

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15960
研究課題名(和文) C型肝炎難治例の薬剤耐性変異及びウイルス排除後肝発癌に関連する遺伝要因の解明

研究課題名(英文) Analysis of HCV drug resistance associated variants treated with direct-acting antiviral (DAA) failure and genetic factors predict of HCC development after SVR.

研究代表者
飯尾 悦子(110, ETSUKO)
名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：20543797
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IFNフリーDAA治療でのHCV排除後肝発癌に関して、ウイルス学的著効(SVR24)症例のゲノムを共同施設から収集し、臨床情報と合わせて検討した。約1100例でTLL1(rs8099917)遺伝子多型を解析した。DAA終了後1年以降の初発肝癌には、SVR24時点におけるAFP、Fib4、TLL1 AT+TT群がSVR後初発肝癌の有意なリスク因子であった。TLL1 AT+TT群ではAA群に比べ優位に累積発癌率が高かった。Fib4、AFP、TLL1は発癌高リスク群の囲い込みに有用であった。以上の結果をJ Gastroenterol. 2019 Apr;54(4):339-346.に論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCVはIFNフリーDAA治療の進歩により、ごく一部の難治症例を除き、ほぼ全例ウイルス排除(SVR)ができる時代になり、SVR後の肝発癌高リスク群の囲い込みが重要になっている。IFN治療時代から言われていた肝硬変、高齢といった因子だけでなく、ヒトの遺伝子要因としてTLL1遺伝子多型が関与することを明らかにした。AFPやFib4といった従来の発癌リスク因子に加えて、遺伝的要因を加味することで、多数のSVR症例の中から、発癌高リスク群の囲い込みに寄与すると思われる。今後の日常臨床において、SVR後フォローに関する重要な知見が得られると思われる。

研究成果の概要(英文)：The eradication of HCV by IFN-free DAAs treatment is effective at reducing the risk of HCC. However, there is still a risk of HCC after eradicating HCV. We investigated the most genetic risk factors of SVR-HCC. More than 1100 patients achieved SVR with IFN free DAAs treatment were enrolled. The proportion of rs17047200 AT/TT was significantly higher in the HCC group than the non-HCC group. Higher levels of a-fetoprotein, FIB-4 and rs17047200 AT/TT were independent risk factors for developing HCC. Cumulative incidence of HCC was significantly higher in patients with rs17047200 AT/TT than in those with AA. Comparing clinical characteristics according to the TLL1 genotypes, patients with rs17047200 AT/TT had significantly lower platelet counts and higher levels of FIB-4 than those with AA. The TLL1 variant was independently associated with HCC development after HCV eradication by IFN-free regimen. We reported these results with J Gastroenterol. 2019 Apr;54(4):339-346.

研究分野：消化器内科

キーワード：HCV DAA SVR後発癌 TLL1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における C 型肝炎感染者は 200 万人程度とされる。近年ウイルス蛋白を標的とした様々な直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) が開発され、従来のインターフェロン (IFN) 治療が困難であった肝硬変患者においても、高い SVR (抗ウイルス治療終了 24 週後に HCV が検出されない率) を得られるようになり、HCV は排除できる時代となった。ただ DAA 治療は IFN 時代にはない、薬剤耐性変異が問題となった。NS5B ポリメラーゼ阻害薬ソホスブミル/NS5A 阻害薬レディパスビル (SOF/LDV) 治療は現在全世界で行われており、高いウイルス排除率が期待できる。一方、本邦では DAA 治療として NS5A 阻害薬ダクラタスビル/NS34A プロテアーゼ阻害薬アスナプレビル (DCV/ASV) 療法が 2014 年に先行して行われ、そのウイルス排除率は 85% 程度であり、DCV/ASV 治療不成功例では様々な NS5A 耐性変異が出現するため、SOF/LDV による再治療の成績は 60-70% 程度と十分ではなく、新たな耐性変異が確認された。DCV/ASV 不成功例は約 8000 人存在すると推定されているが、これらは多剤耐性のため SOF/LDV 治療抵抗性と考えられ、治療法の確立が急務である。さらに DAA 療法によりウイルス排除された症例は高齢、肝硬変を含む線維化進展例など、発癌高リスク群が多く含まれている。したがって、DAA 治療時代においては、これまで以上にウイルス排除後発癌に注意が必要であり、HCV 排除後発癌の高危険群を囲い込むための新たなバイオマーカーの開発が望まれる。我々のグループはこれまでに、HCV に対する主流の治療であったペグインターフェロン (IFN) + リバビリンの薬剤応答性に関連する SNP、および線維化に関連する糖鎖マーカーを同定し、臨床応用してきた (*Int J Cancer*. 2016;15;138(6):1462-71, *Sci Rep*. 2013;3:1065, *Nat Genet* 2009 41:1105-9)。最近、我々は IFN ベースの治療で HCV 排除を達成した症例における肝癌発症に関連する SNP (TLL1) をゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法を用いて同定した。

