HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	伊藤, 淳
Description	配架番号：2276
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12535号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12535
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65884
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Ito.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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)

2017 年 3 月

北海道大学

伊藤 淳

学位論文

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)

2017 年 3 月

北海道大学

伊藤 淳

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7 頁
研究方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8 頁
研究結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23 頁
総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Jun Ito, Goki Suda, Yoshiya Yamamoto, Atsushi Nagasaka, Ken Furuya, Kenichi Kumagai, Hideaki Kikuchi, Takuto Miyagishima, Tomoe Kobayashi, Megumi Kimura, Kazushi Yamasaki, Machiko Umemura, Takaaki Izumi, Seiji Tsunematsu, Fumiyuki Sato, Yoko Tsukuda, Katsumi Terashita, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto for the NORTE Study Group
Prevalence and characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants in patients with hepatitis C virus genotype 1b infection
Hepatology Research 2016/Feb/20. doi:10.1111/hepr.12685. (Online First)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Jun Ito, Goki Suda, Yoshiya Yamamoto, Atsushi Nagasaka, Ken Furuya, Kenichi Kumagai, Hideaki Kikuchi, Takuto Miyagishima, Tomoe Kobayashi, Megumi Kimura, Kazushi Yamasaki, Machiko Umemura, Takaaki Izumi, Seiji Tsunematsu, Fumiyuki Sato, Yoko Tsukuda, Katsumi Terashita, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto
Prevalence and characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants
Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016
2016/2/20~2/24 Tokyo, Japan

緒　言

C型肝炎ウイルス(HCV)は全世界で約1億7,000万人の感染者が存在し、肝硬変や肝癌の主たる原因の一つである[1,2]。本邦では年約3万人が肝癌で死亡し、年齢調整死亡率は悪性新生物全体のなかで第5位と、極めて重要な疾患である。その成因として、HCVに起因するものが約65%を占めており[3]、非B非C型肝癌が増加している昨今においてもC型肝炎治療は肝癌の予防において重要な役割を担っている。

近年、C型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。DAA登場以前のGenotype 1b高ウイルス量C型慢性肝炎症例の標準治療であるペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン（RBV）の併用療法ではウイルス学的著効（SVR）は約50%と十分ではなかったが、2011年9月にHCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤（PI）であるテラプレビル（TPV）が、2013年に第二世代のプロテアーゼ阻害剤であるシメプレビル（SMV）が承認され、PEG-IFN/RBVと併用した3剤併用療法が可能となり、SVR率は著明に上昇した[4-6]。さらに、2014年に認可されたNS5A阻害剤であるダクラタスビル（DCV）とプロテーゼ阻害剤であるアスナプレビル（ASV）の併用療法によりインターフェロン（IFN)を用いない、いわゆるIFN-freeの加療が実現し、SVR率も約85%と良好な治療成績が得られるようになった[7]。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)が登場し、NS5A阻害剤であるレジパスビル（LDV）との併用療法により95%以上のSVR率が期待されている[8]。(図1)

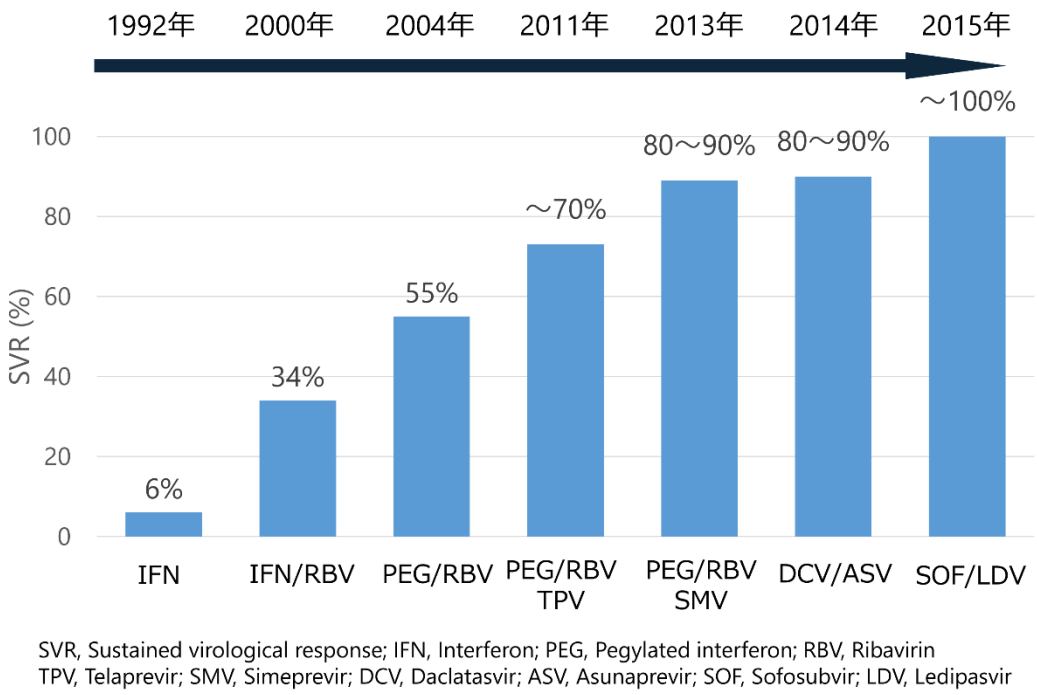


図 1. C 型肝炎の抗ウイルス治療の進歩

IFN-free 治療の実現により、IFN-base の治療しか選択がなかった時には治療が困難であった肝硬変症例や高齢者でもウイルス排除が可能となった。その一方で、DAA 治療では薬剤耐性変異（RAV）の問題が明らかとなった。例えば本邦で広く行われている IFN-free の加療である DCV/ASV 併用療法では、HCV の NS3 領域 D168 や NS5A 領域 Y93 や L31 の RAV を有する症例では、SVR が 40-50%に低下することが報告されている[7,9]。（図 2）

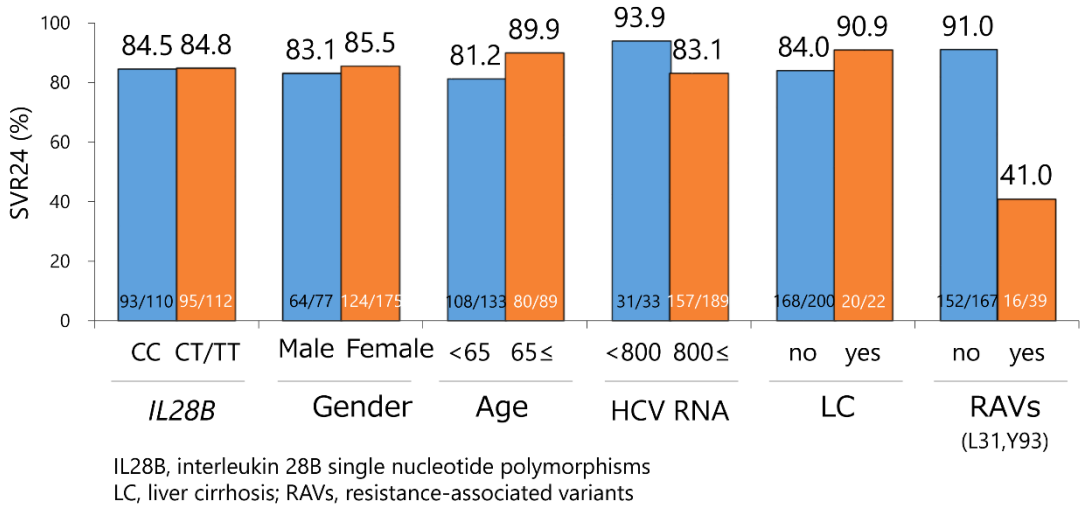
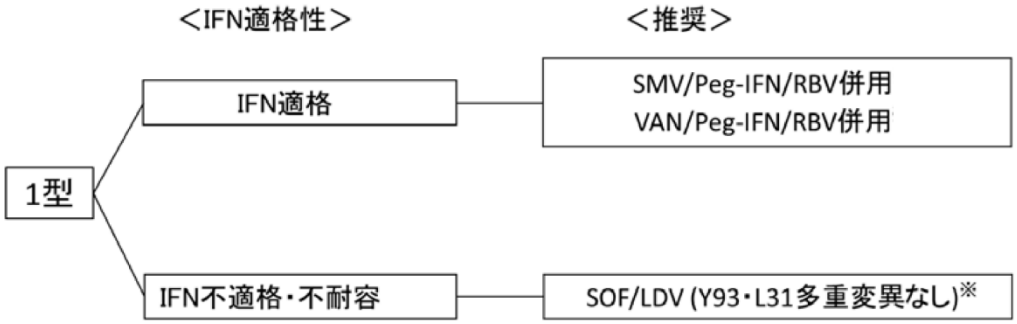


