

99.8%、②終了 1 か月後 R155Q 5.8%、D168V 56.9%、③6 か月後 D168 99.8%、④1 年後 D168 99.9%、であった。症例 G(終了後再燃)；①開始時 D168 99.9%、②終了後 1 か月後 D168V 97.1%、③6 か月後 R155Q 0.3%、D168V 9.0%、D168A 0.4%、④10 か月後 D168N 1.8%、であった。症例 H(終了後再燃)；①開始時 D168 99.8%、②終了 3 か月後、D168 99.9%、③6 か月後、D168 99.9%、④1.5 年後 D168 99.9%、であった。いずれの症例も中止後、終了後再燃例であった。1 例で開始時 D155R 0.2%が中止後 5.8%まで上昇していたが、そのほかの 4 例では、次世代シークエンサーにて開始時 D168 の耐性ウイルスは検出されなかった。1 例で終了後 1 年以降に D168V の耐性ウイルスが 33.6%認められた。

(3) Daclatasvir と asunaprevir 併用療法施行症例での asunaprevir 耐性ウイルスの検討

Daclatasvir と asunaprevir の併用療法を施行し non SVR であった症例 4 例において NS3(プロテアーゼ)領域の D168 変異についても同様に次世代シークエンサーを用いて解析した。いずれの症例も開始時 D168 の変異ウイルスは次世代シークエンサーで検出されなかったが、再燃時点では D168A/V の耐性ウイルスが検出されていた。

D. 考察

C 型慢性肝炎(genotype 1b、高ウイルス量)に対する治療としては、プロテアーゼ阻害剤と PEG-IFN と RBV 併用療法 24 週間投与またはプロテアーゼ阻害剤+NS5A 阻害剤併用療法が行われている。プロテアーゼ阻害剤である SMV または VAN と PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法は、高い SVR 率を認めている。しかし治療不成功例では、SMV または VAN の耐性ウイルスの存在が指摘されている。これらの耐性ウイルスの存在を治療開始時および治療中、終了後で高感度の測定系である次世代シークエ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 SMV または VAN 耐性ウイルスが検出された。昨年度の検討で、SMV の治療開始時では non SVR 例 6 例中 1 例のみが治療前認めた耐性ウイルスの増加を認めた。今回の VAN では、治療開始前の解析で non-SVR 例 5 例中 1 例のみ耐性ウイルスが検出された。この症例では、R155Q 0.2%が終了 1 か月後 R155Q 5.8%と増加していたが、耐性ウイルスとしては D168V 56.9%が主体であった。治療開始時の検討では次世代シークエンサーを用いても TVR、SMV、VAN いずれも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。また VAN 投与 4 例中 3 例で 1 年以降に次世代シークエンサーにて耐性ウイルスの消失を認めた。

一方、SMV 投与での早期 viral breakthrough 症例では、耐性ウイルスが 3 日目より検出され、その後は多彩な変異パターンを示す症例も認められた。これらの症例では PEG-IFN/RBV の効果が乏しく SMV に対する耐性ウイルスが早期から出現すると考えられた。

Daclatasvir と asunaprevir 併用療法施行例での non SVR 例で開始時の D168 変異を、次世代シークエンサーを用いて解析した。いずれの症例でも耐性ウイルスは検出されず、プロテアーゼ阻害剤の耐性ウイルスは治療後に新たに出現したものと考えられた。今後は、プロテアーゼ阻害剤+NS5A 阻害剤治療における NS5A 耐性ウイルスについて次世代シークエンサーを用いた解析が必要である。

E. 結論

C 型慢性肝炎に対する新規薬剤である SMV または VAN と PEG-IFN+RBV 治療例において次世代シークエンサーを用いた耐性ウイルスの存在の検討を行った。VAN では治療開始時の耐性ウイルスの存在例を認めたが、治療後の耐性ウイルスの主体ではなかった。また SMV 投与での早期 viral breakthrough 症例では、耐性ウイルスが 3 日目より検出され、その後は多彩な変異パターンを示す症例も認められた。Daclatasvir と

asunaprevir 併用療法施行例での non SVR 例で開始時の D168 変異を、次世代シーケンサーを用いて解析し、いずれの症例でも耐性ウイルスは検出されなかった。

F. 健康危険情報
特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 学会発表

1. Clinical utility of NS3/4A protease inhibitor-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. Norio A, Fumitaka S, Yushi S, Taito F, Yusuke K, Hitomi S, Yoshiyuki S, Tetuya H, Masahiro K, Satoshi S, Mariko K, Yasuji A, Kenji I, Hiromitsu K. AASLD 2014/11/11 Boston.
2. C 型慢性肝炎に対する DAAs 併用療法の治療効果、瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光。第 100 回日本消化器病学会総会 2014/4/24 東京
3. ダクラタスビル+アスナプレビル 2 剤併用療法の治療効果と治療後長期経過の検討 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光 第 40 回日本肝臓学会東部会 2014/11/27 東京

2. 論文発表

1. 田所 健一、鈴木 文孝、小林 万利子、川村 祐介、瀬崎 ひとみ、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. PCR-Invader を用いた HCV NS5A 領域 Y93H 変異検出法の開発。肝臓 2014;55:720-722.

2. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Evolution of simeprevir-resistant variants over time by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1b. J Med Virol. 2014;86:1314-22.
3. 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 detection of telaprevir-resistant variants for prediction of efficacy of treatment of hepatitis C virus genotype 1 infection. J Clin Microbiol. 2014;52:193-200.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
今回の研究内容については特になし。
2. 実用新案登録
今回の研究内容については特になし。
3. その他
今回の研究内容については特になし。

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

コア 70 番を中心とした HCV ゲノム解析口

研究分担者 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：次世代シーケンス技術を従来の PCR 法と組み合わせ、独立した HCV の全長配列を決定した。コンセンサス配列と比較することで、コア 70 番ミックス症例について解析したところ、IL28 major の場合はコア 70 番による分類が可能であり、一方 IL28 minor の場合はコア 70 番による分類は不可能であった。しかし、IFN/RBV 治療による relapse 後分類が可能となった。次世代シーケンス技術により得られた独立した HCV の全長配列をコンセンサス配列等と比較することで、そのウイルス学意義、臨床的意義についての理解につながる可能性がある。

A. 研究目的

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、独立した HCV の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。

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

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。コア 70 番のアミノ酸置換は、その存在比が治療感受性予測に重要であり、治療中に存在比が変動すること、肝発癌・インスリン抵抗性等の肝病態にも影響することが報告されているので、コア 70 番の変異に注目して解析した。コア 70 番ミックス症例について解析したところ、IL28 major の場合コア 70 番による分類は可能だが、minor の場合は不可能であった。しかし、IFN/RBV 治療による relapse 後分類が可能となった。さらに、治療前の血清を IL28Bmajor または minor のヒト肝キメラマウスに感染させて増殖した HCV の遺伝子配列について解析したところ、いずれもコア 70Q がドミナントであったが 70R クローンも分離された。HS 症例のコンセンサス株、コア 70Q 株、

70R 株の全長配列を合成し、全長構築、サブジェノミックおよび全長レプリコン構築を作製した。

□

D. 考察

コア 70 番ミックス症例について解析したところ、IL28 major の場合はコア 70 番による分類が可能であり、一方 IL28 minor の場合はコア 70 番による分類は不可能であった。しかし、IFN/RBV 治療による relapse 後分類が可能となった。来年度は、そのウイルス学意義、臨床的意義について解析するために、キメラマウスとウイルス増殖実験系による解析を目指す。

□

E. 結論

次世代シーケンス技術を従来の PCR 法と組み合わせ、独立した HCV の全長配列を決定した。コンセンサス配列等と比較することで、そのウイルス学意義、臨床的意義についての理解につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. *J Biol Chem*. 2014 30. pii: jbc.M114.602540.
- 2) Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus. *J Virol*. In press
- 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) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2014 95:2658-67.
- 5) Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of Hepatitis C Virus Genotype 3a Cell Culture System. *Hepatology*. 2014 60:1838-50.
- 6) Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2014 12;9(5):e97078. doi:10.1371/journal.pone.0097078.
- 7) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Alyl HH, Fukasawa M, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and Identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP, *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443:808-13.
- 8) Gilmore JL, Aizaki H, Yoshida A, Deguchi K, Kumeta M, Junghof J, Wakita T, Takeyasu K. Nanoimaging of ssRNA: Genome Architecture of the Hepatitis C Virus Revealed by Atomic Force Microscopy. *J Nanomed Nanotechnol*. 2014; doi:10.4172/2157-7439.S5-010
- 9) 相崎英樹, 松田麻未, 藤本陽, 脇田隆宇. HCV 研究の最先端, HCV 感染実験系における代謝変化. *臨床消化器内科*, 東京:日本メディカルセンター, 2014;29;810-13.

