

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590965

研究課題名(和文) Ultra-deep sequencingを用いたHCV治療戦略の構築

研究課題名(英文) Development of the treatment strategy for HCV-related diseases using ultra-deep sequencing technology.

研究代表者

前川 伸哉 (MAEKAWA, Shinya)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：70397298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、C型肝炎ウイルス(HCV)に対する特異的抗ウイルス剤DAA(Direct Acting Antivirals)が多数開発され、期待されている。一方で、DAA耐性HCVが問題となっており、どのような症例が臨床的DAA耐性出現のリスクを有するのか明らかではなかった。

本研究ではウイルス遺伝子解析においてultra-deep sequenceに加えて系統樹解析を導入、治療反応性と耐性出現の経緯におけるウイルスゲノムの混在状態(quasispecies)とその動態を検討し、ウイルス遺伝子の関与を明らかとした。本結果は、個別化DAA治療において、重要な基礎資料になることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been hard to predict the treatment response of HCV-infected patients to the most advanced DAA-included therapy. Using ultra-deep sequencing technology coupled with phylogenetic analysis, this study was conducted to disclose the role of viral quasispecies in determining the treatment response to DAA-included anti-HCV therapy. As a result, it was disclosed that viral quasispecies changed dynamically and certain viral isolates were selected with the introduction of DAA-based therapy. The result of the study provides better understanding of the mechanism in the appearance of DAA resistance.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HCV Ultra-deep sequence DAA 耐性変異 Quasispecies 系統樹

1. 研究開始当初の背景

近年、C型肝炎ウイルス(HCV)に対する特異的抗ウイルス剤であるDAA(Direct Acting Antivirals)が多数開発され、非常に期待されるものの、一部の症例ではDAA耐性を獲得して無効となるばかりか、多剤耐性となり、将来の治療にも影響が出る可能性がある。しかしながら、どのような症例において、HCVが臨床的DAA耐性を獲得するのか十分に明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

本研究においては、DAAの含まれる抗ウイルス治療において、ultra-deep sequenceに加えて系統樹解析まで行い、ウイルスゲノムの混在状態(quasispecies)を明らかとすることにより、治療反応性と耐性出現の全貌を明らかとし、新たな治療戦略を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペグインターフェロン・リバビリン2者併用療法に対するHCVのnull responder(無反応例)に対するコア領域、NS5A-ISDR領域、NS5A-IRRDR領域のultra-deep sequencingによるquasispecies変化の検討

(2) ペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害剤3者併用療法に対する耐性HCV出現に対する機序のultra-deep sequencingによる検討

(3) NS5A阻害剤に対する自然耐性HCVの検討

以上の各項目について、約500bp塩基長のロングリードが可能なRoche GS Junior シークエンサーを用い、系統樹解析を併せて行うことで、ウイルスquasispeciesと、その動態を明らかとする。

4. 研究成果

(1) ペグインターフェロン・リバビリン2者併用療法に対するHCVのnull responder(無反応例)におけるdeep sequence解析

2者併用療法を施行した症例において、インターフェロン感受性関連領域であるコア、NS5A-ISDR、NS5A-IRRDRの3領域における治療開始前後超早期24時間でのquasispecies変化を検討し、抵抗性と関連するHCV配列についての解明を試みた。興味深いことに、3領域ともインターフェロン感受性と関連する領域として同定されたのにも関わらず、早期の動態は異なっていた。

まずコアに関して、インターフェロン感受性と関連するコア70番アミノ酸は大多数の症例で、野生型(R: アルギニン)と変異型(Q: グルタミン)様々な程度で混在していたが、混在の割合は治療前後で変化を認めなかった。一方、NS5A-ISDR、NS5A-IRRDRの2領域においても、野生型のほかに変異型が、様々に混在していたが、両領域とも治療開始後、特定の配列が選択されていた。IRRDRでは、選択される配列に特定の傾向を認めなかつ

たものの、ISDRでは野生型が強い選択を受けていることが示された。

(2) TVR(テラプレビル)+ペグインターフェロン・リバビリン療法におけるdeep sequence解析

同3剤併用療法導入後わずか12時間後にウイルス多様性は、SVR群あるいはIL28B TT群では低下するものの、non-SVR群あるいはIL28B非TT群では低下を認めないことを示した。治療前から既に混在したTVR耐性変異は臨床的TVR耐性には移行せず、臨床的TVR耐性変異は治療前の野生型に新たに変異を獲得して生じたことを示した。Non-SVR群において治療抵抗性となるに伴い、ウイルスのquasispecies構成は大きく変動し、治療終了後もquasispecies構成変化は治療前には戻らず維持されることを示した。

このようなウイルスの挙動は、SMV(シメプレビル)+ペグインターフェロン・リバビリン3者併用療法においても同様であることを示した。

(3) NS5A阻害剤に対する自然耐性HCVにおけるdeep sequence解析

NS5A阻害剤daclatasvirにおける耐性変異についてdaclatasvir未投与のgenotype 1b症例を対象としてultra-deep sequenceによる検討を行い、daclatasvir耐性変異のひとつNS5A-Y93Hがdaclatasvir未投与でも、3割もの頻度で存在することを明らかとした。

一方、ウイルスと関連する宿主因子の検討において、ペグインターフェロン・リバビリン・telaprevir 3者併用療法におけるウイルスのquasispecies動態、あるいはNS5A阻害剤daclatasvirにおける自然耐性変異率にIL28B SNPは有意に関与することを明らかとした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計14件)

1. Sato M, Maekawa S, Komatsu N, Tatsumi A, Miura M, Muraoka M, Suzuki Y, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Uetake T, Inoue T, Sato T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. 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. 89(11) 2015 6105-16. DOI: 10.1128/JVI.03127-14.査読

- 有
2. Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, Asano Y, Hattori N, Itakura Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Maekawa S, Enomoto N, Izumi N. Naturally occurring resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to IL28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy. *Hepatology* [Epub ahead of print] 2015 [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/hepr.12474. 査読有
 3. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet.* 134(3)2015 279-89. DOI: 10.1007/s00439-014-1520-7. 査読有
 4. 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 hepatitis C virus. *J Virol.* 88(22) 2015 DOI: 13352-66.10.1128/JVI.02280-14. 査読有
 5. 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 Dec;44(14):E360-7. DOI: 10.1111/hepr.12316. 査読有
 6. 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):1339-46. DOI:10.1111/hepr.12309. 査読有
 7. 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.* Jan;49(1)163-4. 2014 DOI: 10.1007/s00535-013-0926-7. 査読無
 8. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K. Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One.* 17;8(12)e82299. 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0082299. 査読有

9. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression. *J Virol.* 87(23) 12541-51. 2013 DOI: 10.1128/JVI.00826-13. 査読有
10. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepat.* 20(4) 281-9. 2013 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2012.01649.x. 査読有
11. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 85(3) 449-58 2013 DOI: 10.1002/jmv.23497. 査読有
12. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic

hepatitis C. *Hepatol Res.* 43(8) 865-75.2013
DOI: 10.1111/hepr.12032. 査読有

13. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. *J Med Virol.* 2012 Sep;84(9):1360-8. doi: 10.1002/jmv.23314. 査読有
14. Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. 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 Nov;56(5):1611-21. doi: 10.1002/hep.25826. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. 前川伸哉、三浦美香、辰巳明久、小松信俊、佐藤光明、鈴木雄一朗、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 Deep-sequence を用いた naturally-occurring DAA resistant HCV の検討 第50回日本肝臓学会総会 2014年5月29日～2014年5月30日 ホテルニューオータニ(東京都千代田区)
2. 佐藤光明、三浦美香、前川伸哉、小松信俊、辰巳明久、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 次世代 sequencer による telaprevir 耐性変異の解析 第50回日本肝臓学会総会 2014年5月29日～2014年5月30日 ホテルニューオータニ(東京都千代田区)
3. 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸 発癌リス

クと治療反応性、薬剤耐性変異を考慮した難治性 C 型肝炎治療 第 50 回日本肝臓学会総会 2014 年 5 月 29 日～2014 年 5 月 30 日 ホテルニューオータニ（東京都千代田区）

4. S. Maekawa, M. Miura, M. Sato, N. Komatsu, Y. Nakayama, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto Deep Sequencing Analysis Of Variants Resistant To Ns5a Inhibitors In Patients With Genotype 1b Hepatitis C Virus Infection. AASLD Liver Meeting 2014 年 11 月 8 日～2014 年 11 月 13 日 ポストン（米国、マサチューセッツ）

〔図書〕（計 2 件）

1. 前川伸哉、榎本信幸 文光堂
HEPATOLOGY PRACTICE C 型肝炎の診療を極める 2014 50-55.
2. 前川伸哉、榎本信幸 診断と治療社 臨床消化器内科 6 月増刊号 C 型肝炎のすべて 2014 135-141.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 伸哉（MAEKAWA Shinya）
山梨大学・総合研究部・講師
研究者番号：70397298

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

榎本 信幸（ENOMOTO Nobuyuki）
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：20251530

三浦 美香（MIURA Mika）
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：00436875

小松 信俊（KOMATSU Nobutoshi）
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：50568003