図 2. DCV/ASV 併用療法の各因子別治療効果

さらに重要なこととして、PI や NS5A 阻害剤や NS5B 非核酸型ポリメラーゼ阻害剤といった DAA は核酸型ポリメラーゼ阻害剤と比較すると、RAV を生じやすく、さら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うることが問題となる。実際、本邦の最新のガイドラインにおいて、DCV/ASV 併用療法非著効例の後治療はこれらの多重変異がないことが SOF-base の治療導入の条件となっている。(図 3)



※ SOF/LDV治療を選択する場合には、Y93/L31変異を含めた耐性変異を詳細に測定し、少なくともL31・Y93多重変異がないことを確認する。DCV/ASV治療により誘導されたL31・Y93多重変異をもつ症例ではSOF/LDV治療の有効性は確認されておらず、再治療の効果についてのエビデンスがない。このような症例の適応判断ならびに治療方針は、発癌リスクならびに変異例に対してSOF/LDV治療を行う場合の著効率とさらなる複雑な多剤耐性獲得のリスクを十分に勘案して方針を決定する。

図 3. C 型慢性肝炎 Genotype 1、DCV/ASV 前治療の非著効例の治療フローチャート

核酸型ポリメラーゼ阻害剤である 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 [10]。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 [11-14]。

Genotype 1b の C 型慢性肝炎の治療においては、phase 1 試験において SOF 単独療法では十分な治療成績が得られなかったために、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、非常に高い SVR 率が報告された [8,15-17]。この非常に高い SVR 率から、SOF-base の加療では併用される PI や NS5A に関連する NS3 領域や NS5A 領域の RAV のみならず、NS5B 領域の RAV も治療効果に影響しないと考えられていた。しかし、これらの治療成績は DAA 治療歴のない症例の報告であり、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の治療効果は未だ明らかではない。特に DCV/ASV 併用療法のような、PI と NS5A 阻害剤を併用したレジメンが非著効となった症例では、NS3 領域と NS5A 領域の多重変異を獲得することが既に知られており、これら変異を有した症例では、後治療として SOF-base の治療を施行しても併用された PI や NS5A 阻害剤などの DAA が十分な効果を発

揮できない可能性が想定される。従って高度耐性となる多重変異を有した症例では、他のクラスの DAA と SOF を併用したレジメンであっても、SOF の単独療法を行う事と同等となることも想定され、前述した NS5B 領域 L159F、C316N、L320F、V321I などの変異の影響を受けて SVR 率の低下に繋がることが懸念される。実際に Kai らは DCV/ASV 併用療法非著効となり多重変異を獲得した HCV ウイルスを感染させたヒト肝細胞キメラマウスの実験で、LDV と核酸型ポリメラーゼ阻害薬の併用療法が非著効となることを報告している[18]。さらに Lawitz らは過去に LDV/SOF 併用療法が非著効となった症例に、再治療として 24 週間に治療期間を延長して LDV/SOF 療法を施行した治療成績を報告しているが、再治療前に NS5A 領域 Y93H の変異が獲得されていた症例の SVR 率は 33%（2/6 例）と不良であった[19]。

また、NS5B 領域 L159F、C316N、L320F、V321I などの変異は 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相関を検討した。

略　語　表

ASV：Asunaprevir
DAA：Direct Acting Antivirals
DCV：Daclatasvir
DNA：Deoxyribonucleic Acid
DW：distilled water
HCV：Hepatitis C Virus
IFN：Interferon
IL28B：Interleukin 28B single nucleotide polymorphisms
LDV：Ledipasvir
PCR：Polymerase Chain Reaction
PEG-IFN：Pegylated Interferon
PI：HCV NS3/4A protease inhibitor
RAV：Resistance-associated variant
RBV：Ribavirin
RNA：Ribonucleic Acid
rpm：revolutions per minite
SMV：Simeprevir
SOF：Sofosubvir
SVR：Sustained Virologic Response
TPV：Telaprevir

研究方法

1. 対象

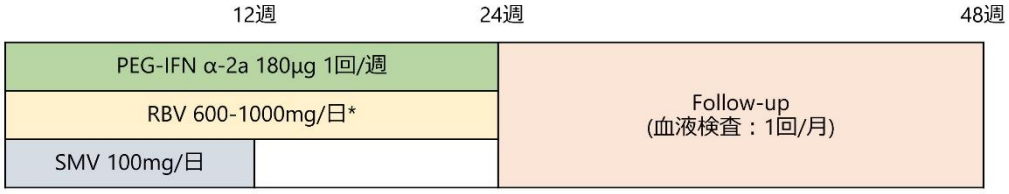
本研究は、2014 年 2 月から 2015 年 7 月の期間に北海道大学病院および NORTE study グループに参加している関連施設において、シメプレビル(SMV)、ペグインターフェロン（PEG-IFN)、リバビリン（RBV）の 3 剤併用療法を施行した DAA 治療歴のない 96 症例を対象とした。試験参加施設は北海道大学病院および NORTE study グループに参加している 21 施設（JCHO 札幌北辰病院、JCHO 北海道病院、NTT 東日本札幌病院、愛育病院、網走厚生病院、岩見沢市立総合病院、帯広厚生病院、北見赤十字病院、釧路ろうさい病院、札幌センチュリー病院、札幌北楡病院、市立札幌病院、市立函館病院、市立稚内病院、東栄病院、苫小牧市立病院、苫小牧日翔病院、函館医師会病院、函館中央病院、北海道医療センター、北海道消化器科病院）で、各施設にて治療を施行し、診療情報および治療開始前の血清を回収し、後方視的な解析を施行した。また、29 例の非著効例のうち血清が回収可能であった 14 症例については、治療終了後の血清（治療終了後 0-8 ヶ月後の血清）と治療前の血清を用いて耐性変異の変化についての検討を施行した。

なお、本研究は、北海道大学病院倫理委員会および NORTE study に参加された各施設の倫理委員会の承認を得て行われ、研究参加に際しては書面による同意が得られた症例を対象とした。

