

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461008

研究課題名(和文) DAA耐性型HCVに対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapies for DAA-resistant HCV

研究代表者

今村 道雄 (Imamura, Michio)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：40403513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Direct-acting antiviral (DAA)はC型肝炎に有効であるが、耐性変異が問題となる。本研究にて、1)治療前プロテアーゼ阻害薬あるいはNS5A阻害薬耐性変異を有する症例ではダクラタスビル+アスナプレビル療法の効果が低下すること、2)DAA療法非SVRでは使用した薬剤に対する耐性変異が高率に出現すること、出現したプロテアーゼ阻害薬耐性変異は次第に減少するがNS5A阻害薬耐性変異は長期的に維持されること、3)非SVRに出現したプロテアーゼ阻害薬は次第に減少するが、同薬剤に対する感受性は低下しており、再治療により容易に耐性変異が再増加することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Direct-acting antiviral (DAA) is effective for chronic hepatitis C. However, resistant associated variants (RAVs) is one of the problems. In the present study, using chronic hepatitis C patients serum samples and HCV-infected human hepatocyte chimeric mice, we clarified 1) Genotype 1 HCV-infected patients with either protease inhibitor or NS5A inhibitor RAVs are likely to fail to daclatasvir plus asunaprevir treatment. 2) While protease inhibitor RAVs that emerged during therapy gradually decreases and became undetectable by deep sequencing analysis, emerged NS5A inhibitor RAVs tends to long-term persist in the absence of the drug. 3) The virological response to daclatasvir plus asunaprevir treatment was low in patients with simeprevir treatment failure. Protease inhibitor resistance remains even after disappearance of mutant strains by deep sequencing.

研究分野：肝臓病学

キーワード：C型慢性肝炎 DAA 薬剤耐性変異

1. 研究開始当初の背景

Direct acting antiviral (DAA)はC型肝炎ウイルス(HCV)の複製を強力に抑制する作用を持ち、C型肝炎慢性肝炎に対して中心的役割を担っている。研究開始当初、本邦では第一世代プロテアーゼ阻害剤であるテラプレビル+PEG-IFN/RBV併用療法が行われていたが、さらにその後、第二世代プロテアーゼ阻害剤+PEG-IFN/RBV、さらにはIFN非使用のDAA併用療法が使用可能になる予定であった。これらの治療は、高い有効性が期待されていたが、PEG-IFN/RBV難治性の症例では、耐性株出現によるbreakthroughが問題となると思われていた。これらDAAを用いた治療を行うにあたり、以下の点が疑問点として挙げられていた。1)治療前にDAA耐性株が存在した場合、治療に影響するか？ 2)DAA耐性株が出現した場合、いつまで体内に存在するか？ 3)プロテアーゼ阻害剤耐性株が出現した場合、次世代治療(他のプロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤などの併用療法)に影響があるか？特にDAA耐性変異が出現した場合、その変異が長期的に残存し、次世代の治療に影響するか否かは、現時点においてもC型肝炎慢性肝炎患者に対する治療方針を決めるうえにおいても重要な要素である。

2. 研究の目的

本研究は、上記の疑問点を解明するために発案した。耐性株に対する次世代治療の有効性は重要な問題であるが、C型肝炎慢性肝炎患者における解析のみではその解明は困難である。本研究はDAA治療を行うC型肝炎慢性肝炎患者における臨床的解析に加え、HCV感染モデル動物であるヒト肝細胞キメラマウスを用いて行う。また耐性株は、次世代シーケンサーを用いたdeep sequenceにより解析する。DAA耐性HCVを感染させたマウスを用いて、耐性株の血中dynamicsをdeep sequenceにより詳細に検討し、さらにこれらのマウスに対し、プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、NS5Bポリメラーゼ阻害剤などの種々のDAAを併用投与し、その有効性を検討し、以下の点を明らかにする。1)治療前のDAA耐性株の頻度とDAA治療効果の関係 2)新たに出現したDAA耐性株の体内の残存期間 3)DAA耐性株に対する各種DAA(第二世代プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤)併用療法の有効性