2. 学会発表

- 1) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokamai M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and ITS application to drug development. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 2) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 3) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 4) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Suzuki R, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T. Japanese encephalitis virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 5) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single domain intrabodies against HCV core inhibit viral propagation and core-induced NF- κ B activation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 6) Watanabe N, Date T, Kono T, Aizaki H, Wakita T. Identification of an important envelope region by competitive inhibition experiment with envelope peptides. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 7) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T. Maintenance of HCV infectivity by down-regulating hepatic lipase expression. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 8) Goto K, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. NS5A-associated membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, regulates hepatitis C virus RNA synthesis and translation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 9) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Kamisuki S, Sugawara F, Wakita T. Flutamide Inhibits Hepatitis C Virus Assembly

- through Disrupting Lipid Droplets. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 10) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 11) Hmwe SS, Suda G, Sakamoto N, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Aizaki H, Wakita T. Construction of novel infectious genotype 2b culture system. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
 - 12) Wakita T, Kong L, Aizaki H. Regulation of viral lifecycle in hepatitis C virus infection. Dynamic interplay between viruses and their hosts, Yokohama, Nov, 2014
 - 13) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoic acid receptor plays an important role in mediating hepatitis B virus infection through regulation of NTCP expression. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014
 - 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、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 HCV 作用 - phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程に与える影響 -。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
 - 15) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B 型肝炎ウイルス (HBV) L タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
 - 16) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス粒子の構築を阻害する flutamide の作用機序の解析。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
 - 17) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。HBV 感染受容体 NTCP の発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗 HBV 効果。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
 - 18) 渡士幸一、相崎英樹、脇田隆字。培養系を用いた抗 B 型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
 - 19) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、鈴木亮介、渡士幸一、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、脇田隆字。グリチルリチンによる抗 C 型肝炎ウイルス作用 - phospholipase A2 および Autophagy による HCV 分泌過程の制御 -。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
 - 20) 脇田隆字、相崎英樹、渡士幸一。C 型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
 - 21) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田

- 隆宇、深澤征義、小祝修、楠原洋之。ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析。第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014 年 5 月
- 22) 渡邊則幸、伊達朋子、河野環、溝上雅史、相崎英樹、脇田隆宇。E1 ペプチドによる HCV 感染阻害機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 23) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆宇。Aryl hydrocarbon receptor による脂肪滴形成及び C 型肝炎ウイルス粒子構築の制御。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 24) Lingbao Kong、青柳春代、松田麻未、藤本陽、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、堂前直、鈴木健裕、鈴木哲朗、脇田隆宇、相崎英樹。Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 25) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、Jesus Izaguirre-Carbonell、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆宇。天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor による C 型肝炎ウイルス産生制御機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 26) 岩本将士、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆宇。効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 27) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、杉山 真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆宇。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 28) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本 徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆宇。遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 29) 渡士幸一、Sluder Ann、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Borrito-Esoda Katyna、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆宇。B 型肝炎ウイルス (HBV) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 30) 嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未、長谷川慎、渡士幸一、相崎英樹、中村紀子、小西英二、加藤孝宣、田島茂、高崎智彦、竹山春子、脇田隆宇、鈴木亮介。日本脳炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス 2 価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

G. 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

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。C型肝炎ウイルス感染患者のなかでも長期にわたって異常を来さない患者群と進行した肝疾患へ進展する患者群が存在する。今回、これらの患者群間でDPB1遺伝子領域の特定のSNPに違いあることがわかった。さらに同遺伝子のRNA発現にも有意差があることが判明した。

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、control群26例、C型肝炎患者23例（無治療経過観察しているキャリア群11例：A群、進行した肝障害を伴う患者群12例：B群、合計49症例）を対象として各々23個のSNP解析を行った。さらに、Taqman® Gene Expression Assaysを用いてDPA1, DPB1, DQA1, DQB1, DRB1のmRNA定量を行い、上記SNPの結果と併せて解析した。

（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) 解析したSNPのうち有意なアレル頻度の違いがみられたのは、control群とC型肝炎群（A群+B群）の比較で4つ（rs872956, rs3128921, rs3128923, rs910049 いずれも $p < 0.05$ ）であった。さらにA群とB群の比較では2つ（rs2071025, $p = 0.001$ とrs3116996, $p = 0.002$ ）であり、これらはいずれもDPB1遺伝子領域のSNPであった。次にRNA発現量について、control群とC型肝炎群（A群+B群）の比較ではDPB1（mean 181 ± 84 vs 354 ± 197 , $P = 0.0005$ ）にて有意な違いがみられ、A群とB群の比較ではDPA1（mean 32 ± 6.6 vs 41 ± 13 , $P = 0.038$ ）、DPB1（mean 33 ± 105 vs 465 ± 200 , $P = 0.001$ ）、DRB1（mean 18 ± 60 vs 413 ± 680 , $P = 0.03$ ）にて有意な違いがみられた。

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、肝癌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、肝癌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。C型肝炎ウイルス感染患者のなかでも長期にわたって異常を来さない患者群と慢性肝炎から肝硬変、肝癌へと進展する患者群が存在する。今回、これらの患者群間でDPB1遺伝子領域の特定のSNPに違いあることがわかった。さらに同遺伝子のRNA発現にも有意差があることが判明した。ウイルスに対する宿主免疫反応において、HLA-class II関連遺伝子、特にDPB1遺伝子のSNPおよびRNA発現が病態の進行に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