2. 治療プロトコール

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われた（図4)。PEG-IFNはPEG-IFNα-2a（ペガシス®、Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan）を用い、週1回180μgを皮下注射で投与を24週間継続とし、減量や中止については薬剤添付文書の基準に従い行った。RBVはコペガス®（Chugai Pharmaceutical）を用い、24週間継続とし、同様に減量や中止については添付文書の基準に従い投与された。SMVについては、ソブリアード®（Janssen Pharmaceutical, Tokyo, Japan）を用い、1日1回100mg内服を12週間継続した。

また、治療効果については、治療終了後24週間後のHCV-RNAにより評価し、RNAの陰性化をもってSVR（Sustained virological response)と判定した。



*RBV投与量
60kg以下：600 mg/日、60-80kg：800 mg/日、80kg超：1000 mg/日

PEG-IFN, Pegylated interferon; RBV, Ribavirin; SMV, Simeprevir

図4. 治療プロトコール

3. HCV-RNAの抽出、逆転写

試薬及び材料

QIAamp® viral RNA mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA)
99.5% ethanol (Wako Pure Chemical Industries)
SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
RNasin®Plus RNase Inhibitor (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
10mM dNTP mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
Random primer (500ug/ml) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)

血清からのHCV-RNAの抽出は、QIAamp® viral RNA mini kitを用いて以下の方法で行った。室温に戻した血清サンプル 140μLをキャリアRNAを含むBuffer AVL 560μLが入ったマイクロ遠心チューブにピペッティングし、室温10分間インキュベートし、チューブをスピンダウンした。次に99.5%エタノールを560μLサンプルに添加し、15秒間ボルッテクスした後に、スピンダウンした。kit専用のQIAamp Miniカラムにアプライし、8,000 rpmで1分間遠心分離し、ろ液を廃棄した。同行程を2回繰り返し全てのサンプルをカラムで遠心分離した後、カラムに500μLのBuffer AW1を添加し、8,000 rpmで1分間遠心分離し、ろ液を破棄した。次に、カラムに500μLのBuffer AW2を添加し14,000 rpmで1分間遠心し、最後に1.5mLのマイクロ遠心チューブにカラムをセットしてBuffer AVE 60μLを添加し、室温で1分間インキュベートし、8,000 rpmで1分間遠心操作しRNAを含む溶出液を回収した。

回収したRNAの濃度測定は、分光高度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。

逆転写の過程はSuperScript® II Reverse Transcriptaseを用いて以下の手法にて行った。RNAを含む溶出液3μLと5x first strand buffer 6.0μL、0.1M DTT 3.0μL、10mM dNTP mix 1.5μL、Random primer (500ug/ml) 0.75μL、RNase-FREE water 3.75μLを混ぜた試薬とRNase-FREE water 9.0μL、RNasin®Plus RNase Inhibitor 1.5μL、SuperScript® II Reverse Transcriptase 1.5μLを混ぜ合わせ、42℃で30分間、4℃で15分間インキュベートし、-20℃で保存した。

4. PCR

試薬及び材料

Advantage® 2 PCR Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)

表1.に示すプライマーを使用し、HCVのNS3領域、NS5A領域、NS5B領域の評価対象とした薬剤耐性変異を含む領域を増幅した。評価対象とした薬剤耐性変異は既報を元に決定した[11-14,20-30]。1st PCRにはcDNA 1.0μL、10mM dNTP 0.5μL、10x Buffer 2.5μL、10μM Forward primer 0.5μL、10μM Reverse primer 0.5μL、50X Advantage® 2 Polymerase 0.25μLに総量が26μLとなるようにDNase-Free waterを加え混ぜ合わせた。95℃ 1分間の後、94℃ 15秒間・61℃ 15 秒間・72℃ 42秒間を35 サイクル、72℃ 1分間の条件にて、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてPCRを行った。

2nd PCRには1st PCR後の検体0.5μL、10mM dNTP 0.5μL、10x Buffer 2.5μL、10μM Forward primer 0.5μL、10μM Reverse primer 0.5μL、50X Advantage® 2 Polymerase 0.25μLに総量が25.5μLとなるようにDNase-Free waterを加え混ぜ合わせた。Polymerase 1μLを加え混ぜ合わせた。95℃ 1分間の後、94℃ 15秒間・61℃ 15 秒間・72℃ 42秒間を35 サイクル、72℃ 1分間の条件にて、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてPCRを行った。PCR 後は4℃に維持し、保存が長期となる場合は-20℃で保管した。

Region	Primer (Name/ Nucleotides/ Sequence)
NS3	NS3 1st s (3302-3329)
	5′ -GGCAGACACCGCGGCGTGTGGGGACAT-3′
	NS3 1st as (4286-4316)
	5′ -GCACTCATCACATATTATGATGTCATAGGC-3′
	NS3 2nd s (3305-3329)
	5′ -AGACACCGCGGCGTGTGGGGACAT-3′
	NS3 2nd as (4054-4074)
	5′ -AGACACCGCGGCGTGTGGGGACAT-3′
NS5A	NS5A 1st s (5872-5891)
	5′ -AAGAGGCTCCACCAGTGGAT-3′
	NS5A 1st as (6730-6749)
	5′ -CGCCGGAGCGTACCTGTGCA-3′
	NS5A 2nd s (5893-5912)
	5′ -AATGAGGACTGCTCCACGCC-3′
	NS5A 2nd as (6690-6709)
	5′ -GTGAAGAATTCGGGGGCCGG-3′
NS5B	NS5B 1st s (7902-7922)
	5′ -GGCTAYGGGGCAAAGGACGTC-3′
	NS5B 1st as (9198-9220)
	5′ -GCYGGRATTGGAGTGAGTTTRAG-3′
	NS5B 2nd s Fwd (7958-7977)
	5′ -CTCCGTGTGGAAGGACYTGC-3′
	NS5B 2nd as Fwd (8318-8337)
	5′ -GGGCCAAGTCACAACATTGG-3′
	NS5B 2nd s Rev (8304-8328)
	5′ -GAGGAGTCAATHTACCAATGTTGTG-3′
	NS5B 2nd as Rev (8615-8635)
	5′ -TACCTRGTCATRGCCTCCGTG-3′

s, sense; as, antisense; Fwd, forward; Rev, reverse

表1. 本研究に用いたプライマー

5. Direct sequencing シークエンシング

試薬及び材料

The BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Standard Kit	(Thermo Fisher Scientific Inc.)
Sodium acetate	(Wako Pure Chemical Industries)
99.5% ethanol	(Wako Pure Chemical Industries)
HiDiTM Formamide	(Thermo Fisher Scientific Inc.)

PCR後のDNAを用いてDirect sequencingを行った。Big Dye® Terminator 2.5μL、halfBD Dye Termminator 2.5μL、DNA product 0.5μLに総量が15μLとなるようにDNase-Free waterを加え混ぜ合わせた。2nd PCRに用いたプライマーを3.3μMに調整し1μLを加え混ぜ合わせた。96℃ 1分間の後、96℃ 10秒間・50℃ 5秒間・60℃ 4分間を25 サイクル、4℃ 7分間の条件にて、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いてPCRを行った。PCR産物 16μLに3M sodium acetate 2μL、99.5% ethanol 40μL を加えボルテックスミキサーにて撹拌した後、室温・遮光で15 分間安置した。18℃、13,200 rpmで10分間遠心し、上清を廃棄した。70%に調整したethanol 100μLを加え、18℃、13,200 rpmで10分間遠心し、上清を廃棄した。室温・遮光で10 分間空気乾燥させ、HiDiTM Formamide 50μLを加え95℃ 2分間、氷上で2分間冷却した。ピペッティングにより混和し、ABIPRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)でシーケンシングを行った。データの解析にはSequence Scanner Software2 version 2.0 (Applied Biosystems)を用いた。変異の検出はCon1を参照配列とし、BLAST®(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)を用いて行った。