3. 研究の方法

C型肝炎患者における検討

シメプレビル/PEG-IFN/RBV療法を施行するC型肝炎慢性肝炎患者において、治療前の血清からHCV RNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてNS3領域をdeep sequenceにより解析し、プロテアーゼ阻害剤耐性株の存在の有無および割合を検討する。すでに少数例の解析の報告はあるが、多数例の検討は

されておらず、本研究では可能な限り多数例を検討し、治療前の耐性profileとその後の治療効果の関連を明らかにする。治療中に耐性株によるbreakthroughあるいは治療終了後のHCV再燃が生じた症例では、耐性profileを経時的に検討し、治療前の耐性株との関連、さらに出現した耐性株がどのぐらいの期間、血中に残存するのかを明らかにする。

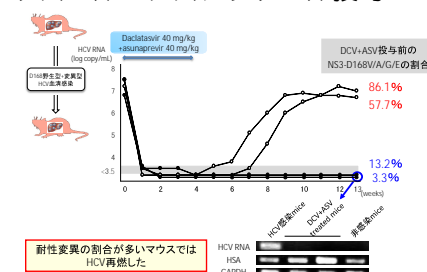
HCV感染マウスを用いた検討

すでに第二世代プロテアーゼ阻害剤耐性変異(NS3-D168A/V)またはNS5A阻害剤耐性変異(NS5A-L31M+Y93H)が出現した患者血清をヒト肝細胞キメラマウスに投与することにより、耐性型HCV感染マウスの作製に成功している。これらDAA耐性型HCV感染マウスの血中HCV RNAをdeep sequenceにて経時的に解析し、自然経過にてマウス体内において耐性profileがどのように変化するかを観察する。また耐性型HCV感染マウスに第一世代プロテアーゼ阻害剤(テラプレビル)、第二世代プロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤などのDAAを組み合わせて投与し、耐性profileの経時的变化および抗ウイルス効果を検討する。

4. 研究成果

(1)Genotype 1b型のHCV患者において、治療前にダクラタスビル+アスナプレビル耐性変異が検出される症例は検出されない症例に比べ、ダクラタスビル+アスナプレビル療法の効果が低下することを見いだした。プロテアーゼ阻害剤耐性変異とダクラタスビル+アスナプレビル療法の効果を検討するため、genotype 1b型HCV感染マウスへシメプレビルを投与したところ、血中HCVにはNS3-D168V/G/E変異が出現し、95.7%に増加した。このマウスの血清を別の4頭のマウスにpassageしHCVを感染させたところ、NS3-D168変異率はそれぞれ3.3%、13.2%、57.7%、86.1%となった。これら4頭のマウスにダクラタスビル・アスナプレビルを投与したところ、NS3-D168変異が3.3%、13.2%の2頭のマウスではHCVが排除されたが、57.7%、86.1%の2頭のマウスではHCV-RNAが再燃した(図1)。プロテアーゼ阻害剤耐性変異が多いほどダクラタスビル+アスナプレビル療法の治療効果も低下する可能性が示された。

