

令和元年6月14日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09372

研究課題名(和文) C型肝炎のDAA治療で高度耐性株出現に関わるオセロ仮説と2-ヒット仮説の検証

研究課題名(英文) Othello Hypothesis and 2-Hit Hypothesis Involved in the Development of HCV Strains Carrying RASs Manifesting Extreme Tolerance Against DAA Therapies.

研究代表者

持田 智 (Mochida, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20219968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)は国民病である肝臓の原因であるが、そのライフサイクルに干渉する経口薬が登場し、対部分の症例でウイルス排除が可能となった。しかし、一部の症例では、耐性アミノ酸変異(RAS)が出現して、治療が不成功となる。まず、NS5A複製複合体阻害薬に対するRASの成立機序を検討し、治療前にRASがないにも拘らず不成功となる機序としてOthello仮説を、NS5A-P32欠損のような高度耐性株が出現する機序として2-ヒット仮説を実証した。また、NS5Bポリメラーゼ阻害薬に対する感受性低下の要因としてNS5B-A218Sを発見し、これをTom & Jerry現象と命名した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DAAs治療不成功はNS5A-L31M/Y93Hで生じるが、これがない場合の不成功要因としてNS5A-L28M/R30Qを見出した。この置換は耐性でないが、耐性NS5A-L28M/R30Q/Y93Hが混在し、これが野生株と置換した(Othello現象)。一方、NS3/4Aプロテアーゼ阻害薬で不成功時には、NS5Aの塩基配列が変化し、NS5A複製複合体阻害薬投与後に高度耐性NS5A-P32欠損が発生した(2-ヒット現象)。一方、NS5Bポリメラーゼ阻害薬の効果はNS5B-A218Sによって減退することを見出した(Tom & Jerry現象)。これらの解明でRAS発生を防ぐ治療法確立に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C virus (HCV) has been the most frequent etiology of hepatocellular carcinoma, but can be eradicated from the liver after antiviral therapies using direct-acting antivirals (DAAs). In a small part of patients, however, virologic failure develops during and after DAA therapies. First, we evaluated the mechanisms involved in the development of HCV strains carrying resistance-associated substitutions (RASs) in the NS5A region, and demonstrated the Othello failure involved in the development of virologic failure in patients without signature NS5A-RASs at baseline, and 2-hit failure associating occurrence of extremely severe tolerant HCV strains against NS5A replication complex inhibitors, such as NS5A-P32 deletion. Moreover, we found NS5B-A218S as a factor involved in derangement of antiviral efficacy of NS5A polymerase inhibitors, and nominated such phenomenon as Tom & Jerry failure.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Hepatitis C virus Direct-acting antivirals RAS NS5A複製複合体阻害薬 NS5Bポリメラーゼ阻害薬

1. 研究開始当初の背景

HCV の抗ウイルス療法は DAAs の導入で飛躍的に進歩した。2014 年 9 月には genotype-1b の症例を対象に、NS5A 複製複合体阻害薬 daclatasvir (DCV) と NS3/4A プロテアーゼ阻害薬 asunaprevir (ASV) 併用治療が開始された。同治療の効果は baseline の NS5A アミノ酸変異に依存しており、NS5A-Y93H ないし NS5A-L31M 変異の認められる HCV 感染例は virologic failure となる頻度が高い。そこで、申請者らは NS5A-Y93H 変異を有する HCV 株を定量評価する簡易迅速測定法 (cycling probe 法) を開発し (Uchida Y, et al. *PloS One* 2014), これと direct sequencing 法と組み合わせた検査システムを確立して (Uchida Y, et al. *J Gastroenterol* 2016), 臨床応用を実現した。また、ASV による肝機能異常を生じた症例を解析することで、その対策法も提案した (Fujii Y, et al. *Hepatology* 2015. Fujii Y, et al. *Hepatology* 2016)。一方、研究開始時までに DCV/ASV 併用療法を 309 例で実施しており、これら症例の SVR12 率は、ITT 解析では 87.4% で、26 例で virologic failure が発生している。これら症例の解析によって、virologic failure の成立に関する新知見として「オセロ仮説」と「2-ヒット仮説」を提唱した。

