

総括研究報告書

1. 研究開発課題名:次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析によるC型肝炎の病態解明と臨床応用
2. 研究代表者: 榎本信幸
3. 研究開発の成果:

ウイルス変異情報を用いた個別化治療の構築

DAA 治療においては既存の direct sequencing では解析できない微量の耐性変異ウイルス動態が重要であり、次世代シーケンス情報による個別化医療の構築を行う。

●抗ウイルス治療の効果を規定する HCV ゲノムの解析:

DAA(direct antiviral agents)治療経過における耐性変異の消長について次世代シーケンスを用い、IFN(interferon)ベースの DAA 治療、IFN フリーの DAA 治療について検討し、両治療ともに治療前の quasispecies の一部が選択・変異することにより多剤・高度耐性変異体が発現すること、DAA 耐性変異は特定の遺伝子構造をもつ quasispecies が重要であることを明らかとした。IFN 併用 DAA 治療において、IL28B メジャー症例群では治療後早期にウイルスゲノム多様性低下が観察されるもののマイナー群では認められないことを示した。NS5A 阻害剤に対する自然耐性変異を deep sequence にて検討し、NS5A 剤高度耐性と関連する Y93H 症例を NS5A 剤未治療でも高頻度 (30%) に認めること、Y93H 症例は IL28B メジャー症例群に多く、同変異 HCV は NS5A 剤耐性であっても IFN に感受性であることを世界で初めて示し、宿主とウイルスゲノムの密接な関連を明らかとした。さらには NS5A 剤耐性 HCV を有する症例群は肝の炎症あるいは肝発癌と関連し、特徴的な臨床像を示す集団であることを示した。

●治療抵抗性 HCV 診断の臨床応用

DAA 治療においては、治療前の正確な DAA 耐性変異の存在診断が必須であり、さらに簡便・安価な測定系が望ましい。感度の高い deep sequence を基準とし、近年開発された invader assay について検出力の感度・特異度について検討し、これまで用いられてきた direct sequence と比した有用性と限界について明らかとした。

●HCV ゲノム変異情報のデータベース化と臨床導入基盤の形成:

治療開始前の DAA 耐性について direct sequencing による解析を施行し臨床データと対比して集積し、特に NS5A においては L31・Y93H のみならず、L28M、R30Q、Q54H、P58S 変異を高頻度に認め、DAA 治療感受性を関連する可能性を示した。

次世代シーケンス技術による新規治療法開発への基盤構築

次世代シーケンス解析によりこれまで未知であったウイルスおよび宿主因子を行い、新たな治療法開発の基盤構築を行う。

●HCV ゲノム変異を基軸とする病変進展・肝発癌機構の解析: 山形コホート研究の長期経過観察症例の検体を用い、次世代シーケンスによる大量解析の技術基盤を確立した。肝移植症例において次世代シーケンサを用いた血中ならびに肝組織の包括的なウイルスゲノム解析から、C 型慢性肝炎の約 30-40% の症例で構造領域のない欠損型 HCV ゲノムが完全長ウイルスと共感染していること、本欠損ウイルスが DAA 耐性化することを明らかにした。レーザーキャプチャー顕微鏡により回収した核酸からの次世代シーケンス解析法を開発、肝癌ゲノム変化の解析を開始、hTERT、β カテニン、p53 の重要性について示した。

●HCV 治療抵抗性および病原性の分子機構の解析:

DAA 耐性型 HCV クローンをヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、DAA 治療による多剤耐性 HCV の出現過程を次世代シーケンスで解析、臨床的耐性 HCV が HCV クローンとして感染モデルにおいても耐性を呈することを明らかとした。一方、次世代シーケンス法を用いて3本の独立した HCV の全長配列を決定し、IFN 感受性予測因子である core 領域と NS5A 領域は1種類のゲノム上に共存し、感受性株と非感受性株はそれぞれクラスターを形成し独立して進化していることを明らかとした。

●次世代シーケンス技術による感染持続機構の解明:

DAA 耐性 HCV 長期培養系を樹立に成功。高度耐性ウイルスの増殖能力・DAA/インターフェロン/リバビリンへの感受性を明らかにした。HLA クラス II 遺伝子領域の SNP を解析し病態と関連する2つの SNP (rs2071025 および rs3116996) を同定した。