

C型肝炎

治療のための

Direct
Acting
Antiviral

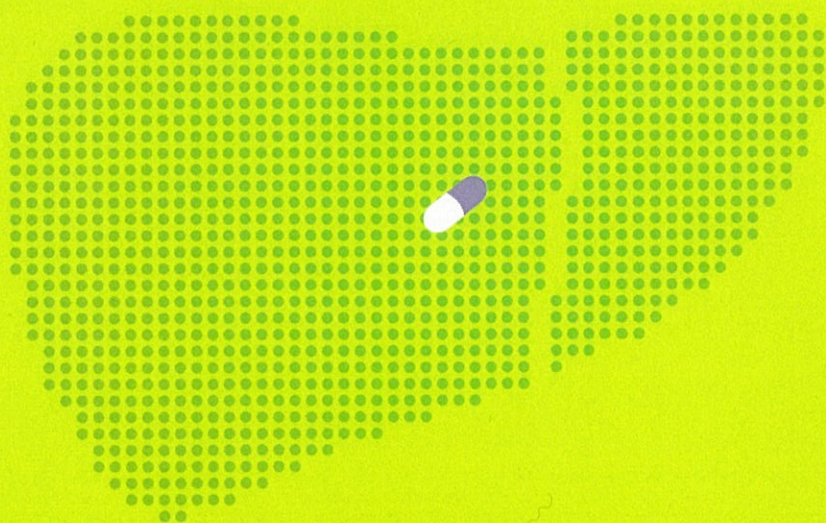
DAA

の使い方

編集

帝京大学医学部内科学講座教授

田中 篤



文光堂

4

耐性変異への対策

概要

C型肝炎ウイルス hepatitis C virus (HCV) に対する抗ウイルス療法は、直接作用型抗ウイルス薬 direct acting antiviral (DAA) の開発により急速に進歩した。現在、薬剤の標的となっているのは、非構造 non-structural (NS) 領域に存在する HCV NS3-4 プロテアーゼ、NS5A 蛋白、NS5B ポリメラーゼであり、それぞれに対する、HCV NS3-4 プロテアーゼ阻害薬、NS5A 阻害薬、NS5B ポリメラーゼ阻害薬が使用可能である (図1)。しかし、HCV は1本鎖のRNAウイルス

であり、ウイルスゲノムの修復機構を持たないため、複製・増殖の過程で高率にアミノ酸変異が出現しウイルスゲノムが変化する。薬剤への曝露があると、薬剤存在下でも増殖可能なウイルスが選択もしくは誘導されて容易に薬剤耐性を獲得する (図2)。しかし、薬剤への曝露がなくとも、もともと薬剤に結合能が弱いなどの理由による、「自然獲得」薬剤耐性変異株 resistance-associated variants (RAV) が一定の頻度で存在することが明らかになっている (図3)¹⁾。

DAA 製剤と耐性変異

1 NS3-4 プロテアーゼ阻害薬

HCV NS3 蛋白はプロテアーゼ活性、およびウイルス複製時に合成される2本鎖RNAを解くヘリカーゼ活性をもつ。HCV 前駆体蛋白は自身の持つNS3-4プロテアーゼにより非構造蛋白であるNS3とNS4A、NS4AとNS4B、NS4BとNS5A、NS5AとNS5Bとに切断され機能蛋白となる。このため、NS3はウイルス増殖に重要な機能をもつことが早くから想像されており、早期に結晶化に成功したNS3-4プロテアーゼの立体構造をもとにNS3-4プロテアーゼ阻害薬が開発された。この薬剤は線状構造をとる第1世代薬剤と環状構造を持つ第2世代薬剤に分類され、前者にはテラプレビル telaprevir (TVR)、後者には

シメプレビル simeprevir (SMV)、バニプレビル vaniprevir (VAN)、アスナプレビル asunaprevir (ASV)、パリタプレビル paritaprevir (PTV) が含まれる。このうち、TVRはペグインターフェロン peginterferon (Peg-IFN) およびリバビリン ribavirin (RBV) と併用して genotype 1型、および genotype 2型のHCVに用いられ、SMV、VANは同様に Peg-IFN+RBV との併用で genotype 1型のHCVに用いられる。また、ASVとPTVはNS5A阻害薬と併用で、インターフェロン (IFN) を用いないDAAのみの「IFN-free」の薬剤として genotype 1型HCVに用いられ、genotype 1b型には有効であるが genotype 1a型では効果が劣る。

NS3-4プロテアーゼ阻害薬の薬剤耐性変異とし

図1 C型肝炎ウイルスと直接作用型抗ウイルス薬(DAA)