6. Emulsion PCR、次世代シーケンシング

試薬及び材料

Ion OneTouchTM 200 Template kit v2
(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)
10M Sodiumhydroxide Solution
(Sigma-Aldrich Japan inc., Tokyo, Japan)
Ion PGMTM 200 Sequencing Kit (Life Technologies Corporation)

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。1回のランで異なるbarcode を付加した1-5検体を、濃度を合わせて混ぜ合わせて使用した。Ion OneTouchTM System (Life Technologies)を用いてEmulsion PCRを行った。Nuclease-free water 25μL、Ion OneTouchTM Reagent Mix 500μL、Ion OneTouchTM PCR Reagent B 300μL、Ion OneTouchTM Enzyme Mix 100μL、26pMに調整したDNA 25μL、Ion OneTouchTM 200 Ion SphereTM Particles 100μLをピペッティングにより混和した。全量をIon OneTouch Plus Reaction Filter Assembly にローディングし、更にIon OneTouch Reaction Oil 1,500μLをローディングし、セットした。Emulsion PCRの終了後、検体をそのままIon OneTouchTM Systemで遠心し、2 本のRecovery tubeに各50μLの検体を残し、上清を廃棄した。

次に検体のenrichmentをIon OneTouchTM ESシステムを用いて行った。前述の検体のペレットを懸濁し、計100μLをIon OneTouchTM ES専用8連tubeのWell 1に分注した。Melt-Off solutionとして、Tween® Solution 280μL、1Mに調整したNaOH 40μLを混ぜ合わせ調整し、Well 7に分注した。1.5 mL DNA LoBind tube によく撹拌した容器からDynabeads® MyOneTM Streptavidin C1 Beads 13μLを移し、マグネティックスタンドに2分間静置し上清を廃棄した。MyOneTM Beads Wash Solution 130μLを添加し、ボルテックスにて撹拌した後、Well 2に分注した。OneTouchTM Wash Solution 各300μL をWell 3-5に移し、検体のenrichment を施行し、サンプルを回収した。

Enrich 済みのサンプル100μLを0.2 mL PCR tubeに移し、Control Ion SphereTM Particles を5μL加えた。更にAnnealing Buffer 100μLを加え、ピペッティングにより混和し15,500 xgで2分間遠心した。3μLを残して上清を廃棄した。3μLのSequencing Primer を加え、95℃ 2 分間、37℃ 2 分間にセットした、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いてannealingを行った。

その後、Sequencing Poymelase 1μLを加え、ピペッティングにより混和し、室温で5 分間静置した。Chip checkを済ませたIon 314TMチップ(Life Technologies)にサンプル7μLをロード、サンプルの混合を施行した。Ion PGMTM (Life Technologies)のシステムセットアップとイニシャライズを済ませ、ローディングが終わったchipをセットし、ランを開始した。得られた配列はCon1を参照配列としmappingを行った。変異の検出はCLC Genomics Workbench software (CLC Bio, DNK)を用いて行った。

7. 統計解析

統計解析には SPSS version 21.0 (IBM Japan, Tokyo, Japan)を用いた。カテゴリー変数の解析にはχ2検定を使用し、連続変数の解析にはマン・ホイットニーのU検定を使用した。また、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。

研究結果

1. 患者背景

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、そのうち、1例は治療効果が不明であり、2例は過去の治療内容および治療効果が不明であった。ヘモグロビン、血小板、AFP、HCV RNA、IL28B SNPs、HCV コアアミノ酸70番変異、HCV コアアミノ酸91番変異についての結果を表２に示す。

	(n = 96)
Age (years)†	61 (25-79)
Male / Female	40/56
Hb (g/dl)†	13.7 (9.1-17.2)
Plt ($x10^4/\mu l$)†	16.9 (6.0-32.7)
ALT (IU/L)†	42 (14-247)
AFP (ng/ml)†	4.8 (1.4-183)
HCV RNA (log IU/ml)†	6.4 (5.0-7.7)
IL28B (rs8099917) : TT/ TG+GG/ unknown	58/35/3
Core70: wild/ mutant/ unknown	65/29/2
Core91: wild/ mutant/ unknown	60/34/2
Past history of IFN therapy:	
naïve/ relapse/ non-responder/ unknown	41/27/23/5

† median(range)

Hb, Hemoglobin; Plt, Platelet; ALT, Alanine aminotransferase; AFP, Alpha-fetoprotein; IL28B, Interleukin 28B single nucleotide polymorphisms; Core 70, core amino acid 70 substitution; Core 91, core amino acid 91 substitution

表2. 患者背景

2. 治療開始前の変異

ベースラインのNS3領域の変異は51例（53.1%）に認めた。しかし、Q80L、S122C/G/N/T、V170Iの変異は高頻度に認めたが、これらは既報ではSMVの薬

剤耐性に影響しないことが報告されている[20]。SMVの薬剤耐性として重要なD168の変異についてはD168A、D168E/Vを有する症例が各1例（1.04%）認めたのみであった。（表3）

部位		変異	n（%）
（単独）	V36A/M	なし	
	T54A/S	T54S	1（1.04%）
	Q80K/L/R	なし	
	S122C/G/N/T	S122C	1（1.04%）
		S122G	3（3.13%）
		S122N	1（1.04%）
		S122T	3（3.13%）
		S122C/G/N/T	1（1.04%）
	R155K/T/Q	なし	
	A156S/T/V	なし	
	D168A/E/V	D168A	1（1.04%）
	V170A/G/I	V170I	21（21.9%）
（多重）	T54 - V170	T54S - V170I	1（1.04%）
	Q80 - V170	Q80L - V170I	7（7.29%）
	S122 - V170	S122G - V170G	1（1.04%）
		S122G - V170I	4（4.17%）
		S122N - V170I	1（1.04%）
		S122T - V170I	1（1.04%）
	V36 - Q80 - D168	V36A - Q80R - D168E/V	1（1.04%）
	T54 - S122 - V170	T54S - S122G - V170I	1（1.04%）
	Q80 - S122 - V170	Q80L - S122G - V170I	1（1.04%）
計			51（53.1%）

表3. NS3領域の変異存在率　（n=96）

NS5A阻害剤の薬剤耐性変異として重要なL31、Y93に関連した変異は全体で12例（12.5%）であった。L31Mが4例（4.17%）、L31Vが1例（1.04%）、Y93Hが6例（6.25%）で、高度耐性変異として知られるL31-Y93の共変異を有した症例は認めなかった。（表4）

部位		変異	n (%)
(単独)	L31M/V	L31M	4 (4.17%)
		L31V	1 (1.04%)
	Y93H/S	Y93H	6 (6.25%)
		Y93S	1 (1.04%)
(多重)		なし	
計			12 (12.5%)

表4. NS5A領域の変異存在率 (n=96)

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。その他の変異として、C316Hが3例 (3.13%) 、L159Fが1例 (1.06%) 、V321Iが2例 (2.08%) に認めた。既報と同様に、L159Fの変異を有する症例は同時にC316Nの変異も有していた[11]。また、S282、L320の変異を有する症例は認めなかった。 (表5)

部位		変異	n (%)
(単独)	L159F	なし	
	S282T	なし	
	C316H/N/Y	C316H	2 (2.08%)
		C316N	44 (45.8%)
	L320F	なし	
	V321I	V321I	1 (1.04%)
(多重)	L159 - C316	L159F - C316N	1 (1.04%)
	C316 - V321	C316H - V321I	1 (1.04%)
計			49 (51.0%)

