

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09420

研究課題名(和文) 肝移植後C型肝炎に対するインターフェロンフリー治療の薬剤耐性機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of emergence of hepatitis C virus with resistance-associated substitution after liver transplantation

研究代表者

上田 佳秀 (Ueda, Yoshihide)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：90378662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝移植後C型肝炎に対するソホスビル+レジバスビル12週間、ならびにグレカプレビル+ピブレンタスビル8週間または12週間が、安全かつ効果的であることを、当院ならびに全国多施設共同研究にて明らかにした。さらに、肝移植症例ならびに非肝移植症例において、C型肝炎ウイルス遺伝子配列の多様性的変化を第三世代シーケンサーを用いて解析した。HCVのNS3、NS5A領域の既知の薬剤耐性変異が段階的に獲得され、多剤耐性ウイルスが出現することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型肝炎ウイルス(HCV)による肝硬変・肝癌症例に対して肝移植が行われた場合には、ほぼ全例で移植後にC型肝炎が再発すること、再発後の進行が速いこと、抗HCV治療の効果が低く副作用が多いことから、肝移植後の長期生存率が低いことが明らかになっていた。本研究では、新しい抗HCV治療が肝移植後C型肝炎に対しても効果的で安全であることを明らかにした。さらに、治療不成功の原因となる薬剤耐性ウイルス出現の機序を、新しい遺伝子解析技術を用いて明らかにした。今後、肝移植後の生存率の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Efficacy and safety of 12-week-regimen of sofosbuvir and ledipasvir, and 8- or 12-week regimen of glecaprevir and pibrentasvir were efficacious and safe in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation in our institution and in Japanese multicenter analysis. Diversity of HCV RNA in post-liver transplant and non-liver transplant patients were analyzed by using third-generation sequencing technique. We revealed that multi-drug resistant HCV clones at treatment failure originated from a subpopulation of pre-existing HCV with resistance-associated substitution, and those HCV were selected for and became dominant with the acquisition of multiple resistance-associated substitutions.

研究分野：消化器内科学

キーワード：C型肝炎 肝移植 direct acting antiviral 耐性変異

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 肝移植後 C 型肝炎の特徴

我が国における慢性肝疾患の成因の約 60%が C 型肝炎ウイルス (HCV) によるものであり、HCV による肝硬変・肝癌が本邦の成人の肝移植レシピエントの原疾患の中で最多である。しかしながら、HCV による肝硬変・肝癌症例に対して肝移植が行われた場合には、ほぼ全例で移植後に C 型肝炎が再発すること、再発後の進行が速く肝移植後の長期予後が悪いことが明らかになっている。この進行を抑制し、予後を改善させるために抗 HCV 治療が不可欠であるが、移植後 C 型肝炎に対する標準的治療法は確立されていなかった。

肝移植後 C 型肝炎は、血中の HCV が移植されたドナー肝に再感染し、感染成立からウイルスの複製、生体の免疫応答の確立、急性肝炎から慢性肝炎、肝線維化の出現から肝硬変への進行と、様々な段階を経て進行していく。そこに抗 HCV 治療が加わり、HCV の減少、無効例では HCV 再燃と、ダイナミックな血中 HCV-RNA 量の変化を特徴とする。申請者は、この変化の各段階で、様々な遺伝子変異を持つ HCV クローンの多様性 (quasispecies) が大きく変化していることを明らかにしてきた。

#### (2) 肝移植後 C 型肝炎に対する治療の問題点

研究開始当初までに行われてきた肝移植後 C 型肝炎に対するインターフェロンを含む治療は、拒絶反応の誘導を含めた有害事象が大きな問題となっていた。そのため、肝移植後症例に対しても経口直接作用型抗ウイルス薬 (direct acting antiviral; DAA) を用いたインターフェロンフリー治療が行われるようになった。しかしながら、肝移植後症例に対する DAA を用いた治療には、2 つの大きな問題点があった。ひとつは移植後に使用される免疫抑制剤との薬物相互作用であった。移植後には必須の免疫抑制剤であるタクロリムスとシクロスポリンは、大部分の DAA と同様に薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) 3A で代謝され、P 糖蛋白質の基質であることから、薬物相互作用が問題となる。もうひとつは、治療効果が低いことであった。これまでの海外からの報告から、肝移植例は非移植例に比べて難治であることが明らかになっているが、その理由は不明であり、薬剤耐性ウイルスの関与が考えられる。薬剤耐性は HCV ゲノムの特定の塩基の遺伝子変異によってアミノ酸が変化することにより、DAA の効果が減弱することにより生じる。各 DAA に対する耐性変異部位が同定されているが、これらの変異を持つ HCV が DAA 投与によって生み出されるのか、もともと存在する耐性ウイルスが増加するのかが不明であった。また、複数の耐性変異を持つ多重変異ウイルスの意義や起源についても不明な点が多かった。さらに、これらの耐性ウイルスが HCV 感染後の長期経過の中でどのように変化しているかについても明らかにされていなかった。加えて、過去の DAA 治療が無効であった症例に対する、他の DAA による再治療の適応についても議論が分かれており、DAA の初回治療により選択的に増殖した薬剤耐性 HCV クローンの多剤耐性を獲得するポテンシャルや、他の DAA に対する感受性についての詳細は明らかとなっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の 3 点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 肝移植後 C 型肝炎に対するインターフェロンフリー治療の効果と安全性
- (2) 治療無効例の HCV ゲノム配列の特徴と薬剤耐性メカニズム
- (3) 薬剤耐性 HCV の肝移植前後のダイナミクス

