

課題番号 : 24指101

研究課題名 : C型慢性肝炎に対する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における有害事象発現に関与する宿主側因子、および耐性ウイルスの出現動態に関する多施設共同前向き研究（2年目）

主任研究者名 : 正木尚彦

研究協力者名 : 山極洋子、溝上雅史、考藤達哉、村田一素、是永匡紹、今村雅俊、西田奈央、杉山真也、青木孝彦、柳瀬幹雄、野崎雄一、姜 貞憲、松居剛志、滝川康裕、宮坂昭生、小松眞史、中根邦夫、上野義之、渡辺久剛、高木 均、小池和彦、建石良介、石井耕司、高亀道生、今関文夫、神田達郎、米田政志、中尾春壽、田中靖人、熊田 卓、豊田秀徳、山本和秀、池田房雄、道堯浩二郎、前城達次

キーワード : C型慢性肝炎、テラプレビル、GWAS、耐性ウイルス

研究成果 : 難治例である1型高ウイルス量のC型慢性肝炎の治療において、2011年11月に承認されたプロテアーゼ阻害剤テラプレビルを加えた3剤併用療法による著効率は70%以上と飛躍的に向上した。しかしながら、重篤な皮膚障害、高度貧血などの有害事象が治療の支障となるため、個別化医療としての適応として有害事象に関連する因子の検索が必要と考えている。また、テラプレビルをはじめとする直接的抗ウイルス剤を用いた治療法が今後C型慢性肝炎の治療において主流となるが、その作用機序のため耐性ウイルスの出現が問題となっている。次世代のプロテアーゼ阻害剤への交差耐性も認められているため、本療法における耐性ウイルスの出現動態の把握は必須である。そこで、多施設共同前向き研究班を組織し、臨床情報およびリンパ球由来ヒトDNA、血清を収集のち、当センターが保有するGWAS、高速シーケンサーを用いて解析を行う。

本研究班では、研究班全体のテーマを「テラプレビルによる重症薬疹発現に関与するSNPsの検索」とし、分担研究のテーマとして「テラプレビル3剤療法によるウイルス学的治療効果予測因子の検討」を行った。1) 皮膚障害に関与するSNP同定を目的として、他の研究班の協力を得て384検体を収集した。SNP typingを行ったところ、平均Dish QC 0.950, overall call rate 99.0%とdata qualityは良好であった。さらに、SNP QC:Call rate>95%、HWE $p$ >0.001、MAF>0.05、Sample QC:Call rate>95%のSNP filteringの条件下に380検体、417769 SNPに絞り込み、Control(皮疹なし)182検体、Case (Grade 3)52検体について解析を行った。 $P = 5.0 \times 10^{-8}$ レベルのSNPは認められなかったが、第5染色体上にtop hitとなったSNPを認めた。通常は、解析結果の再現性を確認するために、異なったサンプル群におけるreplication studyを行うべきであったが、収集検体数の伸び悩みのため、Imputation解析に変更したところである。2) 分担研究「テラプレビル3剤療法によるウイルス学的治療効果予測因子の検討」では、多施設共同研究で収集した1型・高ウイルス量群の患者のうち、「テラプレビル投与期間8週以上、かつ、ペグインターフェロン・リバビリン(P/R)投与期間24週以上」を満たす121例を対象に検討した。特に、P/R2剤併用療法の治療効果予測においてIL28B SNPとともに有用性が報告されている治療前血清IP-10値測定の意義について検討した。その結果、3剤併用療法によるRVR(治療開始4週目までのHCV RNA消失)に寄与する因子として、治療歴とIP-10低値が検出された。SVR(著効)に寄与する因子として、血清アルブミン高値、IL28B TT-genotype、リバビリン初回投与量600mg以上/日が検出された。血清IP-10値をカットオフ値450でカテゴリー化すると、IL28B TT-genotypeではIP-10低値群で有意にRVRが高率であったが(91%対72%)、SVRには全く関連しなかった。一方、non-TT genotypeでは、IP-10低値群で有意にRVRが高率であること(74%対42%)、さらに、IP-10低値+RVR群とIP-10高値+非RVR群とではSVR率において82%対27%と有意差を認めており、3剤併用療法においても治療前血清IP-10値測定は治療効果予測に有用であることが示唆された。

Subject No. : 24A101

Title : A prospective multi-center study: analysis of genetic factors of patients with severe adverse events and evaluation of resistant variants in treatment with telaprevir (TVR), peg-interferon (peg-IFN) and ribavirin (RBV) therapy for chronic hepatitis C patients.