オセロ仮説: SVR12 を規定する要因として NS5A-Y93H 変異とともに NS5A-R30Q 変異が抽出された。Baseline で NS5A-Y93, NS5A-L31 がともに野生株であるにも拘らず、virologic failure となった症例には NS5A-R30Q 変異が見られ、再燃ないし breakthrough 時には NS5A-Y93H との 2 重変異株になっていた。NS5A-R30Q 単変異の HCV 株は baseline でも認められ、DCV に対する感受性は野生株よりも高い。しかし、NS5A-R30Q+Y93H 株は、NS5A-L31M+Y93H 株よりも高度の耐性を示す。従って、baseline で NS5A-R30Q 単変異と判定された HCV 感染例には、2 重変異株が minor clone として存在し、これが failure の原因と想定した。

2-ヒット仮説: DCV/ASV の failure 例のうち 5 例では、シメプレビル (SMV) による 3 剤併用療法の既往があり、うち 4 例では NS5A-29del, NS5A-32del など極めて稀な変異 HCV 株が検出された。これら HCV 株は NS5A 阻害薬に対して高度耐性を示し、NS5A-32del を有する HCV 株の DCV に対する EC50 は野生株の 39 万倍以上である。従って、これら通常は見られない高度耐性 HCV 株は、初回の failure 時に出現した HCV 株に、2 回目の治療が second hit として加わって出現したと想定した。

2. 研究の目的

「オセロ仮説」と「2-ヒット仮説」を証明し、DAA 治療における virologic failure の機序を明確にする。また、virologic failure 例では核酸型 NS5B ポリメラーゼ阻害薬ソフォスビル (SOF) と NS5A 複製複合体阻害薬レディパスビル (LDV) の配合薬による治療を実施し、その有効性と問題点を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) **オセロ仮説**: DCV/ASV 併用療法を実施例を対象に、治療開始時と開始後の血清および virologic failure 例では再燃ないし breakthrough 時の血清を用いて、NS5A 領域の塩基配列を deep sequencing と direct sequencing で解析する。(2) **2-ヒット仮説**: SMV による 3 剤併用療法の既往例で DCV/ASV 併用療法後に virologic failure を生じた 5 例を対象に、併用療法実施前、実施中および failure 時の血清を用いて、HCV の NS3 領域と NS5A 領域の塩基配列を deep sequencing で評価する。(3) **DCV/ASV 併用療法の virologic failure 例の対策**: DCV/ASV 併用療法の virologic failure 例を対象として IFN-β の 1 日 2 分割投与を 14 日間実施し、その後 SOF/LDV

配合薬による 12 週間の治療を実施する。同治療の failure 例では、HCV 株の NS5A 領域と NS5B 領域の塩基配列を direct sequencing で解析し、RASs の意義を *in silico* の系で検討する。

4. 研究成果

DCV/ASV で治療した 309 例のうち virologic failure となったのは 32 例 (10.4%) で、このうち baseline で signature NS5A-RASs の NS5A-Y93H ないし NS5A-L31M が見られたのがそれぞれ 7 例と 1 例、有害事象での中止例が 7 例であった。従って、17 例 (53.1%) では virologic failure の原因は不明であるが、6 例では SMV を用いた 3 剤併用療法の既往があった。SMV を用いた治療の既往がない 11 例をオセロ仮説、既往のある 6 例は 2-ヒット仮説を検証する対象とした。なお、他院で virologic failure になり、当院に紹介された患者を含めると 88 例であった。これらのうち virologic failure 時に NS5A-Y93H ないし NS5A-L31M/V/F/I が見られたのは 65 例 (73.9%) と 46 例 (52.2%) であり、43 例 (48.9%) では両変異が共存していた。一方、NS5A-L28M ないし NS5A-R30Q が見られたのは 36 例 (40.9%) で、うち 23 例では NS5A-L28M ないし R30Q と NS5A-Y93H が共存していた。これら変異が見られなかったのは 5 例 (5.7%) であり、うち 2 例には NS5A-P32del、1 例には P29del が認められた。