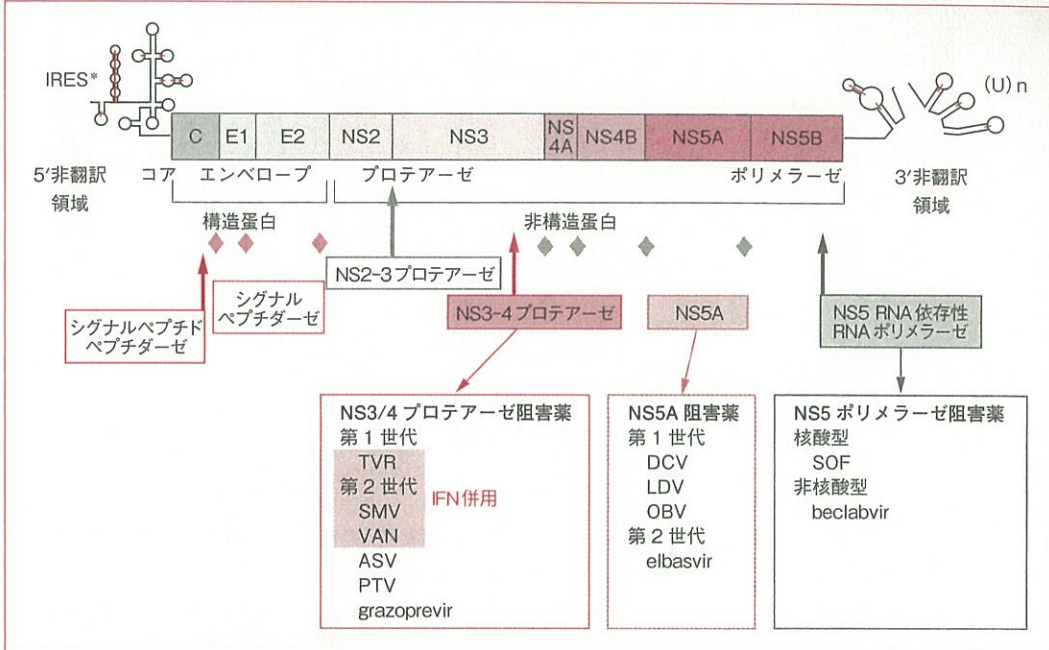
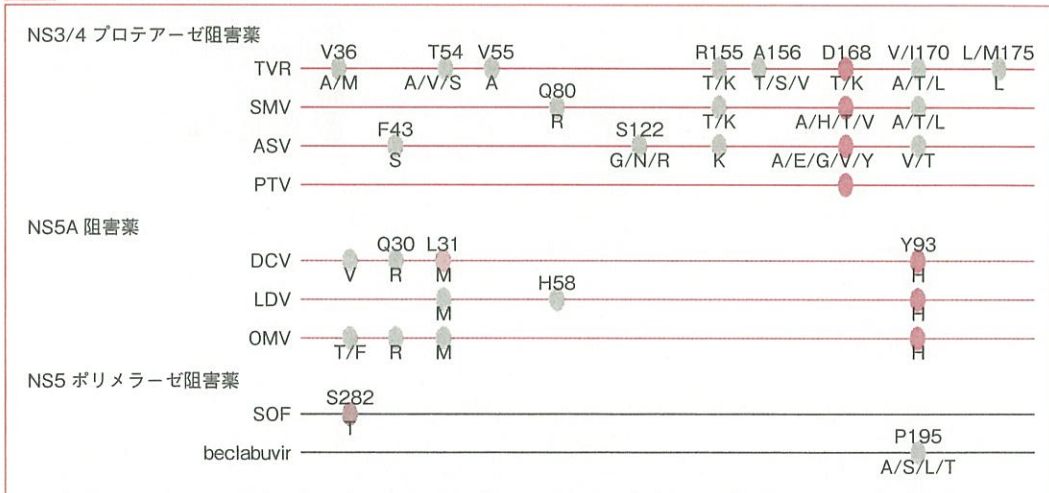


図2 DAA の薬剤耐性プロファイル

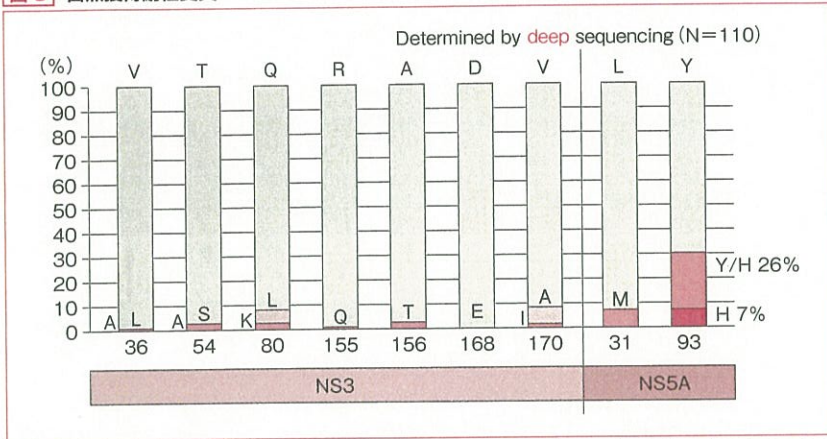


DAA の薬剤耐性プロファイルは、同じ種類の薬剤でも若干異なる。

ては、V36A/M, T54A, R155K/T/Q, A156S/V/T および D168A/V/T/H などが知られているが、自然界に存在する可能性は低い。耐性変異は第1世代と第2世代では異なり、V36A/M, T54A は第1世代、D168A/V/T/H はおもに第2世代、