Researchers : Naohiko Masaki, Yoko Yamagiwa, Masashi, Mizokami, Tatsuya Kanto, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, Masatoshi Imamura, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Yoshihiko Aoki, Mikio Yanase, Yuichi Nozaki, Jong-Hon Kang, Takeshi Matsui, Yasuhiro Takikawa, Akio Miyasaka, Masafumi Komatsu, Kunio Nakane, Yoshiyuki Ueno, Hisayoshi Watanabe, Hitoshi Takagi, Kazuhiko Koike, Ryosuke Tateishi, Koji Ishii, Michio Kogame, Fumio Imazeki, Tatsuro Kanda, Masashi Yoneda, Haruhisa Nakao, Yasuhito Tanaka, Takashi Kumada, Hidenori Toyoda, Kazuhide Yamamoto, Fusao Ikeda, Kojirou Michitaka, and Tatsuji Maeshiro.

Key word : chronic hepatitis C, telaprevir, GWAS, resistant variants

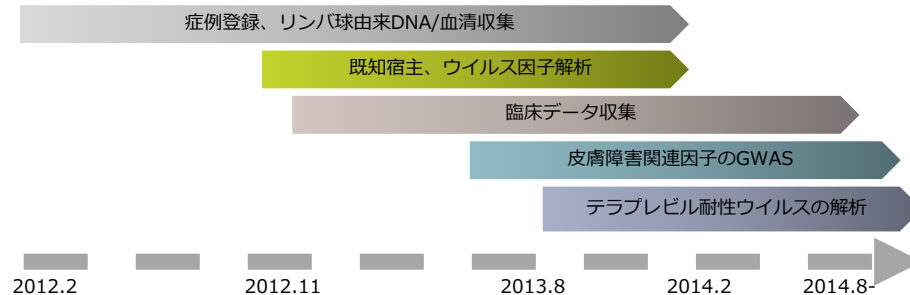
Abstract : Our aims are to analyze genetic factors of patients with severe adverse events with genome-wide association study (GWAS) and to evaluate resistant variants using deep-sequencing analysis, induced by TVR, the first direct-acting antiviral agent against hepatitis C virus (HCV).

Patients treated with TVR/peg-IFN/RBV therapy for HCV genotype 1 infection with high viral load have been enrolled since February 2012.

1) As for the host factors for serious skin rash, analysis with GWAS was performed in our institute. So far 384 DNA samples were collected and applied for SNP typing. We confirmed the excellent data quality with mean Dish QC (0.950) and overall call rate (99.0%). Under the conditions of SNP filtering for SNP QC (call rate > 95%, HWE<sub>p</sub> > 0.001, MAF > 0.05) and sample QC (call rate > 95%), we have selected 380 DNA samples and 417769 SNPs. By comparing control group (no skin rash; n = 182) and case group (grade 3 skin rash; n = 52), no SNPs which could achieve *P* value less than  $5.0 \times 10^{-8}$  were revealed, however on the 5th chromosome, one candidate SNP was discovered. Since the replication study could not be performed, due to shortage of the enrolled patients in this prospective study, we are now doing imputation analysis instead. 2) As for the predicting factors for sustained virological response (SVR) to the triple therapy, we included 121 patients in whom the treatment durations were longer than 8 weeks of telaprevir and longer than 24 weeks of peginterferon and ribavirin. In this study, we evaluated the role of pretreatment measurement of serum IP-10 (interferon- $\gamma$  inducible protein 10), as previously reported in peginterferon ribavirin dual therapy. With respect to the predictive factors for RVR (rapid virological response = disappearance of serum HCV RNA until 4 weeks of treatment), history of previous interferon therapy and serum IP-10 were selected in multivariate logistic regression analysis. When IP-10 levels were categorized at cut-off value of 450 pg/mL, SVR rates were significantly different between low IP-10/RVR group and high IP-10/non-RVR group (82% vs 27%), in the patients with IL28B non-TT genotype. In conclusion, pretreatment measurement of serum IP-10 levels were useful, in part, even in the triple therapy.