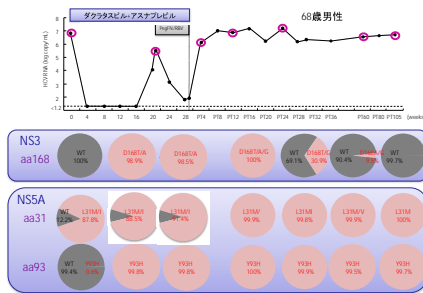
図1. NS3-D168変異型マウスに対するダクラタスビル+アスナプレビル投与



耐性変異の割合が多いマウスではHCV再燃した

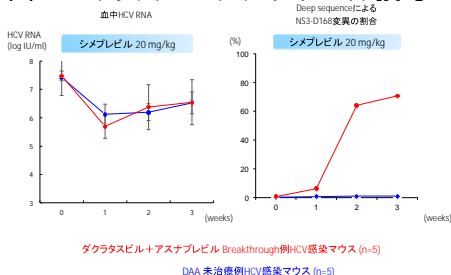
(2)次世代シーケンサーを用いた検討によりシメプレビル+PegIFN/RBV療法の非SVR例では高率にNS3-D168変異が出現した。しかし時間の経過とともに変異株は次第に減少し、次世代シーケンサーにて感度以下となった。ダクラタスビル+アスナプレビル療法の非SVR例では、高率にNS3-D168変異およびNS5A-L31, Y93変異が出現した。NS3-D168変異は次第に減少し次世代シーケンサーにて感度以下となったが、NS5A-L31, Y93変異は高率のまま維持され、治療終了2年後においても維持されていた。(図2)。

図2.ダクラタスビル+アスナプレビル療法非SVR例における耐性変異の経過



(3)シメプレビル+PegIFN/RBV療法の非SVR例に生じたNS3-D168変異は時間の経過とともに減少し、次世代シーケンサーにて感度以下になるにも関わらず、シメプレビル+PegIFN/RBV療法の非SVR例に対するダクラタスビル+アスナプレビル療法のSVR率は33.3%(3/9)とシメプレビル治療歴のない患者に対するSVR率95.3%(184/193)に比べ有意に低値であった。そこで、シメプレビル+PegIFN/RBV療法でbreakthroughを生じた症例で次世代シーケンサーにてNS3-D168変異が感度以下に低下したbreakthrough 60週後の血清またはDAA未治療HCV例の血清を別のマウスにpassageしたところ、NS3-D168変異はいずれのマウスにおいても1.0%未満であった。両群のマウスにシメプレビル20mg/kgを3週間投与したところ、DAA未治療例のHCV感染マウスのNS3-D168変異は低頻度の出現であったのに対し、breakthrough例の血清投与マウスのNS3-D168変異は2週で高度に増加し($P < 0.05$)、すべてのマウスで血中HCVの再上昇が認められた(図3)。

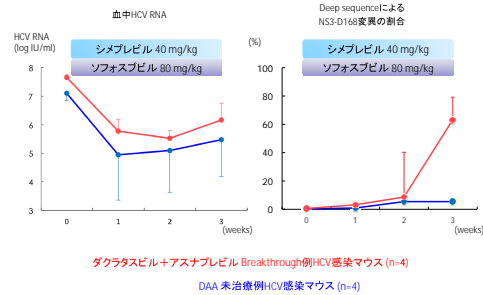
図3.マウスへのシメプレビル投与



シメプレビル20mg/kgとリバビリン50mg/kg

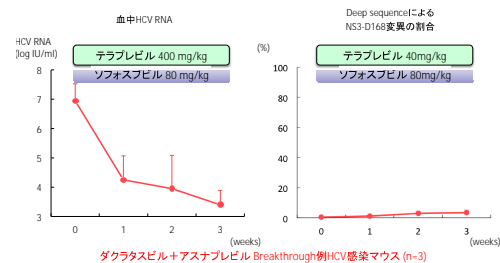
の併用投与ではbreakthrough例の血清投与マウスはNS3-D168耐性の増加が3週まで抑制されたが、HCV-RNAの低下は軽度であった。シメプレビル20mg/kgとNS5B阻害剤ソフォスビル80mg/kgの併用投与ではbreakthrough例の血清投与マウスではNS3-D168耐性の増加が3週まで抑制されたが、最終的な割合は同程度で、HCV-RNAの再上昇も認められた(図4)。

図4.マウスへのシメプレビル+ソフォスビル投与



シメプレビルおよびアスナプレビルと耐性プロファイルの異なるプロテアーゼ阻害薬であるテラプレビル400mg/kgとソフォスビルの併用により、breakthrough例の血清投与マウスではNS3-D168耐性変異の出現が抑制され、HCV RNAの持続低下が得られた(図5)。

