

平成30年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09004

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスゲノム変異とヒトゲノム多型の相関に関する研究

研究課題名(英文) Study of the mutations in the HCV genome and human genetic variations

研究代表者

越智 秀典(Ochi, Hidenori)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・講師

研究者番号：10415119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルスの変異頻度の迅速・高感度な測定法を確立した。本法により直接作用型抗ウイルス薬療法の効果と耐性変異の関係を詳細に検討した。HCV1b型のNS5A領域Y93H変異型頻度は治療前から高く自然発生的と考えられた。Y93H変異は、ウイルス量、ISDR変異、ALTレベル、IL28B遺伝子多型との関連性を認めた。NS5B領域C316N変異、コア領域70番アミノ酸変異等とC型慢性肝炎患者のSNPアレイデータの関連解析によってウイルス変異とヒトゲノム多様性の間に関連性が示された。得られた知見は薬剤耐性獲得メカニズムだけでなくウイルスの免疫回避機構やウイルスの分子進化を検討する上で重要である。

研究成果の概要(英文)：A system to rapidly and accurately evaluate the proportion of HCV mutant strains was developed, which enabled us to further study the efficacy of various direct acting drugs regimens and their relationships with resistant associated variants (RAVs). NS5A-Y93H substitution at baseline could be frequently found and thus regarded as naturally occurring RAV. It was associated with viral titer, the number of mutations within the NS5A-ISDR, ALT levels, and IL28B variant. Association of NS5B-C316N and core 70 amino acid substitutions with human genetic variants were examined and found that there were some associations between viral mutations and human polymorphisms. These findings may provide new insights into an understanding of viral escape from the host immune system and the viral molecular evolution as well as the virological mechanisms of HCV drug resistance.

研究分野：消化器病学、肝臓病学、ウイルス学、遺伝学

キーワード：HCV ウイルス変異 直接作用型抗ウイルス薬 薬剤耐性変異 ヒトゲノム多様性

1. 研究開始当初の背景

近年ゲノムワイド SNP 関連解析により肝臓疾患において疾患発症や治療効果・副作用に関連する SNPs が同定報告され、IL28B や ITPA の SNPs は効果や副作用予測のために実臨床に応用されており、研究代表者らもこれまでにいくつかの遺伝子多型について報告してきた(表内下線部)。

慢性肝炎	<u>HLA-DPA1</u> , <u>HLA-DPB1</u> , <u>HLA-DQA1</u> , <u>HLA-DQB2</u> , <u>HLA-DR</u> , <u>GRIN2A</u>	原発性胆汁性肝硬変	<u>HLA-DQB1</u> , <u>IL12A</u> , <u>IL12RB2</u> , <u>IRF5</u> , <u>TNPO3</u> , <u>ZFPBP2</u> , <u>MMEL1</u> , <u>SPIB</u> , <u>IKZF3</u> , <u>DENDND1B</u> , <u>CXCR5</u> , <u>CLEC16A</u> , <u>NFKB1</u> , <u>IL7R</u> , <u>RAD51L1</u> , <u>CD80</u> , <u>MAP3KIP1</u> , <u>TNFRSF1A</u> , <u>PLDL2</u> , <u>TNFAIP2</u> , <u>RPS6KA4</u> , <u>TNFSF15</u> , <u>POLR2AF1</u>
肝硬変	<u>RNF7</u> , <u>MERTK</u> , <u>KIF1B</u> , <u>TPT22</u> , <u>DDX18</u>	原発性硬化性胆管炎	<u>HLA-BMS11</u> , <u>BCL2L11</u> , <u>MMEL1</u> , <u>TNFRSF14</u>
肝臓癌	<u>MICA</u> , <u>DEPDC5</u> , <u>HLA-DQA1</u> , <u>GRK1</u> , <u>STAT4</u>		
C型肝炎インターフェロン治療効果	<u>IL-28B</u>		
リポビリン誘導性貧血	<u>ITPA</u>	NASH/NAFLD	<u>ENPLAS</u> , <u>FDF1</u> , <u>COL13A1</u> , <u>LTBP3</u> , <u>EFGAB4</u> , <u>DDX60L</u> , <u>PALLD</u> , <u>NCAN</u> , <u>GC</u> , <u>LGPI1</u> , <u>SAMM50</u> , <u>PARVB</u>

