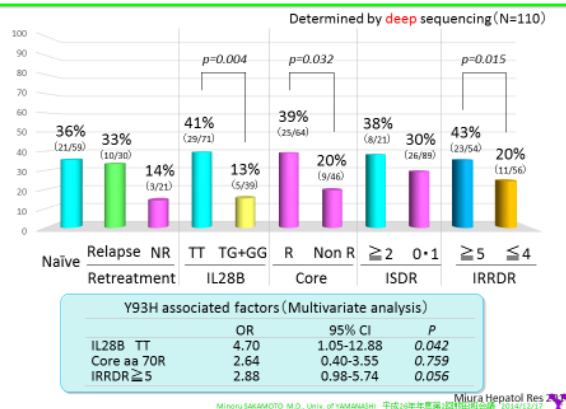
2) ASV+DCV 治療は 36 例に導入されたが、そ

変異数 5 が有意な因子で、IFN 感受性が高いと考えられる集団に多く見られた。

Y93H: Percentage of resistance mutation at aa93



Y93H: Frequency in each background



D. 考察

1b 型 HCV に対する治療法は IFN 適格未治療例では PEG-IFN+RBV + SMV (もしくは VPV) が第 1 選択であり、IFN 不適格未治療、不对応例、IFN 無効例では ASV+DCV 併用療法が第 1 選択である。しかし、DAA 製剤は薬剤耐性変異の問題を含んでおり、これらを慎重に検討する必要がある。とくに NS5A 阻害剤の daclatasvir (DCV) に高度耐性を示す Y93H は、IFN 感受性を示す症例に多く存在する。しかもこれらは PEG-IFN+RBV + SMV の治療効果とは関連しないため、治療選択にあたり慎重な検

討が必要である。しかも耐性変異測定には、種々の方法があり、高感度測定法ではかなりの頻度で耐性ウイルスが存在することが明らかになった。また高感度測定では早期の治療効果を判定できる可能性があり、最終的な治療効果を含め、測定法の臨床的有用性ととも今後の検討課題であると考えられた。

E. 結論

C 型慢性肝炎の治療方針を決定するためには薬剤耐性変異を十分検討することが必要である。とくに DCV 耐性の Y93H は、測定法や自然獲得耐性例の存在も十分考慮する必要がある。

まとめ

1、NS3 protease阻害剤の耐性変異の検討

- SMV failure例ではいずれもD168の耐性変異が出現していた。
- D168のminor mutationは治療前から存在していた可能性がある。

2、NS5A阻害剤耐性変異の検討

- Direct sequencingでは検出できない変異をInvader assayでは検出できる可能性がある。
- Invader assayの結果は、ASV+DCV治療の早期の治療反応性と関連する可能性がある。
- NS5A-Y93H変異は、IL28B TT、コア70アミノ酸置換、ISDR/IRRDRと関連する。とくに、IFN感受性が高いと考えられる症例での頻度が高い。