C型肝炎患者において、HLAクラスII領域SNP、特にDPB1遺伝子領域の特定の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 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. **Mol. Clin. Oncol.** 2014; 2: 1028-1034.
- 2) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y and Nakatsura T: A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. **Int. J. Oncol.** 2014; 46: 497-504.
- 3) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S: Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 2014; 60: 1674-1685.
- 4) 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; 63: 347-356.
- 5) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H,

Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A, Nakamuta 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. **Hepatol. Res.** 2014 ; 44: 1299-1307.

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Hiramatsu K, Nemoto T, Suto H, Kaneko S: Identification of Hypermethylation and Non-Synonymous Mutations in Genes Down-Regulated during the Process of Hepatocarcinogenesis in a Model of Chronic Hepatitis B. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 637A; 一般; poster: Nov. 9, 2014.
- 2) Naito T, Baba T, Mukaida N, Nakamoto Y: Cytotoxic CD4+ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 497A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 3) Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Shimomura M, Nakamoto Y: Identification of a Novel HLA-A2 Restricted Immunotherapeutic Target Derived from an EGFR Mutated Antigen for the Treatment of Metastatic Liver Tumors. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 508A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 4) Matsuda H, Naito T, Nosaka T, Nemoto T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Cellular, Humoral, and Innate Immune Responses following Immunosuppressive Chemotherapies Responsible for Hepatitis B Virus Reactivation. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 1039A; 一般; poster: Nov. 11, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

次世代シーケンス技術による薬剤耐性変異の解析とプロテアーゼ 3 剤併用療法の治療効果

担当責任者：朝比奈靖浩・東京医科歯科大学肝臓病態制御学・教授

研究要旨：【目的】本研究では次世代シーケンスを用い治療開始前後におけるDAA耐性変異の動態を解析し、治療予後との関連について検討を行った。【方法】テラプレビルまたはシメプレビル3剤併用療法を施行した、genotype 1b高ウイルス症例20例を対象として、治療前および治療開始後1週間におけるNS3領域とNS5A領域のdeep sequenceを行った。【成績】DAA製剤の投与歴のない症例でもNS3またはNS5A耐性変異株をそれぞれ85%、87%の症例に認めた。初回治療例、前治療再燃例においてはDAA耐性株の存在は治療効果に影響を与えなかった。一方前治療無効症例、すなわちIFN抵抗例においては治療開始早期または治療後再燃時にNS3耐性株が野生株よりも優位となる症例があった。【結論】IFN応答性が極めて不良な症例では治療前に微量に存在する薬剤耐性ウイルスが治療成績に影響する可能性が示唆された。今後IFNを用いない治療では、治療前に存在する微量の薬剤耐性ウイルスが治療効果に影響を与える可能性がある。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス直接阻害剤（DAA）の登場により C 型慢性肝炎治療のウイルス学的著効（SVR）率は向上したが、DAA 耐性変異株による治療効果への影響が報告されている。本研究では次世代シーケンスを用い治療開始前後における DAA 耐性変異の動態を解析し、治療予後との関連について検討を行った。

B. 研究方法

当院において 3 剤併用療法（テラプレビルまたはシメプレビル /PEG-IFN/RBV）を施行した、genotype 1b 高ウイルス症例 20 症例について治療前および治療開始後 1 週間以内に採取した患者血清から HCV-RNA を抽出し、NS3 領域と NS5A 領域の deep sequence を行った。DAA 耐性部位として NS3 (V36A/M、T54A、R155K/T/Q、A156S/V/T、V170A)、NS5A (L31M/V、Y93H) について解析し、耐性変異株出現と治療予後の関連について検討した。治療後再燃又はブレイクスルー症例について再燃時の DAA 耐性変異株についても追加解析した。

（倫理面への配慮）

所属施設での倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

治療完遂した 20 症例（テラプレビル 12 例、シメプレビル 8 症例）中、SVR は 13 例、治療終了後再燃を 6 例、ブレイクスルーは 1 例認めた。

NS3 耐性株の解析において初回治療および前治療再燃例では治療前、治療開始早期の解析にて 13 例中 10 例に 1%以下の NS3 領域の耐性株を認めたがそのうち 8 例は SVR となった。前治療無効例においては 7 例中 2 例のみ SVR となり、治療前の解析では低率（0.1～1.29%）ながら全例に耐性株が存在した。治療開始早期の解析では治療後再燃例のうち 2 例に A156S 株の増加（87.5%、53.6%）を認めた。この 2 例においては再燃時の解析でも耐性株が優勢のまま推移していた。また治療後再燃例の 1 例において再燃時の解析で治療前、治療開始早期にはみられなかった A156S 株の増加（91.3%）を認めた。NS5A の治療前の解析では L31M を 5 例（0.14～98.74%）、Y93H を 12 例（0.11～59.31%）認めた。そのうち治療後再燃またはブレイクスルーとなった 7 症例では L31M を 2 例（0.14～98.74%）、Y93H を 5 例（0.11～9.74%）認めたが、ダイレクトシーケンスでは治療前後の耐性株の変化はみられなかった。