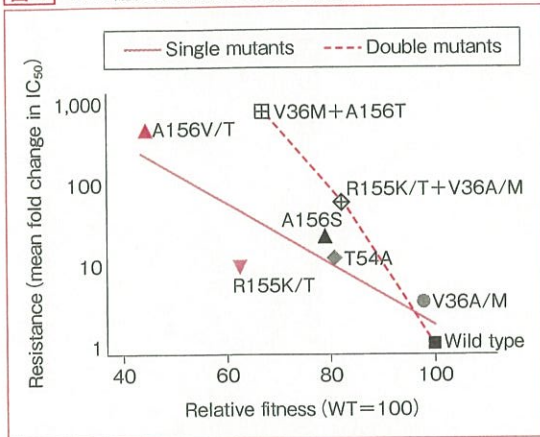
R155K/T/Q, A156S/V/T は第1世代、第2世代とも出現する変異である。一般に、薬剤耐性変異が生じると自身の変異により増殖能も低下することが知られ、Sarrazinら²⁾はTVR耐性変異部位と増殖能の関連を明らかにしている。これに

図3 自然獲得耐性変異



「自然獲得」薬剤耐性変異株 resistance-associated variants (RAV) が一定の頻度で存在することが明らかになっている。

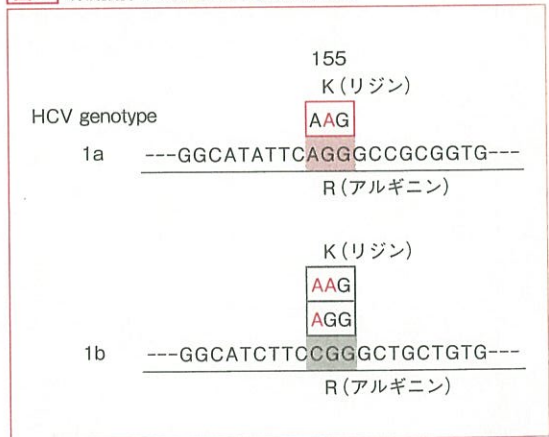
図4 TVR 耐性株の薬剤感受性と増殖能



一般的には耐性強度が高い変異株ほど増殖能は弱い、複数の変異が生じることにより、ウイルス増殖適応性 (fitness) が増しウイルス増殖能が回復することが知られており、一般的には単独変異よりも代償の変異が加わった複数変異のほうが治療抵抗性と考えられている。(文献2)より引用)

よれば、R155KTやA156V/TはV36A単独変異よりも耐性強度は強いが野生株に比較して増殖能は弱い。一般的には耐性強度が高い変異株ほど増殖能は弱い、複数の変異が生じることにより、ウイルス増殖適応性 (fitness) が増しウイルス増殖能が回復することが知られており、単独変異よりも代償の変異が加わった複数変異のほうが治療抵抗性と考えられている(図4)。また、耐性変異の出現頻度はHCVの遺伝子型 genotype により

図5 薬剤耐性変異に対する遺伝的障壁



コドン155(アルギニン：R)の塩基配列が genotype 1b型ではCGAであるのに対し genotype 1a型ではAGAであるため、K(リジン：AAA)に変化するためには genotype 1b型では2個の塩基変異が必要なのに対し genotype 1a型では1塩基変異でアミノ酸置換が生じるといった遺伝的障壁 genetic barrier が関与していると考えられている。

異なることが明らかにされている。例えば第1世代のTVRは、genotype 1b型に対して genotype 1a型で治療効果が劣り、その理由として薬剤耐性変異の出現が高率であることが示されている。とくにR155 K/T変異が genotype 1a型で高率に出現しているが、野生株ではコドン155(アルギニン：R)の塩基配列が genotype 1b型ではCGAであるのに対し genotype 1a型ではAGAであるため、K(リジン：AAA)に変化するため

には genotype 1b 型では 2 個の塩基変異が必要なのに対し genotype 1a 型では 1 塩基変異でアミノ酸置換が生じるといった遺伝的障壁 genetic barrier が関与していると考えられている (図 5)。