2. 研究の目的

DCV/ASV 治療不成功例における SOF/LDV 治療例での耐性変異と治療効果の関係、また今後増加するウイルス排除後の肝発癌に着目した。

1) DCV/ASV 治療不成功例で SOF/LDV 治療を施行した症例において治療成功例と不成功例の血清を用いて耐性変異を検討する。これまでに得られた結果から、SOF/LDV 治療不成功例では、SOF 耐性として既報の NS5B 領域 L159F、I262V、S282T、C316N、L320F などの変異を認めない症例が多い。我々はすでに新規の耐性変異の検索を行い、治療失敗例では NS5B 領域 207T+218S+316N 変異が存在することを見出している。この変異株に対しレプリコンを用いて薬剤耐性能、ウイルス複製能を検証する。DCV/ASV 不成功例は本邦で約 8000 人存在すると考えられるが、これらは SOF/LDV に対して難治と考えられており、治療法の確立が急務である。また DAA 内服治療により大多数の症例でウイルス排除が得られ、今後重要となると考えられ、2) ウイルス排除後の肝発癌について検討した。これまでに我々は多施設共同研究で得られた血清やゲノム DNA を用いて、発癌に関係する SNP や線維化マーカーを見出してきた。DAA 治療によりウイルス排除された症例の検体及び臨床情報を継続的に収集し、発癌との関連性を検討することで真の発癌予測マーカーの同定を目指す。これらの結果から DAA 治療不成功症例における効率的な治療法の選択、及び HCV 排除後の発癌高リスク群の囲い込みを行うことを目標とした。

3. 研究の方法

DCV/ASV 不成功例に対する SOF/LDV 療法不成功例で生じる耐性変異について、NS5A 領

域の耐性変異に加えて、SOF/LDV 療法失敗例においては NS5B 領域の 207T+218S+316N 変異が存在する。レプリコンを用いた解析により、真の耐性変異を特定することを試みた。SOF/LDV 療法を施行前後の患者血清から HCV-RNA を抽出し、逆転写酵素を反応させ相補的 DNA (cDNA) とする。この cDNA を鋳型として NS5A, NS5B 領域の PCR を行い、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定する。我々はすでにこれまでの検討で、NS5B 領域に関して、既報にない SOF の治療不成功例に特徴的な変異 207T+218S+316N 変異を見出している。SOF/LDV 療法の治癒例・治療不成功例それぞれの特徴的塩基配列を持った PCR 産物を制限酵素処理してクローニングベクターに組み込み、大腸菌を形質転換させ、この大腸菌を大量培養した後、ベクターを抽出・精製・確認を行った。その後共同研究施設の国立感染症研究所でこの特徴的な配列を組み込んだ HCV レプリコンを作成し、SOF 耐性やウイルス複製能について検討した。

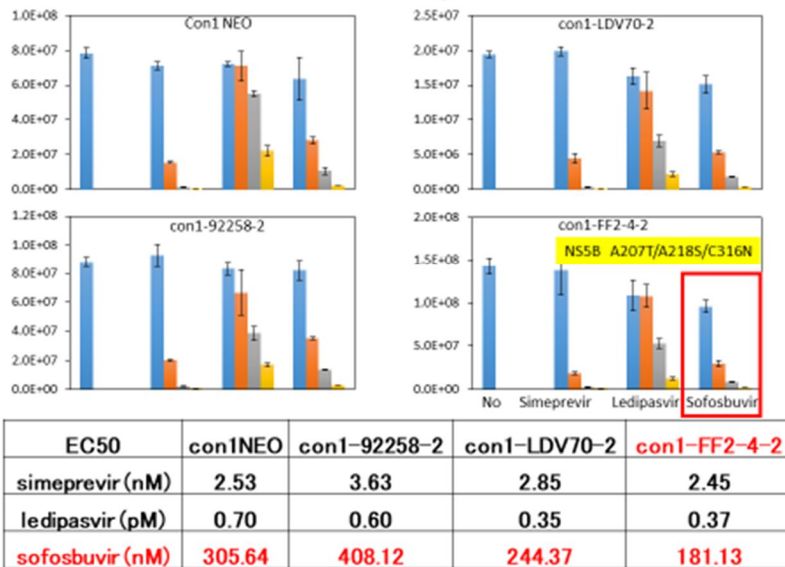
もう一つの課題は、DAA 治療によりウイルス排除を達成した高齢者や線維化進展例など発癌高リスク群のフォローアップシステムの確立を目標とした。これまでに収集したゲノム検体 (IFN ベース治療の約 5000 例、DAA 治療例で約 1000 例) を用いて、多くの共同研究施設からの DAA 治療前後、さらに経時的な血清、臨床情報と合わせて解析することで、DAA 治療後の発癌や線維化改善について検討を行った。DAA 治療後にウイルス排除を達成した症例において、一定期間の経過観察期間を経て発癌した例と非発癌例において発癌に関わる SNP を検討した。我々は IFN ベース治療で SVR となった症例における発癌に寄与する TLL1 SNP をゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法で同定した。一方で DAA 治療例は高齢者や肝硬変など従来 IFN 時代の治療例に比べて発癌の高リスク群と考えられており、DAA 治療例においても SNP が発癌予測となりうるか、検討を行った。肝線維化など臨床情報を含めて発癌との関連を解析した。