現時点では、NS3およびNS5A領域のDAA耐性変異を検討して治療方針を検討する必要がある。今後、未治療例にASV+DCV治療が適応になってもとくにY93H変異例は、IFN baseの治療効果が高い可能性があることも考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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 gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res* 2014, 44, 1339-1346, DOI: 10.1111/hepr.12309
- (2) 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 1 in hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2014 in press Article first published online : 10 APR 2014, DOI: 10.1111/hepr.12316
- (3) Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Liver Stiffness Measurement for Risk Assessment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology Research* 2014 in press Article first published online : 20 OCT 2014, DOI: 10.1111/hepr.12377
- (4) 坂本穰、榎本信幸、線維化進展例に対する 3 剤併用療法、*医学のあゆみ* 249 (3) 237-241, 2014
- (5) 坂本穰、榎本信幸、C 型慢性肝炎、肝硬変、診療ガイドライン UP-TO-DATE、290-297、メディカルレビュー社
- (6) 坂本穰、榎本信幸、C 型肝炎の治療目標、*HEPATOLOGY PRACTICE C 型肝炎の診療を極める*。138-144、文光堂
- (7) 坂本穰、榎本信幸、DAA 時代におけるインターフェロンの意義、*Mebio* 31、61-63、2014
- (8) 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、*日本臨床* 73(2) 208-212、2015
- ## 2. 学会発表
- (1) 小松信俊、前川伸哉、佐藤光明、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 Pre-S 領域の遺伝子学的検討、第 24 回抗ウイルス療法研究会、2014.5.8、富士吉田
- (2) 鈴木雄一郎、坂本穰、辰巳明久、佐藤光明、小松信俊、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸。B 型肝炎の核酸アナログ投与における肝炎抑制効果と発癌、第 24 回抗ウイルス療法研究会、2014.5.8、富士吉田
- (3) 前川伸哉、三浦美香、高野伸一、佐藤光明、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 24 回抗ウイルス療法研究会、2014.5.8、富士吉田
- (4) 前川伸哉、三浦美香、高野伸一、佐藤光明、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。HCV 感染者における NS3 プロテアーゼ阻害剤 + NS5A 阻害剤耐性変異の検討、第 24 回抗ウイルス療法研究会、2014.5.8、富士吉田
- (5) 佐藤光明、三浦美香、坂本穰、小松信俊、辰巳明久、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸。次世代 sequencer による telaprevir 耐性変異の検討、第 24 回抗ウイルス療法研究会、2014.5.8、富士吉田
- (6) 鈴木雄一郎、坂本穰、榎本信幸、核酸アナ

- ログ療法の有効性に関わるウイルス因子、宿主因子の検討、第 100 回日本消化器病学会総会(ワークショップ)、2014.4.26、東京
- (7) 廣瀬純穂、中山康弘、鈴木雄一郎、佐藤光明、小松信俊、辰巳明久、三浦美香、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、岡田大樹、荒木拓次、雨宮秀武、松田政徳、榎本信幸、脈管侵襲をきたした高度進行肝細胞癌に対する治療法とその成績、第 100 回日本消化器病学会総会、2014.4.26、東京
- (8) 坂本穰、三浦美香、佐藤光明、小松信俊、辰巳明久、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸、発癌リスクと治療反応性、薬剤耐性変異を考慮した難治性 C 型肝炎治療、第 100 回日本消化器病学会総会、2014.4.26、東京
- (9) 辰巳明久、佐藤光明、鈴木雄一郎、廣瀬純穂、小松信俊、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、FibroScan による肝硬度測定および脂肪化測定を用いた NBNC 肝癌評価、第 100 回日本消化器病学会総会、2014.4.26、東京
- (10) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、発癌リスクと protease 阻害剤を含む 3 剤併用療法の治療反応性と薬剤耐性変異を考慮した C 型肝炎に対する治療戦略、第 50 回日本肝臓学会総会(シンポジウム)、2014.5.29、東京
- (11) 鈴木雄一郎、坂本穰、榎本信幸、B 型肝炎における HBsAg、HBcrAg、ファイブロスキャンの有用性、第 50 回日本肝臓学会総会(シンポジウム)、2014.5.29、東京
- (12) 井上泰輔、辰巳明久、鈴木雄一郎、佐藤光明、三浦美香、雨宮史武、中山康弘、坂本穰、榎本信幸、ファイブロスキャンによる肝硬度と C 型肝炎へのインターフェロン治療、第 50 回日本肝臓学会総会(ワークショップ)、2014.5.29、東京
- (13) 佐藤光明、三浦美香、前川伸哉、小松信俊、辰巳明久、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代 sequencer による telaprevir 耐性変異の解析、第 50 回日本肝臓学会総会、2014.5.29、東京
- (14) 前川伸哉、三浦美香、辰巳明久、小松信俊、佐藤光明、鈴木雄一郎、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、Deep sequencing を用いた naturally-occurring DAA resistant HCV の検討、第 50 回日本肝臓学会総会、2014.5.29、東京
- (15) 小松信俊、坂本穰、榎本信幸、EOB-MRI 肝細胞相で低信号を示す乏血性結節と発癌リスクの検討、第 50 回日本肝癌研究会(シンポジウム)、2014.6.5、京都
- (16) 佐藤光明、中山康弘、小松信俊、辰巳明久、三浦美香、雨宮史武、井上泰輔、坂本穰、前島良康、栗山健吾、大西洋、榎本信幸、肝細胞癌に対する定位放射線療法の成績、第 50 回日本肝癌研究会(ワークショップ)、2014.6.5、京都
- (17) 雨宮史武、加藤亮、石田泰章、早川宏、川上智、小馬瀬一樹、門倉信、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、当院における非 B 非 C 型肝炎肝細胞癌の臨床的特徴、第 50 回日本肝癌研究会、2014.6.5、京都
- (18) S.Maekawa、M.Sakamoto、N.enomoto、The Impact of the recently-found SNPs on liver fibrosis in chronic HBV and HCV hepatitis. 第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、