### 3. 研究の方法

- (1) 肝移植後 C 型肝炎に対するインターフェロンフリー治療の効果と安全性の解析  
肝移植後 C 型肝炎に対するインターフェロンフリー治療の効果と安全性を明らかにする。

- (2) 第三世代シーケンサーによる HCV ゲノム配列の解析

治療無効例の原因を解明するため、治療開始前、治療開始 1 週間後、ならびに HCV 再発時の段階での血液から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて HCV をクローニングし、HCV の NS3, NS5A, NS5B 領域の既知の薬剤耐性変異領域についてディープシーケンシング解析を行う。その配列の経時的変化を明らかにし、治療無効に関与した HCV ゲノム配列を同定する。複数の薬剤耐性変異が同一の HCV クローン内に存在するかどうかを明らかにするため、長いリード長のディープシーケンシングが可能な第三世代シーケンサー (PacBio®) を用いて全長 HCV ゲノム配列を決定する。

- (3) 肝移植前後における薬剤耐性変異 HCV のダイナミクスの解析

第三世代シーケンサーを用い、肝移植前の血清ならびに肝組織、肝移植後の再感染後、急性肝炎期、慢性肝炎期、抗 HCV 治療前、治療 1 週間後、HCV 再発時、HCV 再発後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年後の血清を用い、HCV ゲノム配列の解析を行う。これらを経時的に比較して分子系統樹解析を行い、HCV の多様性の変化を明らかにする。薬剤耐性変異 HCV の肝移植前後の経時的変化を明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) 肝移植後 C 型肝炎に対するインターフェロンフリー治療の効果と安全性の解析  
当院における、HCV1b 型に対するソホスブビル+レジパスビル 12 週間 (31 例)、グレカプレビル

+ ピブレンタスビル 12 週間 (2 例)、8 週間 (2 例)、2b 型に対するソホスブビル+リバビリン 12 週間 (1 例)、グレカプレビル+ピブレンタスビル 12 週間 (1 例) 治療の効果と安全性を解析した。32 例は生体肝移植後、5 例が脳死肝移植後であり、移植から治療開始までの期間は中央値 71 ヶ月 (4~175 ヶ月) であった。12 例に direct acting antiviral (DAA) 治療歴あり、10 例に HCV NS5A の耐性変異を認めた。有害事象として、出血性十二指腸潰瘍を 2 例に、肺出血、帯状疱疹、サイトメガロウイルス網膜炎、失神、敗血症、急性拒絶反応、下血をそれぞれ 1 例ずつ認めたが、治療中止例はなかった。37 例全例で sustained virological response (SVR) を達成した。

次に、本邦の多施設共同研究により、HCV1 型に対するソホスブビル+レジパスビル 12 週治療の効果と安全性を解析した。HCV genotype 1b 型の肝移植後 C 型肝炎 54 例に対してソホスブビル+レジパスビルの 12 週間治療が行われ、治療中に肺炎によって死亡した 1 例を除く 53 例 (98%) で SVR12 が達成された。有害事象としては、肺炎による死亡例を 1 例認め、その他、出血性十二指腸潰瘍 3 例、肺出血 1 例、胸水 1 例、帯状疱疹 1 例に対して入院加療を要した。