2 NS5A 阻害薬

NS5A 蛋白は亜鉛結合能を持つ 2 量体形成蛋白で、HCV のコア蛋白と相互作用することでウイルス粒子形成や複製に重要な機能を担っていると考えられている。特に N 末端寄り 1/3 のドメイン I は、RNA 結合領域が存在すること、IFN 治療効果に関連する interferon sensitivity determining region (ISDR)³⁾ や IFN+RBV resistant-determining region (IRRDR)^{4,5)} が存在すること、さらに臨床知見などから、HCV の複製や増殖に重要な機能を有していることが推測される。さらに NS5A 阻害薬に対する重要な HCV 耐性変異は、NS5A 蛋白 2 量体を形成するうえで重要な亜鉛結合部位近傍に存在することが明らかになっている。

NS5A 阻害薬のうち、わが国で最初に保険収載されたのはダクラタスビル daclatasvir (DCV) で、ASV との併用で最初の IFN-free の治療法として genotype 1 型 C 型慢性肝炎および代償性肝硬変に対し認可された。現在はレジパスビル ledipasvir (LDV) がポリメラーゼ阻害薬のソホスブビル sofosbuvir (SOF) との併用で、両者の合剤としてハーボニー[®]が、オムビタスビル ombitasvir (OBV) が PTV とリトナビル ritonavir (r) との併用で、合剤としてヴィキラックス[®]が認可されており、エルバスビル elbasvir がグラゾプレビル grazoprevir との併用で承認申請中である。これらは genotype 1 型 HCV に対し有効であるが、genotype 2 型 HCV にも有効であることから現在わが国で、追加承認のための臨床開発試験が行われており、2016 年 9 月 OBV/PTV/r+RBV が genotype 2 型に対して追加承認された。

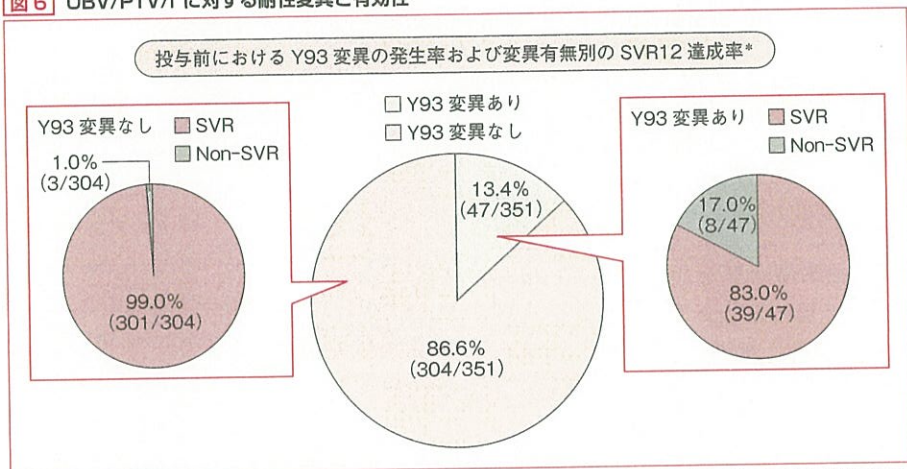
NS5A 阻害薬の薬剤耐性変異としては、NS5A 蛋白 2 量体を形成するうえで重要な亜鉛結合部位

表 1 NS5A 変異と DCV への抵抗性

アミノ酸変異	EC ₅₀ (pM)	Fold resistance
None (野生型)	2.6±0.3	1
L31F	12.6±1.2	5
L31M	8.4±1.9	3
L31V	61±15	23
Y93H	49.2±12.8	19
L31F+Y93H	14,874.3±1,762.9	5,271
L31M+Y93H	10,989.4±122.9	4,227
L31V+Y93H	21,674.5±9,461.3	8,336

近傍の L31M/V, Y93H が重要である。特に、Y93H 変異は NS5A 阻害薬未使用例でも 11~23% に自然獲得変異として存在する。これらは HCV の感受性を低下させることが HCV レプリコンの実験から明らかになっており (表 1)、耐性変異株では著効率が低下する。DCV+ASV 治療の国内開発治験では、Y93H が不在の症例では 91.3% の sustained virological response (SVR) 12 を達成したのに対し、Y93H が存在する症例では 43.3% に過ぎなかったことが報告されている⁶⁾。同様に OBV/PTV/r でも、Y93H が不在の症例では 99% の SVR 率であったのに対し、Y93H のある症例では 83% の SVR 率であったことが報告されている (図 6)⁷⁾。また、DCV+ASV 治療では L31M/V が治療効果には関係するが、OBV/PTV/r 治療では治療効果には関係なかったと報告されている。このように薬剤耐性変異を有する症例に対する不用意な治療は、効果を減弱するばかりか、多剤耐性変異を獲得する可能性もあることから、DCV+ASV や OBV/PTV/r の治療前には薬剤耐性変異、特に Y93H を測定することが推奨されている。このほか、NS5A 領域には M28V, Q30R などの耐性変異が知られているが、現在までには、自然耐性獲得変異で治療に大きな影響を及ぼすものは少ないと考えられている。しかし Peg-IFN+RBV+SMV 治療不成功例で、DCV+ASV 治療によってもウイルス排除ができなかった症例では、P29 や P32 や、A92K など自然界では存在せず、DCV や LDV, OBV に対

