

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：72696

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590999

研究課題名 (和文) B型肝炎症例への核酸アナログ製剤による薬剤耐性と新規治療薬の検討

研究課題名 (英文) Emergence of multidrug resistance in patients with chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus lamivudine or entecavir monotherapy and efficacy of tenofovir therapy.

研究代表者

鈴木 文孝 (Suzuki, Fumitaka)

公益財団法人冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：80322642

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要 (和文) : B型慢性肝疾患症例に対して現在行われている核酸アナログ製剤 (ラミブジン、アデホビル、エンテカビル) の効果が得られない原因にそれぞれの薬剤に対する耐性ウイルスが出現している可能性がある。そこで耐性ウイルスの頻度とタイプを調べる研究を行った。ラミブジン、アデホビルの併用療法では約6%に耐性ウイルスが認められた。(主にアデホビル耐性ウイルスであった。) また初回治療例のエンテカビルでは約1%に認められた。(エンテカビル耐性ウイルス) このような治療抵抗例にはテノホビルが効果的であり2年で87%の症例でウイルスが陰性化していた。ただしテノホビル治療でも少数例で効果が得られない症例もあった。

研究成果の概要 (英文) : We analyzed 406 Japanese patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated with lamivudine plus adefovir dipivoxil combination therapy. Substitutions associated with multidrug resistance were identified in 11 patients (2.7%) at baseline, and in 12 patients (3%) during lamivudine plus adefovir dipivoxil therapy. Moreover, we analyzed 976 patients treated with entecavir monotherapy. Substitutions associated with entecavir resistance were identified in 9 patients (1%) during entecavir monotherapy. Moreover, these 44 patients with multidrug resistance received tenofovir disoproxil fumarate (TDF) therapy. Ratio of patients with undetectable serum HBV DNA levels during TDF therapy was 67% and 87% at years 1 and 2, respectively. However, viral breakthrough occurred in 2 patients during TDF therapy. Where indicated, HBV DNA and virological analysis should be carefully monitored.

研究分野：肝臓内科

キーワード：B型肝炎 ラミブジン アデホビル エンテカビル テノホビル 多剤耐性ウイルス 次世代シークエ
ンサー

1. 研究開始当初の背景

現在の B 型慢性肝疾患に対する治療は、インターフェロンまたは核酸アナログ製剤による治療が行なわれている。インターフェロンの効果は、若年症例、ウイルス量が低い症例、ALT 値が高い症例で効果が認められるものの全体では 20-30% の治療効果であり決して十分な治療成績ではない。従って現在は年齢が高い症例やインターフェロン抵抗例、重症肝炎の既往がある症例では核酸アナログ製剤が使用されている。核酸アナログ製剤の治療成績は、ALT 値の正常化率、DNA の陰性化率ともに高い。しかし核酸アナログ製剤の治療は長期投与が必要となり、治療の長期化は耐性ウイルスの出現を招く。1995 年以降 B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤はラミブジン治療が主体であった。しかしラミブジンの長期投与は高率に耐性ウイルスの出現を認め肝炎の再燃を来した。そこで 2004 年以降ラミブジン耐性ウイルスには、アデホビルの併用投与が行われている。アデホビルの併用投与の成績は高く当院の成績でも 5 年投与によって 90% 以上の症例で HBV DNA 量の陰性化が得られている。(Hosaka et al., J Gastroenterol. 2007;42: 368-74)しかしラミブジンとアデホビル両剤に耐性ウイルスをもつ症例も認められる。当院の成績 (Yatsuji H et al., J Hepatol, 2008;48:923-31)では、アデホビル開始時すでにアデホビル耐性ウイルスが出現していた症例が 132 例中 3 例に認められていた。さらに 2 年間の治療期間で 2 例でアデホビル開始後両剤耐性のウイルスが新たに出現していた。一方 2006 年以降は新規の核酸アナログ製剤としてエンテカビル治療が広く行われている。過去に核酸アナログ製剤未使用例 (naïve 例) に対するエンテカビルの治療成績は良好であるが、少数例で耐性ウイルスが出現する。(Suzuki F et al., J Clin Virol, 2007;39:149-52)さらにラミブジン治療からの切り替え例では、切り替え時 DNA 量の多い症例でエンテカビル耐性ウイルスの出現率が高いと報告されている。(Suzuki F et al., J Gastroenterol Hepatol, 2010;25:892-98) このように現在のアデホビル、エンテカビルなどの新規の核酸アナログ製剤の長期投与においても新たな多剤耐性ウイルスの出現を招く可能性がある。このような多剤耐性ウイルスの出現頻度や遺伝子変異のタイプについての報告は世界的にも少なく、本邦では当院の報告以外ない。そこで現在治療中の核酸アナログ製剤使用例において多数例での検討を行ない、HBV DNA の polymerase gene の reverse transcriptase (rt) 領域の遺伝子変異を経時的に検討する必要がある。現在遺伝子変異の検討には PCR-direct sequence 法が主として施行されているが、高感度の測定系として次世代シーケンサーによる解析も行う。さらにこれら多剤耐性ウイルスによる肝炎出現例に対して、新規治療薬 (テノ

