

令和 5 年 4 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16996

研究課題名（和文）テノホビル(TDF)に対する新規耐性HBVの同定と耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Identification of novel HBV resistant to tenofovir (TDF) and elucidation of the resistance mechanisms

研究代表者

林 佐奈衣 (Hayashi, Sanae)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：10597587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：全国多施設病院で多剤不応を呈したB型慢性肝炎患者34例を対象にHBV遺伝子解析を行った結果、LAM+ETV不応23例、LAM or ETV+ADV不応3例、ETV+TDF不応8例より既知変異保有25例中20例で新規RT変異を検出した。TDF/ETV併用中にVBTを起こした患者血清より新規RT変異およびETV耐性変異を有する新規HBV株を樹立し、in vitroにてTDF感受性試験を行った。その結果、新規HBV株はGenotype Ce野生株、ADV耐性1株およびETV耐性2株よりもTDF感受性の低下を呈した。一方で新規RT単独変異株のTDF感受性は野生株と比較して差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在推奨される核酸アナログ(NAs)はいずれも強力にHBV複製を抑制するが、HBV根絶には至らないため、B型慢性肝炎の治療適応例の多くは多剤NAs治療を継続している。我々は、ETV/TDFに対して抵抗性を示すB型慢性肝炎症例より新規コンビネーションHBV株を同定し、TDF感受性の低下に寄与することを明らかにした。これまでにETV・TDFに対する交叉耐性変異の報告はないとされるが、推奨NAsであるETVおよびTDF/TAFに対する耐性変異を保有する慢性肝炎症例も散見されることから、今後もNAs治療により薬剤耐性変異株が出現する可能性は疑う余地がない。

研究成果の概要（英文）：HBV from thirty-four patients with chronic hepatitis B with multiple drug failure at nationwide multicenter survey were sequenced. Among 23 patients with LAM+ETV failure, 3 patients with LAM or ETV+ADV failure, and 8 patients with ETV+TDF failure, we identified novel mutation in RT region of HBV in 20 of 25 patients with the well-documented drug resistance mutations. A plasmid carrying a replication-competent 1.24-fold HBV genome, isolated from sera of patient who developed VBT during TDF/ETV combination therapy and with the novel RT mutation and ETV-resistant mutations, was tested for TDF susceptibility in vitro. The novel RT mutation plus ETV-resistance mutations reduced susceptibility to TDF compared with the wild-type genotype Ce HBV clone, ADV-resistant 1 strain, and ETV-resistant 2 strains, while the novel RT mutation was equally susceptible to TDF treatment compared with wild-type clone.

研究分野：医歯薬学

キーワード：B型肝炎ウイルス 核酸アナログ テノホビル 変異 耐性 genotype 肝臓学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HBV は、垂直感染・水平感染を介してキャリア化する世界規模の感染症である。B 型肝炎ウイルス (HBV) に感染した慢性肝炎患者の多くは未治療の場合に高率に肝硬変や肝癌へと進展する。B 型慢性肝炎に対する推奨治療薬である核酸アナログ (NAs) は、HBV がコードする逆転写酵素 (rt) を特異的に阻害することで HBV 複製過程を直接抑制する。現在わが国では、エンテカビル (ETV)、テノホビル (TDF)、タフ (TAF) が第一選択薬となっており、これらの推奨 NAs は血中 HBV-DNA 量を強力に抑制し予後を改善させるが、投薬期間中に薬剤耐性変異を獲得し、治療不応や viral breakthrough (VBT) を発症することが問題視されている。研究代表者は、ETV 不応例より rtA186T 変異が ETV 耐性であることを世界で初めて証明し¹⁾、国内外においても同変異を保有した ETV 不応例が散見されることを明らかにした²⁾。一方で、これまで TDF に対する耐性変異はないとされていたが、韓国グループから rtS106C/rtH126Y/rtD134E/rtL269I のコンビネーション変異が TDF 耐性を有することが報告された³⁾。さらに、研究代表者は最近、全国多施設病院で問題となっている TDF/ETV 不応の B 型慢性肝炎患者に対して HBV 遺伝子解析を行った結果、上記の TDF 耐性コンビネーション変異とは異なる変異パターンを検出した。以上の背景により、本研究の核心をなす問いは、「TDF 耐性を付与する HBV 変異の特徴は何か？」ということである。

2. 研究の目的

TDF 治療に対する薬剤耐性メカニズムを解明し、HBV による病態進行の制御を目指す。

目的 1. TDF 治療に対して抵抗性を示す症例より、新規の TDF 耐性 HBV 株を同定する。

目的 2. 新規 TDF 耐性変異のウイルス学的特徴を検討する。

これらの目的を達成することにより、B 型慢性肝炎患者に対する治療の最適化を図るとともに、TDF 治療不応例に対する治療方針を決定するための情報が得られる。これまでに、TDF・TAF に対する不応例は複数報告があるものの、これらの不応に関連する HBV 変異の報告は見受けられなかった。最近、韓国のグループより TDF に対する耐性コンビネーション変異が同定されたが、研究代表者らが全国多施設病院で ETV/TDF 不応例に関して HBV 遺伝子解析を行ったところ、上記のコンビネーション変異は同定されず新規の変異パターンを検出した。これらの背景をもとに、本研究では核酸アナログ多剤耐性例より新規 TDF 耐性 HBV 株を同定し、TDF 応答性を検証する。以上を解明する本研究は、TDF の治療効果に関連する HBV 変異株のウイルス学的特徴を明らかにし、TDF 治療不応例の HBV 病態進行を抑制する治療を決定する可能性が期待される。

