

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790702

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたHCVに対する3者併用療法中の耐性株の動態の解析

研究課題名(英文)Tracking the emergence of escape mutants during triple therapy for hepatitis C virus infection

研究代表者

Hayes C. Nelson (Hayes, C. Nelson)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・特任講師

研究者番号：50572327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：現在も世界で1.5億人が、慢性C型肝炎ウイルス感染症を有している。直動抗ウイルス薬(DAA)には治癒率は現在70%を超えるまで増加した。しかし、一部の患者はDAA薬に耐性を持つようになる。本研究の目的は、抗ウイルス抵抗性のリスクを最小化するためのガイドラインの確立を支援することでした。ウイルスの突然変異の分析は、直接的な配列決定によって、ならびに超深度配列決定によって行った。この研究の結果は抵抗があってもDAAの併用療法下で出現することができるということを示唆している。この研究は、耐性変異体の分析が、DAA療法の結果を予測するのは必要であるが十分ではないことを示している。

研究成果の概要(英文)：150 million people worldwide have chronic hepatitis C virus infection. With new direct-acting antiviral (DAA) agents, the cure rate has increased to >70%. However, some patients develop resistance to DAA drugs. These experiments were conducted to determine when and how resistance mutations emerge, to identify the properties of common mutants alone and in combination, to examine the effect of resistance mutations on viral fitness, and to investigate the effectiveness of DAA drugs in different genotypes in monotherapy versus combination therapy. Analysis of viral mutations was performed by direct sequencing as well as ultra-deep sequencing. Results of this study suggest that resistance can emerge even under DAA combination therapy, but the presence of resistance mutations prior to therapy does not necessarily lead to treatment failure. These studies demonstrate that analysis of resistance variants is necessary but not sufficient to predict the outcome of DAA therapy.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ウイルス ゲノム 遺伝子 医療 免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

現在も世界で1.5億人が、慢性C型肝炎ウイルス(HCV)感染症を有している。治療によらず、肝硬変および肝癌発症の危険性が高い。最近まで、患者のわずか50%のみが承認された療法によって正常に処理されてきた。直動抗ウイルス薬(DAA)という新しいクラスの薬が最近承認され、テラプレビルとdaclatasvirとasunaprevir等には治癒率は現在70%を超えるまで増加した。しかし、一部の患者は、DAA療法への応答に失敗し、一部はDAA薬に耐性を持つようになる。野生型株はしばしばDAA療法中にほとんど検出されなくなったものの、治療を中止したとき、野生型株は急速に回復し、変異株はほぼ検出されなくなった。これは、耐性変異が薬剤の存在下で強力な競争優位性を与えるが、薬剤が存在しないときに複製を妨げる可能性があることを示している。この結果は、耐性変異が低い適性を持っている薬を設計する上で役立つことがある。尚、この研究は、DAA療法における耐性のリスクを最小限にするために行った。

## 2. 研究の目的

HCV複製は、急速でエラーが発生しやすくなり、薬剤に耐性の変異が直ぐに出現する。ある場合には一つでもヌクレオチドの変異が耐性を発生するのに十分であるかもしれない。したがって、各薬物および各変異の性質の抵抗に対する障壁を理解する必要がある。いくつかの耐性変異は、治療前に自然に存在するのに、他の耐性変異は治療の過程の間に出現することができる。これらの実験はいくつかの理由のために実施した：1) どの耐性変異が出現する、2) 単独で、共通の変異体の性質を識別し、組み合わせる、3) ウイルス適応上の耐性変異の影響を調べるために、決定すること、および4) 単独療法に対する併用療法における異なる遺伝子型でのDAA薬の有効性を調査する。本研究の目的は、抗ウイルス抵抗性のリスクを最小化するためのガイドラインの確立を支援することでした。

## 3. 研究の方法

最初の研究では、サブゲノムHCVレプリコン細胞においてHCV遺伝子型1bおよび2aに対するBMS-605339(NS3プロテアーゼ阻害剤)、BMS-788329(NS5A阻害剤)およびBMS0821095(NS5Bポリメラーゼ阻害剤)との併用療法の効果は調べた。各薬剤は、ヒト肝細胞キメラマウスでは単独および併用療法で研究した。ウイルスの突然変異の分析は、直接的な配列決定によって、ならびに超深度配列決定によって行った。

第二の研究において、8人の患者は、daclatasvir、ペグインターフェロン、およびリバビリンで処理した。耐性変異体が、治療前に存在したか、治療中に出現したか否かを測定した。超深度配列決定は、耐性変異体が、治療前に存在したか、治療中に出現したか否かを測定した。

第三の研究において、10人の患者は、daclatasvirおよびasunaprevir併用療法で治療した。NS3およびNS5Aにおける抵抗の変異の頻度は、超深度配列決定を使用して、治療前および治療中に測定した。

## 4. 研究成果

最初の研究では、BMS-605339及びBMS-821095は、遺伝子型2aよりも遺伝子型1bに対してより強力であった。各薬剤は、単剤療法で用いたときに、キメラマウスでは、耐性変異は、BMS-605339およびBMS-788329、およびBMS0821095に対して出現した。コンビネーションBMS-605339およびBMS-788329のどちらかBMS0821095完全に根絶遺伝子型1bのウイルスを用いた治療が、遺伝子型2aまたは2bウイルスに対して効果的ではなかった。

第二の研究において、患者は8人のうち6人は治ったが、治療の終了前には2人にはウイルスが発生した(ウイルスブレイクスルー)。超深度配列決定は、これらの患者からの血清について行った。治療中、NS5Aにおける耐性変異の頻度が急激に増加した。治療中、NS5Aにおける耐性変異の頻度が急激に増加した。これらの結果は、DAA療法の前および治療中に耐性突然変異の出現を監視する必要があることを示唆している。

第三の研究において、10人の患者のうち8人が治ったが、ウイルスブレイクスルーまたは再発は2人の患者に発生した。既存のdaclatasvir耐性変異は、ウイルスのブレイクスルーを有された患者においてだけでなく、治った患者の2人にも検出された。既存のasunaprevir耐性変異はどの患者で検出された変異は検出されなかった。しかし、どちらも、治っていない2人の患者において、daclatasvirおよびasunaprevirの突然変異は検出された。この研究の結果は抵抗があってもDAAの併用療法下で出現することができるということを示唆している。逆に、前治療に対する耐性変異の存在は、常に治療の失敗につながるものではない。

要約で、この研究は、耐性変異体の分析が、DAA療法の結果を予測するのは必要であるが十分ではないことを示している。

## 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 10 件)

1. Fujino H, Imamura M, Nagaoki Y, Kawakami Y, Abe H, Hayes CN, Kan H, Fukuhara T, Kobayashi T, Masaki K, Ono A, Nakahara T, Honda Y, Naeshiro N, Urabe A, Yokoyama S, Miyaki D, Murakami E, Kawaoka T, Hiraga N, Tsuge M, Hiramatsu A, Hyogo H, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Ohishi W, Chayama K. Predictive value of the interferon lambda 4 polymorphism on outcome of telaprevir, pegylated interferon, and ribavirin therapy for older patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology*, 印刷中, 査読有
2. Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami M, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in hepatitis C virus genotype 1 infected patients. *Journal of Viral Hepatitis*, 印刷中, 査読有
3. Nagaoki Y, Imamura M, Kawakami Y, Kan H, Fujino H, Fukuhara T, Kobayashi T, Ono A, Nakahara T, Naeshiro N, Urabe A, Yokoyama S, Miyaki D, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Aikata H, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Chayama K. Interferon lambda 4 polymorphism effects on outcome of telaprevir, pegylated interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology Research*, 印刷中, 査読有, doi: 10.1111/hepr.12336
4. Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Kubo M, Chayama K. Interferon lambda 4/interleukin-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. *Journal of General Virology*, 95 巻, 査読有, 2014, pp1297-306, doi:10.1099/vir.0.060103-0
5. Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A translational study of resistance emergence using sequential direct-acting antiviral agents for hepatitis C using ultra-deep sequencing. *American Journal of Gastroenterology*, 108 巻, 査読有, 2013, pp1464-1472, doi: 10.1038/ajg.2013.205
6. Chayama K, Hayes CN. Interleukin-28B polymorphisms and hepatitis C virus clearance. *Genome Medicine*, 5 巻, 査読有, 2013, p6, doi: 10.1186/gm410
7. Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441 巻, 査読有, 2013, pp230-235, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.040
8. Miki D, Ochi H, Takahashi A, Hayes CN, Urabe Y, Abe H, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Akuta N, Suzuki F, Ikeda K, Kumada H, Karino Y, Toyota J, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HLA-DQB1\*03 confers susceptibility to chronic hepatitis C in Japanese: a genome-wide association study. *Public Library of Science One*, 8 巻, 査読有, 2013, pp e84226, doi:10.1371/journal.pone.0084226
9. Shi N, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Zhang Y, Kosaka K, Okazaki A, Murakami E, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Takahashi S, Ochi H, Tateno-Mukaidani C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Gao M, Chayama K. Combination therapies with NS5A, NS3 and NS5B inhibitors on different genotypes of hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *Gut*, 62 巻, 査読有, 2013, pp1055-1061, doi:10.1136/gutjnl-2012-302600
10. Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultra-deep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, pegylated interferon, and ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58 巻, 査読有, 2014, pp2105-2112, doi: 10.1128/AAC.02068-13

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tahahashi S, Ochi H, Chayama K. Early and late changes in gene expression profiles following infection with hepatitis B or C virus in human hepatocyte chimeric mice, The 64nd annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 4 Nov 2013, Washington DC, U.S.A.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：査読有  
報告集  
〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

ヘイズ クレアー ネルソン (Hayes, Clair Nelson)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・特任講師

研究者番号：50572327

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：