オセロ仮説: Virologic failure 時に NS5A-L28M+R30Q+Y93H の 3 重変異が見られた 12 症例のうち 8 例で baseline の血清が利用可能であり、これらで HCV 株の deep sequencing を実施した。これら症例で NS5A-R30Q を有する HCV 株の比率は 16.2% から 99.7% であったが、NS5A-Y93H の見られる HCV 株の比率は 7 例が 0.2% から 93.5%、1 例が 0.1% 未満であり、NS5A-L31M/V の HCV 株は 2 例が 0.3%、6 例が 0.1% 未満であった。従って、NS5A-L31M/V と NS5A-Y93H が共存する症例は 1 例のみで、その比率は 0.3% であったが、NS5A-R30Q と NS5A-Y93H が共存する症例は 6 例であり、比率は 0.1% から 92.9% であった。NS5A-R30Q と NS5A-Y93H が共存する HCV 株の比率が 0.1% 未満であった 2 例も含めて系統樹解析を実施すると、NS5A-L28M+R30Q+Y93H の 3 重変異株は 8 例中 7 例では NS5-R30Q+Y93H の多重変異株起点として発生しており、その比率が全体の 0.1% 未満であった症例も存在した。NS5A-R30Q は genotype 1a の HCV では野生株であり、replicon 系での検討によると、genotype 1b の HCV の場合には、NS5A-R30 野生株よりも NS5A 複製複合体阻害薬に対する感受性が高い。しかし、NS5A-R30Q+Y93H 株は NS5A-L31M+Y93H 株よりも NS5A 複製複合体阻害薬に対して高度の耐性を示す。一般に direct sequencing で NS5A-L28M+R30Q と判定される genotype 1b の HCV 株では、様々な比率で NS5A-L28M+R30Q+Y93H を示す HCV 株が含まれる quasispecies を呈しており、これが virologic failure の原因となることが証明された。

2-ヒット仮説: NS5A-P29del、P32del など baseline では認められない RAS を有する HCV 株は、SMV を用いた 3 剤併用療法で virologic failure 後に、DCV/ASV 併用療法を実施して再度 failure になった際に出現する。これら特殊な RAS の見られた症例の HCV 株を対象に deep sequencing を実施し、系統樹解析を行ったところ、以下のことが判明した。Signature NS5A-RASs の認められない genotype 1b の HCV 株の見られる症例では、SMV 投与後に NS3-D168A/E などの NS3-RAS が出現すると、NS5A-RAS は出現しないが、NS5A 領域の塩基配列は大きく変化する。この状態で DCV/ASV 併用療法を実施すると、signature NS5A-RASs は出現しないが、SMV 投与後に出現した HCV 株を起点として、NS5A-P29del、P32del などの NS5A 複製複合体阻害薬に対する超高度耐性を呈する HCV 株が出現した。SMV 投与前、DCV/ASV 投与前の検体では、10 万 read 以上の sequencing を実施しても NS5A-P29del、P32del 株は全く検出されず、*de novo* に出現したものと考えられた。なお、bioinformatics の検討を実施したところ、NS5A 蛋白は S25 までが両

水性で小胞体の膜内に埋入されており，S38以降が domain-1 で 2 量体を形成していると考えられた。従って，K26 から F37 までは膜埋入部と domain-1 を繋ぐリンカー領域で，P29，P32，P35 と規則的にプロリン (P) が配列していることが判明した。P は 5 員環の N でペプチド結合しており，蛋白の立体構造の形成に重要で，P が欠損することで，2 本のリンカー領域で形成される空間の構造が変化し，NS5A 複製複合体が domain-1 に到達し難くなることで，高度耐性の要因と推定された。

