

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590964

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるHCVゲノム解析と薬剤耐性機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the HCV genome analysis and drug resistance mechanism by the next generation sequencer

研究代表者

坂本 穰(SAKAMOTO, Minoru)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：60324191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PEG-IFN+RBV+NS3-4 protease阻害剤(TVR/SMV)の治療効果はPEG-IFN+RBVと同様、HCV NS5A -ISDR、-IRRDR、coreアミノ酸変異(R70Q)と関連し、R70Qは、宿主のIFNの感受性を規定するIL28B SNPとも関連した。またDAAに対する薬剤耐性変異はDAA未治療例にも存在しIFN感受性株に多いこと、宿主内ではHCVは多数の変異体の集合体(quasispecies)であり、薬剤耐性変異は野生株から出現し、治療前とは異なる変異体の集合体を形成し、耐性部位が逆変異してもなおこの集合体が維持されることを次世代シーケンサーで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：With the recent development of highly potent and safe direct antiviral agents (DAAs), viral response (SVR) rate in HCV patients has been significantly improved. Therapeutic effect of PEG-IFN + RBV + NS3-4 protease inhibitor (TVR / SMV) was associated is a PEG-IFN + RBV, associated with HCV NS5A interferon sensitivity determining region (ISDR), -interferon/ribavirin resistance determining region (IRRDR) and core amino acid mutations (R70Q). Also R70Q mutation was associated with IL28B SNP related to IFN response. We revealed that drug resistance mutations to DAA is existed in the DAA naive cases, it was often found in IFN-sensitive strains. In the analysis by the next generation sequencer, HCV was a collection of a large number of variants (quasispecies), drug resistance mutations emerged from the wild-type strain, and Composition of major population greatly changed as the acquired resistant and altered composition were maintained thereafter.

研究分野：消化器内科学

キーワード：C型肝炎 遺伝子変異 薬剤耐性変異 DAAs 次世代シーケンサー quasispecies

1. 研究開始当初の背景

年間3万人以上が死亡する肝癌の原因であるC型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus, HCV)の治療法は、HCVに直接作用するDAAs (direct acting antiviral)の開発が進んでいる。とくにNS3-4 protease 阻害剤であるTalaprevir (TVR) や Simeprevir (SMV)はPEG-IFN+RBVとの併用で用いられるようになった。しかしこれらDAAは、薬剤耐性をはじめとした治療抵抗性因子が問題となっている。一方、HCVは多様な変異体の集合体(quasispecies)を形成していることが明らかになっている。しかしこれらの詳細な検討は従来のdirect sequencing法に代表されるpopulation sequencing法は解析困難であった。そこで、次世代シーケンサーを用いたHCVゲノムの詳細な解析により治療抵抗性因子を明らかにし、薬剤耐性機構を解明することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HCVゲノムを、次世代シーケンサーを用いて、網羅的かつ詳細に解析することにより、従来の手法では明らかにすることのできなかった遺伝子変異の単一個体内での分布と治療抵抗性要因を明らかにし、臨床成績と比較することで、薬剤耐性機構を解明することにある。

3. 研究の方法

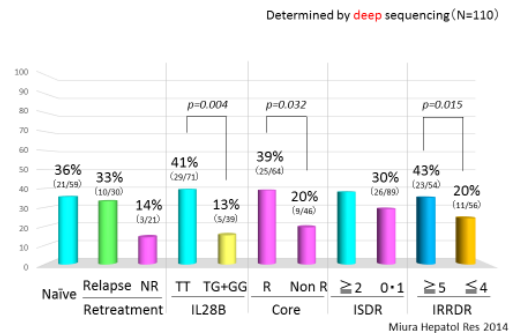
- (1) DAAs未使用例110例における、DAA耐性変異の存在頻度および、その特徴について、次世代シーケンサー(GS junior)で検討した。
- (2) DAAsを用いて治療を行ったPEG-IFN+RBV+TVR 46例、PEG-IFN+SMV 29例における、治療効果および耐性変異の出現パターンおよびその特徴を、次世代シーケンサーで検討し、少数存在する変異株の存在頻度および遺伝的距離を検討した。

4. 研究成果

- (1) DAAs耐性変異とくにTVR、SMV耐性に関連するといわれるNS3耐性変異は、DAA未治療例にも存在することがその頻度は極めて低いことが明らかになった。とくにNS3/4 protease 阻害剤で問題となるD168Vの耐性変異は今回の検討では見られなかった。一方、NS5A耐性は多くに認められた。
- (2) 今後わが国で主流となると考えられる、NS3/4 protease 阻害剤と併用するNS5A阻害剤であるDaclatasvir (DCV)耐性であるNS5A-Y93H頻度をultra-deep sequencing法を用いて検討すると、混在比率50%以上