図6 OBV/PTV/rに対する耐性変異と有効性



*ウイルス学的治療不成功以外の理由(治療の早期中止, SVR 判定時のデータ欠損など)で SVR を達成できなかった患者は含まない。

OBV/PTV/r では Y93H が不在の症例では 99% の SVR 率であったのに対し, Y93H のある症例では 83% の SVR 率であった。(文献7)より引用)

しても高度耐性となる変異が出現することが報告されている。

3 NS5B ポリメラーゼ阻害薬

NS5B は膜貫通領域を持つ RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり, HCV 複製複合体の酵素活性本体である。C 末端の 21 アミノ酸残基が膜貫通領域で細胞内の小胞体由来の脂質膜に局在する。RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは複製時の誤りを修正する機構が欠けているため, HCV は増殖過程での変異が蓄積し, quasispecies の状態を形成する。NS5B 阻害薬は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを標的としており, 核酸型と非核酸型がある。核酸型は, ウイルス RNA 合成の基質(核酸類似物質[アナログ])として NS5B ポリメラーゼに取り込まれることで RNA 伸長を停止してウ

イルス複製を阻害し, chain terminator として機能する。このため耐性変異を生じにくく, 幅広い genotype の HCV に有効である。しかし, 薬剤として開発に成功したのは SOF のみである。

わが国では, SOF は, RBV との併用で 2 型の, NS5A 阻害薬の LDV との併用で 1 型の C 型慢性肝炎および代償性肝硬変に認可された。薬剤耐性は S282T のみが報告されているが, *in vitro* の実験でも, 耐性強度はたかだか 2.4~18.1 倍程度と報告されている。一方, 非核酸型は NS5B の触媒ドメインに結合することでポリメラーゼ活性を阻害する。これまで, 異なる 4カ所をエピトープとする薬剤が開発されているが, 薬剤耐性変異を生じやすいこと, genotype によりエピトープが異なることから汎遺伝子型対応とはならない。ベクラブビル beclabuvir が ASV, DCV との併用で, わが国で認可申請中である。

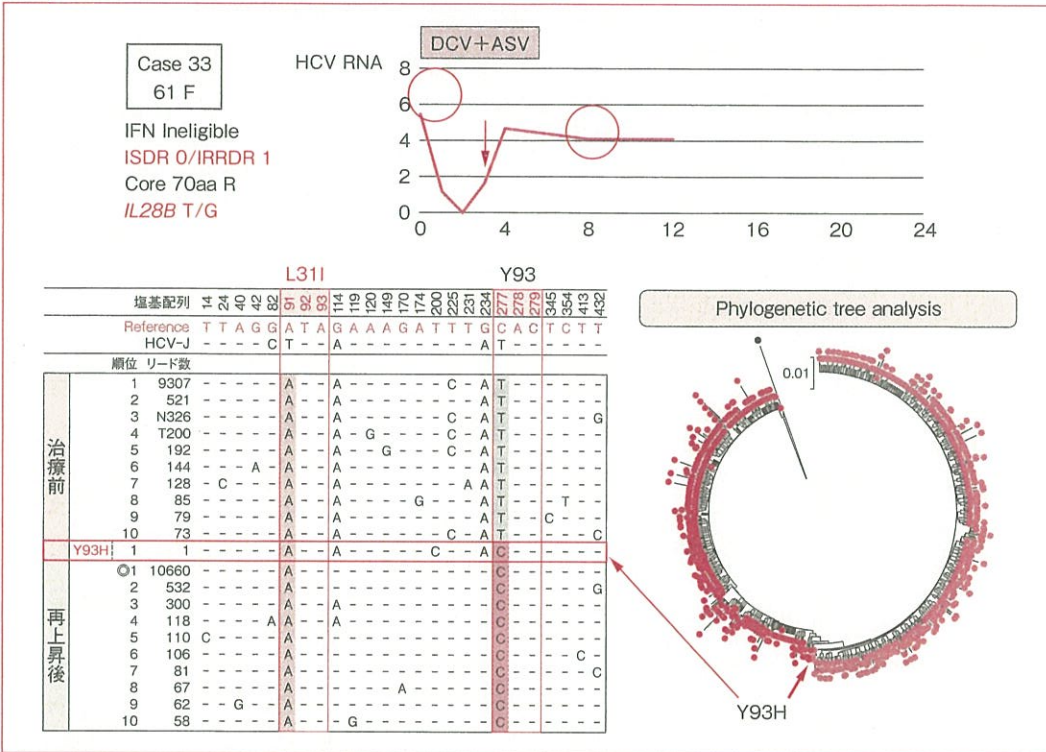
DAA 耐性変異に対する対策

1 NS3/4A プロテアーゼ阻害薬耐性変異に対する対策

現在まで NS3/4A プロテアーゼ阻害薬は, Peg-

IFN+RBV と併用, もしくは DCV や OBV など NS5A 阻害薬との併用で genotype 1 型の HCV 治療に用いられてきた。TVR は第 1 世代のプロテアーゼ阻害薬であり, 第 2 世代の SMV, ASV,