Researchers には、分担研究者を記載する。

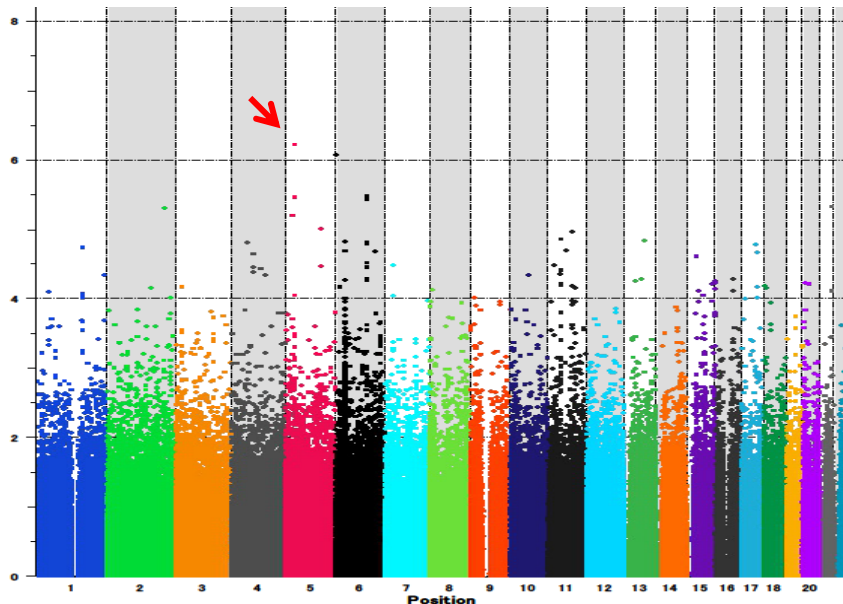
## ロードマップ



## テラプレビル薬疹に関連する宿主因子

・GWASプラットフォームとしてAxSYMを用い、380検体417769 SNPsを検討（タイピングのクオリティは平均Dish QC 0.95/Overall call rate 99.0%/で、SNP filtering条件はSNP QC call rate > 95%/HWE  $p < 0.001$ /MAF > 0.05/Sample QC call rate > 95%）。

・さまざまな組み合わせでグレード間の比較検討を実施したところ、第5染色体上に $p < 10^{-6}$ 以上の候補SNPが選択された（下記マンハッタン・プロット参照）。



・収集し得た検体のN数が十分ではないため、GWAS結果をreplicationすることは断念した。このプラットフォームに載っていないSNPで有意なものがあるかを調べる目的で、現在fine mappingは行わず、In silicoのImputation作業を実施している（健常人対照として1000人ゲノム検体、HapMap検体160例を想定）。

・これで有意なSNPsが見出せば、TaqMan法にて収集検体を用いた測定を行う予定。

# ペグインターフェロン/リバビリン/ テラプレビル3剤併用療法における 血清IP-10値による治療効果予測の検討

(全国21施設の協力を得て実施)

## 対象

1型高ウイルス量C型慢性肝炎  
2011.11.1-2013.3.31  
21施設  
n = 218

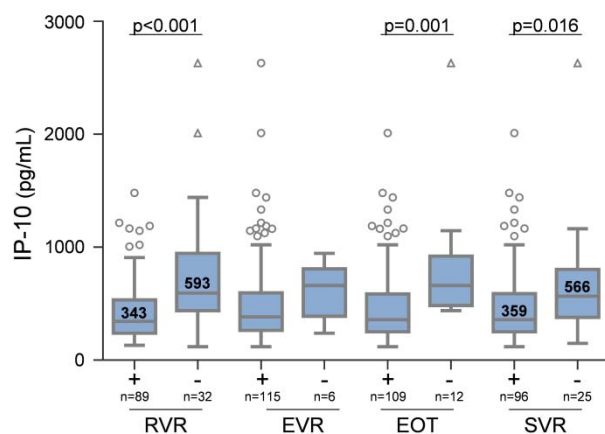
除外 → TVR 8週未満 または  
Peg-IFN/RBV 24週未満 (n=49)  
(治療中のHCV RNA非消失例、  
再陽性化例を除く)

n = 169

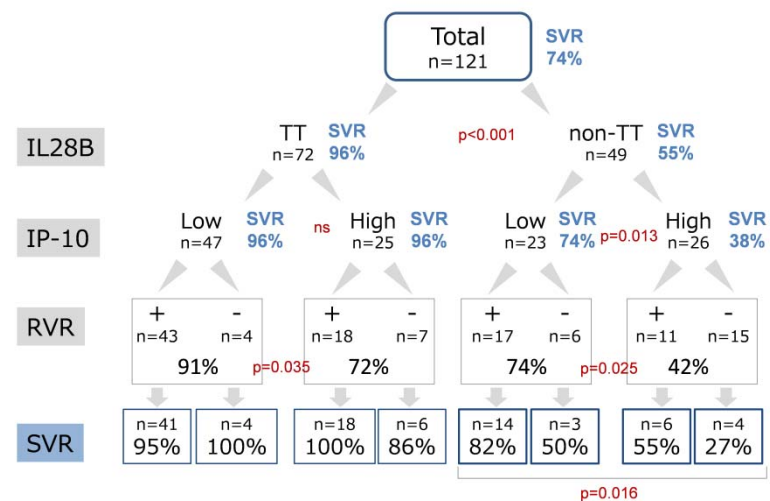
除外 → 脾摘術後 (n=11)  
部分的脾動脈塞栓術後 (n=1)  
欠損値 (n=36)

n = 121

## ウイルス学的効果と血清IP-10値 (n=121)



## 血清IP-10値測定はIL28B non-TT群で有用



課題番号 : 24指101

研究課題名 : C型慢性肝炎に対する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における有害事象発現に関与する宿主側因子、および耐性ウイルスの出現動態に関する多施設共同前向き研究（2年目）