D. 考察

DAA 製剤の投与歴のない症例でも NS3 または NS5A 耐性変異株をそれぞれ 85%、87%の症例に認めた。初回治療例、前治療再燃例においては DAA 耐性株の存在は治療効果に影響を与えなかった。一方前治療無効症例、すなわち IFN 抵抗例においては治療開始早期または治療後再燃時に NS3 耐性株が野生株よりも優位となる症例

があった。今回の NS3 阻害剤で治療不成功となった症例において 7 例中 6 例に NS5A 耐性株が存在し、次回の再治療時における DAA 製剤の選択には注意を要すると考えられた。

E. 結論

IFN 応答性が極めて不良な症例では治療前に微量に存在する薬剤耐性ウイルスが治療成績に影響する可能性が示唆された。今後 IFN を用いない治療では、治療前に存在する微量の薬剤耐性ウイルスが治療効果に影響を与える可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakawa M*, [Asahina Y](#)*, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kitazume-Kusano A, Watanabe T, Kawai-Kitabatake F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai N, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. *MM and YA contributed equally to this work. Impaired induction of IL28B and expression of IFN λ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 doi: 10.1111/jgh.12902.
2. 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* 2014; 120: 229–273.
3. Tsuchiya K, [Asahina Y](#), Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2014; 20: 291–297.
4. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, [Asahina Y](#), Enomoto N, Arii S, Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. *Oncology* 2014; 86: 53–62.
5. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzuka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, [Asahina Y](#), Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res* 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421.
6. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, 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, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; 9: e86449.
7. 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* 2014; 44: 319–326.
8. 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.
9. 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* 2014; 44: 720–727.

2. 学会発表

1. Kawai-Kitahata F, [Asahina Y](#), Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Gene alterations in β -catenin and p53/ cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
2. Nakagawa M, [Asahina Y](#), Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y,

- Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based- direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
3. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN/4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 4. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, YItsui Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 5. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Azuma S, Asahina Y, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase-14 regulates the maturation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 6. Tsuchiya K, Yasui Y, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Clinical outcomes in patients who develop hepatocellular carcinoma after hepatitis C viral eradication by antiviral therapy. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 7. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Yamamoto K, Sasazuki T, Sugiyama M, Seto W, Yuen M, Poovorawan Y, Ahn SH, Han K, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang J, 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, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 8. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN λ 4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
 9. Tsuchiya K, Yasui Y, Takada N, Nakakuki S, Matsuda S, Kaneko S, Muraoka M, Yamashita N, Hattori N, Tamaki N, Osaki S, Suzuki T, Hosokawa K, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriaminepentaacetic acid magnetic resonance imaging and contrast enhanced ultrasonography with sonazoid as part of therapeutic strategies for small nonhypervascular hepatic nodular lesions. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
 10. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
シンポジウム 難治性 C 型慢性肝炎に対するプロテアーゼ 3 剤併用療法の治療効果と DAA 耐性変異の検討
第 40 回日本肝臓会東部会
東京, 2014 年 11 月
 11. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺 守
シンポジウム NS3 および NS5A 阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル 3 剤併用療法の治療効果
第 50 回日本肝臓会総会
東京, 2014 年 5 月
 12. 朝比奈靖浩
公聴会 NS3 および NS5A 阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル 3 剤併

