

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15821

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス直接作用薬治療不成功に関連する新たな薬剤耐性変異の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of novel resistance-associated substitutions of direct-acting antivirals for hepatitis C virus

研究代表者

馬渡 誠一 (Mawatari, Seiichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50735339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)に対する直接作用型抗ウイルス薬(DAA)は高いウイルス消失率を示しているが、薬剤耐性変異(RAS)が治療不成功の原因となっている。我々は、Glecaprevir (GLE)+Pibrentasvir (PIB)の治療不成功例ではNS5A領域のQ24K/L28M/R30E/A92Kのアミノ酸共変異を有し、Q24K/L28M/R30E/A92K共変異を有するレプリコン細胞での検討にて、これらの変異はPIBを含むすべてのNS5A阻害剤に高度の耐性を示す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

実臨床において、Glecaprevir (GLE)+Pibrentasvir (PIB)の治療不成功に関連する薬剤耐性変異は報告されていたが、in vitro実験系で証明した報告はない。特に今回NS5A共変異に対するPIBなどのNS5A阻害剤に対する薬剤耐性について初めて明らかにした。本研究は、特にC型肝炎に対する直接作用型抗ウイルス薬の治療不成功者への治療戦略に役立つことが期待された。

研究成果の概要(英文)：Direct-acting antivirals (DAAs) for hepatitis C virus (HCV) have shown high rates of sustained virologic response (SVR). However, resistance-associated substitutions (RASs) are a cause of treatment failure. In the present study, we demonstrated that the patients who failed to Glecaprevir (GLE) and Pibrentasvir (PIB) therapy had co-existence of Q24K, L28M, R30E, and A92K RASs in the NS5A region. In addition, these RAS had severe resistance to NS5A inhibitors, including PIB in the analysis of replicons introduced co-existence of these RASs.

研究分野：消化器内科

キーワード：薬剤耐性変異 C型肝炎ウイルス 直接作用型抗ウイルス薬

1 . 研究開始当初の背景

C 型慢性肝疾患に対する直接作用型抗ウイルス薬 (Direct acting antivirals (DAAs)) は , 従来のインターフェロン療法と比較し高い治療効果を示しているが , 治療不成功例では , 薬剤耐性変異 (Resistance-associated substitutions; RAS) が問題となっている . DAAs 治療不成功例は少なからず存在し , DAAs 不成功後の再治療の治療成績も低いことから , DAAs 不成功例への対応が重要な課題であるが , DAAs 再治療不成功に関連する因子は明らかではない .

2 . 研究の目的

(1) 実臨床における DAA 治療不成功に関連する因子を明らかにする .

(2) *in vitro* 実験系で治療不成功に関連する RAS を検討し , 新規抗ウイルス薬の治療効果の予測につなげることを目的とする .

3 . 研究の方法

(1) DAA 療法の治療成績と治療不成功に関連する薬剤耐性変異を direct sequence 法や次世代シーケンサーで解析する .

(2) 上記で明らかとなった薬剤耐性変異を持つ HCV レプリコン細胞を合成し , NS5A 阻害剤や NS5B 阻害剤に対する薬剤耐性を検討する .

4 . 研究成果

(1) SOF/LDV 療法を施行された 493 例 (再治療 30 例を含む) におけるウイルス消失率は 96.6% で , 17 例で治療不成功となった . そのうち 11 例がウイルス学的不成功であった . NS5A , NS5B 領域の薬剤耐性変異を direct sequence 法で解析し , 治療不成功例について治療前後の血清を次世代シーケンサーでも解析した . その結果 , 8 例で NS5A 領域の 24 番目 (Q24) , 28 番目 (L28) and/or 30 番目 (R30) , 31 番目 (L31) , 93 番目 (Y93) のアミノ酸の共変異を有し , 1 例で 32 番目 (P32) と 92 番目 (A92) のアミノ酸変異を有していた . 一方 NS5B 218 番目 (A218) と 316 番目 (C316) の共変異を有し , 治療効果に関連することを明らかにした . 特に , NS5A:Q24/L28/R30 変異は約 80% で共変異を C316 変異保有例の 99% は A218 変異を有し , A218 変異保有例の 79.1% は C316 変異を有していた . 11 例の不成功例中 10 例で A218 と C316 共変異を認めていた . A218/C316 共変異のない症例では , NS5A 共変異を認めていても全例でウイルス消失が得られていた . NS5B 領域で過去の報告にある 282 番目 , 320 番目の変異は治療前に保有例がなく , 159 番目 , 321 番目の変異については , 治療前にそれぞれ 5 例保有していたが , それらの保有例から治療不成功例はなかった . また , 治療不成功において , NS5B 領域に新たな変異の獲得もなかった . 初回治療において , A218/C316 変異のない症例は , NS5A 変異の有無にかかわらず全例ウイルス消失が得られ , A218/C316 変異のある症例では NS5A 変異が 2 つ以上ある症例で治療成績が有意に低下していた .

