

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 伊藤 淳

学 位 論 文 題 名

慢性 C 型肝炎患者におけるソフォスブビル関連薬剤耐性変異に関する研究

(Prevalence and characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants in patients with hepatitis C virus genotype 1b infection)

【背景と目的】 C型肝炎ウイルス(HCV)は肝硬変や肝臓の主な原因の一つであり、本邦でも肝臓の成因の約65%を占める。従って C型肝炎治療は肝臓の予防において必須である。近年、C型慢性肝炎の抗ウイルス治療はDAA(Direct-Acting Antivirals)の登場により飛躍的な進歩を遂げた。HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 (PI)の登場により SVR 率は著明に上昇し、さらに NS5A 阻害剤と PI の併用療法により、IFN-free の加療が実現した。現在、核酸型ポリメラーゼ阻害剤であるソフォスブビル (SOF) の登場により 95%以上の SVR 率が期待される。

しかし、DAA には薬剤耐性変異 (RAV) の問題があり、特に治療非著効に関連して獲得された多重変異は高度耐性となり長期残存し得ることが問題となる。SOF は良好な治療成績に加え、RAV を生じにくいという点から期待が持たれる薬剤である。SOF に関連した RAV として広く知られている HCV の NS5B 領域 S282T の変異は非常に稀な変異であり、自然発生ではほぼ認めない。しかし、最近になり NS5B 領域 L159F、C316N、L320F、V321I などの変異が SOF の RAV である可能性が報告されてきている。

Genotype 1b の C型慢性肝炎の治療においては、SOF は PI や NS5A 阻害剤などの他のクラスの DAA との併用で用いられるが、過去の DAA 非著効により獲得された RAV を有する症例に対しての再治療時は併用された PI や NS5A 阻害剤などの DAA が十分な効果を発揮できないことが想定され、前述した NS5B 領域の新規 RAV の影響を受けて SVR 率の低下に繋がることが懸念される。また、これらの新規 RAV は S282T と異なり、自然発生の変異として存在する。このため、DCV/ASV 併用療法などの DAA 治療非著効となった症例が増加している今、これら新規に報告され始めた NS5B 領域の変異の自然発生の存在率の解明は非常に重要である。しかし、本邦ではこれらの SOF の薬剤耐性に関連が疑われる変異の存在比率に関する報告はない。

本研究では、DAA 治療歴のない症例の血清を用い、これら NS5B 領域 L159F、C316N、L320F、V321I および S282T の変異の自然発生の存在率を明らかにし、NS3 領域や NS5A 領域の RAV との関連や背景因子との関連を検討した。

【対象と方法】 本研究は、2014 年 2 月から 2015 年 7 月の期間に北海道大学病院および関連施設において、シメプレビル (SMV)、ペグインターフェロン (PEG-IFN)、リバビリン (RBV) の 3 剤併用療法を施行した DAA 治療歴のない 96 症例を対象とした。本研究において、SMV/PEG-IFN/RBV 併用療法は本邦の標準的な治療法に準じて行い、治療効果については、治療終了 24 週間後の HCV-RNA の陰性化をもって SVR (Sustained virological response)と判定した。

血清からの HCV-RNA の抽出は、QIAamp® viral RNA mini kit を用い、逆転写の過程は SuperScript® II Reverse Transcriptase を用いて行った。評価対象とした RAV は既報を元に決定し、HCV の NS3 領域、NS5A 領域、NS5B 領域の各領域について、Advantage® 2 PCR Kit を用いて PCR を施行した。PCR 後の DNA を The BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Standard Kit を用いて Direct sequencing を行った。データの解析には Sequence Scanner Software2 version 2.0 を用い、変異の検出は Con1 を参照配列とし、BLAST®を用いて行った。

また、NS5B 領域の L159F の変異の評価のため、C316 野生型および C316N の症例、各 10 症例について次世代シーケンシングを施行した。次世代シーケンシングは Ion OneTouch™ 200 Template kit v2、Ion PGMTM 200 Sequencing Kit、Ion PGMTM を用いて行った。得られた配列は Con1 を参照配列とし mapping を行い、変異の検出は CLC Genomics Workbench software を用いて行った。

統計解析には SPSS version 21.0 を用い、カテゴリー変数の解析には χ^2 検定を、連続変数の解析にはマン・ホイットニーの U 検定を、C316N の変異に関連した因子の解析には多変量ロジスティック回帰分析を使用した。いずれの検定においても、P 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意であると判断した。