4. 研究成果

SOF/LDV 治療不成功例における耐性変異の検討についての検討

治療不成功例の患者血清から抽出した HCV-RNA で多く認められた 207T+218S+316N 変異変異株のレプリコン解析を行った。ウイルス再燃時の患者血清から、HCV-RNA を抽出し、相補的 DNA (cDNA) 作成。この cDNA を鋳型として NS5B 領域の PCR を行い、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、NS5B A207T/A218S/C316N の塩基配列を有する PCR 産物と治療成功例の NS5B A207/A218/C316 の塩基配列を有する PCR 産物を BglII で処理して Ligation、大腸菌を形質転換させてそれぞれのクローンを 10 コロニーほどピックアップ、ミニプレップ後で増幅後、プラスミド精製した。その後この配列を BglII fragment を Con1 レプリコンに挿入した。Huh7 細胞を G418 存在下に 3 週間培養し、NS5B A207T/A218S/C316N の塩基配列と NS5B A207/A218/C316 の塩基配列を有するレプリコン RNA を複製した。変異株は野生株と同程度に SOF による複製能低下を認め、また SOF の EC50 は野生株 305.6nM、変異株 181.3nM と変異株は野生株と同程度であった。このため、207T+218S+316N 変異変異株は SOF 耐性としては否定的であった(図)。この結果について、また DAA 治療不成功例における NS5A 変異、NS5B 薬剤耐性変異に関して、第 53 回日本肝臓学会総会、JDDW2017、第 55 回日本肝臓学会総会にて発表を行った。

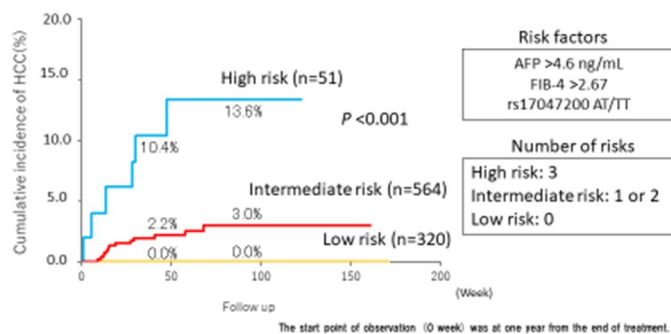
Resistance of replicon cells



ウイルス排除後の初発肝発癌検討

SVR 症例のゲノムを全国多施設から収集しており、これまでに約 1700 例収集した。我々は IFN ベース治療で SVR 後発癌に寄与する因子として TLL1 (rs8099917) 遺伝子多型を報告したが、IFN フリー DAA 治療で SVR24 を達成した約 1100 例において TLL1 遺伝子多型の解析を行った。DAA 治療前、ウイルス学的著効 (SVR24) 時点における臨床データと遺伝的要因を合わせて検討すると、DAA 治療終了後 1 年以降の初発 肝癌の検討では、SVR24 時点における AFP、Fib4、TLL1 AT+TT 群が SVR 後初発肝癌の有意なリスク因子であった。また TLL1 (rs8099917) AT+TT 群では AA 群に比べ優 位に累積発癌率が高かった。さらに Fib4、AFP、TLL1 を組み合わせることで、発癌高リスク群を効率に囲い込みが可能と思われた。

Cumulative incidence of HCC after achieving SVR by interferon-free therapy according to the number of risk factors



Cumulative incidence of HCC after achieving SVR by interferon-free therapy according to the number of the risk factors AFP >4.6 ng/mL, FIB-4 >2.67 and rs17047200 AT/TT. The 1- and 2-year cumulative incidence rates of HCC from the start point were 10.4% and 13.6% in the High risk group, 2.2% and 3.0% in the Intermediate risk group, and 0.0% and 0.0% in the Low risk group (0.0% and 0.0%), respectively.