本研究開始後に , Glecaprevir (GLE)/Pibrentasvir (PIB) が承認されたため , DAA 不成功に対して GLE/PIB で再治療された 44 例の治療効果と不成功に関連する因子を検討した . GLE/PIB のウイルス消失率は Genotype (GT) 1: 92.5% (37/40) , GT2: 100% (4/4) であった . 不成功 3 例は Daclatasvir (DCV)+Asunaprevir failure , IL28b: minor allele で , 2 例は再治療前に

NS5A:Q24K/L28M/R30Q+A92K 共変異を有し、不成功後に NS5A:R30Q→E に変化していた。1 例は再治療前に NS5A:L31I+P32del 共変異を有し、不成功後も P32del を有していた。GT1 において NS5A:Y93 変異例は全例 SVR であったが(31/31), IL28b:minor allele(major vs minor=100% vs 81.3%, p=0.125), NS5A:A92 変異有(無 vs 有 = 97.1% vs 60.0%, p=0.036)で SVR 率が低下していた。

(2) GLE/PIB 療法の不成功に関連する薬剤耐性変異である Q24K/L28M/R30Q または E+A92K 変異の薬剤耐性についてレプリコン細胞を用いて検討した。ネオマイシン耐性遺伝子および Renilla luciferase を含む genotype1b の 1b-4 株の NS5A 領域を Q24K/L28M/R30Q(E)/A92K に置換した人工遺伝子を作成し、この遺伝子を HuH-7 細胞由来 OR6c 細胞に導入し、持続的に増殖する細胞株を樹立した。この細胞株に NS5A 阻害剤である DCV, LDV, Velpatasvir (VEL), Elbasvir(Elb), PIB, NS5B 阻害剤である SOF を添加し、薬剤耐性を検討した。HCV 複製能をルシフェラーゼ活性で検討した。

Q24K/L28M/R30E/A92K 共変異を有する 1b 型 HCV レプリコン細胞における NS5A 阻害剤である Daclatasvir (DCV), Ledipasvir (LDV), Velpatasvir (VEL), Elbasvir(Elb)に対する 50%抑制濃度(EC50)は、それぞれ野生型の約 64 万倍, 64 万倍, 15 万倍, 5 万倍であった(図 1)。R30E 変異は R30Q 変異と比較し 1.45-39.4 倍の耐性を示した。これらの薬剤は R30Q もしくは R30E を含む共変異に高度耐性であった。一方 PIB に対する EC50 は野生型の約 1500 倍とその他の薬剤よりも低いものの, R30E 変異は R30Q 変異の約 800 倍の耐性であった(図 1)。また, NS5B 阻害剤である SOF は野生型, 共変異ともに EC50 に差はなかった。

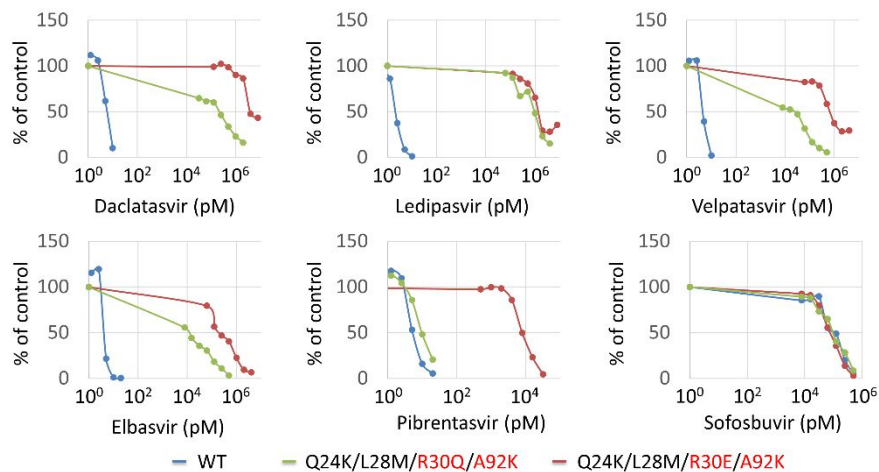


図 1 : NS5A , NS5B 阻害剤に対する薬剤感受性 (WT:wild type)

SOF は核酸型であり、チェーンターミネーターとして HCV RNA 鎖の伸長を直接させるため、薬剤耐性は生じにくいとされる。今回、SOF/LDV 療法不成功に関連する薬剤耐性変異として、NS5B: L159, S282, L320, V321 変異は報告されていたが、今回 A218 と C316 共変異が治療不成功と関連し、NS5A 変異と共存することで治療成績が低下することを初めて明らかにした。

その後、DAA 治療不成功例に対して高い抗ウイルス効果を示す GLE/PIB 療法が登場し、C 型肝炎治療ガイドラインにおいて本薬剤が DAA 治療不成功例に対する第一選択薬となった。本研究により、GLE/PIB 療法不成功に関連する因子として、NS5A:Q24K/L28M/R30E+A92K 共変異が関連することが、実臨床並びに *in vitro* 実験系で確認された。Q24K/L28M/R30Q+A92K 共変異が NS5A 阻害剤に対して強い耐性を持つことは既に報告されていたが、今回 NS5A:Q24K/L28M/R30E+A92K 共