3. 研究の方法

本研究では TDF 治療不応例より新規の TDF 耐性変異株を同定し、その特徴を明らかにすることを目的とし、以下に具体的な研究計画を示す。なお、各施設の倫理委員会の承認は得ている。

目的 1: 多剤 NAs 不応を呈した B 型慢性肝炎患者 (CHB) より、新規の TDF 耐性 HBV 株を同定する。(図 1)

1-(a) 全国多施設病院で多剤不応を呈した CHB34 例を対象とし、LAM+ETV 不応症例 (ETVr) 23 例、LAM or ETV+ADV 不応症例 (ADVr) 3 例、ETV+TDF or TAF (±ADV) 不応症例 (TAFr) 8 例に対して、患者血清より HBV 遺伝子解析を実施した。

1-(b) TAFr 例のうち、TDF/ETV 併用治療中に VBT を起こした患者血清に含まれる HBV 変異パターンをダイレクトシーケンス法により解析した。治療前後の HBV シーケンスを比較して、TDF 治療後に増加していた全長 HBV ゲノムをクローニングし、1.24 倍長 HBV 発現プラスミド (新規

HBV 株)を樹立した。

1-(c) 1-(a)の結果、多剤 NAs 耐性例で頻発した HBV 変異の TDF 感受性を明らかにするために、TDF 治療不応例の HBV genotype 型と同じ 1.24 倍長 HBV genotype 野生株に対して site direct mutagenesis 法により導入し、HBV 感染粒子産生株を樹立した。

目的 2: TDF/ETV 治療不応例より同定した新規 HBV 変異株のウイルス学的特徴を検討

1-(b)で同定した新規 HBV 株を、高分化型ヒト肝癌由来細胞株の Huh7 細胞へトランスフェクションし、サザンプロット法により薬剤非存在下における細胞内 HBV 複製効率を HBV 野生株と比較検討した。また、TDF 存在下における HBV 複製効率を検討し、新規 HBV 株が実際に TDF 抵抗性を示すか検証した。

4 . 研究成果

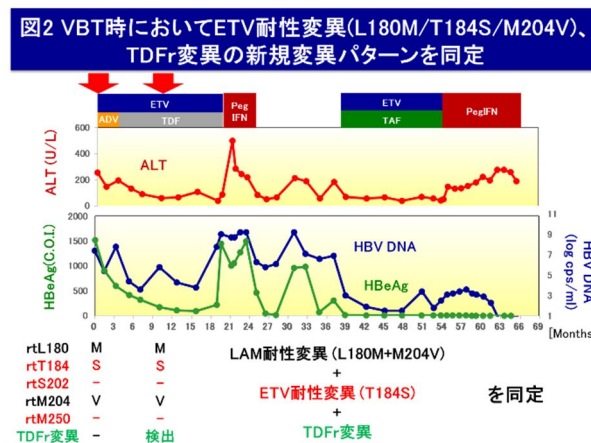
目的 1: 多剤 NAs 不応を呈した B 型慢性肝炎患者(CHB)より、新規の TDF 耐性 HBV 株を同定する。(図 1)。

1-(a)の結果、HBV 遺伝子型は genotype C2/Ce 型 33 例、genotype A2/Ae 型 1 例であった。既知 NAs 変異保有例は、ETVr 群で 17/23 例、ADVr 群で 3/3 例、TAFr 群で 5/8 例の、計 25 例が確認された(図 1)。興味深いことに、既知変異保有 25 例のうち 20 例で新規 RT 変異として TDF 耐性関連変異(TDFr 変異)が検出された。

1-(b)の結果、ETV+ADV 併用時には ETV 耐性変異 (L180M/M204V/T184S)が確認された。さらに、ETV+TDF 併用中の VBT 時では、ETV 耐性変異(L180M/M204V/T184S)に TDFr 変異が加わった新規変異パターン株(新規 HBV 株)を同定した(図 2)。