図7 DCV+ASV：治療不成功例の耐性変異 VBT 1



NS5A 耐性変異は、治療前にわずかに存在した耐性株が顕在化して耐性獲得後の主体となった。しかも薬剤耐性の活性中心部の薬剤耐性変異が消失しても、他部位の変異が起こり、もともと存在したウイルスとは異なるウイルスが主体となり、もともとの quasispecies の状態が大きく変化してしまう。

PTV とは薬剤耐性プロファイルが異なるため、Peg-IFN+RBV+TVR 治療不成功例には、Peg-IFN+RBV+SMV 治療や IFN-free 治療である DCV+ASV や OBV/PTV/r 治療は有効であると考えられる。しかし、第2世代の SMV を用いた治療で治療不成功となると D168A/V/T/H 変異が高率に出現する。この変異は第2世代プロテアーゼ阻害薬に共通であり ASV や PTV と交差耐性の可能性があるため、IFN-free 治療である DCV+ASV や OBV/PTV/r では治療効果が劣る可能性が指摘されている。特に Peg-IFN+RBV+SMV 治療不成功例に DCV+ASV 治療を行うと、治療効果が劣るほか、新たな薬剤耐性変異を生じ、しかもその耐性変異は、これまで存在しなかったような特殊な変異(欠失など)で、今後の治療にも悪影響を及ぼすことが予想されており、注意を要する。理論的には、このような症例では

NS3/4 プロテアーゼ阻害薬を含まないレジメンでの治療が好ましい。また SMV を含む治療の失敗例で出現した D168A/V/T/H 変異は、治療終了後、薬剤曝露がなくなると検出できなくなるが、そのような状態で ASV による治療を行っても治療不成功になる可能性が高いことが知られている。その理由は明らかではないが、われわれは超高感度の遺伝子検査 (deep-sequencing 法) での検討により、薬剤耐性の活性中心部の薬剤耐性変異が消失しても、他部位の変異が起こり、もともと存在したウイルスとは異なるウイルスが主体となり、もともとの quasispecies の状態が大きく変化してしまうことを指摘している(図7)⁸⁾。

2 NS5A 阻害薬耐性変異に対する対策

現在、わが国で使用可能な NS5A 阻害薬は、

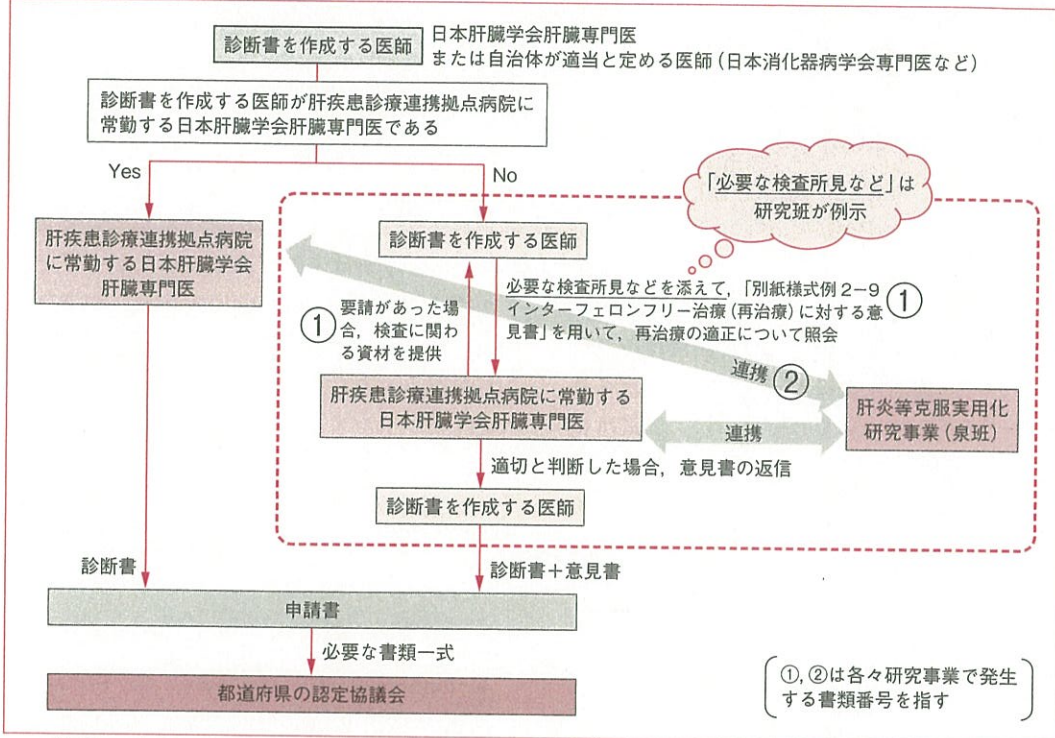
DCV, LDV, OBVである。NS5A阻害薬には、自然獲得耐性変異株が自然界に一定の確率で存在する。特に、DCV+ASV治療ではL31M/VやY93Hが、OBV/PTV/r治療ではY93Hが治療効果を減弱させることから、治療前に耐性変異を測定し、変異例には治療を行わないのが原則である。現在、これらは健康保険では測定できないが、検査会社で受託測定が可能でありサポートプログラムも実施されている。現在、ダイレクトシーケンス法、サイクリープPCR法、PCR-Invader法による測定が行われている。一方、LDVはNS5Bポリメラーゼ阻害薬であるSOFとの合剤で発売されているが、臨床試験では、治療効果はNS5A耐性とは関連しないことが指摘されている。