変異に対する PIB などの NS5A 阻害剤に対する薬剤耐性について初めて明らかにした。現在 DAAS 治療不成功例に対しては GLE/PIB 療法，SOF/VEL 療法が承認されている。実臨床では，GLE/PIB 療法不成功例に対して SOF/VEL，SOF/VEL 療法不成功例に対しては GLE/PIB 療法が行われるが，今後，今回の研究で明らかとなった多重耐性変異保有者の治療成績を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Mawatari Seiichi, Oda Kohei, Kumagai Kotaro, Tabu Kazuaki, Ijuin Sho, Fujisaki Kunio, Inada Yukiko, Uto Hirofumi, Saisyoji Akiko, Hiramine Yasunari, Hori Takeshi, Taniyama Ohki, Toyodome Ai, Sakae Haruka, Hashiguchi Masafumi, Kure Takeshi, Sakurai Kazuhiro, Tamai Tsutomu, Moriuchi Akihiro, Ido Akio	4. 巻 50
2. 論文標題 Viral and host factors are associated with retreatment failure in hepatitis C patients receiving all - oral direct antiviral therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 453 ~ 465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13474	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 Mawatari Seiichi, Oda Kohei, Tabu Kazuaki, Ijuin Sho, Kumagai Kotaro, Fujisaki Kunio, Hashiguchi Masafumi, Inada Yukiko, Uto Hirofumi, Hiramine Yasunari, Kure Takeshi, Hori Takeshi, Taniyama Oki, Kasai Ai, Tamai Tsutomu, Moriuchi Akihiro, Ido Akio	4. 巻 13
2. 論文標題 The co-existence of NS5A and NS5B resistance-associated substitutions is associated with virologic failure in Hepatitis C Virus genotype 1 patients treated with sofosbuvir and ledipasvir	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0198642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0198642	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 Tabu K, Mawatari S, Oda K, Kumagai K, Inada Y, Uto H, Saisyoji A, Hiramine Y, Hashiguchi M, Tamai T, Hori T, Fujisaki K, Imanaka D, Kure T, Taniyama O, Toyodome A, Ijuin S, Sakae H, Sakurai K, Moriuchi A, Kanmura S, Ido A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Hypovascular tumors developed into hepatocellular carcinoma at a high rate despite the elimination of hepatitis C virus by direct-acting antivirals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237475	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1．発表者名 馬渡誠一, 森内昭博, 井戸章雄.
2．発表標題 DAA 治療不成功例の特徴と再治療効果.
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 馬渡誠一、森内昭博、井戸章雄
2．発表標題 DAAs治療不成功に関連する薬剤耐性変異の解析
3．学会等名 日本肝臓学会総会
4．発表年 2018年

1．発表者名 馬渡誠一、森内昭博、井戸章雄
2．発表標題 SOF/LDV治療不成功に関連する因子の解析
3．学会等名 日本消化器病学会総会
4．発表年 2018年

1．発表者名 Seiichi Mawatari, Kohei Oda, Kazuaki Tabu, Sho Ijuin, Kotaro Kumagai , Shuzo Tashima, Ai Kasai, Tsutomu Tamai, Akihiro Moriuchi , Akio Ido
2．発表標題 NS5A and NS5B resistance-associated substitutions are associated with virologic failure in Hepatitis C Virus genotype 1 patients treated with sofosbuvir and ledipasvir
3．学会等名 UEGW2018（国際学会）
4．発表年 2018年

1 . 発表者名 馬渡誠一、森内昭博、井戸章雄
2 . 発表標題 DAAs治療非著効に関連する薬剤耐性変異の検討
3 . 学会等名 JDDW2018
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Mawatari S, Kasai A, Taniyama O, Ijuin S, Sakae H, Tabu K, Oda K, Kumagai K, Ido A.
2 . 発表標題 The retreatment efficacy of all-oral direct antiviral therapy for patients with hepatitis C virus infection.
3 . 学会等名 UEGW2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mawatari S, Moriuchi A, Tashima S, Kasai A, Ijuin S, Tabu K, Oda K, Kumagai K, Ido A.
2 . 発表標題 The efficacy of Glecaprevir and Pibrentasvir therapy for patients who fail direct-acting antiviral therapy.
3 . 学会等名 The Asian Pacific Association for the study of the Liver 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mawatari S, Tashima S, Ijuin S Kasai A, Tabu K, Oda K, Moriuchi A, Ido A.
2 . 発表標題 The evaluation of the inhibitory effect of oral anti-hepatitis C virus agents on carcinogenesis.
3 . 学会等名 EASL The International Liver Congress 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 馬渡誠一, 森内昭博, 井戸章雄
2. 発表標題 乏血性腫瘍に対するDAAs治療の発癌抑制効果の検証
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 馬渡誠一, 森内昭博, 井戸章雄
2. 発表標題 DAA治療不成功例の再治療効果に関連する因子の検討
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 馬渡誠一, 池田正徳, 井戸章雄
2. 発表標題 再治療不成功例における薬剤耐性変異の検討
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------