

「肝臓内科レター第65号」発行にあたって

飯塚病院肝臓内科 部長 本村 健太

いろいろな面で想像を超えた COVID-19 の最初の波が去り、梅雨の季節になりました。先生方にはいつも大変お世話になっております。今月は、飯塚病院のインターフェロン治療の集計結果の予定でしたが「プロテアーゼ阻害剤」について触れておくことにしました。

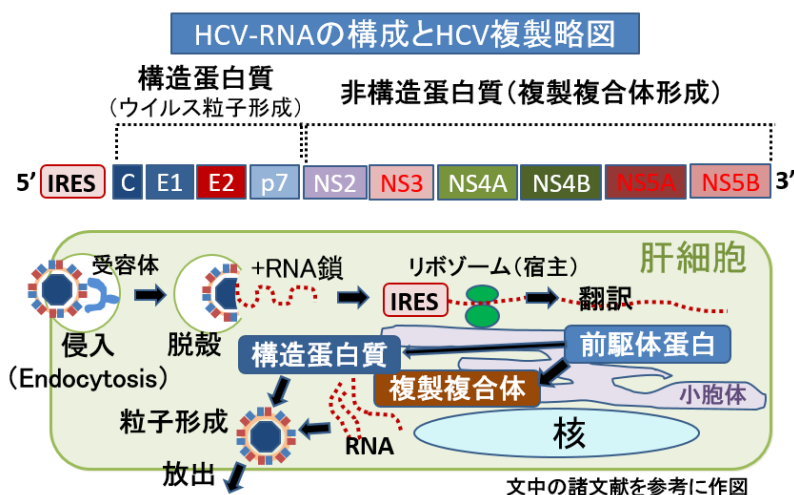
## <C型肝炎ウイルス(HCV)の治療薬開発への課題>

C型肝炎に対するインターフェロン治療を、第1期「通常型インターフェロン単独療法時代」、第2期「リバビリン併用療法時代」、第3期「プロテアーゼ阻害剤併用療法時代」に分けると、前号では第2期までを概説したことになります。第3期の主役はプロテアーゼ阻害剤—直接作用型抗ウイルス薬 (Direct Acting Antiviral, DAA) で、インターフェロンは脇役なので、この併用療法を「インターフェロン療法」に分類しないこともあります。

リバビリン併用療法では難治例「ゲノタイプ 1b・高ウイルス量」でのウイルス除去成功率は50%以下であり、非特異的な抗ウイルス薬であるインターフェロンとリバビリンの限界を示していました。培養増殖が容易だった AIDS のヒト免疫不全ウイルス HIV に対しては特異的な抗ウイルス薬が次々に開発されており、これを追うように HCV に対する特異的な治療薬を目指した研究もさかんに行われ、2000年ごろには HCV 増殖に働くウイルスタンパク質の同定と役割の解析が進んでいました。しかし、HCV の培養細胞系がなかったため、それぞれのウイルスタンパク質の機能を阻害することで、ウイルスの複製・産生が本当に抑制されるのかがわかりませんでした (ウイルス 65:239-244:2015)。1989年の HCV 遺伝子が同定されて以後では、HCV を培養細胞に感染させてウイルス増殖細胞系を作成する方法の確立が HCV 研究の最大の課題だったのです (国立感染症研究所 HP「C型肝炎」)。

多くの RNA ウイルスでは、ウイルスゲノム RNA を培養細胞に人為的に導入する「トランスフェクション」でウイルスを複製増殖させられるようで、HCV に対しても同様の試みが数多く行われたものの、いずれもウイルス複製レベルが低く高感度の RT-PCR でないとウイルスが検出できなかったそうです (肝臓 46:691-702:2005)。このため、HCV は持続感染を成立させるためにむしろ増殖を抑え、低いレベルで複製するように調整しているのではないかと考えられるようになりました (ウイルス 55:287-296:2005)。