これまで、わが国では、多くの症例にDCV+ASV治療が用いられ、約85%でウイルス排除がなされている。しかし、約15%の症例では治療が不成功であったと推定される。このような症例では、治療前に耐性変異がなくとも、治療失敗時にはNS5A阻害薬耐性変異を生じていることが示されている。これは、治療の免疫学的圧力により獲得したのか、もともと存在する微量の耐性変異ウイルスが選択されたのか明らかではないが、いずれにせよ耐性変異を生じると今後の治療に難渋する可能性がある。しかも、NS3/4プロテアーゼ阻害薬とNS5A阻害薬の治療失敗例では、NS5A阻害薬のみならず、NS3/4プロテアーゼ阻害薬に対する耐性変異をも生じて、さらに治療困難となる可能性が高い。わが国におけるgenotype 1型HCVに対するIFN-freeの治療法は、2016年5月現在、いずれもNS5A阻害薬を含むため、DCV+ASV治療失敗例が大きな問題となっている。そこで、このような症例を蓄積し、薬剤耐性変異を検討して治療法選択の指針とするため、現在全国の肝疾患診療連携拠点病院を通じて日本医療研究開発機構(AMED)「慢性肝炎・肝硬変・肝がんの遺伝子やバイオマーカーを含めた病態解明と、各病態で求められる診療指針の開発と普及のための研究」班(班長：泉 並木)による多施設共同研究が進行中である。わが国では、

C型肝炎に対する抗ウイルス治療に対し医療費助成が行われているが、IFN-free治療に対する助成は1回のみとされており、IFN-free治療の2回目以降の医療費助成の申請には、肝疾患診療連携拠点病院に常勤する「肝臓専門医」による診断書か、この治療が適切であるとの「意見書」が必要である。この際に、上記研究による薬剤耐性変異を判断材料にしようとするものである(図8)。

理論的には、NS5A阻害薬耐性ではNS3/4プロテアーゼ阻害薬+NS5Bポリメラーゼ阻害薬が、NS3/4プロテアーゼ阻害薬耐性例では再度の(強力な)NS5A阻害薬+NS5Bポリメラーゼ阻害薬の治療が有効である可能性がある。DCV+ASV治療はわが国で行われたため、DCV+ASV治療例に対する他の国・地域でのIFN-free治療の治療成績は明らかではない。わが国ではDCV+ASV治療不成功例にSOF/LDV治療を行った成績が公表されているが、未治療例に比べ治療効果が劣るとされる⁹⁾。NS5A阻害薬は、耐性変異が生じても容易に野生型に逆変異することや、患者の背景により治療を待機できないことが、再治療選択の根拠になっているが、多重耐性出現による治療抵抗性獲得の危険性は十分に考慮しなくてはならない。これが、「肝臓専門医」による高度な知識と経験に基づく判断を求めている理由である。現在用いられているDCVやOBVより強力なNS5A阻害薬が開発中で、すべての遺伝子型に有効(パンジェノタイプ: pan-genotype)で、薬剤耐性を生じにくく、治療期間も短縮可能であることが期待されている。これらの薬剤がDCVなどの薬剤起因性の耐性変異に有効である保証はないが、少なくとも現在使用可能なNS5A阻害薬よりは有効性が高いことが予想される。今後の情報を含め注視することが必要である。現在、日本肝臓学会による「C型肝炎治療ガイドライン」¹⁰⁾では、DCV+ASV治療不成功例に対してはPeg-IFN+RBV+SMVも治療選択肢として挙げている。

図8 IFN-free 治療再治療の実施体制



IFN 再治療の医療費助成を申請する際は、全国の肝疾患診療連携拠点病院を通じて日本医療研究開発機構 (AMED) の「慢性肝炎・肝硬変・肝がんの遺伝子やバイオマーカーを含めた病態解明と、各病態で求められる診療指針の開発と普及のための研究」班 (班長: 泉 並木) による遺伝子検査を行う仕組みができています。