DCV/ASV 併用療法の virologic failure 例に対する LDV/SOF に有効性: DCV/ASV で virologic failure となった 33 例で LDV/SOF による再治療を実施した。NS5A-L31M+Y93H は軽度，NS5A-L28M+R30Q+Y93H は中等度，NS5A-L31V+Y93H は高度，NS5A-P32~~del~~ は超高度耐性とすると，軽度耐性は 9 例，中等度耐性は 9 例，高度耐性は 2 例，超高度耐性は 1 例で，11 例は replicon での成績がなく，耐性の程度が不明であった。軽度ないし中度耐性の症例では LDV/SOF の単独投与を，高度ないし超高度耐性の症例では IFN-β の 1 日 2 分割投与を read-in として 2 週間実施した後に LDV/SOF による治療を，耐性の程度が不明の場合は，患者さんの希望で何れも選択できるとの方針で再治療を実施した。27 例で LDV/SOF の単独投与を実施したが，中等度耐性の 1 例で virologic failure を生じ，その後は中等度耐性の場合は IFN-β の 1 日 2 分割投与による read-in を実施するように方針を転換した。その結果，中等度耐性の 2 例，高度耐性の 2 例，超高度耐性の 1 例，耐性度不明の 1 例の計 6 例では read-in を実施したが，高度耐性，超高度耐性の各 1 例は IFN-λ3 の SNP が minor allele で，この 2 症例のみが virologic failure となった。高度耐性でも major allele の症例では SVR が得られている。このため SVR 率は単独療法では 96.3%，read-in 実施例では 66.7% であり，全体で 90.9% と良好な成績が得られた。耐性の程度を評価すると，DCV/ASV の virologic failure 例は LDV/SOF による再治療で良好な成績が得られるが，IFN-β の 1 日 2 分割投与による read-in 治療は IFN-λ3 の SNP が major allele の症例でのみ有効であると考えられた。なお，その後，DAA 未治療で LDV/SOF 投与を行って virologic failure になった 6 例が集積され，その NS5B 領域のアミノ酸配列を精査したところ，全例で signature NS5B-RAS である NS5B-S282T は見られなかったが，NS5B-A207T+A218S+C316N+Q464E の 4 重変異が認められた。一方，genotype 1b のレプリコン系によって，これら多重変異の影響を評価したが，明らかな耐性は認められなかった。そこで bioinformatics によって NS5B ポリメラーゼの立体構造を評価したところ，aa207，aa218，aa316 が構成するトライアングルの間をリン酸化して活性化した SOF が通過することが示された。特に，aa218 は NTP および活性化 SOF の通過する NTP トンネルの表面に位置しており，NS5B-A218S では表面が疎水性から親水性に変化すると考えられた。活性化 SOF は UTP の水酸基をメチル化フッ素に置換したアナログである。従って，NS5B-A218 野生のポリメラーゼでは，疎水性である活性化 SOF は親水性の UTP よりも NTP トンネルを通過しやすいが，NS5B-A218S 場合には UTP が優先的に通過することで，SOF の抗ウイルス効果が減退すると推定した。次いで，分子動力学の手法によって，このことを定量化して証明した (Tom & Jerry 現象)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Uchida Y, 他11名, **Mochida S**: last author. A Case of genotype-3b HCV in which whole-genome was successfully analyzed using third-generation nanopore sequencing. *Hepatol Res* 2019 Mar 28. doi: 10.1111/hepr.13339. [Epub ahead of print]. (Reviewed)

2. Umemura J, 他11名, **Mochida S**: last author. NS5A-P32 deletion as a factor involved in virologic failure in patients receiving glecaprevir and pibrentasvir. *J Gastroenterol* 2019; 54 (5): 459-470. doi: 10.1007/s00535-018-01543-9. (Reviewed)
3. Uchida Y, 他10名, **Mochida S**: last author. Serum asunaprevir concentrations showing correlation with the extent of liver fibrosis as a factor inducing liver injuries in patients with genotype-1b hepatitis C virus receiving daclatasvir plus asunaprevir therapy. *PLoS One* 2018 Oct 11; 13 (10): e0205600. doi: 10.1371/journal.pone.0205600. eCollection 2018. (Reviewed)
4. Uchida Y, 他13名, **Mochida S**: last author. Significance of NS5B substitutions in genotype 1b hepatitis C virus evaluated by bioinformatics analysis. *Sci Rep* 2018 June 11; 8 (1): 8818. Doi: 10.1038/s41598-018-27291-7. (Reviewed)
5. Uemura H; 他15名, **Mochida S**: last author. Retreatment with sofosbuvir/ledipasvir with or without lead-in interferon- β injections in patients infected with genotype 1b HCV after unsuccessful daclatasvir/asunaprevir therapy. *Hepatol Res* 2018 March 48 (4): 233-243.. doi: 10.1111/hepr.12980. (Reviewed)
6. Kurata H, 他13名, **Mochida S**: last author. A case of chronic hepatitis caused by hepatitis C virus exhibiting a discrepancy between serogroup and genotype because of inter-genotypic 2b/1b recombination: A pitfall in antiviral therapy with direct-acting antivirals. *Hepatol Res* 2018 Februry; 48 (3): E372-E378. doi: 10.1111/hepr.12977. (Reviewed)
7. Uchida Y, 他7名, **Mochida S**: last author. "Reversi-Type Virologic Failure" Involved in the Development of NS5A-RAVs in Patients with Genotype 1b HCV Carrying No Signature RAVs at Baseline. *Hepatol Res* 2017 Dec; 47 (13): 1397-1407. doi: 10.1111/hepr.12882. (Reviewed)
8. Uchida Y, 他6名, **Mochida S**: last author. Development of rare RAVs that are extremely tolerant against NS5A inhibitors during daclatasvir/asunaprevir therapy via a two-hit mechanism. *Hepatol Res* 2016; 46 (12): 1234-1246. Doi: 10.1111/hepr.12673. (Reviewed)
9. Uchida Y, 他10名, **Mochida S**: last author. Significance of variants associated with resistance to NS5A inhibitors in Japanese patients with genotype 1b hepatitis C virus infection as evaluated using cycling-probe real-time PCR combined with direct sequencing. *J Gastroenterol* 2016; 51 (3): 260-270. Doi: 10.1007/s00535-015-1106-8. (Reviewed)