- International Sessin (Symposium)、2014.10.23、神戸
- (19) 鈴木雄一郎、坂本穰、榎本信幸、核酸アナログの発癌抑止に及ぼす影響と予後の検討、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW) (シンポジウム)、2014.10.23、神戸
- (20) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、治療反応性と薬剤耐性変異を考慮した C 型肝炎の治療戦略、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW) (シンポジウム)、2014.10.23、神戸
- (21) 小松信俊、前川伸哉、佐藤光明、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 Pre-S 領域の遺伝子学的検討、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、2014.10.23、神戸
- (22) 村岡優、坂本穰、辰巳明久、鈴木雄一郎、佐藤光明、小松信俊、三浦美香、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、榎本信幸、Fibroscan による NBNC-HCC 高危険群囲い込みと検診への応用、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、2014.10.23、神戸
- (23) 小松信俊、本杉宇太郎、佐藤光明、辰巳明久、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、市川智章、榎本信幸。EOB-MRI 肝細胞相を用いた発癌リスクの検討、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、2014.10.23、神戸
- (24) 佐藤光明、三浦美香、小松信俊、辰巳明久、中山康弘、井上泰輔、前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、次世代シーケンサーによる telaprevir 耐性変異の解析、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)、2014.10.23、神戸
- (25) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、薬剤耐性変異を考慮した C 型肝炎治療と発癌抑制からみた治療法選択、第 40 回日本肝臓学会東部会 (シンポジウム)、2014.11.27、東京
- (26) 鈴木雄一郎、坂本穰、榎本信幸、B 型肝炎における Fibroscan 測定の意義、第 40 回日本肝臓学会東部会 (パネルディスカッション)、2014.11.27、東京
- (27) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸、ウイルス性肝炎の病態進展における MICA、DEPDC5、PNPLA3 遺伝子多型の臨床的意義の検討、第 40 回日本肝臓学会東部会 (ワークショップ)、2014.11.27、東京
- (28) 佐藤光明、前川伸哉、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 sequencer による telaprevir 耐性変異と quasispecies の動態の解析、第 40 回日本肝臓学会東部会、2014.11.27、東京

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

作成上の留意事項

委託業務成果報告（業務項目）の題名及び研究者名は、様式第2「業務計画書」に記載された業務項目及び担当責任者を記入すること。

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「（倫理面への配慮）」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）に関わる状況、実験に動物対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。
なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年厚生労働省告示第425号）、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。
4. 「F. 健康危険情報」について
 - ・業務項目の担当責任者や研究協力者の把握した情報・意見等についても業務主任者がとりまとめて委託業務成果報告（総括）に記入すること。
5. その他
 - (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。
 - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。