この結果については、JDDW2018、AASLD2018、第 105 回日本消化器病学会総会での報告を行った。また J Gastroenterol. 2019 Apr;54(4):339-346.に論文報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iio E, Matsuura K, Shimada N, Atsukawa M, Itokawa N, Abe H, Kato K, Takaguchi K, Senoh T, Eguchi Y, Nomura H, Yoshizawa K, Kang JH, Matsui T, Hirashima N, Kusakabe A, Miyaki T, Fujiwara K, Matsunami K, Tsutsumi S, Iwakiri K, Tanaka Y.	4. 巻 54
2. 論文標題 TLL1 variant associated with development of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus by interferon-free therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 339-346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-018-1526-3.	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 Huang CF, Iio E, Jun DW, Ogawa E, Toyoda H, Hsu YC, Nomura H, Park SH, Nakamuta M, Huang JF, Tai CM, Lo GH, Lee MH, Yang HI, Kao JH, Tamori A, Eguchi Y, Ueno Y, Furusyo N, Tanaka Y, Yu ML, Nguyen MH, et al; REAL-C Investigators.	4. 巻 13
2. 論文標題 Direct-acting antivirals in East Asian hepatitis C patients: real-world experience from the REAL-C Consortium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Int. 2019 Sep;13(5):587-598	6. 最初と最後の頁 587-598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-019-09974-z	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Etsuko Iio, Kentaro Matsuura, Noritomo Shimada, Masanori Atsukawa, Koichi Takaguchi, Yuichiro Eguchi, Hideyuki Nomura, Noboru Hirashima, Atsunori Kusakabe, Tomokatsu Miyaki, Kei Fujiwara, and Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 Predictors of hepatocellular carcinoma development after eradication of hepatitis C virus based on TLL1 variant, AFP and Fib 4 inde
3. 学会等名 AASLD2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯尾悦子、島田紀朋、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患IFNフリーDAA治療不成功例における薬剤耐性変異からみた再治療の検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯尾悦子、松浦健太郎、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患におけるDAA治療後初発肝発癌のリスク因子検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯尾悦子、松浦健太郎、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患におけるDAA治療後肝発癌のリスク因子検討
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯尾悦子、松浦健太郎、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患におけるDAA再治療、治療後発癌および肝線維化の検討
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯尾悦子、松浦健太郎、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患におけるDAA治療後肝発癌及び線維化改善とTLL1遺伝子多型の関連性
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Etsuko Iio, Kentaro Matsuura, Noritomo Shimada, Masanori Atsukawa, Koichi Takaguchi, Yuichiro Eguchi, Hideyuki Nomura, Noboru Hirashima, Atsunori Kusakabe, Tomokatsu Miyaki, Shunsuke Nojiri, Kayoko Matsunami, Kei Fujiwara, and Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 Association of TLL1 variant with development of hepatocellular carcinoma and fibrosis after eradication of hepatitis C virus
3. 学会等名 AASLD2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯尾悦子、松浦健太郎、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患に対するIFN-free治療非著効例の宿主因子、薬剤耐性変異の検討
3. 学会等名 JDDW2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Etsuko Iio, Noritomo Shimada, Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 Investigating the association of TLL1 variant with development of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus by interferon-free regimens
3. 学会等名 AASLD2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯尾悦子、松浦健太郎、田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患に対するIFNフリー治療成績及び治療後発癌に寄与する宿主因子の同定
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯尾悦子, 島田紀朋, 高口浩一, 妹尾知典, 江口有一郎, 厚川正則, 坪田昭人, 安部宏, 加藤慶三, 日下部篤宣, 宮木知克, 松浦健太郎, 野尻俊輔, 藤原圭, 松波加代子, 田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患に対するSofosbuvir/Ledipasvir併用療法における非著効例の検討
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 飯尾悦子, 島田紀朋, 松浦健太郎, 松波加代子, 野尻俊輔, 田中靖人
2. 発表標題 C型慢性肝疾患genotype1に対するSofosbuvir/Ledipasvir併用療法非著効例における薬剤耐性変異検討
3. 学会等名 第27回抗ウイルス療法学会総会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----