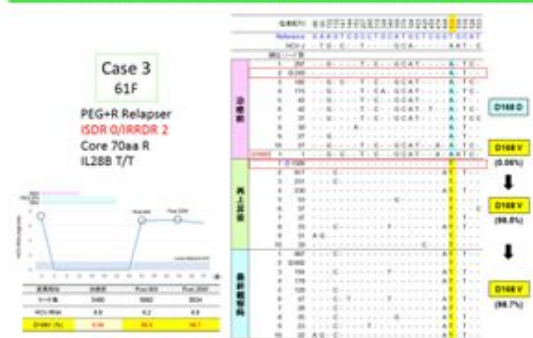
の頻度で検出される症例が7%、0.1%以上で検出される症例まで含めると33%に認められた。この症例の特徴を多変量解析で検討すると、IL28B TT、コア70番アミノ酸R(野生型)、IRRDR変異数5が有意な因子で、IFN感受性が高いと考えられる集団に多く見られた。

Y93H: Frequency in each background



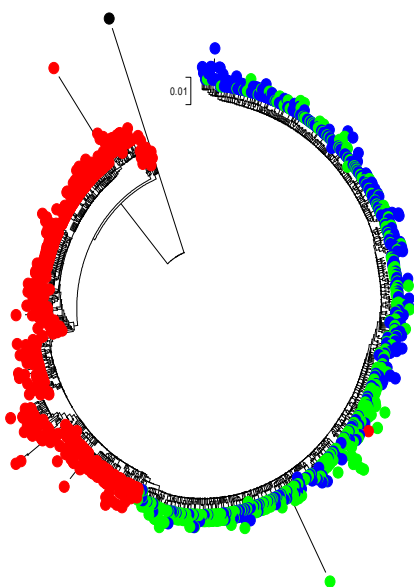
- (3) 治療失敗例につき薬剤耐性変異ウイルスの存在を次世代シーケンサーで検討すると、ウイルス再増殖時にはNS3-4 protease 阻害剤の耐性変異であるD168V変異が出現していた。これを、Ultra-deep sequencing法で詳細に検討すると、治療前からわずかながら耐性変異を持ったウイルスが存在することが明らかになった。しかし、耐性部位以外の変異を検討すると、ウイルス再増殖時に多数を占めるウイルスは、治療前に存在していたごく微量のウイルスを起源として選択・増殖している可能性が示唆された。しかも、数か月の経過で、耐性部位のアミノ酸が逆変異し野生型に戻っても、耐性部位以外の変異は変化せず、異なる変異の集積をもつウイルスが主流となり、quasispecies構成自体が変化し、維持されていた。

PEG-IFN+RBV+SMV: Change of amino acid (Relapse case)



以上から、薬剤耐性変異はウイルスの1点の単変異ではなく遺伝子変異の単一個体内での分布による影響が大きいと考えられ、これが薬剤耐性機構の主たる要因であることが推察された。さらに、これらを系統樹解析すると、薬剤耐性ウイルスはもともと存在していたウイルスとは別のク

ラスターを形成しており、さらにその後もこのクラスター集団が維持されていることから、quasispecies 構成自体が変化していることが、系統樹解析からも確認された。



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 19 件)

- 1) Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the NS5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology Research* 2014 in press Article first published online : 10 APR 2014, DOI: 10.1111/hepr.12316 査読有
- 2) 坂本穰, 榎本信幸, 線維化進展例に対する 3 剤併用療法, *医学のあゆみ* 249(3), 237-241, 2014 査読なし
- 3) 坂本穰, 榎本信幸, DAA 時代におけるインターフェロンの意義, *Mebio* 31, 61-63, 2014
- 4) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C *J Med Virol.* 2013; 85: 449-458 Article first published online: 7 JAN 2013 ; DOI: 10.1002/jmv.23497 査読有
- 5) Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Deep-Sequencing Analysis of the Association between the Quasispecies Nature of the Hepatitis C Virus Core Region and Disease Progression. *J. Virol.* 2013; 87: 12541-12551 Published ahead of print 14 August 2013, doi: 10.1128/JVI.00826-13 査読有
- 6) 坂本穰, 榎本信幸, C 型肝炎治療における宿主因子とウイルス因子 実地診療での臨床応用のすめかた, *Medical Practice* 30(2); 323 - 328, 2013 査読なし
- 7) 坂本穰, 榎本信幸, C 型肝炎硬変における抗ウイルス療法, *Modern physician* 33(4)454-458, 2013 査読なし
- 8) 坂本穰, 榎本信幸, ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン療法の治療成績と発癌リスクを考慮した新規治療法への展望, *消化器内科* 56(4), 437-442, 2013 査読なし
- 9) 坂本穰, 榎本信幸, 発癌リスクと治療反応性を考慮した C 型肝炎の最新治療, *消化器内科* 57(3), 379-384, 2013 査読なし
- 10) 坂本穰, 榎本信幸, C 型肝炎診療 up-to-date, 発癌リスクと新規治療法, *診断と治療* 101(9), 1277-1282, 2013 坂本穰, 榎本信幸, C 型肝炎ウイルスと治療, *HIV 感染症と AIDS の治療* 4(2), 55-59, 2013 査読なし
- 11) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Sugauchi F, Sakamoto N, Yatsunami H, Izumi N. Age and total ribavirin dose are independent predictors of relapse after interferon therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antiviral Therapy* 2012; 17: 35-43 査読有
- 12) Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; 6: 386-396 査読有
- 13) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int* 2012 6: 482-490 査読有
- 14) Osada M, Kaneko M, Sakamoto M, Endoh M, Takigawa K, Inoue-Suzuki K, Inoue O, Satoh K, Enomoto N, Yatomi Y, Ozaki Y. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infection. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2012; 18:272-280 査読有

15) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Izumi N. Data mining model using simple and readily available factors could identify patients at high risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012;56(3):602-608 査読有

16) Maekawa S, Sakamoto M(equally contributed), Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S and Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in HCV-1b infection. *Hepatology* 2012, 56; 1611-1621 査読有

17) 坂本穰, 榎本信幸, プロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異と意義, 肝胆膵67(6): 893-898, 2013 坂本穰, 榎本信幸, ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた PEG-IFN+RBV 療法と Protease 阻害剤の適応, 消化器内科 54(4): 454-458, 2012 査読なし

18) 坂本穰, 榎本信幸, C 型肝炎の個別化治療 - 肝がんの危険性とウイルス排除の可能性を考慮して -, *Medical Practuce* 29(6): 1048 - 1049, 2012 査読なし

19) 坂本穰, 榎本信幸, ペグインターフェロン + リバビリン + テラプレビル併用療法 - 宿主・ウイルス因子の解析からみた最適な治療 -, 消化器の臨床;15(3):249-256, 2012

〔学会発表〕(計 24 件)

1) 坂本穰, 三浦美香, 佐藤光明, 小松信俊, 辰巳明久, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸, 発癌リスクと治療反応性, 薬剤耐性変異を考慮した難治性 C 型肝炎治療, 第 100 回日本消化器病学会総会, 2014.4.26, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

2) 坂本穰, 前川伸哉, 榎本信幸, 発癌リスクと protease 阻害剤を含む 3 剤併用療法の治療反応性と薬剤耐性変異を考慮した C 型肝炎治療に対する治療戦略, 第 50 回日本肝臓学会総会(シンポジウム), 2014.5.29, ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

3) 佐藤光明, 三浦美香, 前川伸哉, 小松信俊, 辰巳明久, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本穰, 榎本信幸, 次世代 sequencer による telaprevir 耐性変異の解析, 第 50 回日本肝臓学会総会, 2014.5.29, ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

4) 前川伸哉, 三浦美香, 辰巳明久, 小松信俊, 佐藤光明, 鈴木雄一朗, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本穰, 榎本信幸, Deep sequencing を用いた naturally-occurring DAA resistant HCV の検討, 第 50 回日本肝臓学会総会, 2014.5.29, ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

5) S.Maekawa, M.Sakamoto, N.enomoto, The

Impact of the recently-found SNPs on liver fibrosis in chronic HBV and HCV hepatitis. 第 18 回日本肝臓学会大会(JDDW), International Sessin (Symposium), 2014.10.23, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

6) 坂本穰, 前川伸哉, 榎本信幸, 治療反応性と薬剤耐性変異を考慮した C 型肝炎の治療戦略, 第 18 回日本肝臓学会大会(JDDW)(シンポジウム), 2014.10.23, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

7) 佐藤光明, 三浦美香, 小松信俊, 辰巳明久, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸, 次世代シーケンサーによる telaprevir 耐性変異の解析, 第 18 回日本肝臓学会大会(JDDW), 2014.10.23, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

8) 坂本穰, 前川伸哉, 榎本信幸, 薬剤耐性変異を考慮した C 型肝炎治療と発癌抑制からみた治療法選択, 第 40 回日本肝臓学会東部会(シンポジウム), 2014.11.27, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

9) 佐藤光明, 前川伸哉, 小松信俊, 辰巳明久, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本穰, 榎本信幸, 次世代 sequencer による telaprevir 耐性変異と quasispecies の動態の解析, 第 40 回日本肝臓学会東部会, 2014.11.27, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

10) 坂本穰, 前川伸哉, 榎本信幸, 発癌リスクと治療反応性を考慮した C 型肝炎の最新治療, 第 99 回日本消化器病学会総会(シンポジウム), 2013.3.22, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