- 用療法の治療効果
第 50 回日本肝臓会総会
 東京, 2014 年 5 月
13. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 パネルディスカッション C 型慢性肝炎に
 対するインターフェロンをベースとしたプ
 ロテアーゼ 3 剤併用療法の治療効果と DAA
 耐性変異の検討
第 19 回日本肝臓会大会
 神戸, 2014 年 10 月
14. 櫻井幸, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 パネルディスカッション B 型慢性肝疾患
 における核酸アナログ治療中の肝発癌危険
 因子の検討
第 40 回日本肝臓会東部会
 東京, 2014 年 11 月
15. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 ワークショップ 高齢者 C 型慢性肝炎への
 IFN 治療後発癌と発癌に関与する因子の解
 析
第 19 回日本肝臓会大会
 神戸, 2014 年 10 月
16. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 ワークショップ ウイルス性急性肝炎およ
 び de novo B 型肝炎の動向
第 40 回日本肝臓会東部会
 東京, 2014 年 11 月
17. 東正新, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 ワークショップ 肝細胞癌スクリーニング
 時における拡散強調画像陽性所見の重要性
- 第 40 回日本肝臓会東部会**
 東京, 2014 年 11 月
18. 村川美也子, 朝比奈靖浩, 中川美奈, 後藤文男,
 大谷賢志, 河合富貴子, 谷口未樹, 新田沙由
 梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 井津井康浩, 東正新,
 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺 守
 ワークショップ C 型慢性肝炎治療におけ
 る IFN 不応性に関わる IL28B 近傍遺伝子多
 型(SNP)と血球内 IFN λ 産生能の関連
第 50 回日本肝臓会総会
 東京, 2014 年 5 月
19. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 ワークショップ インターフェロン治療後の
 線維化マーカーの推移と発癌リスクの検討
第 50 回日本肝臓会総会
 東京, 2014 年 5 月
20. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
 ワークショップ 次世代プロテアーゼ阻害
 剤併用 3 剤治療の適応症例の検討
第 100 回日本消化器病学会総会
 東京, 2014 年 4 月
- H. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

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

分担研究者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

分担研究課題：HCV ゲノム変異解析プラットフォームの開発

研究要旨：

C型慢性肝炎の約1/3から1/2の症例では、HCVの構造領域の蛋白質(core, envelope 領域)を欠損したウィルスクローン(欠損型クローン)が完全長ウィルスクローンと共感染しており、肝組織へのHCVの新規感染時には完全長ウィルスクローンが複製増殖するのに対し、慢性期では欠損型クローンが感染ウイルスの中心となっていることが明らかになった。次世代シーケンサーを用いた大規模ウィルスクローン解析からは、HCVに対する経口剤治療薬に対する薬剤耐性変異を保有する頻度が完全長ウィルスと欠損型ウィルスで異なっている症例が存在することもわかってきた。以上の研究成果から、欠損型クローンがC型慢性肝炎に対する抗HCV経口剤治療への感受性を左右する要因となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の多彩なウィルスクローン構成が、HCV感染時の病態形成や抗ウイルス治療への感受性・抵抗性と深く関連することが知られている。我々のこれまでの研究成果から、C型慢性肝炎の約1/3~1/2の症例では、構造領域から非構造領域までのすべてのウィルス蛋白質を有する完全長ウィルスのみ感染が成立しているのではなく、大部分の構造領域(core, envelope 領域)を欠失した非構造領域のみのウィルスゲノムをもつ欠損型クローンも共感染していることが明らかとなってきた。*In vitro*のHCV感染実験からは、これらの欠損型クローンは完全長HCVと同時に感染することにより、ウィルス粒子の形成過程で完全長ウィルスの産生した構造領域の蛋白質を共有し、ウィルス粒子内に packaging されていることが示されている。すなわち、

C型慢性肝炎症例において完全長ウィルスとともに欠損型クローンの同時感染を有する症例では、肝細胞におけるHCVの複製・増殖・ウィルス粒子形成と血中への放出というすべてのウィルスのライフサイクルに、欠損型ウィルスが関与しているものと考えられる。興味深いことに、ペグインターフェロン(peg-IFN)とリバビリンの併用療法に際して、欠損型ウィルスクローンを有する症例では、完全長ウィルスのみ感染病態となっている症例と比較すると、治療後の血中HCV RNAの低下速度が遅く、最終的な治療への反応性も乏しい例が多いことが確認されている。これは、欠損型ウィルスクローンの存在が、抗ウイルス療法への反応性を規定するウィルス側の因子としての重要な役割を果たしている可能性があることを示唆している。

そこで、本研究課題では、次世代シーケ

ンサーを用いた大規模ウイルスゲノム解析法を活用し、構造領域のウイルスゲノムを欠損した HCV クロオンが HCV に対する新しい経口剤治療に際しての薬剤耐性に関与する可能性を詳細に検討することを目的とし、peg-IFN、リバビリンとプロテアーゼ阻害剤を用いた 3 剤併用療法を実施された C 型慢性肝疾患症例の血中ならびに肝組織中に検出される全長型、欠損型それぞれの HCV クロオンのゲノム解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象 ;

C 型慢性肝炎に対して、シメプレビル、peg-IFN、リバビリンを用いた 3 剤併用療法が行われた genotype 1b 症例のうち、治療後再燃例ならびに治療無効例の感染 HCV を検討対象とした。

血清検体は、それぞれ 3 剤併用療法の治療導入前、治療開始 4 週間以内、再燃時、あるいは breakthrough 時の血清サンプルから HCV RNA を増幅し、薬剤耐性変異の推移の検討を行った。

