

論文の内容の要旨

論文題目 Genetic Variation of the Hepatitis C Virus RNA Caused by Ribavirin (RBV) and Potential Mechanisms of RBV Resistance

和訳 薬剤耐性を有する C 型肝炎ウイルスの発現様式

指導教員 小池和彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 ススムエー

C型肝炎ウイルス（HCV）は感染後、非常に高い確率で慢性肝炎をひき起こし、数十年間の持続感染の後、肝硬変、肝細胞癌へと進展する。HCVは、ゲノム配列が多様性に富んでおり、6種類の遺伝子型（genotype）と数10種類のサブタイプに分類される。そのうち genotype 1と2は世界中に分布し、日本では genotype 1bが約70%、genotype 2aが10-15%を占めている。慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は1990年代のインターフェロン（IFN）単独療法から、2001年に開始されたIFNとribavirin（RBV）併用療法へと移行した。2003年、ポリエチレングリコール添加IFN（PEG-IFN）が保険認可され、近い将来PEG-IFN・RBV併用療法の導入が予定されている。

RBVは、古典的な抗ウイルス薬であり、その抗ウイルス作用の主要な機序は、細胞のIMP脱水素酵素の活性を阻害してGMP（GTP）プールを減少させRNAの合成を抑制すること、RNA

の複製時にエラーを起こさせてウイルスの増殖能力を失わせること、ウイルスポリメラーゼ活性を阻害することである。

一般的に、ウイルス感染症の化学療法において完全にウイルスが除去されない場合、残存するウイルスに遺伝子変異が観察されるケースが多い。実際、C型肝炎のIFN・RBV療法の場合も、投与終了後に肝炎が再燃するケースではHCV遺伝子変異を伴うことが報告されている。RBVに対する耐性HCVの出現は、これまでgenotype 1について報告されているが、その他のgenotypeでは研究が進んでいない。また、薬剤耐性化の分子機構についてはほとんど解明されていない。

本研究では、HCV genotype 2aの持続複製細胞に対して長期間のRBV処理を行い変異ウイルスの出現を誘発した。その中にRBV耐性を獲得した変異ウイルスが存在するかを明らかにし、耐性ウイルスについて、そのRBV耐性の分子機構の解析を行った。

HCV genotype 2a JFH1 クローンの subgenomic replicon RNA が持続的に複製するヒト肝癌細胞 Huh-7 (IH4-1) に 100 μM RBV を 8 週間処理した場合、RBV 耐性細胞の出現は観察されなかったが、200 μM RBV 存在下で 20 週間培養することで IH4-1 細胞が RBV 耐性化することを見出した。すなわち、RBV 非処理細胞では、HCV RNA レベルを 50%阻害する RBV 濃度 (IC₅₀) は 59 μM であるのに対して、RBV 長期処理細胞では同等の阻害効果を示すために約 9 倍 (531 μM) の RBV を要した。

RBV 処理 IH4-1 細胞が獲得した薬剤耐性が、細胞の変化 (薬物取り込み能の低下など) によるものかどうかを明らかにするため、RBV 耐性及びコントロール IH4-1 細胞から IFN 処理によって HCV RNA を除去した上で RBV の感受性を調べたところ、両細胞とも同等の RBV 感受性を示すことがわかった。すなわち、IH4-1 細胞の RBV 耐性獲得は細胞側の変化によるものではないことが示唆された。

一方、RBV 耐性が、ウイルス側の変化によるものであるかを調べるため、RBV 耐性及びコントロール IH4-1 細胞からそれぞれ total RNA を抽出し、naïve な Huh-7 細胞へ導入し新たに replicon 細胞を作製した。得られた 2 種類の replicon 細胞について RBV の抗 HCV 作用を比較したところ、RBV 耐性 IH4-1 細胞由来 RNA を導入した replicon 細胞の方が明らか

に RBV に対して非感受性であることが示された。

このように、HCV 遺伝子の変化によって RBV 耐性が獲得された可能性が示唆されたため、RBV 耐性 IH4-1 細胞中の HCV 遺伝子 (NS3~NS5B 領域：約 6 kb) の塩基配列を決定した。その結果、耐性細胞の HCV replicon には、アミノ酸変化を伴う特徴的な変異が NS3、NS4B、NS5A、NS5B 領域に各 1 カ所 (T1134S、P1969S、V2405A、Y2471H) 存在することを見出した。

これらの HCV 変異が RBV 耐性獲得に重要であるかどうかを明らかにするため、全 4 カ所の変異 (m34B5A5B)、または NS3、NS4B 領域の 2 変異 (m34B)、NS5A、NS5B 領域の 2 変異 (m5A5B) を導入した HCV JFH1 replicon プラスミドを構築し、各変異 replicon 細胞を作製した。RBV の抗 HCV 効果を比較したところ、高濃度 RBV を添加したとき、m34B5A5B あるいは m5A5B の変異 replicon 細胞は、野生型また m34B 変異 replicon 細胞に比べ明らかに HCV RNA 阻害効果が低かった。この結果、NS5A 及び NS5B 領域の点変異 (V2405A、Y2471H) が JFH1 クローンの RBV に対する耐性獲得に関与する可能性が示された。genotype 1 及び 2 の種々の HCV クローンのアミノ酸配列を比較解析したところ、アミノ酸 2405 番目のバリン、2471 番目のチロシンとも genotype 2a 及び 2b の各クローンでは保存されているが、genotype 1a、1b では認められなかった。よって genotype 2 特異的に出現する耐性ウイルスであることが示唆された。

本研究で、RBV に対して耐性を示す genotype 2 の HCV が初めて見出された。さらに、この耐性獲得には NS5A 及び NS5B 領域の点変異が重要であることが示された。NS5B 蛋白は RNA ポリメラーゼであり、NS5A 蛋白もゲノム複製に重要であることが知られていることから、V2405A、Y2471H の変異が、RBV による HCV RNA 複製阻害作用からのエスケープに働いているのかもしれない。本研究成果は、C 型慢性肝炎患者への抗ウイルス療法における薬剤耐性ウイルスの出現予測とその対策に役立つとともに、核酸代謝拮抗剤の抗 HCV 薬としての開発研究にとって有用な知見となるものと期待される。