ホビル) が使用されている。この治療効果と耐性ウイルスの推移についても検討する。

2. 研究の目的

ラミブジン耐性ウイルスに対してラミブジンとアデホビル併用療法、エンテカビル使用症例における長期治療成績を解析するとともに、耐性ウイルスの出現頻度と耐性ウイルスの遺伝子学的研究を行う。これら耐性ウイルスの変異のタイプと各種核酸アナログ製剤の効果に関しても明らかにする。さらにこれらの多剤耐性ウイルスに対する新たな治療薬 (テノホビル) の効果を臨床的、遺伝子学的に明らかにする。

3. 研究の方法

ラミブジン耐性ウイルスに対してラミブジンとアデホビル併用例 406 例、エンテカビル初回使用例 976 例、核酸アナログ不応例に対してテノホビルを使用した 44 例を対象とした。

これらの長期治療成績を検討するとともに、治療抵抗性の症例 (投与中にウイルス量が最低値より 10 倍以上上昇した症例、ウイルス量が 1/100 以下にならない症例) を選び HBV polymerase の rt 領域の遺伝子解析を PCR direct-sequence 法にて行なった。測定方法は、既報の方法にて行った。(Suzuki F et al., J Med Virol 2006;78:341-352., Suzuki F et al., J Med Virol 2006;78:1025-34.)

さらにラミブジン、アデホビル併用療法後多剤耐性ウイルスが出現した症例の治療開始時の血清から次世代シーケンサー (Ion OneTouch Enrichment System) により耐性ウイルスの検討を行った。

4. 研究成果

ラミブジン治療に抵抗性を示した症例からの多剤耐性ウイルスの出現と治療効果について検討した。ラミブジン抵抗例 406 症例 (ラミブジン治療中に血清 HBV DNA 量が最低値より 1 log copies/mL 以上続けて上昇した症例、または、ラミブジン治療 1 年以降で DNA 量が 5 log copies/mL 以上の症例) において、アデホビルとの併用療法を行った。ラミブジンとアデホビルの併用療法 (観察期間中央値 5.4 年) では、HBV DNA の陰性化率 (<2.6 log copies/mL) は 1 年目 63%、3 年目 75%、5 年目 81%、7 年目 86% と良好であった。一方併用療法開始時に多剤耐性ウイルス (ラミブジン + アデホビル耐性、エンテカビル耐性) を認めた症例は 11 例 (2.7%) であった。内訳は rtM204 の変異を伴わない rtA181S/T を認めた症例が 4 例、rtM204 の変異を同じ clone に伴わない rtA181T を認めた症例が 3 例、rtA181T と rtM204V/I の変異を認めた症例が 2 例、エンテカビル耐性変異を認めた症例が 2 例であった。11 例中 4 例のみが併用療法中に陰性化が得られたが、3 例では十分な効果が得られずテノホビルの投与を必要とした。

一方、併用療法開始後 12 例 (3%) でラミブジンとアデホビル両剤に対する耐性ウイルスの出現を認めた。RtA181S/T の変異を 11 例に認め、rtT184I または rtM250I の変異を 4 例に認め、rtA181T と N236T の double mutation を 2 例に認めた。併用療法中 5 例で DNA 量の再上昇を認めテノホビル等の他の治療に移行した。この 5 例中 2 例は rtA181T と N236T の double mutation であり、残り 3 例では多彩な変異が出現した症例であった。多剤耐性ウイルスの出現は、ラミブジンとアデホビルの併用療法に抵抗性を示す可能性が高い。