2. 方法 ;

各症例の血清を用い、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) の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 クロオンの塩基配列を同定するために新たに 2 種類の primer を作成し、特異的な RT-PCR 増幅を行った。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 クロオンの欠失領域の前後の配列、ならびに NS3 領域の既知の薬剤耐性変異部位の塩基配列を決定した。

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。

C. 研究結果

シメプレビル+peg-IFN+リバビリン 3 剤併用療法を実施し、再燃あるいは無効と判定された 20 例の C 型慢性肝疾患症例の、治療前ならびに治療中の breakthrough 時、あるいは無効例のウイルス量再上昇時の血中 HCV RNA を抽出し、完全型、欠損型それぞれについて次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。まずはじめに、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、無効例のウイルス量再上昇時の 2 症例の血清から増幅した HCV RNA において、HCV の構造領域 (core から NS2 の中間にかけて) の遺伝子配列に限局した coverage の減少を認める症例の存在が確認され、完全長ウイルスとともに欠損型クローンが併存して治療抵抗性を示していることが示唆された。この所見に一致して、HCV RNA の 5'側ウイルスゲノムの前半部分 (~5,000bp: 5'非翻訳領域~NS3 了以尅岐) のウイルス配列を増幅したところ、構造領域の欠損した塩基長のウイルスゲノムが確認された。そこで、これらの欠損型クローンと併存する全長型クローンを個々に template として、既知のプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異部位の deep sequencing 解析を実施した。症例# 1 の場合、3 剤治療開始 11 週間後にウイルス量が再上昇をきたした際の血中 HCV ゲノムにおいて、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異である R155K/T/Q, A156T/V/S はいずれも検出されなかったが、Q80R/K は全長型が 42%、欠損型クローンが 82% の頻度で耐性変異を有していた。同様に、D168V/A/E については全長型が 84%、欠損型クローンが 97% の頻度で耐性変異を有しており、特にシメプレビル治療の成否に大きな影響を与えうる D168V/A/E については全長型と欠損型クローンで大きな存在頻度の差を認めなかった。これに対して、症例# 2 では、治療無効と判断されたウイルス量再上昇時の血中のウイルス解析において、Q80R/K, R155K/T/Q, A156T/V/S はいずれも検出されなかったが、D168V/A/H

については、全長型が D168V を 46%、欠損型クローンが 91% の頻度で耐性変異を有しており、さらに全長型は D168H も 17% の頻度で有していることが確認された。

D. 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わかってきた。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。さらに今回の結果から、プロテアーゼ阻害剤 + peg-IFN + リバビリン 3 剤治療に際してのプロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異は、全長型 HCV のみならず欠損型クローンが保有している症例が存在し、いずれの薬剤耐性の実臨床における抗ウイルス療法に対する治療抵抗性に関与しているかを考慮する必要があるものと推定された。

E. 結論

C 型慢性肝炎症例の血清ならびに肝組織中に存在する欠損型 HCV クローンが、経口抗 HCV 薬を加えた治療戦略の中で、薬剤抵抗性に関与する可能性があるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014. 146(1): 222-232.
- 2) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Hga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014. 97: 344-350.
- 3) Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. *J Hepatology*. 2014. 61: 492-501.

2. 学会発表

- (1) Ohtsuru S, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Infectivity and clinical significance of defective hepatitis C virus clones in chronic hepatitis C patients. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2015.3.12-15, Istanbul.
- (2) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therap. The 11th JSH Single Topic Conferences, 2014.11.20, Hiroshima.
- (3) 大鶴繁、上田佳秀、犬塚義、千葉勉、丸澤宏之. C型慢性肝炎における欠損型HCVの感染病態と臨床的意義. 第24回抗ウイルス療法研究会総会 2014.5.7-9. 山梨.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

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（平成26年度）

次世代シーケンサーによるDAA耐性ウイルスの検討

分担研究者 今村 道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：C型肝炎患者およびHCV感染マウスを用いて、NS5A阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤耐性変異の存在および頻度を次世代シーケンサーにて解析し、ダクラタスビル+アスナプレビル療法の効果との関連を検討した。Genotype 1b型C型肝炎患者においてダクラタスビル+アスナプレビル療法前26例中16例で0.2%以上のNS5A Y93変異が検出された。NS5A Y93変異が検出されなかった10例では全例でダクラタスビル+アスナプレビル療法によってSVRが得られた。NS5A Y93変異が0.2-18%の症例が6例存在したが全例でSVRが得られた。NS5A Y93変異が21.9-100%の症例が7例存在し、うち3例（43%）でSVRが得られた。NS3 D168変異とダクラタスビル+アスナプレビル療法の効果との関連はヒト肝細胞キメラマウスを用いて行った。4頭のマウスに種々の割合のNS3 D168変異型 genotype 1b型HCVを感染させ、ダクラタスビル+アスナプレビルを4週間投与したところ、投与中にすべてのマウスで血中HCVは陰性化した。投与前のNS3 D168変異が3.3%および13.2%であった2頭のマウスでは投与終了9週間後まで血中HCVは陰性であり、ウイルス排除が得られたと思われる。一方、NS3 D168変異が57.7%および86.1%であった2頭のマウスでは投与終了1週間および3週間後に血中HCVは再陽性化し、その後ウイルス量は増加した。C型肝炎患者およびHCV感染マウスを用いた検討から、薬剤耐性変異が存在していても、その頻度が少ない場合はダクラタスビル+アスナプレビル療法が有効である可能性が示された。