肝臓疾患領域におけるゲノムワイド関連解析

C 型慢性肝炎の治療は近年、インターフェロンから直接作用型抗ウイルス薬(DAAs)による治療法へ移行して著効率は非常に上昇したが、その一方で薬剤抵抗性ウイルス変異の出現による治療無効・再燃が問題となっており薬剤耐性ウイルス変異の量的評価の重要性は非常に増大している。従来法のダイレクトシーケンス法では 2,30%未滿の頻度の変異を検出することができず迅速・高感度な測定系の確立が待たれていた。HCV ウイルス変異とヒトゲノム多様性の関連性に関する研究はこれまでほとんど行われていない。

2. 研究の目的

そこで、HCV ゲノム変異を迅速・定量的に評価できる測定系を確立して、DAAs のターゲット領域である NS3, NS5A, NS5B 領域の薬剤耐性変異を測定評価し、各種 DAA 療法の効果と薬剤耐性変異の関係を明らかにし、さらに HCV ウイルスゲノム変異とヒトゲノム遺伝子多型の関連性とそれらが C 型慢性肝炎の病態・薬剤応答に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) HCV ゲノム変異検出法の確立

保存患者血清 100-200 μ l から HCV-RNA をシリカメンブレン法で抽出し、逆転写酵素で cDNA を合成した。ウイルスデータベースの配列情報を元にして NS3, NS5A, NS5B の DAAs のターゲット領域を含みかつ変異によらず安定的に増幅するように縮重プライマーを設計調整した。さらに nested-PCR 法を行うことで低ウイルス量のサンプルでもプローブによる測定に十分な核酸増幅ができるようにした。オリゴヌクレオチドプローブに多型検出法の一つである Invader 法のプラットフォームを用いてプローブ配列の一部にも縮重を導入した。本法の変異検出感度や精度を評価するために次世代シーケンスによる変異型頻度との比較を行った。

(2) HCV ゲノム変異とヒトゲノム遺伝子多型の関連解析

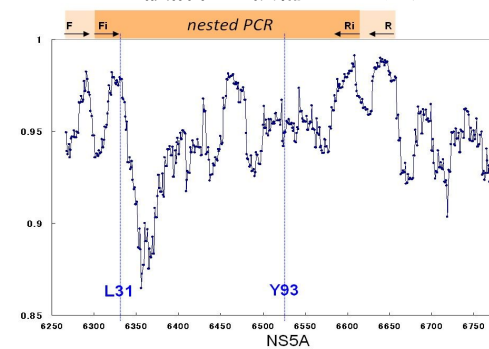
ダイレクトシーケンス法またはインベーター法を用いて各種 DAA に対する HCV ゲノム上の耐性変異部位を中心に C 型慢性肝炎症

例の DAA 治療開始前における変異型保有例の割合を評価した。変異型保有例の頻度が高い耐性変異部位(自然発生的薬剤耐性変異)は薬剤投与によって変異が選択されるだけでなく、宿主の遺伝的要因が選択圧として作用していると予想してヒトゲノム遺伝子多型との関連解析の対象に選定した。

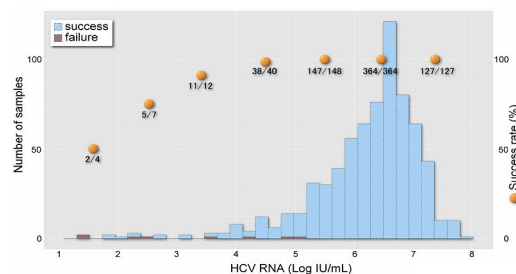
4. 研究成果

(1) HCV ゲノム変異検出法の確立

ネスト PCR 用のプライマー設定に際し、公的なデータベースから 240 個の HCV1b 型の NS5A 領域の配列を取得しプライマー中のメジャーな塩基の頻度の平均値をプロットし、その値が高い部分を変異が少ない領域と考えプライマーの設計位置候補として選定した。