表5. NS5B領域の変異存在率 (n=96)

なお、各領域の変異を同時に有する症例は11例 (11.5%) に認めたが、高度耐性変異として報告されるNS3領域のD168とNS5A領域のL31-Y93を同時に有する症例は認めなった。多くの症例が、頻度の高かったC316Nに関連した多領域変異であった。 (表6)

	NS3†	NS5A‡	NS5B¶	n (%)
(NS3 - NS5A)				
	T54S	Y93H		1 (1.04%)
(NS3 - NS5B)				
	Q80R - D168E/V		C316N	1 (1.04%)
	T54S		C316N	1 (1.04%)
	D168A		C316N	1 (1.04%)
(NS5A - NS5B)				
		L31M	C316N	3 (3.13%)
		L31V	C316N	1 (1.04%)
		Y93H	C316N	2 (2.08%)
		Y93H	V321I	1 (1.04%)
(NS3 - NS5A - NS5B)				
	なし			
計				11 (11.5%)

† NS3: V36A/M, T54A/S, Q80K/R, R155K/Q/S/T, A156T/V, D168A/E/H/T/V, V170A/T

‡ NS5A: L31M/V, Y93H/C

¶ NS5B: L159F/I, S282T, C316N, V321I

表6. 複数領域（NS3,NS5A,NS5B）の多重変異存在率（n=96）

3. 次世代シーケンシングによるNS5B領域L159F変異

L159Fの変異はC316Nと共存することが報告されており、次世代シーケンシング解析ではより高頻度の存在比率が報告されている。さらに、重要なこととして、次世代シーケンシング解析でL159Fの変異が陽性であった症例はSOF/RBV併用療法非著効との関連が指摘された[11,12,25]。そこで、我々もC316 野生型の症例10例とC316Nの症例10例においてL159Fの変異を次世代シーケンシングによる評価を施行した。その結果、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。（図5）

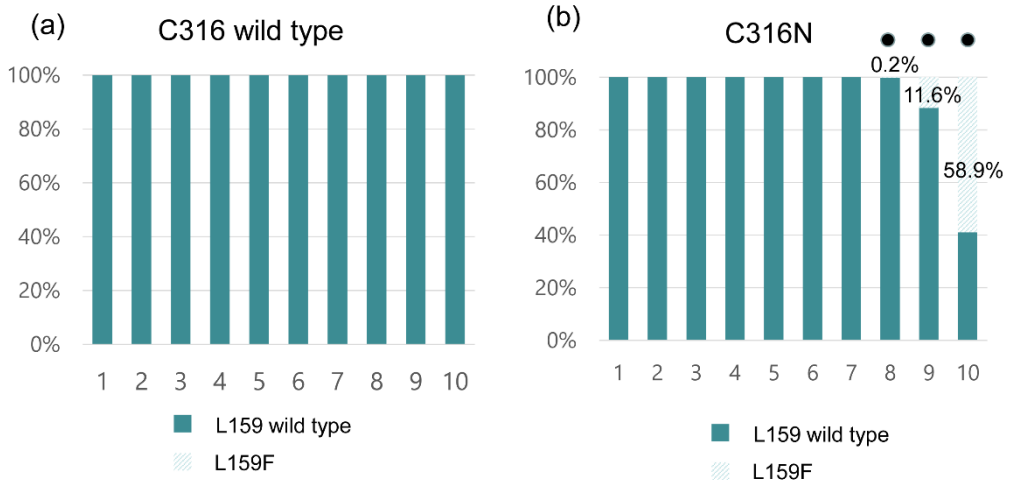


図5. 次世代シーケンシング解析

NS5B C316 野生型 10例、C316N 10例で次世代シーケンシングによるL159F変異の有無を検討した。（a）C316 野生型の症例ではL159Fの変異は検出されず、（b）C316Nの症例では10例中3例にL159Fの変異が検出された。（変異率: 0.21% of 5286× coverage, 11.65% of 18 176× coverage, and 58.9% of 988× coverage）

4. NS5B領域C316N変異に関連する背景因子

NS5B領域C316N変異を高頻度に認めたため、同変異と背景因子の関連についての検討を行った。その結果、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いことがわかった(P = 0.003)。また、多変量解析においても同様にコアアミノ酸91番変異のみが抽出された。（表7）

	C316 (n=93)		Univariate	Multivariate	
	C or H (n=48)	N (n=45)	P value	OR (95% CI)	P value
Age (years)¶†	59.5 (30-74)	63 (25-79)	0.129		0.677
Male / Female‡	21/27	18/27	0.714		
Hb (g/dl)¶†	13.95 (10.9-17.2)	13.55 (9.1-16.0)	0.531		
Plt ($x10^4/\mu l$)¶†	17.05 (6.0-26.2)	16.3 (6.6-32.7)	0.292		
ALT (IU/L) ¶†	39.5 (14-221)	47 (15-247)	0.210		
AFP (ng/ml) ¶†	4.8 (2.0-183)	4.8 (1.4-56)	0.832		
IL28B (rs8099917)‡ : TT/ TG+GG/ Unknown	28/18/2	29/15/1	0.620		
Core70‡: wild/ mutant/ Unknown	35/13/0	28/16/1	0.339		
Core91‡: wild/ mutant/ Unknown	38/10/0	22/22/1	0.003	3.80 (1.524-9.473)	0.004
Past history of IFN therapy‡: naïve/ relapse/ non-responder/ Unknown	23/11/11/3	17/14/12/2	0.240		

¶ median (range) † Chi-square test ‡ Mann-Whitney U test

Hb; Hemoglobin, Plt; Platelet, ALT; Alanine aminotransferase, AFP; Alpha-fetoprotein, IL28B; Interleukin 28B single nucleotide polymorphisms, Core 70; core amino acid 70 substitution, Core 91; core amino acid 91 substitution

表7. C316N変異と背景因子

5. 薬剤耐性変異の有無とSMV併用療法の治療効果

本研究ではプロテアーゼ阻害剤のSMVとPEG-IFN,RBVの3剤併用療法により67例（69.8%）でSVRが得られた。NS5A領域の変異を有する症例では、L31M/Vを有する症例でSVR率が100%（6/6例）、Y93Hを有する症例でSVR率が83.3%（5/6例）と比較的良好な治療成績が得られたが、統計的な有意差は認めなかった。同様に、NS5B領域のC316N変異を有する症例ではSVR率が77.8%(35/45例）とC316C/H症例のSVR率64.6%（31/48例）と比較してやや高かったが、統計学的有意差は認めなかった（P = 0.161）。また、SMPに関連したNS3領域の薬剤耐性変異であるD168の変異を有する症例は2例しか認めず、1例で非著効となったものの治療効果に有意差は認めなかった。（図6）