主任研究者名 : 正木尚彦

分担研究者課題名 : C型慢性肝炎に対する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の治療効果予測因子に関する検討

分担研究者名 : 正木尚彦

研究協力者名 : 山極洋子、溝上雅史、考藤達哉、村田一素、是永匡紹、今村雅俊、西田奈央、杉山真也、青木孝彦、柳瀬幹雄、野崎雄一、姜 貞憲、松居剛志、滝川康裕、宮坂昭生、小松眞史、中根邦夫、上野義之、渡辺久剛、高木 均、小池和彦、建石良介、石井耕司、高亀道生、今関文夫、神田達郎、米田政志、中尾春壽、田中靖人、熊田 卓、豊田秀徳、山本和秀、池田房雄、道堯浩二郎、前城達次

キーワード : C型慢性肝炎、テラプレビル、GWAS、耐性ウイルス

研究成果 : 難治例である1型高ウイルス量のC型慢性肝炎の治療において、2011年11月に承認されたプロテアーゼ阻害剤テラプレビルを加えた3剤併用療法による著効率は70%以上と飛躍的に向上した。しかしながら、重篤な皮膚障害、高度貧血などの有害事象が治療の支障となるため、個別化医療としての適応として有害事象に関連する因子の検索が必要とされている。また、テラプレビルをはじめとする直接的抗ウイルス剤を用いた治療法が今後C型慢性肝炎の治療において主流となるが、その作用機序のため耐性ウイルスの出現が問題となっている。次世代のプロテアーゼ阻害剤への交差耐性も認められているため、本療法における耐性ウイルスの出現動態の把握は必須である。そこで、多施設共同前向き研究を組織し、臨床情報およびリンパ球由来ヒトDNA、血清を収集のち、当センターが保有するGWAS、高速シーケンサーを用いて解析を行う。

このうち、ペグインターフェロン・リバビリン（P/R）併用療法の宿主側治療効果予測因子として有用であることを2009年に報告したIL28B SNPに関する検討を分担研究として行っているが、特に平成25年度は、P/R2剤併用療法の治療効果予測においてIL28B SNPとともに有用性が報告されている治療前血清IP-10値測定の意義についても検討した。多施設共同研究で収集した1型・高ウイルス量群の患者のうち、「テラプレビル投与期間8週以上、かつ、P/R投与期間24週以上」を満たす121例を対象に検討した。その結果、3剤併用療法によるRVR（治療開始4週目までのHCV RNA消失）に寄与する因子として、治療歴とIP-10低値が検出された。SVR（著効）に寄与する因子として、血清アルブミン高値、IL28B TT-genotype、リバビリン初回投与量600mg以上/日が検出された。血清IP-10値をカットオフ値450（pg/mL）でカテゴリー化すると、IL28B TT-genotypeではIP-10低値群で有意にRVRが高率であったが（91%対72%）、SVRには全く関連しなかった。一方、non-TT genotypeでは、IP-10低値群で有意にRVRが高率であること（74%対42%）、さらに、IP-10低値+RVR群とIP-10高値+非RVR群とではSVR率において82%対27%と有意差を認めており、3剤併用療法においても治療前血清IP-10値測定は治療効果予測に有用であることが示唆された。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指101

研究課題名： C型慢性肝炎に対する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における有害事象発現に関与する宿主側因子、および耐性ウイルスの出現動態に関する多施設共同前向き研究

主任研究者名： 正木尚彦

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Ex vivo induction of IFN- $\lambda$ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients.	Murata K, Sugiyama M, Kimuta T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramine S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, <u>Masaki N</u> , Mizokami M.	J Gastroenterol	2013. DOI 10.1007/s00535-013-0814-1.	2013
IL28B polymorphisms and clinical implications for hepatitis C virus infection in Uzbekistan.	Khudayberganova D, Sugiyama M, <u>Masaki N</u> , Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, Mizokami M.	PLoS ONE	2014 Mar 24;9(3):e93011 . doi: 10.1371/journal.pone.0093011 . eCollection	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
多施設共同研究における3剤併用療法のウイルス学的効果と副作用の検討.	山極洋子、正木尚彦、西田奈央、杉山真也、竹田努、青木孝彦、是永匡紹、村田一素、今村雅俊、溝上雅史.	第17回日本肝臓学会大会 (JDDW2013)	東京	2013年10月
Regional differences should be considered for the more effective interferon treatment of chronic hepatitis C: Evidences on Japanese nation-wide	<u>Masaki N</u> , <u>Yamagiwa Y</u> , Mizokami M.	APASL Liver Week 2013	Singapore	June, 2013

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				