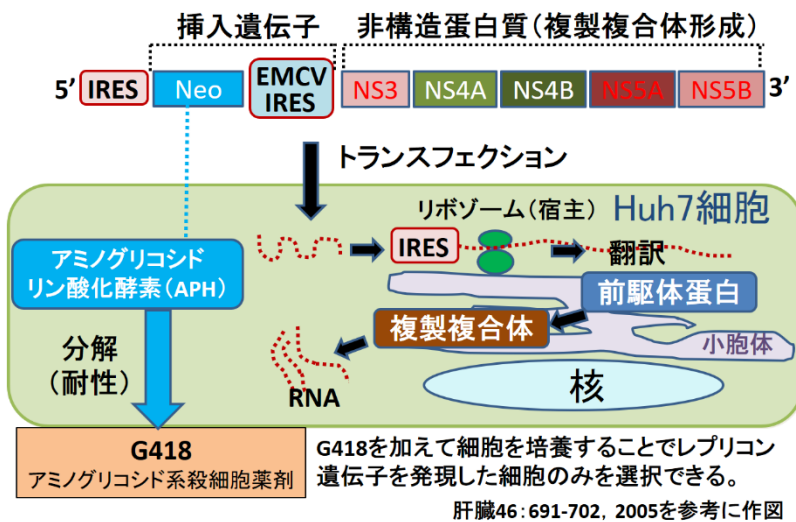
## <HCV-RNA 複製過程を観察できるようにした「HCVレプリコンシステム」>



細胞内で簡単に増えてくれないという難点を克服したのが HCV レプリコンシステムでした (Science 285:110-113:1999)。HCV 増殖サイクルは、細胞への侵入→翻訳 (ウイルス RNA から前駆体蛋白が合成される) →前駆体蛋白のプロセッシング (前駆体が数カ所で切断されて各部品になる) →ウイルス RNA の複製→ウイルスの組み立て・熟成・放出からなります。HCV の遺伝子はメッセージャー RNA と同じプラス鎖 1 本鎖 RNA なので、宿主の肝細胞内に侵入し脱殻すると、細胞のタンパ

ク合成装置であるリボソームに RNA 先端部近傍の塩基配列 (IRES) が認識されて翻訳が開始され、RNA の配列にあわせてアミノ酸をつなげてウイルスタンパクが合成されます。HCV の 1 本鎖の RNA 上の遺伝情報は、前半の「構造タンパク質 (ウイルス粒子の殻)」と後半の「非構造タンパク質 (宿主細胞内でウイルス複製にかかわる)」からなります。

### HCVレプリコンRNAの構造とレプリコン実験系略図



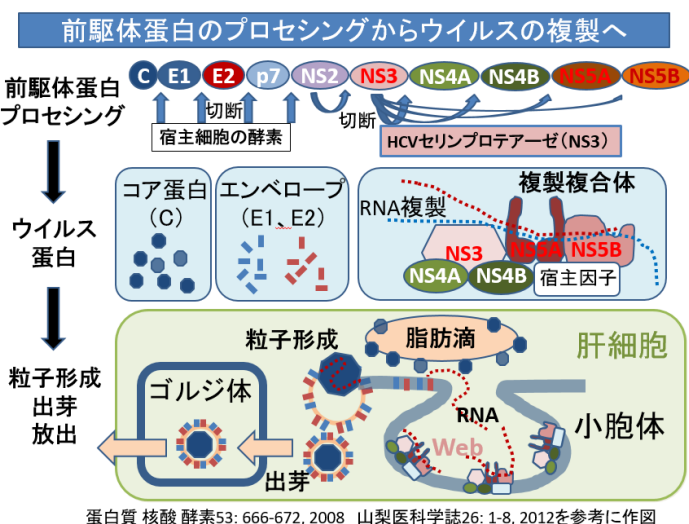
HCV レプリコンは、この前半の構造タンパク質の遺伝子を取り除いて、その部分に「ネオマイシン耐性遺伝子」と、「脳心筋炎ウイルス (EMCV) の IRES (より強力に RNA をリボソームに翻訳させる効果がある)」が入れてあります。この HCV レプリコンを Huh7 というヒト肝細胞癌由来の細胞株にトランスフェクションして、殺細胞性アミノグリコシド系薬剤 G418 を加えて培養すると、細胞内にレプリコンが入って RNA が翻訳された細胞はネオマイシン耐性遺伝子の働きで生きのびます。構造タンパク質の遺伝子がないのでウイルス粒子は出来ませんが、細胞内ではレプリコンからウイルス複製装置が作られレプ