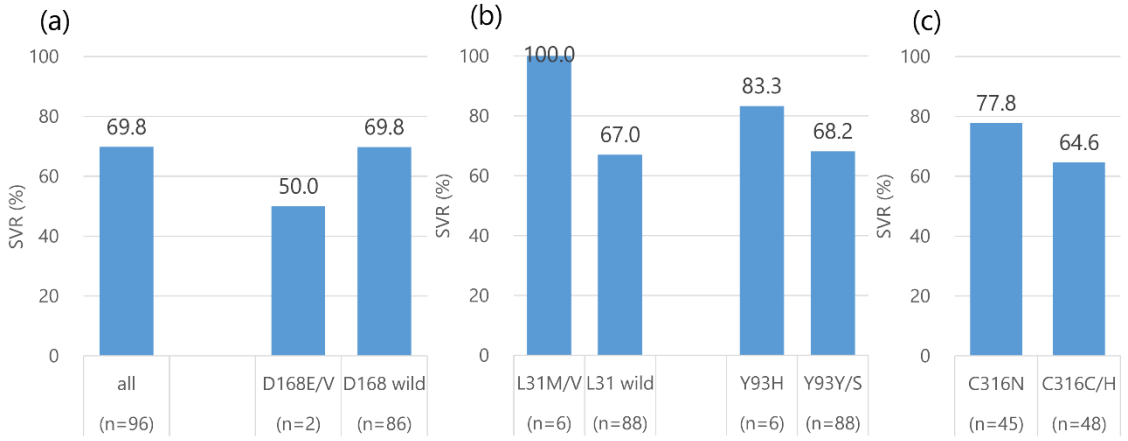


図6.　各耐性変異別のSVR率

各領域の変異の有無別にSVR率を比較検討した。(a) 96例全体のSVR率は69.8%であった。D168の変異を有する症例は2例のみでSVR率は50%と低いものの有意差は認めなかった。(b) NS5A領域 L31やY93の変異を有するとSVR率が高いものの、症例数も少なく有意差は認めなかった。(c) NS5B領域 C316Nの変異を有した症例ではSVR率 77.8%と高かったが、統計学的有意差は認めなかった（P = 0.161）。

6. 非著効例における薬剤耐性変異の獲得

本研究では96例中26例が治療非著効であった。その内、10例は投薬中の再燃で、3例が治療中断例（1例が他疾患罹患、2例が通院中断）であった。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った。その結果、12例でNS3領域の薬剤耐性の出現を認めた。その内訳は、8例がD168A/E/V単独の変異、4例がQ80RとD168A/E/Vの多重変異であった。（表8）

	Baseline			at virologic failure		
	NS3†	NS5A‡	NS5B¶	NS3†	NS5A‡	NS5B¶
Case 1	Q80R, D168V/E	-	C316N	Q80Q/R,D168D/V	-	C316N
Case 2	-	-	C316N	D168V	-	L159I, C316N
Case 3	Q80L	-	-	Q80L,D168E	-	C316N
Case 4	-	-	-	D168D/V	-	-
Case 5	-	-	-	D168V	-	-
Case 6	-	-	-	D168D/V	-	-
Case 7	-	-	-	D168A	-	-
Case 8	undetectable	-	C316N	Q80Q/R,D168D/V	-	C316N
Case 9	-	-	undetectable	D168V	-	C316N
Case 10	-	-	-	Q80Q/R,D168D/E	-	-
Case 11	-	-	C316N	Q80R,D168E	-	C316N
Case 12	-	-	-	-	-	-
Case 13	-	-	-	-	-	-
Case 14	-	Y93H	-	D168V	-	-

† NS3: Q80K/R, R155K/Q/S/T, A156T/V, D168A/E/H/T/V, V170A/T

‡ NS5A: L31M/V, Y93H/C

¶ NS5B: L159F/I, S282T, C316N, V321I

表8. SMV治療非著効例における治療前後の薬剤耐性変異の比較

考　察

核酸型ポリメラーゼ阻害薬であるソフォスブビル（SOF）は高い治療効果と安全性、そして薬剤耐性変異が少ないことから現在広く用いられている薬剤である。しかし、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 SVR 率 10-85%[31,32] と十分ではない。このため、genotype 1 の C 型肝炎の治療ではプロテアーゼ阻害剤や 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る。

最近になり、HCV の NS5B 領域、L159F、C316N、L320F、V321I などといった SOF に関連する薬剤耐性変異の可能性がある変異が報告されるようになった[11-14]。Donaldson らはバイオインフォマティクス的手法を用いた解析により、これらの変異が SOF の薬剤耐性を示す可能性を明らかにし、構造解析で NS5B 領域 S282 と L159 は近接して存在し、互いに影響する可能性が示された[11]。さらに、C316 野生型と C316N の残基の構造比較から、C316N の残基では活性部位への SOF の侵入が阻害される可能性が示された。また、C316 と同様に V321 も HCV-NS5B 領域の触媒三残基（D220、D318、D319）に近接しており、V321A/I の変異は PSI-352938 や PSI-353661 といった核酸アナログの薬剤耐性変異として知られている[33,34]。既報によれば、genotype 1b の HCV では V321I の変異は 2.5-3.0%認められ、変異のない場合と比較すると PSI-352938 の EC50 は *in vitro* で 2.7 倍に上昇し、S282 と共存した場合には 4.7 倍にまで上昇する[13,25,30]。

しかし、本邦におけるこれらの薬剤耐性変異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。SOF の薬剤耐性変異としてよく知られている NS5B 領域 S282T の変異は本研究では認めなかったが、C316N の変異は 46.9%（45/96 例）に認め、ヨーロッパのデータベースの解析結果（32.3%、157/486 例）や既報（10.88～36.6%）[13,30] と比較して高頻度であった。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 例でのみ認めたが、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。また、ダイレクトシーケンシング解析では V320 の変異は指摘されず、L321I の変異は 2.08%（2/96 例）で認めた。

C316N と L159F が併存する理由は明らかではないが、いくつかの可能性が示唆されている。その一つとして、*in vitro* の解析で L159F のウイルスの複製能は野生型のウイルスと比較して 0.24-0.25 倍と低く、SOF の薬剤耐性も 1.3-1.6 倍程度であるが、C316N と L159F が併存したウイルスでは複製能

が 0.65 倍、薬剤耐性が 1.6 倍に増加することが可能性として考えられる[12,25]。

なお、本研究では NS3 領域の Q80K/R、R155K/Q/S/T、A156T/V、D168A/E/H/T/V や NS5A 領域 L31M/V などの変異の存在率については既報と同程度であったが、NS5A 領域 Y93H の変異の存在率が既報と比較してやや低かった[13,20,22]。Miura らは IL28B SNP のメジャーアリル群が Y93H の変異との関連を報告しており[35]、本研究では IL28B SNP のマイナーアリル群が多かったことが、Y93H の存在率に影響したものと考えられる。

また、NS3 領域や NS5A 領域の耐性変異についても検証したが、これらの耐性変異と NS5B 領域の耐性変異の間に関連性は認めなかった。しかし、NS5B 領域 C316N と背景因子との検討では、C316N の変異を有する症例では、HCV コアアミノ酸 91 番変異の症例が有意に多かった。

今回、我々は 14 例の SMV 併用療法非著効例において、治療開始前と非著効後の薬剤耐性変異の変化についての検討も行った。その結果、NS5B 領域 C316 が野生型の症例 9 例のうち 1 例で、非著効時に C316N の変異を獲得しており、C316N 変異の 4 症例は全例で非著効時も変異が保持されていた。これらの結果から C316N の変異を有する症例は IFN 療法の効果が不良である可能性が考えられるが、本研究では SMV 併用療法の SVR 率は C316N の変異を有する症例と C316C/H 症例の間で有意差は認めておらず、さらなる検討が望まれる。