図5.マウスへのテラプレビル+ソフォスビル投与



プロテアーゼ阻害薬治療非SVRに出現したNS3-D168耐性変異は次第に減少し、長期的には次世代シーケンサーにて検出感度以下になるが、プロテアーゼ阻害薬に対する感受性は低下しており、再投与により、耐性変異が容易に出現する可能性が示された。シメプレビル治療非SVR例に対し、ソフォスビル+テラプレビルの投与により耐性変異の出現は抑制されており、プロテアーゼ阻害薬治療非SVRに対するDAA再治療には、耐性プロファイルの異なる薬剤を選択することが望ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1) Kan H, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Uchida T, Miyaki E, Tsuge M, Abe H, Aikata

H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Combination therapies with daclatasvir and asunaprevir on NS3-D168 mutated HCV in human hepatocyte chimeric mice. *Antivir Ther.* 査読あり, 2016;21(4):307-15

2) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Kan H, Miyaki E, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Ellis JD, Chayama K. Elimination of HCV via a non-1SG-mediated mechanism by vaniprevir and BMS-788329 combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *Virus Res.* 査読あり, 2016;213:62-8.

3) Kan H, Imamura M, Uchida T, Hiraga N, Hayes CN, Tsuge M, Abe H, Aikata H, Makokha GN, Chowdhury S, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Protease inhibitor resistance remains even after mutant strains become undetectable using deep sequencing. *J Infect Dis.* 査読あり, 2016;214(11):1687-1694

4) Yoshimi S, Imamura M, Murakami E, Hiraga N, Tsuge M, Kawakami Y, Aikata H, Abe H, Hayes CN, Sasaki T, Ochi H, Chayama K. Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy. *J Med Virol.* 査読あり, 2015;87(11):1913-20.

5) Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J Viral Hepat.* 査読あり, 2015;22(2):156-63.

〔学会発表〕(計8件)

1) Michio Imamura, Hiromi Kan, Takuro Uchida, Masataka Tsuge, Hiromi Abe, Hiroshi Aikata, Nelson Hayes and Kazuaki Chayama. Protease inhibitor resistance remains even after mutant strains become undetectable by deep sequencing. HCV 2016. 2016年10月13日, Kyoto

2) 今村道雄, 辻 恵二, 茶山一彰. 薬剤耐性型C型慢性肝炎に対するダクラタスビル+アスナプレビル療法の治療効果およびプロテアーゼ阻害薬耐性変異の感受性. 第52回日本肝臓学会総会. 2016年5月20日, 幕張

3) 今村道雄, 平賀伸彦, 菅 宏美, 茶山一彰. C型慢性肝炎患者において, NS3/4A プロテアーゼ阻害薬治療 failure に出現した NS3-D168 変異は deep sequence により検出されなくなっても残存する. 第26回抗ウイルス療法研究会. 2016年5月14日, 名古屋

4) 今村道雄, 辻 恵二, 茶山一彰. 野生型および耐性型C型慢性肝炎に対するダクラタスビル+アスナプレビル療法の治療効果第102回日本消化器病学会総会 2016年4月21日, 東京

5) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤+NS5A阻害剤併用療法の治療効果. 第101回日本消化器病学会総会. 2015年4月23日, 仙台

6) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤+NS5A阻害剤併用療法の治療効果. 第18回日本肝臓病学会大会. 2014年10月23日, 神戸

7) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤+NS5A阻害剤併用療法の治療効果および耐性株の検討. 第50回日本肝臓病学会総会. 2014年5月25日, 東京

8) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型慢性肝炎患者におけるDAA耐性株の検討-DAA併用療法を見据えて-. 第100回日本消化器病学会総会. 2014年4月26日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 道雄 (Michio, Imamura)
広島大学病院・消化器・代謝内科・講師
研究者番号: 40403513

(2) 研究協力者

平賀 伸彦 (Nobuhiko Hiraga)
広島大学、大学院医歯薬保健学研究院
小酒 慶一 (Keiichi Kosaka)
広島大学、大学院医歯薬保健学研究院、博士課程
菅 宏美 (Hiromi Kan)
広島大学、大学院医歯薬保健学研究院、博士課程
内田 宅郎 (Takuro Uchida)
広島大学、大学院医歯薬保健学研究院、博士課程