さらに、肝移植後 C 型肝炎に対するグレカプレビル+ピブレンタスビル治療の本邦における治療成績を多施設共同研究として解析した。HCV1 型ならびに 2 型の肝移植後 C 型肝炎症例 25 例に対してグレカプレビル+ピブレンタスビルが投与され、嘔気のため 3 日で治療中止となった 1 例を除く 24 例 (96%) にて SVR12 が達成された。8 週治療が行われた 13 例全例で SVR12 が達成され、肝移植後 C 型肝炎に対する 8 週間治療の有効性が示された。また、4 例の透析例を含む 8 例の重度腎障害例が含まれており、腎不全例や透析例に対する安全性と有効性が示された。有害事象は 24% に認められたが、治療薬に関連した有害事象は嘔気、皮膚掻痒症、軽度の腎障害のみであった。薬剤関連有害事象による中止例はなく、1 例のみが軽度の拒絶反応を認めている。以上の結果から、グレカプレビル+ピブレンタスビル治療は、肝移植後 C 型肝炎例に対して、安全かつ効果的であることが示された。

## (2) 第三世代シーケンサーによる HCV ゲノム配列の解析

インターフェロンフリー治療無効例の治療開始前ならびに HCV 再発時の段階での血液から RNA を抽出し、第三世代シーケンサーを用い、HCV ゲノムの長いリード長の一分子ディープシーケンシングを行った。その結果、HCV の NS3, NS5A 領域の既知の薬剤耐性変異がひとつの HCV クローン上で多重変異となっていることを明らかにした。また、HCV の NS3, NS5A 領域の既知の薬剤耐性変異が段階的に獲得され、多剤耐性ウイルスが出現することを明らかにした。

