

厚生科学研究委託費（肝炎等克服緊急対策研究事業） 分担研究報告書

研究テーマ名 次世代シーケンス技術を用いた DAA 耐性変異 HCV の検出

研究分担者 前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

研究要旨：近年、C 型肝炎ウイルス（HCV）に対して、顕著な抗ウイルス効果を示す多数の DAA (direct antiviral agent) が開発され、これらの組み合わせによる様々な臨床試験が進み、また一部の DAA においてはすでに臨床の場に用いられつつある。一方で、DAA 治療においては耐性変異の出現が問題となっている。すなわち DAA は HCV の特定の限られたウイルス領域をターゲットとしており、異なる DAA 間で交差耐性を示す多剤耐性変異出現が容易に起こりうる懸念されている。このような多剤耐性変異 HCV の問題克服に向けて、本研究では deep sequence、direct sequence の手法を用いて、DAA 耐性 HCV の臨床意義について明らかとすべく、さらには高感度かつ簡便な耐性 HCV 検出系を確立することを目指してゆく。H26 年度においては、DAA 未投与症例における NS5A 阻害剤耐性のプロファイル解析にて、特に NS5A-Y93 番変異が多く混在すること、さらに NS5A 阻害剤耐性変異は IL28B SNP major type (TT) 症例に多く、内因性インターフェロンと耐性変異の関連することを示した。また deep sequence との比較における direct sequence の Y93H 変異検出の感度・特異度について明らかとした。

A. 研究目的

近年、C 型肝炎ウイルス（HCV）に対して、顕著な抗ウイルス効果を示す多数の DAA (direct antiviral agent) が開発され、これらの組み合わせによる様々な臨床試験が進み、また一部の DAA においてはすでに臨床の場に用いられつつある。一方で、DAA 治療においては耐性変異の出現が問題となっている。すなわち DAA は HCV の特定の限られたウイルス領域をターゲットとしており、異なる DAA 間で交差耐性を示す多剤耐性変異出現が容易に起こりうる懸念されている。

HCV は遺伝子変異を高頻度起こし宿主体内において複雑な変異体の集合 (quasispecies) を形成しているが、DAA 耐性変異 HCV の解析においても、quasispecies の詳細な解析を通じた検討は不可欠と考えられる。

このような多剤耐性変異 HCV の問題克服に向けて、本研究では近年大きく進歩した deep sequence の手法を用いて、DAA 耐性 HCV の臨床意義について詳細に明らかとすべく、その一方で、高感度かつ簡便な耐性 HCV 検出系を確立することを目指してゆく。

B. 研究方法

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 relapser 30 例、null-responder 21 例)、NS5A 領域の daclatasvir 耐性変異を deep sequencer を用いて解析した。

(2) NS3 領域におけるプロテアーゼ阻害剤耐性変異の検討：PEG-IFN/RBV/テラプレビル 3 剤併用療法を導入した genotype 1b、高ウイルス量

の C 型肝炎患者 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。

(3) NS5A-Y93H の検出に関して、deep sequence とダイレクトシーケンスを同時に行った 80 症例に注目し、Deep sequence を基準とした場合のダイレクトシーケンスの感度と特異度について検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究の遂行においては山梨大学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。

C. 研究結果

(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、breakthrough 1 例、再燃 2 例、NVR 2 例であった。non-SVR 8 例中 5 例 (62.5%) で明確な耐性変異を有したと考えられた。2 例で治療前に耐性

に關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。

(3)Deep sequenceでY93H（変異型）を25%以上混在すると判定された症例は全例 direct sequenceで検出可能であった。一方、deep sequenceでY93Hの混在が25%未満の場合にはdirect sequenceでの検出感度は40%であった。しかしながらdirect sequenceでY93Hの混在が検出された症例はdeep sequenceでもY93Hの混在を認めており、direct sequenceによるY93Hの混在診断の特異性は高かった。

D. 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ようになった。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。耐性変異検出に関して、簡便に測定可能なdirect sequence法は有用な方法であることが明らかとなった一方で、その感度に関してはさらなる方法の確立が必要なが考えられた。

E. 結論

本年度の検討により、ウイルスゲノムの混在状態を詳細に検討することで以下の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。

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。

耐性HCV検出において、精度は高いが手技の煩雑なdeep sequence、簡便なものの感度に劣るdirect sequence両方の欠点を補う新たな変異検出システムが望まれること。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J Virol.* 2014 Nov 15;88(22):13352-66.
- 2) 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 Res.* 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]
- 3) Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology Res.* 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]
- 4) 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. *Hepatology Res.* 2014 Dec;44(13):1339-1346.
- 5) 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 Jan;49(1):163-4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（ 予定を含む ）

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

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、実験に動物に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16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. 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。