最近の報告では、Chulanov らが 16 週間の SOF/RBV 併用療法を施行した症例で、37.5%（12/32 例）に NS5B 領域 L159F の変異を認め、それらの症例では SVR 率が 25%（3/12 例）と低いことを報告している[36]。また、Donaldson らは肝移植前の症例における SOF/RBV 併用療法の効果を検討した第二相試験で、HCV genotype 1b の症例 13 例中、NS5B 領域 C316N の変異を 6 例に、L159F の変異を 4 例に認め、これらの症例は全例が非著効であったことを報告した[11]。本邦では HCV genotype 1b の症例では SOF と NS5A 阻害剤であるレジパスビル（LDV）の併用療法が施行されているが、DCV/ASV 併用療法のような NS5A 阻害剤を含んだレジメンで非著効となった症例では高度の薬剤耐性が獲得され、SOF/LDV 併用療法が SOF 単剤療法と同等となり、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。実際、Kai らは DCV/ASV 併用療法非著効となり多重変異を獲得した HCV ウイルスを感染させたヒト肝細胞キメラマウスの実験で LDV と核酸型ポリメラーゼ阻害薬の併用療法が非著効となることを報告している[18]。

本邦において、DCV/ASV 併用療法は HCV genotype 1b 症例に広く行われている治療であり、2014 年 9 月から 2016 年 10 月までの間に約 50,000 例以上

に施行され、7,500 例以上が非著効となったと見積もられている。第三相臨床試験では DCV/ASV 併用療法非著効となった症例の多くは、NS5A 阻害剤や第二世代のプロテアーゼ阻害剤の高度耐性変異である NS3 領域の D168V 変異、NS5A 領域の L31M 変異および Y93H の多重変異を獲得したことが知られており、更に Yoshimi らは治療非著効時に獲得された耐性変異が、治療終了後も長期間にわたり残存することを報告している[37]。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、本研究の限界と課題がいくつか存在する。最も重大な点として、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をきたすかどうかは明らかではなく、未だ議論の余地がある部分である。また、本研究は後方視的研究であり、症例数も限られている。そのため、これらの結果を検討すべく、今後大規模な前向き研究が望まれる。

総　括

本研究において、以下の知見が得られた。

・本邦では、HCV の NS5B 領域 C316N の変異は 46.9%（45/96 例）と高頻度に認められる。

・C316N の変異を有する症例では HCV コアアミノ酸 91 番変異が有意に多い。

本研究では 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。

しかし、実臨床で C316N の変異が SOF の治療効果に影響するかは未だ不明であり、今後大規模な前向きな検討が望まれる。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究に対する心構えや信念、実験方法、データ解釈、論文作成など、様々な面において御指導・御援助頂きました北海道大学病院消化器内科助教　須田剛生先生には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

臨床における技術指導や、検体の採取などにご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 肝臓グループの諸先生方には、深謝いたします。

さらに、本論文の作成においてNORTE studyグループの研究に参加していただきました以下の先生、および各施設の消化器内科諸先生方に心より深く感謝申し上げます。

JCHO札幌北辰病院　消化器内科
　吉田　純一　先生、高木　智史　先生
JCHO北海道病院　消化器センター
　古家　乾　先生
NTT東日本札幌病院　消化器内科
　赤倉　伸亮　先生
愛育病院　消化器内科
　佐賀　啓良　先生
網走厚生病院　内科・消化器内科
　藤永　明　先生
岩見沢市立総合病院　消化器内科
　加藤　寛士　先生
帯広厚生病院　消化器科
　菊池　英明　先生

北見赤十字病院　消化器内科
　上林　実　先生
釧路ろうさい病院　内科・消化器内科
　宮城島　拓人　先生
札幌センチュリー病院　内科・消化器内科
　岡本　宗則　先生
札幌北楡病院　消化器科
　工藤　峰生　先生
市立札幌病院　消化器内科
　永坂　敦　先生
市立函館病院　消化器内科
　山本　義也　先生
市立稚内病院　内科
　国枝　保幸　先生
東栄病院　内科
　常松　泉　先生
苫小牧市立病院　消化器内科
　小林　智絵　先生
苫小牧日翔病院　内科・消化器内科
　舘山　美樹　先生
函館医師会病院　消化器科
　熊谷　研一　先生
函館中央病院　内科・消化器内科
　紺野　潤　先生
北海道医療センター　消化器内科
　木村　宗士　先生、大原　行雄　先生
北海道消化器科病院　消化器科
　目黒　高志　先生

2017年3月

伊藤 淳

引用文献

1 Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* **57**, 1333-1342(2013).

2 Seeff, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* **36**, S35-46(2002).

3 日本肝癌研究会. 第 19 回全国原発性肝癌追跡調査報告. (2006～2007 年).

4 Sakamoto, N. & Watanabe, M. New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* **44**, 643-649(2009).

5 Izumi, N., Hayashi, N., Kumada, H., Okanoue, T., Tsubouchi, H., Yatsuhashi, H., Kato, M., Ki, R., Komada, Y., Seto, C. & Goto, S. Once-daily simeprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-experienced HCV genotype 1-infected patients in Japan: the CONCERTO-2 and CONCERTO-3 studies. *J. Gastroenterol.* **49**, 941-953(2014).

6 Kumada, H., Hayashi, N., Izumi, N., Okanoue, T., Tsubouchi, H., Yatsuhashi, H., Kato, M., Rito, K., Komada, Y., Seto, C. & Goto, S. Simeprevir (TMC435) once daily with peginterferon-alpha-2b and ribavirin in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection: The CONCERTO-4 study. *Hepatol. Res.* **45**, 501-513(2015).

7 Kumada, H., Suzuki, Y., Ikeda, K., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., Kawakami, Y., Ido, A., Yamamoto, K., Takaguchi, K., Izumi, N., Koike, K., Takehara, T., Kawada, N., Sata, M., Miyagoshi, H., Eley, T., McPhee, F., Damokosh, A., Ishikawa, H. & Hughes, E. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* **59**, 2083-2091(2014).

8 Mizokami, M., Yokosuka, O., Takehara, T., Sakamoto, N., Korenaga, M., Mochizuki, H., Nakane, K., Enomoto, H., Ikeda, F., Yanase, M., Toyoda, H., Genda, T., Umemura, T., Yatsuhashi, H., Ide, T., Toda, N., Nirei, K., Ueno, Y., Nishigaki, Y., Betular, J., Gao, B., Ishizaki, A., Omote, M., Mo, H., Garrison, K., Pang, P. S., Knox, S. J., Symonds, W. T., McHutchison, J. G., Izumi, N. & Omata, M. Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naive and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 645-653(2015).

9 Suzuki, Y., Ikeda, K., Suzuki, F., Toyota, J., Karino, Y., Chayama, K., Kawakami, Y., Ishikawa, H., Watanabe, H., Hu, W., Timothy Eley, T., Fiona McPhee, F., Eric Hughes, E. & Kumada, H. Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *Journal of hepatology* **58**, 655-662(2013).

10 McCown, M. F., Rajyaguru, S., Le Pogam, S., Ali, S., Jiang, W. R., Kang, H., Symons, J., Cammack, N. & Najera, I. The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase or protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1604-1612(2008).

11 Donaldson, E. F., Harrington, P. R., O'Rear, J. J. & Naeger, L. K. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology* **61**, 56-65(2015).

12 Svarovskaia, E. S., Dvory-Sobol, H., Parkin, N., Hebner, C., Gontcharova, V., Martin, R., Ouyang, W., Han, B., Xu, S., Ku, K., Chiu, S., Gane, E., Jacobson, I. M., Nelson, D. R., Lawitz, E., Wyles, D. L., Bekele, N., Brainard, D., Symonds, W. T., McHutchison, J. G., Miller, M. D. & Mo, H. Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis C virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 1666-1674(2014).

13 Paolucci, S., Fiorina, L., Mariani, B., Gulminetti, R., Novati, S., Barbarini, G., Bruno, R. & Baldanti, F. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol. J.* **10**, 355(2013).

14 Ji, H., Kozak, R. A., Biondi, M. J., Pilon, R., Vallee, D., Liang, B. B., La, D., Kim, J., Van Domselaar, G., Leonard, L., Sandstrom, P. & Brooks, J. Next generation sequencing of the hepatitis C virus NS5B gene reveals potential novel S282 drug resistance mutations. *Virology* **477**, 1-9(2015).

15 Lawitz, E., Jacobson, I. M., Nelson, D. R., Zeuzem, S., Sulkowski, M. S., Esteban, R., Brainard, D., McNally, J., Symonds, W. T., McHutchison, J. G., Dieterich, D. & Gane, E. Development of sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1358**, 56-67(2015).

16 Reddy, K. R., Bourlière, M., Sulkowski, M., Omata, M., Zeuzem, S., Feld, J. J., Lawitz, E., Marcellin, P., Welzel, T. M., Hyland, R., Ding, X., Yang, J., Knox, S., Pang, P., Dvory-Sobol, H., Mani, G., Subramanian, M., Symonds,

W., McHutchison, J. G., Mangia, A., Gane, E., Mizokami, M., Pol, S. & Afdhal, N. Ledipasvir and sofosbuvir in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis: An integrated safety and efficacy analysis. *Hepatology* **62**, 79-86(2015).

17 Shiffman, M. L., James, A. M., Long, A. G. & Alexander, P. C. Treatment of Chronic HCV With Sofosbuvir and Simeprevir in Patients With Cirrhosis and Contraindications to Interferon and/or Ribavirin. *Am. J. Gastroenterol.* **110**, 1179-1185(2015).

18 Kai, Y., Hikita, H., Tatsumi, T., Nakabori, T., Saito, Y., Morishita, N., Tanaka, S., Nawa, T., Oze, T., Sakamori, R., Yakushijin, T., Hiramatsu, N., Suemizu, H. & Takehara, T. Emergence of hepatitis C virus NS5A L31V plus Y93H variant upon treatment failure of daclatasvir and asunaprevir is relatively resistant to ledipasvir and NS5B polymerase nucleotide inhibitor GS-558093 in human hepatocyte chimeric mice. *J. Gastroenterol.* **50**, 1145-1151(2015).

19 Lawitz, E., Flamm, S., Yang, J. C., Pang, P. S., Zhu, Y., Svarovskaia, E., McHutchison, J. G., Wyles, D. & Pockros, P. *50th Ann. Meeting EASL*(2015).

20 Itakura, J., Kurosaki, M., Takada, H., Nakakuki, N., Matsuda, S., Gondou, K., Asano, Y., Hattori, N., Itakura, Y., Tamaki, N., Yasui, Y., Suzuki, S., Hosokawa, T., Tsuchiya, K., Nakanishi, H., Takahashi, Y., Maekawa, S., Enomoto, N. & Izumi, N. Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to interleukin-28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy. *Hepatol. Res.* **45**, E115-121(2015).

21 Schneider, M. D. & Sarrazin, C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: do we need resistance testing? *Antiviral Res.* **105**, 64-71(2014).

22 Suzuki, F., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Seko, Y., Kawamura, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Saito, S., Arase, Y., Ikeda, K., Kobayashi, M., Mineta, R., Watahiki, S., Miyakawa, Y. & Kumada, H. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J. Clin. Virol.* **54**, 352-354(2012).

23 Sarrazin, C. & Zeuzem, S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**, 447-462(2010).

24 Pawlotsky, J. M. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* **53**, 1742-1751(2011).

25 Tong, X., Le Pogam, S., Li, L., Haines, K., Piso, K., Baronas, V., Yan, J.

M., So, S. S., Klumpp, K. & Najera, I. In vivo emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *J. Infect. Dis.* **209**, 668-675(2014).

26 Halfon, P. & Locarnini, S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J. Hepatol.* **55**, 192-206(2011).

27 Nakamoto, S., Kanda, T., Wu, S., Shirasawa, H. & Yokosuka, O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J. Gastroenterol.* **20**, 2902-2912(2014).

28 Salvatierra, K., Fareleski, S., Forcada, A. & Lopez-Labrador, F. X. Hepatitis C virus resistance to new specifically-targeted antiviral therapy: A public health perspective. *World J. Virol.* **2**, 6-15(2013).

29 Lenz, O., Verbinnen, T., Lin, T. I., Vijgen, L., Cummings, M. D., Lindberg, J., Berke, J. M., Dehertogh, P., Fransen, E., Scholliers, A., Vermeiren, K., Ivens, T., Raboisson, P., Edlund, M., Storm, S., Vrang, L., de Kock, H., Fanning, G. C. & Simmen, K. A. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1878-1887(2010).

30 Bartels, D. J., Sullivan, J. C., Zhang, E. Z., Tigges, A. M., Dorrian, J. L., De Meyer, S., Takemoto, D., Dondero, E., Kwong, A. D., Picchio, G. & Kieffer, T. L. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naive patients prior to treatment. *J. Virol.* **87**, 1544-1553(2013).

31 Gane, E. J., Stedman, C. A., Hyland, R. H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W. T., Hindes, R. G. & Berrey, M. M. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **368**, 34-44(2013).

32 Osinusi, A., Meissner, E. G., Lee, Y. J., Bon, D., Heytens, L., Nelson, A., Sneller, M., Kohli, A., Barrett, L., Proschan, M., Herrmann, E., Shivakumar, B., Gu, W., Kwan, R., Teferi, G., Talwani, R., Silk, R., Kotb, C., Wroblewski, S., Fishbein, D., Dewar, R., Highbarger, H., Zhang, X., Kleiner, D., Wood, B. J., Chavez, J., Symonds, W. T., Subramanian, M., McHutchison, J., Polis, M. A., Fauci, A. S., Masur, H. & Kottilil, S. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *JAMA.* **310**, 804-811(2013).

33 Lam, A. M., Espiritu, C., Bansal, S., Micolochick Steuer, H. M., Zennou, V.,

Otto, M. J. & Furman, P. A. Hepatitis C virus nucleotide inhibitors PSI-352938 and PSI-353661 exhibit a novel mechanism of resistance requiring multiple mutations within replicon RNA. *J. Virol.* **85**, 12334-12342(2011).

34 Margeridon-Thermet, S., Le Pogam, S., Li, L., Liu, T. F., Shulman, N., Shafer, R. W. & Najera, I. Similar Prevalence of Low-Abundance Drug-Resistant Variants in Treatment-Naive Patients with Genotype 1a and 1b Hepatitis C Virus Infections as Determined by Ultradeep Pyrosequencing. *Plos One* **9**, e105569(2014).

35 Miura, M., Maekawa, S., Sato, M., Komatsu, N., Tatsumi, A., Takano, S., Amemiya, F., Nakayama, Y., Inoue, T., Sakamoto, M. & Enomoto, N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatol. Res.* **44**, E360-367(2014).

36 Chulanov, V., Zhdanov, K., Kersey, K., Zhu, Y., Massetto, B., Zhuravel, S., Romanova, S., Nurmukhametova, E., Morozov, V., Kozhevnikova, G., Gogova, L., Geyvandova, N., Gankina, N., Chesnokov, E., Burnevich, E. Z., Bessonova, E., Abdurakhmanov, D., Brainard, D. M., McHutchison, J. G., Bakulin, I. G. & Isakov, V. *65th Ann. Meeting AASLD*(2014).

37 Yoshimi, S., Imamura, M., Murakami, E., Hiraga, N., Tsuge, M., Kawakami, Y., Aikata, H., Abe, H., Hayes, C. N., 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.* **87**, 1913-1920(2015).