## (3) 肝移植前後における薬剤耐性変異 HCV のダイナミクスの解析

第三世代シーケンサーを用い、肝移植後の慢性肝炎期、インターフェロン治療前、HCV 再発時、DAA 治療前、HCV 再々発時、HCV 再発後 1 ヶ月の血清から RNA を抽出し、HCV ゲノム配列のシーケンシング準備を行った。その結果、各段階において非常に HCV クローンの多様性が大きく変化していることが明らかになった。HCV の NS3, NS5A 領域の既知の薬剤耐性変異についても治療前後でダイナミックに変化していた。NS5A に P32del 変異を持つ 2 症例については、遺伝子変異頻度が非常に高く、遺伝子不安定性が生じていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita T, Takeda H, Takai A, Arasawa S, Nakamura F, Mashimo Y, Hozan M, Ohtsuru S, Seno H, Ueda Y, Sekine A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Single-molecular real-time deep sequencing reveals the dynamics of multi-drug resistant haplotypes and structural variations in the hepatitis C virus genome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59397-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Y	4. 巻 49
2. 論文標題 New sequencing technology, third-generation Nanopore sequencing, for hepatitis C virus research.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 961-963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13383.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda H, Yamashita T, Ueda Y, Sekine A.	4. 巻 25
2. 論文標題 Exploring the hepatitis C virus genome using single molecule real-time sequencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 4661-4672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v25.i32.4661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 上田 佳秀、恵荘 裕嗣、高井 淳、高橋 健、妹尾 浩	4. 巻 78
2. 論文標題 Special Populationに対するDAA治療 肝移植後症例に対する治療成績	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 569-574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上田 佳秀、恵荘 裕嗣、高井 淳、高橋 健、妹尾 浩	4. 巻 5
2. 論文標題 肝移植例での治療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「消化器・肝臓内科」	6. 最初と最後の頁 633-637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上田 佳秀	4. 巻 148
2. 論文標題 肝移植前後のウイルス肝炎対策	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 2178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上田 佳秀、安富 栄一郎、畑澤 友里、林 宏樹、塩見 優紀、矢野 嘉彦	4. 巻 7
2. 論文標題 肝移植患者と抗ウイルス療法(HBV, HCV)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「消化器・肝臓内科」	6. 最初と最後の頁 281-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Y, Kobayashi T, Ikegami T, Miura S, Mizuno S, Akamatsu N, Tkaki A, Ishigami M, Takatsuki M, Sugawara Y, Maehara Y, Uemoto S, Seno H.	4. 巻 54
2. 論文標題 Efficacy and safety of glecaprevir and pibrentasvir treatment for 8 or 12 weeks in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation: A Japanese multicenter experience.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 660-666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01561-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上田佳秀	4. 巻 76
2. 論文標題 特集：C型肝炎の新たな壁を越える次世代DAA治療．肝移植後症例に対する治療成績	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 255-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota T, Hata K, Sozu T, Ueda Y, Hirao H, Okamura Y, Tamaki I, Yoshikawa J, Kusakabe J, Tanaka H, Kageyama S, Anazawa T, Yoshizawa A, Yagi S, Yamashiki N, Okajima H, Kaido T, Uemoto S.	4. 巻 267
2. 論文標題 Impact of donor age on recipient survival in adult-to-adult living-donor liver transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Surg.	6. 最初と最後の頁 1126-1133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshihide, Ikegami Toru, Akamatsu Nobuhisa, Soyama Akihiko, Shinoda Masahiro, Goto Ryoichi, Okajima Hideaki, Yoshizumi Tomoharu, Taketomi Akinobu, Kitagawa Yuko, Eguchi Susumu, Kokudo Norihiro, Uemoto Shinji, Maehara Yoshihiko	4. 巻 52
2. 論文標題 Treatment with sofosbuvir and ledipasvir without ribavirin for 12?weeks is highly effective for recurrent hepatitis C virus genotype 1b infection after living donor liver transplantation: a Japanese multicenter experience	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 986 ~ 991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-017-1310-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami Toru, Ueda Yoshihide, Akamatsu Nobuhisa, Ishiyama Kohei, Goto Ryoichi, Soyama Akihiko, Kuramitsu Kaori, Honda Masaki, Shinoda Masahiro, Yoshizumi Tomoharu, Okajima Hideaki, Kitagawa Yuko, Inomata Yukihiko, Ku Yonson, Eguchi Susumu, Taketomi Akinobu, Ohdan Hideki, Kokudo Norihiro, Shimada Mitsuo, et al.	4. 巻 31
2. 論文標題 Asunaprevir and daclatasvir for recurrent hepatitis C after liver transplantation: A Japanese multicenter experience	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Transplantation	6. 最初と最後の頁 e13109 ~ e13109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ctr.13109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Atsuyuki, Ikeda Kaori, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Marusawa Hiroyuki, Seno Horoshi, Inagaki Nobuya, Kokuryu Hiroyuki	4. 巻 96
2. 論文標題 Hepatitis C Treatment with Sofosbuvir and Ledipasvir Accompanied by Immediate Improvement in Hemoglobin A1c	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 228 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000484237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshihide Ueda
2. 発表標題 Anti-HCV Therapy after Liver Transplantation
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference, Immunology and Genetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 佳秀
2. 発表標題 免疫抑制状態における肝炎の安全性について
3. 学会等名 日本消化器病学会東北支部 第207例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 佳秀、海道 利実、八木 真太郎、秦 浩一郎、穴澤 貴行、伊藤孝司、山敷 宣代、恵荘 裕嗣、高井 淳、高橋 健、羽賀 博典、妹尾 浩、上本 伸二
2. 発表標題 肝移植後C型肝炎に対する抗ウイルス治療の効果と安全性
3. 学会等名 第37回日本肝移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田佳秀
2. 発表標題 C型肝炎の最新知識 ~ウイルス発見から29年の医学の進歩~
3. 学会等名 第27回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村文保、上田佳秀、丸澤宏之
2. 発表標題 第三世代シーケンサーを用いた肝移植後C型肝炎ウイルスの耐性獲得機序の検討
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田治彦, 上田佳秀, 高井淳, 大鶴繁, 関根章博, 丸澤宏之, 妹尾浩
2. 発表標題 Single molecule real-time sequencing unveils the evolution of multi-drug resistant hepatitis C virus clones during direct-acting antiviral therapy
3. 学会等名 UEG Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田佳秀
2. 発表標題 臓器移植における肝炎ウイルスUpdate
3. 学会等名 第54回日本移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihide Ueda, Toru Ikegami, Nobuhisa Akamatsu, Akihiko Soyama, Masahiro Shinoda, Ryoichi Goto, Hideaki Okajima, Tomoharu Yoshizumi, Akinobu Taketomi, Yuko Kitagawa, Susumu Eguchi, Norihiro Kokudo, Shinji Uemoto, Yoshihiko Maehara.
2. 発表標題 Treatment with sofosbuvir and ledipasvir without ribavirin for 12 weeks is highly effective for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: a Japanese multicenter experience.
3. 学会等名 EASL The Internationala liver congress 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田 佳秀、丸澤 宏之、上本 伸二
2. 発表標題 肝移植後C型肝炎に対するsofosbuvir-based therapyの効果と安全性
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田 佳秀、海道 利実、岡島 英明、秦 浩一郎、八木 真太郎、穴澤 貴行、吉澤 淳、山敷 宣代、羽賀 博典、丸澤 宏之、妹尾 浩、上本 伸二
2. 発表標題 肝移植後C型肝炎に対するインターフェロンフリー治療の現状と問題点
3. 学会等名 第53回日本移植学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 江川 裕人、佐藤 滋、後藤 憲彦、伊藤 健太、上田 佳秀、亀井 宏一、長浜 正彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社メディカルレビュー社	5. 総ページ数 89
3. 書名 成人臓器移植予防接種ガイドライン 2018年版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----