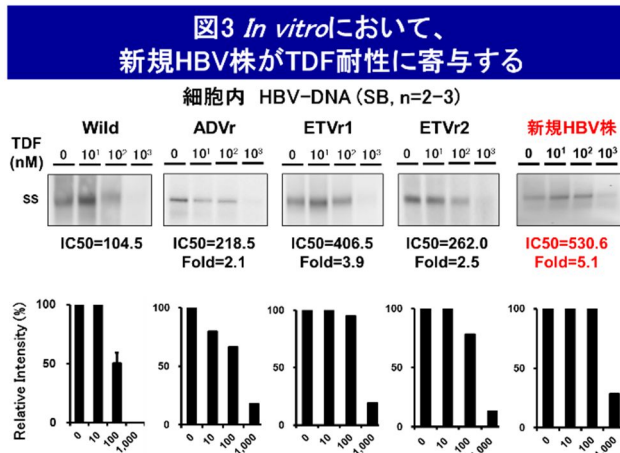
図 1 全群において TDFr変異が最も多く検出された

Multiple-drug-refractory CHB (n=34)	ETVr (n=23)	ADVr (n=3)	TAFr (n=8)
HBV genotypes Ae/Ce (patient#)	22/1	3/0	8/0
NAs耐性変異 (patient#)	17 (73.9%)	3 (100%)	5 (62.5%)
LAMr変異 (patient#)	10 (43.5%)	3 (100%)	2 (25%)
L180M/M204V	7	1	2
L180M/M204I	0	1	0
M204I	3	1	0
ETVr変異 (patient#)	6 (26.1%)	2 (66.7%)	1 (12.5%)
T184S/I	2	0	1
S202G/C	2	0	1
M250V/L	0	2	0
A186T	2	0	0
ADVr変異 (patient#)	1 (4.3%)	1 (33.3%)	1 (12.5%)
A181T	0	1	1
A181T/N236T	1	0	0
TAFr変異 (patient#)	15 (65.2%)	3 (100%)	4 (50%)
H126Y	1	0	0
D134E	3	1	1
TDFr変異	14	3	4



目的 2: TDF/ETV 治療不応例より同定した新規 HBV 変異株のウイルス学的特徴を検討

各 HBV クローンの TDF に対する IC₅₀ 値、HBV 複製効率を検証した。その結果、新規 HBV 株は、Ce 野生株、既知 ADV 耐性 1 株 (A181T/N236T) および ETV 耐性 2 株 (S202G/L180M/M204V)、(A186T/L180M/M204V) よりも TDF 感受性の低下を呈し(図 3)、野生株よりも新規 HBV 株の複製効率は 53.1%と低値を示した。一方で、新規 TDFr 単独変異株の TDF 感受性は、野生株と比較して差は認められなかった。



以上の結果より、rtL180M/M204V/T184S/TDFr が TDF 耐性に寄与する可能性が示唆された。
TDFr 変異は genotype A、B、C1、3、D-G において野生株として存在することから、今後は TDF 耐性変異の薬剤感受性が HBV genotype により依存するかを検証する。

引用文献

- 1) Hayashi S, Tanaka Y. et al. Journal of Hepatology. 2015.
- 2) Amano K, Hayashi S, Tanaka Y. et al. Kanzo. 2015.
- 3) Eun-Sook Park, Kyun-Hwan Kim. et al. Journal of Hepatology. 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sanae Hayashi, Katsuya Nagaoka, Yasuhito Tanaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Blood-Based Biomarkers in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma, Including the Viral Genome and Glycosylated Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222011051	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 Sanae Hayashi, Masanori Isogawa, Keigo Kawashima, Kyoko Ito, Natthaya Chuaypen, Yuji Morine, Mitsuo Shimada, Nobuyo Higashi-Kuwata, Takehisa Watanabe, Pisit Tangkijvanich, Hiroaki Mitsuya, Yasuhito Tanaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Droplet digital PCR assay provides intrahepatic HBVcccDNA quantification tool for clinical application	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05882-9	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 Takehisa Watanabe, Sanae Hayashi, Yasuhito Tanaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Drug Discovery Study Aimed at a Functional Cure for HBV	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v14071393	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sanae Hayashi, Tangkijvanich Pisit, Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 新規cccDNA絶対定量系の開発とその臨床応用
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sanae Hayashi, Masanori Isogawa, Keigo Kawashima, Kyoko Ito, Natthaya Chuaypen, Nobuyo Higashi-Kuwata, Pisit Tangkijvanich, Hiroaki Mitsuya, Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 A novel droplet digital PCR reveals the stability of intrahepatic hepatitis B virus cccDNA and its clinical application
3. 学会等名 The Liver Meeting AASLD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 佐奈衣, 田中 靖人, 満屋 裕明
2. 発表標題 In vivoで強力な抗HBV活性を発揮する長時間作用型新規核酸アナログE-CFCPの開発
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 佐奈衣, 榎本 大, 松浦 健太郎, 井出 達也, 松居 剛志, 髭 修平, 榎本 平之, 渡邊 丈久, 長岡 克弥, 立山 雅邦, 田中 靖人
2. 発表標題 核酸アナログ多剤耐性例のウイルス学的特徴
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林佐奈衣、渡邊丈久、田中靖人
2. 発表標題 ddPCR法を用いたcccDNA定量法の開発と臨床応用
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sanae Hayashi, Yuji Morine, Mitsuo Shimada, Takehisa Watanabe, Yasuhito Tanaka
2. 発表標題 Clinical Utility of Droplet Digital PCR for HBV cccDNA quantification
3. 学会等名 APASL (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	田中 靖人 (Tanaka Yasuhito)		

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
---------	---------