【結果】 登録された 96 症例の年齢の中央値は 61 歳で 40 例 (41.7%) が男性であった。過去に IFN による加療歴を有している症例は 53 例 (55.2%) であった。

HCV の NS3 領域の治療開始前の変異存在率は、全体で 51 例 (53.1%) に認めたが、SMV の薬剤耐性として重要な D168 の変異は 2 例 (2.08%) 認めたのみであった。NS5A 領域では、NS5A 阻害剤の薬剤耐性として重要な L31M/V が 5 例 (5.21%)、Y93H が 6 例 (6.25%) に認めたが、高度耐性変異の L31-Y93 の多重変異は認めなかった。NS5B 領域の薬剤耐性変異の可能性が示唆された C316N の変異は本研究では 45 例 (46.9%) と非常に高頻度に認めた。L159F の変異は 1 例 (1.06%) に認め、同時に C316N の変異を有していた。

次世代シーケンシングによる C316 野生型と C316N の症例各 10 例における L159F の変異の評価では、C316 野生型の症例では 10 例中 1 例も L159F の変異を有する症例は認めず、C316N の症例では 10 例中 3 例に L159F の変異を認めた。

NS5B 領域 C316N 変異と背景因子の関連についての検討を行った結果、C316N の変異を有している症例では、有意に HCV コアアミノ酸 91 番変異を有する率が高かった (P = 0.003)。

本研究では SMV/PEG-IFN/RBV 併用療法により 67 例 (69.8%) で SVR が得られた。SMV に関連する NS3 領域 D168 の変異を有する症例は 2 例のみで、SVR 率に有意差は認めなかった。

また、非著効となった 14 例において、治療前と再燃後の薬剤耐性変異の比較を行い、12 例で NS3 領域の薬剤耐性の出現を認めた。

【考察】 SOF は高い治療効果と安全性、そして RAV が少ないことから現在広く用いられている薬剤である。最近になり、HCV の NS5B 領域、L159F、C316N、L320F、V321I などといった RAV の可能性がある変異が報告されるようになったが、本邦におけるこれらの RAV の存在比率の詳細は明らかではない。本研究では、DAA 治療歴のない症例における自然発生の NS5B 領域の薬剤耐性変異の存在率を示した。C316N の変異は 46.9% (45/96 例) と既報より高頻度に認め、L159F の変異はダイレクトシーケンシング解析ではわずかに 1 例で認めたのみであったが、次世代シーケンシング解析では C316N 症例の 30% (3/10 例) に認めた。C316N と L159F が併存する理由は明らかではないが、*in vitro* の解析で L159F の複製能と SOF の薬剤耐性が C316N の変異との併存で増加することが示されており、2 つの変異が併存する理由の一つとして考えられる。

SOF は genotype 1 の C 型肝炎症例では、DAA が 1 剤のみとなるレジメンである SOF/RBV 併用療法は治療効果が十分ではないため PI や NS5A 阻害剤などの他のクラスの DAA と SOF を併用した治療が行われ、本邦では NS5A 阻害剤であるレジパスビル (LDV) との併用療法が施行されている。最近の報告で、SOF/RBV 併用療法と NS5B 領域 L159F、C316N の変異との関連が指摘されており、過去の DAA 治療非著効により高度の薬剤耐性が獲得された症例では SOF に併用される DAA の効果が十分に得られず、L159F や C316N といった変異が治療効果に影響する可能性が懸念される。

DAA 治療非著効となった症例が増加している今、NS5B 領域 C316N の変異が多い本邦では、DAA 治療非著効症例の後治療として SOF を含んだレジメンでの加療を検討する際にはこれらの変異の有無について十分な配慮をする必要がある。

なお、本研究の限界として、NS5B 領域 C316N の変異が SOF を含んだレジメンの治療効果に実際に影響するかどうかは未だ明らかではなく、今後さらなる検討が望まれる。

【結論】 本研究では本邦において HCV の NS5B 領域 C316N 変異の自然発生の存在率が高頻度であること、NS5B 領域 L159F と C316N の変異が共存することが示された。DAA 治療非著効となった症例で後治療として SOF を含んだ治療を検討する際には、DAA 治療非著効に関連して獲得された高度薬剤耐性のため、これらの NS5B 領域の変異が SOF の治療効果に影響を及ぼす可能性に十分な配慮が必要と考えられる。