A. 研究目的

Genotype 1型C型肝炎患者に対しIFN非使用のダクラタスビル+アスナプレビル療法が行われおり、高い治療効果が期待されるが、耐性変異の問題がある。C型肝炎患者およびHCV感染マウスを用いて、NS5A阻害剤あるいはプロテアーゼ阻害剤

耐性変異の存在と頻度を次世代シーケンサーにて解析し、ダクラタスビル+アスナプレビル療法の治療効果との関係を検討した。

B. 研究方法

ダクラタスビル+アスナプレビル療法

を行ったDAA未治療のgenotype 1b型C型肝炎患者26例を解析対象とした。治療前のNS5A Y93のアミノ酸配列を次世代シーケンサー (Ion Torrent) によるdeep sequenceにて解析し、治療効果との関連を検討した。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。また4頭のヒト肝細胞キメラマウスを用いて、種々の割合のNS3 D168変異型HCV感染マウスを作成し、ダクラタスビル (10 mg/kg, 1日1回) とアスナプレビル (40 mg/kg, 1日2回) を4週間連日併用で経口投与した。治療終了後、経時的に血中HCV RNAをreal-time PCRにて測定し、治療前の耐性変異の割合と治療効果の関連について検討した。

C. 結果

Genotype 1b型C型肝炎患者において、ダクラタスビル+アスナプレビル療法前、26例中16例で0.2%以上のNS5A Y93変異が検出された。NS5A Y93変異が検出されなかった10例では全例でダクラタスビル+アスナプレビル療法によってSVRが得られた。NS5A Y93変異が0.2-18%の症例が6例存在したが全例でSVRが得られた。NS5A Y93変異21.9-100%の症例が7例存在し、うち3例 (43%) でSVRが得られた。

4頭のヒト肝細胞キメラマウスに種々の割合のNS3 D168変異型genotype 1b型HCVを感染させ、ダクラタスビル+アスナプレビルを4週間投与したところ、投与中にすべてのマウスで血中HCVは陰性化した。投

与前のNS3 D168変異が3.3%および13.2%であった2頭のマウスでは投与終了9週後まで血中HCVは陰性であり、ウイルス排除が得られたと思われた。一方、NS3 D168変異が57.7%および86.1%であった2頭のマウスでは投与終了1週後および3週後に血中HCVは再陽性化し、その後ウイルス量は増加した。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いたdeep sequenceにより、NS3 D168, NS5A Y93変異などの薬剤耐性変異の存在および頻度が明らかになる。C型肝炎患者において、NS5A Y93変異が検出されない症例では高い確率でダクラタスビル+アスナプレビル療法によりSVRが得られた。Y93変異が検出されてもその頻度が低ければSVRが得られるが、頻度が高い症例では、SVR failureとなる可能性が高くなるものと思われた。マウスを用いた検討により、NS3 D168変異も低い頻度であればダクラタスビル+アスナプレビル療法によりHCVの排除が期待できる可能性が示された。

E. 結論

次世代シーケンサーによるdeep sequenceは、DAA製剤に対する耐性変異株の存在の検討に有効である。薬剤耐性変異の頻度が少ない場合は、ダクラタスビル+アスナプレビル療法が有効な可能性がある。

F.健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultra deep sequencing study of HCV genotype 1 in chronic hepatitis patients treated with daclatasvir, peg-interferon and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 58(4): 2105-12, 2014

2) Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients

infected with hepatitis C virus genotype 1.

22(2): 156-63, 2015

2. 学会発表

1) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎患者におけるDAA耐性株の検討-DAA併用療法を見据えて-. 2014年4月26日. 第100回日本消化器病学会総会, 東京

2) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤+NS5A阻害剤併用療法の治療効果および耐性株の検討. 2014年5月26日. 第50回日本肝臓学会総会, 東京

3) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤+NS5A阻害剤併用療法の治療効果. 2014年10月23日. 第18回日本肝臓学会大会, 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし