

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09358

研究課題名(和文) 欠損型C型肝炎ウイルス変異による薬剤耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses of the dynamics of drug-resistant hepatitis C virus clones focusing on the defective HCV clones

研究代表者

大鶴 繁 (Ohtsuru, Shigeru)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60437225

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)： インターフェロン(IFN)フリー療法に伴い出現する薬剤耐性C型肝炎ウイルス(HCV)の動態を、欠損型HCVに着目して明らかにすることを旨とした。京大病院及びその関連病院でのIFNフリー療法の治療前と再発時の血清検体を集積し、ディープシーケンシングにより主要な薬剤耐性変異の動態について解析した。

8例の欠損型HCV症例を同定し、治療前に存在した欠損型HCVが再燃時に検出されなくなる等、ダイナミックなクローン多様性の変化が観察された。また長鎖塩基配列を連続して解読可能な第3世代シーケンサーを用いて、HCVを一分子レベルで同定し、治療前後で欠損型HCVの多様性が大きく変化している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性変異の出現は完全なHCVの排除の障壁になっており、本研究では塩基置換だけではなく欠損型クローンという構造異常に着目した点に新規性があり、社会的な脅威である肝炎ウイルス撲滅にむけた病態解明に貢献したと考えられる。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study is to unveil the dynamics of drug-resistant hepatitis C virus clones emerging after interferon-free therapies focusing on the defective HCV clones. We analyzed the dynamics of major drug-resistant nucleotide changes in the serum samples collected by the patients who received interferon-free therapies in Kyoto University Hospital and related hospitals using deep sequencing method. We detected 8 cases harboring defective HCV clones before treatment, some of which disappeared during the treatment period. We also focused on the third-generation sequencing platform, which can determine heterogeneous population of defective and non-defective HCV clones in the single-molecular resolution. Establishing this novel methodology, we demonstrated the dynamic changes of the quasispecies of HCV clones which possess long deletions on the viral genome, which would be shedding light on the pathogenesis of chronic HCV infection.

研究分野：医歯薬学

キーワード：C型肝炎ウイルス 欠損型クローン 薬剤耐性変異 肝臓学 ディープシーケンシング 第3世代シーケンサー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝癌の最大の原因のひとつであるC型肝炎(HCV)に対して、新規開発されたインターフェロンフリーの経口剤治療は有用な治療法として臨床導入されたが、薬剤耐性ウイルスの出現が大きな問題となった。また高齢者や腎機能低下例に使用できない等の問題が残る。従って、薬剤耐性を考慮した従来治療薬との使い分け戦略が必要であり、HCVの薬剤耐性変異の動態解明がますます重要と考えられた。

(2) 申請者らはこれまで、C型肝炎ウイルス(HCV)が持つ多様性に注目し、ディープシーケンシング技術を用い、HCV感染の病態解明を行ってきた。中でも申請者は、ヒトでのHCV初感染～慢性化モデルとして肝移植後C型肝炎に着目し、肝移植後のグラフト肝への再感染に伴うHCVの多様性の動態を解明してきた(文献)。申請者らの研究室では、多様なHCVの中でも非常にダイナミックな変化として、C型慢性肝炎の肝及び血清中に、構造領域に欠失を伴った欠損型HCVが完全型HCVと共感染していることを見出し、世界に先駆けて抗ウイルス治療抵抗性との関連性及びその特徴を報告してきた(文献)。欠損型HCVは完全型HCVと共感染し、それぞれ独立して自己複製されていることが明らかにされており(文献)、欠損型HCVの存在と治療抵抗性との関連性が報告されているが、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ディープシーケンサー解析を用いて、C型慢性肝炎への新規抗ウイルス療法(インターフェロンフリー療法)に伴う、欠損型HCVと薬剤耐性化との関連性を明らかにすることにより、HCVの薬剤耐性変異獲得メカニズムを解明することを目的とする。

(2) HCVに対するインターフェロンフリー療法症例血清中HCVのDAA(直接作用型抗ウイルス薬 Direct-acting Antiviral Agents)開始前(A)・開始1週間後(B)・HCV再燃時(C)のディープシーケンサー比較解析により、欠損型HCVと薬剤耐性化との関連性を研究するため、以下の3点を明らかにする。

- インターフェロンフリー療法に伴うHCV薬剤耐性変異及び多様性の変化
- インターフェロンフリー療法再燃例におけるHCV薬剤耐性変異の変化
- 欠損型HCVの動態とその薬剤耐性変異の変化

3. 研究の方法

(1) 本研究では、C型慢性肝炎に対するインターフェロンフリー療法に伴う、欠損型HCVと薬剤耐性化との関連性を明らかにし、HCVの薬剤耐性変異獲得メカニズムを解明する目的で、ディープシーケンサー解析を用い下記項目の解析を実施する。

まず、上記目的の及びの解析を行うことで、DAA経口2剤併用療法に伴う薬剤耐性変異の経時的変化を解明する。さらに、について完全型HCVと比較解析し、耐性変異が完全型と欠損型のどちらのクローンに存在するのか、またその特徴を明らかにする。

(2) 対象は、京都大学医学部附属病院及びその関連病院でインターフェロンフリー療法を施行した約400例の慢性C型肝炎症例。このうち30例の治療前、治療一週間後、再燃時の3点における血清検体を集積し、HCV-RNAを抽出し凍結保存した。HCV-RNAサンプルを用いて、NS3からNS5Aまでの領域をRT-PCR法にて増幅し、ターゲットディープシーケンシングの手法により、主要な薬剤耐性変異を検出した。

検出した薬剤耐性変異の割合を、DAA開始前、開始一週間後、HCV再燃時と比較することにより、薬剤耐性変異を有するウイルスの動態について解析した。

(3) 新たに一分子リアルタイムシーケンシングと呼ばれる新規シーケンサー(第3世代シーケンサー)が開発され、従来の次世代シーケンサーに比して極めて長い塩基配列を連続して解読できる技術が登場した。代表的な第3世代シーケンサーであるPacBioシーケンサーを用いることで、HCVの構造領域から薬剤耐性関連領域に至る、より高精度な解析が可能となり、特に、長い欠失を伴う欠損型HCVの解析には有用であると考えられたため、PacBioシーケンサーを用いてインターフェロンフリー治療前後の欠損型HCVの動態を解析した。

4. 研究成果

(1) HCVのNS3からNS5Aの一部に至る約3,000塩基のRT-PCRを施行し、まず、サーモフィッシュ社のIonProtonシーケンサーを使用して、ターゲットディープシーケンシングを行った。先行研究にて0.4%以上の頻度で認められる塩基置換はエラーと区別ができることが示されており(文献)、それをもとに、これまでによく知られている薬剤耐性変異について各時点での存在比率を算出した。多くの検体において、再燃時にはNS3およびNS5Aの複数個所の薬剤耐性変異が全体の大半を占めることが分かり、再燃時には多剤耐性変異ウイルスが大量に存在している

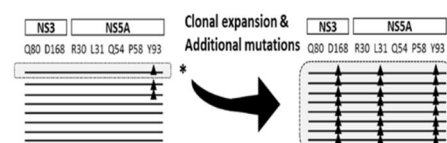


図1 薬剤耐性変異の治療前後の変化

ことが確認できた。

一方、治療前の検体でも、様々な頻度で薬剤耐性変異が検出されることが分かった。重要なことに、治療前には一般臨床で用いられるサンガー法では変異を認めずに野生型と判定されていた症例においても、サンガー法よりも感度が高いディープシーケンシングを用いることによって、1%のものも含め、多彩な薬剤耐性変異が潜在していることが判明した。

(2) 次に、Core 領域から NS5A までの 7,000 塩基に渡る領域を PCR で増幅することにより、構造領域を含む塩基配列の解析を行った。すると、本来電気泳動にて 7,000 塩基の単一バンドが確認されるべきところ、複数バンドが出るサンプルが 8 例存在した。短い方のバンドについては長さがサンプルごとに異なったが、短い方のバンドのみをゲル抽出の手法で分離した上でシーケンシングを行うと、いずれも HCV ゲノムの一部に一致し、欠損型ウイルスのゲノムである可能性が示唆された。

臨床の現場では、「変異が検出されたのに治る症例と治らない症例が存在するのはなぜか」という問題が生じており、それを明らかにするため、第一世代のインターフェロンフリー治療であるダクラタスビル・アスナプレビル併用療法の治療失敗例の原因として最も代表的な NS5A-Y93H 変異の有無を、全長型および欠損型の HCV に分けて比較した。すると、症例によって全長型と欠損型で Y93H の比率が大きく異なる例が散見された。例えば、ある症例では、全体では Y93H が 48%であったところ、全長型だけでは Y93H が 27%、欠損型では 71%と、欠損型で多くの薬剤耐性変異が認められ、インターフェロンフリー治療にてウイルス排除 (SVR) が得られた。一方、別の症例では Y93H の存在比率がこれと逆であった。さらに、治療前に存在した欠損型 HCV が再燃時に検出されなくなるなど、ダイナミックなクローン多様性の変化が観察された。

欠損型 HCV の多くは構造領域に大きな欠損が生じていて、自身では構造蛋白を作ることができないことを考えると、同じ比率で NS5A-Y93H を有していても、それを完全型 HCV が有しているのか、欠損型 HCV が有しているのかによって、その意味合いが大きく変わることが示唆される。欠損型 HCV が検出される症例が限定的であること、欠損型 HCV の分離が比較的難しいことなどから、現時点では欠損型 HCV の存在と Y93H 比率、および治療効果との間で統計学的に有意な差を得ることまではできなかったが、このような視点を加えて薬剤耐性の病態を考察することの重要性が示唆される結果を得たと考える。

(3) ゲノム上離れた位置に存在する複数の変異を同時に有する多重変異を解析するために、当初の研究計画に加え、第 3 世代シーケンシングを追加で施行することにした。第 3 世代シーケンシングは千葉大学予防医学センター 臨床予防医学 オミックス解析応用学部門で行った。代表的な第 3 世代シーケンサーである PacBio RSII, Sequel による HCV ゲノムの解析手法の確立を目指した。第 3 世代シーケンシングでは、長鎖塩基配列を連続して解読可能であり、この特徴を生かして、数百塩基に渡る欠損をはじめとした多様な欠損型 HCV を一分子レベルで同定することが可能となった (図 2)。実際には、同一患者血清には、単一の欠損型 HCV ではなく、様々な部位に様々な長さの欠損型 HCV クローンが共存していることが判明した。すなわち、これまで塩基置換という観点から HCV ゲノムの多様性が論じられてくることが一般的であったが、本解析結果から、HCV ゲノムには欠損部位の多様性というゲノム構造異常の多様性があることが分かり、感染ウイルス全体のゲノムの多様性を極めて複雑にしていることが判明した。さらに、治療前と再燃時では欠損型 HCV の多様性が大きく変化していることが明らかとなった。各薬剤耐性変異の有無と領域欠損の有無に基づくと、同一血清内に数千のハプロタイプの HCV が共存しており、当初想定していた「欠損型と完全型での薬剤耐性変異の有無」という単純な比較では全体像を説明することができないほど複雑な病態であることが判明した。

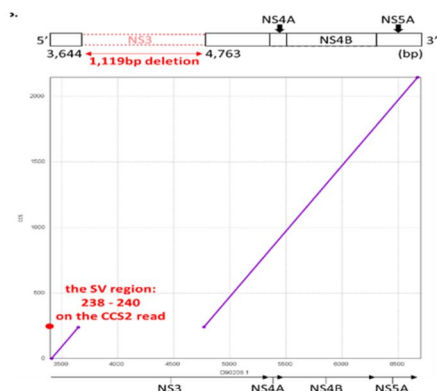


図2 欠損型ウイルスゲノムのMummer plot

(4) 本研究では塩基置換だけではなく欠損型クローンという構造異常に着目して最新のシーケンシング技術を用いて解析した点に新規性があり、従来考えられてきた以上に複雑な多様性を持ってウイルスがヒトに感染しているという、新たな知見を明らかにすることができた。今回確立したプラットフォームを用いることで、今後多数例を対象とした統計学的解析が期待でき、社会的な脅威である肝炎ウイルス撲滅にむけた病態解明に貢献したと考えられる。

< 引用文献 >

Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Chiba T “Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis”, J Clin Microbiol. 2013; 51(11):3645-3652

Iwai A, Marusawa H, Y Takada, et al Identification of Novel Defective HCV Clones in Liver Transplant Recipients With Recurrent HCV Infection. *J Viral Hepatitis*. 2006 Aug;13(8):523-31.

Sugiyama K, Suzuki K, Shimotohno K, et al. Genetic Analysis of Hepatitis C Virus With Defective Genome and Its Infectivity in Vitro. *J Virol*. 2009 Jul;83(13):6922-8.

Takeda, H. Ueda Y, et al. Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing. *Sci Rep* 2017; 7, 45605.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takeda H, Ohtsuru S, et al.	4. 巻 68
2. 論文標題 The Oncogenic Potential of Regenerative Nodules in Cirrhotic Liver Confirmed By Total Transcriptome Analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 214A
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 H. Takeda, S. Ohtsuru, et al.	4. 巻 66, NUMBER1 (SUPPL)
2. 論文標題 Third-generation sequencing unveils the evolution of multi-drug resistant hepatitis C virus clones during direct-acting antiviral therapy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 463A
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeda H, Ohtsuru S, et al.
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 (United European Gastroenterology) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeda H, Ohtsuru S, et al.
2. 発表標題 The Oncogenic Potential of Regenerative Nodules in Cirrhotic Liver Confirmed By Total Transcriptome Analysis.
3. 学会等名 AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruhiko Takeda, Yoshihide Ueda, Tadashi Inuzuka, Shigeru Ohtsuru, Hiroshi Seno, Akihiro Sekine, Hiroyuki Marusawa
2. 発表標題 Third-generation sequencing unveils the evolution of multi-drug resistant hepatitis C virus clones during direct-acting antiviral therapy.
3. 学会等名 AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihide Ueda, Haruhiko Takeda, Shigeru Ohtsuru, S. Uemoto, H. Marusawa
2. 発表標題 EMERGENCE OF MULTIDRUG-RESISTANT HEPATITIS C VIRUS DURING INTERFERON-FREE THERAPY WITH ASUNAPREVIR AND DACLATASVIR AFTER SIMPREVIR-BASED TRIPLE THERAPY FOR RECURRENT HEPATITIS C AFTER LIVER TRANSPLANTATION
3. 学会等名 United European Gastroenterology 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	上田 佳秀 (Ueda Yoshihide) (90378662)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	小池 薫 (Koike Kaoru) (10267164)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	竹田 治彦 (Takeda Haruhiko) (40647525)	千葉大学・予防医学センター・日本学術振興会特別研究員 (P D) (12501)	