3 NS5B ポリメラーゼ阻害薬変異に対する対策

NS5B ポリメラーゼ阻害薬のうち、すでに用いられている SOF は核酸型の薬剤であり、耐性変異は生じにくく、S282T のみが知られている。この変異の耐性強度は、genotype 1b 型では 9.5 倍、genotype 2a 型、genotype 2b 型ではそれぞれ

2.8 倍、5.2 倍と報告されている。しかも、DAA 未治療の症例ではこの変異はほとんど存在しないことから、治療前に測定する意義は少ないと考えられる。また、SOF を用いた治療の不成功例でもこの変異は生じにくいとされ、仮に SOF を含むレジメンで治療不成功に終わっても、その理由は他に求めなければならない。

C 型肝炎に対する今後の展望

現在、C 型肝炎の治療は、IFN-free DAA が中心である。これまで用いられてきた IFN と異なり、ウイルスゲノムに直接作用するため、効果は優れているが耐性変異の問題が宿命として存在する。現在使用可能な薬剤は、NS3/4 プロテアーゼ阻害薬、NS5A 阻害薬、NS5B ポリメラーゼ阻害

薬の 3 種に限られ、これらの薬剤を組み合わせる必要がある。そこで、自然耐性と薬剤耐性変異について十分な知識をもち、治療選択の判断材料にすることが重要である。また、すでに治療不成功により獲得した耐性変異についても、その特徴や診断時期を十分認識する必要がある。

現在、わが国ではDCV+ASV治療不成功例が大きな問題となっているが、これに対しても治療不成功の理由を十分に考慮し、特に治療後に出現した新たな薬剤耐性変異について十分な検討が必要である。新たな薬剤を使用する場合高度の多重耐性変異が生じ、今後の治療にさらに難渋する可能性を考慮し、現在の治療必要性や治療可能性を慎重に判断することが重要である。特にわが国では、DAA治療は慢性肝炎と代償性肝硬変例に限られ、非代償性肝硬変例や肝癌合併例には認可されていない。肝線維化進行や肝癌併発が予測される症例では早期治療の必要性が高いが、肝線維化非進行例や若年例では早期の治療必要性は低い。これまで日本肝臓学会の治療ガイドラインでは肝線維化進展例と非進展例に分けての記載があった

が、2015年9月の改訂第4版からこの記載が省略された。しかし、肝線維化や年齢なども十分考慮して治療時期を判断することが重要である。また、現在新たなDAAの開発が著しく、今後強力で安全な薬剤がわが国でも使用できる可能性が高い。しかし、これらの薬剤に対する耐性変異や、すでに生じた薬剤起因性耐性変異を新薬で克服できるかどうかは未知である。したがって、われわれは、薬剤耐性変異について十分な知識を持つとともに新薬の開発状況に対しても注視していく必要がある。ただし、本当に注視すべきなのは、C型肝炎ウイルスではなく、目前にいる症例、すなわち患者であることを忘れてはならない。

(坂本 穰・榎本信幸)

文献

- 1) Shindo H, et al. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hapatol Int* 2012 ; 6 : 482-490.
- 2) Sarrazin C, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 1767-1777.
- 3) Enomoto N, et al. Mutations in the Nonstructural Protein 5a Gene and Response to Interferon in Patients with Chronic Hepatitis C Virus 1b Infection. *N Engl J Med* 1995 ; 334 : 77-81.
- 4) El-Shamy A, et al. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hapatology* 2008 ; 48 : 38-47.
- 5) Maekawa S, et al. Comprehensive analysis for viral elements and interleukin-28B polymorphisms in response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in hepatitis C virus 1B infection. *Hepatology* 2012 ; 56 : 1611-1621.
- 6) Kumada H, et al. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* 2014 ; 59 : 2083-2091.
- 7) Kumada H, et al. Randomized phase 3 trial of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir for hepatitis C virus genotype 1b-infected Japanese patients with or without cirrhosis. *Hepatology* 2015 ; 62 : 1037-1046.
- 8) Sato M, et al. Deep Sequencing and Phylogenetic Analysis of Variants Resistant to Interferon-Based Protease Inhibitor Therapy in Chronic Hepatitis Induced by Genotype 1b Hepatitis C Virus. *J Virol*. 2015 ; 89 : 6105-6116.
- 9) Akuta N, et al. Retreatment efficacy and predictors of ledipasvir plus sofosbuvir to HCV genotype 1 in Japan. *J Med Virol* 2016 [Epub ahead of print]
- 10) 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会. C型肝炎治療ガイドライン(第5.1版). 2016, http://www.jsh.or.jp/medical/guidelines/jsh_guidelines/hepatitis_c