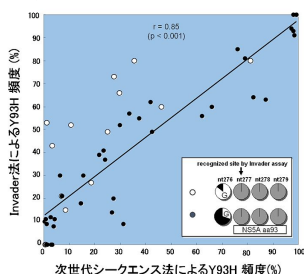


プライマー配列中でマイナーな変異型塩基を含むポジションには混合塩基を適用した縮重プライマーを用いることで変異の影響を回避して、さらにネスト PCR を行い低ウイルス量のサンプルでも PCR 成功率を高めることができた。上述の配列情報を元にインベータープローブとシグナルプローブ配列内にも混合塩基を適用して近傍の変異の影響を極力抑制できた。変異型頻度の定量性向上のために、両端にインナープライマーと相補配列、内部に野生型と変異型配列を対に含む合成オリゴヌクレオチドを野生型 100%、変異型 100%、野生型 50%変異型 50%判定用の内部標準を作成した。インベーター反応後の 2 波長の蛍光強度の 2 次元プロットにより 100%野生型、100%変異型の他に、様々な混合比のいわゆる拮抗型が認められ、さらに 3 種のスタンダードと NTC の角度とサンプルの角度から蛍光強度比を変異型頻度に補正変換することができた。本法による 702 例のタイピング成功率は 98.9%で、成功率はウイルス量 3 log オーダー以下で次第に低下し、検出下限は 1 ~ 2 log の範囲であると推定された。



55 例について次世代シーケンサーの結果と比較して本法の検出下限を評価したと

ころ、変異型頻度 2.8%以上のサンプルは全例検出可能で、検出下限は 1~2%の範囲と推定された。また、変異型頻度の相関は $r=0.85$ と良好な相関を認めたと、直前の塩基が G の場合には野生型頻度を過剰評価する傾向が認められた。

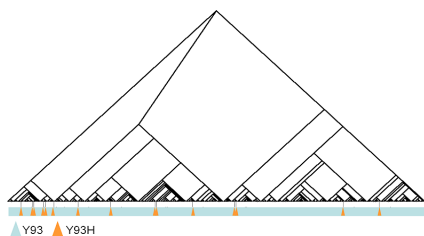


本法を用いて約 1200 例の HCV1b 症例について Y93H の変異型解析を行い、各種因子との関連性を検討したところ、Y93H 変異型はウイルス量 ($p = 2.4E-5$) 及び IL28B 遺伝子多型 ($p = 1.6E-4$) との関連性が最も強く、ISDR 変異 ($p=1.9E-3$)、ALT 値 ($p=0.015$)、インターフェロン治療歴 ($p=0.02$) との関連性が認められた。

NS5A 領域以外でも本法による HCV の各種薬剤耐性変異に対するプローブを作成することで、Daclatasvir/Asunaprevir 療法の高齢者および腎機能低下例での有用性安全性評価、同療法不成功例における sofosbuvir/ledipasvir 療法の有用性安全性評価、sofosbuvir/ledipasvir 療法不成功例にみられた薬剤耐性変異の検討など、各種 DAA 療法と薬剤耐性変異の関係や、有用性・安全性の評価の解析に供され、重要な知見を得ることができた。

(2) HCV ゲノム変異とヒトゲノム遺伝子多型の関連解析

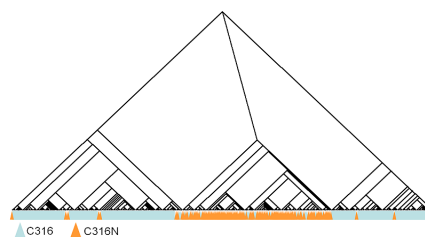
ダイレクトシーケンス法及び本法を用いて、HCV1b 型ウイルスの NS3, NS5A 領域の薬剤耐性変異について測定を行い、頻度の高い変異を検討したところ、NS5A 領域 Y93 の部位に治療前(自然発生的)に変異型(Y93H)を有する頻度は約 23%と高く、他の薬剤耐性変異では変異型の頻度は比較的稀であった。HCV1b 型ウイルスの NS5A 領域配列による系統樹解析では Y93H の分布は特定の分枝に限局せず散発的で、分子進化との関係は明らかでなかった。



SNP アレライピングデータを有する 1,056 例(Y93(野生型)865例、Y93H(変異型)191例)について変異と関連する遺伝子多型をゲノムワイドに探索したところ、ゲノムワイドレベル ($P < 1.07 \times 10^{-7}$) で有意なローカス

は認められなかったが、suggestive なレベル ($P < 1 \times 10^{-4}$) のローカスを 45 個同定した。自然免疫関連遺伝子も複数含まれており、今後もサンプル数を増加させたりパスウェイ解析等を加えることによって、持続感染に重要と思われる宿主側分子とウイルス側分子のインタラクション、ヒトゲノム多型とウイルス変異間の相互関係を明らかにしてゆきたい。