11) 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸, C 型肝炎の病態における肝脂肪化と PNPLA3 および IL28B 遺伝子多型の意義の検討, 第 99 回日本消化器病学会総会(シンポジウム), 2013.3.22, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

12) S.Maekawa, M.Miura, N.Komatsu, A.Tatsumi, Y.Asakawa, S.Takano, M.Sato, K.Shindo, F.Amemiya, Y.Nakayama, T.Inoue, M.Sakamoto, N.Enomoto. An Association between Quasispecies Nature of Hapatitis C Virus Core Region and Disease Progression Analysis by Deep Sequencing. The 2nd JSGE International topic conference. 2013.3.23, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

13) 坂本穰, 前川伸哉, 榎本信幸, 発癌リスクと治療反応性を考慮した最新の C 型肝炎治療, 第 49 回日本肝臓学会総会(シンポジウム), 2013.6.7, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

14) 三浦美香, 前川伸哉, 高野伸一, 小松信俊, 辰巳明久, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本穰, 榎本信幸, 次世代シーケンサーを用いた NS5A 阻害剤耐性変異の検討, 第 49 回日本肝臓学会総会, 2013.6.7, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

15) 三浦美香, 前川伸哉, 高野伸一, 小松信俊, 辰巳明久, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本穰, 榎本信幸, 次世代シーケンサーを用いた NS5A 阻害剤耐性変異の検討, 第 23 回ウイ

ルス療法研究会、2013.6.14、リーガロイヤルホテル東京(東京都新宿区)

16) 辰巳明久、前川伸哉、三浦美香、小松信俊、田中佳祐、津久井雄也、佐藤光明、雨宮史武、進藤邦明、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代 deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異株の検討、第 23 回ウイルス療法研究会、2013.6.14、リーガロイヤルホテル東京(東京都新宿区)

17) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、発癌リスクと宿主・ウイルス遺伝子からみた C 型肝炎治療、第 17 回日本肝臓学会大会(JDDW)(シンポジウム)、2013/10/10、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

18) 三浦美香、前川伸哉、高野伸一、小松信俊、辰巳明久、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代シーケンサーを用いた HCV NS5A 阻害剤耐性変異の検討、第 17 回日本肝臓学会大会(JDDW)、2013/10/10、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

19) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、ウイルス変異と宿主ゲノムから見た PEG-IFN+RBV 療法の治療成績と発癌リスクを考慮した新規治療法、第 98 回日本消化器病学会総会(シンポジウム)、2012.4.20 京王プラザホテル(東京都新宿区)

20) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、臨床背景とウイルス変異・宿主ゲノムからみた C 型肝炎に対する治療選択、第 48 回日本肝臓学会総会(ワークショップ)、2012.6.7 金沢

21) 小松信俊、前川伸哉、進藤邦明、三浦美香、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代シーケンサーを用いた Telaprevir 耐性変異株の検討、第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワークショップ)、2012.6.7 ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)

22) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸、発癌リスクとウイルス排除の可能性からみた最新の C 型肝炎治療、第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW2012)(シンポジウム)、2012.10.10、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

23) 小松信俊、前川伸哉、三浦美香、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代 deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異株の検討、第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW2012)、2012.10.10、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

24) 三浦美香、前川伸哉、小松信俊、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸、次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析、第 16 回日本肝臓学会大会(JDDW2012)、2012.10.10、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 6 件)

1) 坂本穰、榎本信幸、C 型慢性肝炎、肝硬変、診療ガイドライン UP-TO-DATE、290-297、メディカルレビュー社、2013

2) 坂本穰、榎本信幸、C 型肝炎の治療目標、HEPATOLOGY PRACTICE C 型肝炎の治療を

極める、138-144、文光堂 2013

3) 坂本穰、榎本信幸、DAA 併用療法(IFN based regimen)、C 型肝炎治療～DAAs で広がる治療対象～(熊田博光他編)、89-107、2014、医薬ジャーナル社(大阪)2013

4) 坂本穰、榎本信幸、慢性肝炎・肝硬変(C 型)、治療過程で一目でわかる消化器薬物療法 STEP 1・2・3(一瀬雅夫、岡政志、持田智編集)、174-178、2013、メジカルビュー社、東京

5) 坂本穰、榎本信幸、C 型肝炎、カラー版消化器病学 基礎と臨床(浅香正博、菅野健太郎、千葉勉編)、1177-1188、2013

6) 坂本穰、榎本信幸、ウイルス肝炎治療薬、薬物治療と薬理メカニズム、カラー版内科学(門脇孝・永井良三総編集)246-249、西村書店、2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 穰(SAKAMOTO Minoru)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号:60324191

(2) 研究分担者

なし