さらにラミブジン、アデホビル併用療法後多剤耐性ウイルスが出現した 10 症例の治療開始時の血清を用いて、次世代シーケンサー (Ion OneTouch Enrichment System) により耐性ウイルスの検討を行った。併用療法後 rtA181T/V/S の変異が出現した 10 例中 7 例で治療開始前にすでに rtA181T/V の変異が検出された。この検出量は 7 例中 6 例で 1% 以下であった。一方 rtT184I, rtM236T, rtM250I/L の変異は、治療開始時でも検出されなかった。次にエンテカビル初回治療例 976 例での HBV DNA の陰性化率 (<2.6 log copies/mL) は 1 年目 89%、3 年目 95%、5 年目 97%、7 年目 99% と非常に良好であった。一方エンテカビル初回治療例での耐性ウイルスの検討では、5 例でエンテカビル耐性を認め、さらに 4 例では rtM204I, L180M+M204V, A181T, A181S+T184A+M204I, A181T+M204I+M250M などのラミブジンおよびアデホビル耐性に関係する変異ウイルスを認めた。このような核酸アナログ製剤の耐性ウイルス出現例や不応例 44 例に対するテノホビルの成績を検討した。HBV DNA の陰性化率 (<2.1 log copies/mL) は、1 年 67%、2 年 87%、3 年 86% であった。しかし rtA181T, rtS202G の変異をもつ 4 例の中では 2 年目で HBV DNA 量の陰性化を認めず、さらに 2 例では viral breakthrough を認めた。以上のようにラミブジン、アデホビル併用療法では 6%、エンテカビルでは 1% に多剤耐性ウイルスを認めた。このような症例に対するテノホビルの効果は高いが、2 例で viral breakthrough を認め rtA181T, rtS202G の変異例を中心に注意が必要である。

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)

Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitou S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. J Hepatol. 2012 Sep;57(3):508-14. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.037. Epub 2012 May 30. PMID: 22659518

Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H. Long-term efficacy and emergence of multidrug resistance in patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus lamivudine. J Gastroenterol. 2014 Jun;49(6):1094-1104. doi: 10.1007/s00535-013-0864-4. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23929069

Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Suzuki Y, Kumada H. Virologic breakthrough in a patient with chronic hepatitis B by combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir. Drug Desig, Development and Therapy 2014(8): 869-873. doi : 10.2147/DDDT.S65349.eCollection

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

鈴木文孝: 核酸アナログ製剤の長期投与成績 - ラミブジン、アデホビル、エンテカビルの長期成績 - , 医学のあゆみ 242(5):427-430, 2012

鈴木文孝: 核酸アナログ製剤の長期投与成績 - ラミブジン、アデホビル、エンテカビルの長期成績, 別冊 医学のあゆみ B 型肝炎 - 最新治療コンセンサス (第 1 版):59-62, 2013

〔学会発表〕 (計 5 件)

鈴木文孝、保坂哲也、熊田博光。シンポジウム 4: B 型肝炎における HBs 抗原陰性化に関する検討 第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.7.

鈴木義之、鈴木文孝、熊田博光。ワークショップ 8: 核酸アナログ製剤不応例に対する新規治療の有用性 第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.4.26.

鈴木文孝、鈴木義之、熊田博光。パネルディスカッション 2: B 型肝炎肝疾患に対するテノホビル治療の効果と耐性ウイルスの検討 第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.27.

鈴木文孝、鈴木義之、熊田博光。B 型肝炎肝疾患の核酸アナログ治療における不応例の検討とテノホビルの治療成績 第 51 回日本肝臓学会総会 パネルディスカ

セッション 4 2015.5.22.

〔図書〕(計 1 件)
HEPATOLOGY PRACTICE 第 1 巻
B 型肝炎の診療を極める 2013 205p

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 文孝 (Suzuki, Fumitaka)
公益財団法人 冲中記念成人病研究所
その他部局等・研究員
研究者番号：80322642

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：