また、NS5B 領域における薬剤耐性変異の解析では、C316N 変異型頻度が 65%と高く自然発生的変異型と考えられた。NS5B 領域配列による系統樹解析では C316N の分布は特定の分枝に集中したクラスターを形成し、分子進化との関係が示唆された。



C316N 変異型はインターフェロン治療抵抗性が報告されている HCV コア領域の 91 番アミノ酸変異と有意な関連性 ($P < 0.001$) が認められたが、IL28B 遺伝子多型との関連性は認めなかった ($P=0.63$)。

同じくインターフェロン治療抵抗性が報告され、研究代表者らが IL28B 遺伝子多型との関連性を報告している HCV コア領域の 70 番アミノ酸変異について、変異と関連する遺伝子多型を 901 例(野生型 523 例変異型 378 例)でゲノムワイドに探索したところ、トップ SNP はその IL28B 遺伝子多型であり、ゲノムワイドレベルの関連性が示された。

今回研究代表者らは迅速で高感度な HCV ウイルス変異の検出法を開発した。それを用いて得られたこれらの知見はウイルスゲノムの変異とヒトゲノム多様性の関係性を示すものであり、自然発生的薬剤耐性変異の一部は自然免疫によるウイルス排除機構を回避すべく誘導あるいは進化した可能性が示唆された。これらの分子-分子インタラクションをさらに解析することで新たなメカニズムのウイルス治療薬・予防薬の開発につながってゆくことも期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Kawakami Y, Ochi H, Hayes CN, Imamura M, Tsuge M, Nakahara T, Katamura Y, Kohno H, Kohno H, Tsuji K, Takaki S, Mori N, Honda Y, Arataki K, Takahashi S, Kira S, Tamura T, Masuda K, Nakamura T, Kikkawa M, Chayama K. Efficacy and safety of ledipasvir/sofosbuvir with ribavirin in chronic hepatitis C patients who failed daclatasvir/asunaprevir therapy: pilot study. *Journal of Gastroenterology* 53, 548-56(2018) doi:

10.1007/s00535-017-1380-8. 査読有
2. Kawaoka T, Imamura M, Morio K, Nakamura Y, Tsuge M, Hayes CN, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Ishiyama K, Ohdan H, Chayama K. Three patients treated with sofosbuvir plus ledipasvir for recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Clinical Journal of Gastroenterology* 10, 179-84(2017) doi: 10.1007/s12328-017-0722-7. 査読有
3. Kan H, Imamura M, Kawakami Y, Daijo K, Teraoka Y, Honda F, Nakamura Y, Morio K, Kobayashi T, Nakahara T, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Hayes CN, Miki D, Ochi H, Honda Y, Mori N, Takaki S, Tsuji K, Chayama K. Emergence of drug resistance-associated variants and changes in serum lipid profiles in sofosbuvir plus ledipasvir-treated chronic hepatitis C patients. *Journal of Medical Virology* 89, 1963-72(2017) doi: 10.1002/jmv.24885. 査読有
4. Morio K, Imamura M, Kawakami Y, Morio R, Kobayashi T, Yokoyama S, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Naswa MG, Hayes CN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Honda Y3, Mori N3, Takaki S3, Tsuji K, Chayama K. Real-World Efficacy and Safety of Daclatasvir and Asunaprevir Therapy for Hepatitis C Virus-Infected Cirrhotic Patients. *J Gastroenterol Hepatol* 32, 645-50(2016) doi: 10.1111/jgh.13511. 査読有
5. Nakamura Y, Imamura M, Kawakami Y, Teraoka Y, Daijo K, Honda F, Morio K, Kobayashi T, Nakahara T, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Aikata H, Hayes CN, Miki D, Ochi H, Chayama K. Efficacy and safety of daclatasvir plus asunaprevir therapy for chronic hepatitis C patients with renal dysfunction. *J Med Virol* 89, 665-71(2016) doi: 10.1002/jmv.24679. 査読有
6. Kan H, Imamura M, Uchida T, Hiraga N, Hayes CN, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Makokha GN, Chowdhury S, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Protease inhibitor resistance remains even after mutant strains become undetectable using deep sequencing. *J Infect Dis* 214, 1687-94(2016) doi.org/10.1093/infdis/jiw437. 査読有
7. Morio R, Imamura M, Kawakami Y, Morio K, Kobayashi T, Yokoyama S, Kimura Y, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Nelson Hayes C, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Mori N, Takaki S, Tsuji K, Chayama K. Safety and efficacy of dual therapy with daclatasvir and asunaprevir for older patients with chronic hepatitis