[学会発表](計 23 件)

1. Uemura H, 他 6 名, **Mochida S**: last author. Real-world efficacy of glecaprevir plus pibrentasvir for patients with HCV with or without prior DAA therapies: evaluation by deep sequencing for HCV strains with NS5A-RASs. *AASLD 2018 Nov, Boston*.
2. **Mochida S**. Mechanisms involved in the development of NS5A-RAVs and NS5B-RAVs in patients receiving DAA therapies. *APASL-STC "Prevention of HCC development" 2017 Apr, Nagasaki*.
3. Uchida Y, 他 8 名, **Mochida S**: last author. NS5B-A218S mutation locating along with the NTP tunnel as a factor involved in virologic failure after sofosbuvir/ledipasvir therapy in patients with genotype 1b HCV: Evaluation by bioinformatics and molecular dynamics. *AASLD 2017 Oct, Washington*
4. **Mochida S**. Mechanisms Involved in the Development of NS5A-RAVs and NS5B-RAVs in Patients Receiving DAA Therapies. *APASL STC 2017 Apr, Nagasaki*.
5. Uchida Y, 他 7 名, **Mochida S**: last author. "Othello Hypothesis" Involved in the Development of

NS5A-RAVs in Patients with Genotype 1b HCV Infection. *AASLD 2016 Nov, Boston*.

6. Uchida Y, 他 7 名, **Mochida S**: last author. "Othello Hypothesis" Involved in the Development of RAVs Tolerant to NS5A Inhibitors in Patients with Genotype 1b HCV Infection. *EASL 2016 April, Barcelona*.
7. 他に国内学会 16 件

〔図書〕(計 1 件)

1. **Mochida S**. Resistance-associated variants in the NA5A region of HCV and methods for the detection. *Hepatitis C Virus Treatment, Chayama K, eds, Springer, 2016; pp25-32*.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: Detection method for mutation in 93rd amino acid of hepatitis c virus ns5a protein, and detection kit for mutation in 93rd amino acid of hepatitis c virus ns5a protein

発明者: 持田 智、内田 義人、神山 淳一、内木 佳代子

権利者: 学校法人埼玉医科大学

種類: 特許(米国)

番号: 15/103184

出願年: 2014 年

国内外の別: 国外

○取得状況(計 2 件)

名称: C 型肝炎ウイルスの NS5A タンパク質の 93 番目のアミノ酸の変異の検出方法、及び C 型肝炎ウイルスの NS5A タンパク質の 93 番目のアミノ酸の変異の検出用キット

発明者: 持田 智、内田 義人、神山 淳一、内木 佳代子

権利者: 学校法人埼玉医科大学

種類: 特許(日本)

番号: 特許第 6425352 号

取得年: 2018 年

国内外の別: 国内

名称: Detection method for mutation in 93rd amino acid of hepatitis c virus ns5a protein, and detection kit for mutation in 93rd amino acid of hepatitis c virus ns5a protein

発明者: 持田 智、内田 義人、神山 淳一、内木 佳代子

権利者: 学校法人埼玉医科大学

種類: 特許(カナダ)

番号: 2934243

取得年: 2018 年

国内外の別: 国外

6. 研究組織

研究協力者: 中山 伸朗、内田 義人、植村 隼人

ローマ字氏名: (NAKAYAMA,nobuhaki) (UCHIDA,yoshihito) (UEMURA,hayato)

国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。