

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 SU SU HMWE

本研究は C 型肝炎ウイルス(HCV)の薬剤耐性化の分子機構を明らかにするため、HCV genotype 2a 株の持続複製(replicon)細胞を C 型肝炎治療薬の1種であるソラシタビリン(RBV)存在下で長期間培養した。これにより、RBV に対して耐性を獲得した HCV 株を同定し、さらに耐性獲得の分子機構の解析を行っており、下記の結果を得ている。

1. 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)を 200 μ M RBV 存在下で 20 週間培養することで IH4-1 細胞が RBV に対して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 μ M 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 μ M)の RBV を要した。
2. RBV の細胞障害性効果は、RBV 耐性及びコントロール IH4-1 細胞でほぼ同等であった。このことから、RBV 処理により薬剤の取り込み能、排出能など薬剤感受性に関わる細胞側の変化は認められないことが示唆された。
3. 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 による抗 HCV 効果が低いことが示された。これにより、HCV の遺伝子変化によって RBV 耐性が獲得された可能性が考えられた。
4. 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。

5. 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 プラスミドをそれぞれ構築し、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、野生型または 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。

以上、本研究のよって、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。これらのアミノ酸配列は genotype 1 では保存されていないことから、本研究で見出された薬剤耐性変異は genotype 2 に特徴的なものであるものと考えられる。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思われ、学位の授与に値するものと考えられる。