C. *J Gastroenterol* 52, 504-11(2016) doi: 10.1007/s00535-016-1255-4. 査読有
8. Akamatsu S, Hayes CN, Ochi H, Uchida T, Kan H, Murakami E, Abe H, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. Association between variants in the interferon lambda 4 locus and substitutions in the hepatitis C virus non-structural protein 5A. *J Hepatol* 63, 554-63(2015) doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.033. 査読有
9. Yoshimi S, Ochi H, Murakami E, Uchida T, Kan H, Akamatsu S, Hayes CN, Abe H, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Rapid, Sensitive, and Accurate Evaluation of Drug Resistant Mutant (NS5A-Y93H) Strain Frequency in Genotype 1b HCV by Invader Assay. *PLoS one* 10, e0130022(2015) doi: 10.1371/journal.pone.0130022. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 菅 宏美, 今村道雄, 大上加奈, 寺岡雄吏, 本田芙美, 稲垣有希, 盛生 慶, 小林知樹, 中原隆志, 長沖祐子, 河岡友和, 柘植雅貴, 平松 憲, 川上由育, 相方 浩, 越智秀典, 茶山一彰. ソフォスビル・レジパスビル併用療法の治療成績と脂質代謝への影響について 第 53 回日本肝臓学会総会 2017/6/8
2. Kan H, Imamura M, Hiraga N, Hayes CN, Uchida T, Miyaki E, Tsuge M, Abe-Chayama H, Aikata H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Protease inhibitor resistance remains even after mutant strains become undetectable using ultra-deep sequencing AASLD2016, Boston, 2016/11/11
3. 盛生慶, 今村道雄, 川上由育, 中村有希, 本田芙美, 小林知樹, 長沖祐子, 河岡友和, 柘植雅貴, 平松憲, 相方浩, 越智秀典, 茶山一彰, 森奈美, 高木慎太郎, 辻恵二. 代償性肝硬変患者に対する Daclatasvir/Asunaprevir 併用療法の有効性および安全性の検討 第 20 回日本肝臓学会大会 2016/11/3
4. 中村有希, 今村道雄, 川上由育, 盛生慶, 盛生玲央奈, 本田芙美, 小林知樹, 中原隆志, 長沖祐子, 河岡友和, 839, 相方浩, 越智秀典, 森 奈美, 高木慎太郎, 辻恵二, 茶山一彰. 腎機能障害を有する C 型慢性肝炎におけるダクラタスビル・アスナプレビル療法の有効性と安全性の検討 第 20 回日本肝臓学会 2016/11/3
5. 盛生 慶, 今村道雄, 本田芙美, 中野憲仁, 中村有希, 鳩岡正浩, 福原崇之, 小林知樹, 長沖祐子, 河岡友和, 柘植雅貴, 平松 憲, 川上由育, 相方 浩, 越智秀典, 茶山一彰. 難治性の C 型慢性肝炎に対する

Daclatasvir/Asnaprevir 療法の治療効果 第 52 回日本肝臓学会総会 2016/5/19

6. 越智 秀典, 三木 大樹, 茶山 一彰. C 型肝炎ウイルス変異の迅速・高感度測定法の開発と自然発生的薬剤耐性変異 Y93H の臨床的意義の検討 第 102 回日本消化器病学会総会ワークショップ 2016/4/22

7. Ochi H, Yoshimi S, Murakami E, Uchida T, Kan H, Akamatsu S, Hayes CN, Abe H, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Rapid, sensitive, and accurate evaluation system for drug resistant strain (NS5A-Y93H) frequency in genotype 1b HCV AASLD2015, San Francisco, 2015/11/13

〔その他〕

プレスリリース

「C 型肝炎ウイルス薬剤耐性変異の迅速・高感度な測定法を開発」

https://www.hiroshima-u.ac.jp/koho_press/press/2015/2015_024

6 . 研究組織

(1)研究代表者

越智 秀典 (Hidenori Ochi) 広島大学・医歯薬保健学研究科 (医)・講師

研究者番号 : 10415119