リコンの RNA が持続的に複製されます。まとめると「複製複合体の部分のみの HCV-RNA」に「薬剤耐性遺伝子」と、より多く翻訳される「EMCV の IRES」を組み込んだ RNA を作り、これを導入できた細胞だけを薬剤耐性遺伝子の働きで生き延びさせて容易に選別できるように工夫した産物です。

HCV レプリコンが複製できるようになる細胞は、ほんのごく一部だったそうですが、こうやって培養細胞内で HCV-RNA の複製過程を見ることができるようになりました。そして、これは再現が容易な実験系であったため、世界中に急速に普及しました。C 型肝炎の治療薬の開発にとってはたいへん大きな一歩であり、この研究を主導したドイツのウイルス学者 Ralf F. W. Bartenschlager 博士は 2016 年のラスカー賞を受賞しています。

### <HCV のライフサイクルのすべてがわかる「JFH-1 株」の感染培養系>

2001 年に東京慈恵医大第三病院の劇症肝炎症例の急性期血清から HCV 株「JFH-1 株」が分離されました。Bartenschlager 博士らが作成した HCV レプリコンはゲノタイプ 1b でしたが、JFH-1 はゲノタイプ 2a でした。「ネオマイシン耐性遺伝子」・「EMCV の IRES」・「JFH-1 の非構造タンパク質遺伝子」という構成のレプリコンを作成すると、非常に強い増殖能があり、Huh7 細胞以外の細胞腫でも増殖させられることがわかりました。さらに、JFH-



1 全長の遺伝子を Huh7 細胞に導入すると感染性がある HCV 粒子が産生され、HCV 感染培養系が作成できることがわかりました。この系では HCV 複製過程だけでなく、細胞への感染・侵入からウイルス粒子形成・放出までのサイクルすべてを確認できます (肝臓 46:691-702:2005)。これらの培養系の進歩の結果、HCV の増殖は「複製複合体」が複数集まって小胞体の膜上に Web と呼ばれる「HCV-RNA 製造ライン」を作って肝細胞の細胞質内の脂肪滴と絡まりながらウイルス粒子を形成していくことがわかりました (蛋白質 核酸 酵素 53:666-672:2008)。

ちなみに JFH-1 に関する研究を主導されたのは、現在、新型コロナウイルス感染症対策専門家会議の座長を務め

ておられる国立感染症研究所所長の脇田隆字先生です。

## ＜プロテアーゼ阻害剤の登場＞

培養系ができると、あとは多数の化合物を振りかけて奏効するものを選んで、その中からヒトに安全に投与できるものを探すということになります。先行していた HIV 治療薬を参考に、まずは HCV の複製複合体の中で機能を持っている蛋白であるプロテアーゼ (NS3) や、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (NS5B) がターゲットになり、その後機能不明である NS5A を阻害しても HCV が増殖できなくなることが判明し、この阻害薬も開発されていくことになりました (<http://www.tr-networks.org/PDF/20160320inoue.pdf>)。

ポリメラーゼ阻害剤は人体に無害な化合物がなかなかできず、最初に登場したのはプロテアーゼ阻害剤でした。NS3 のプロテアーゼを阻害すると前駆体蛋白から複製複合体が切り出せなくなるため HCV 複製ができない、という作用機序になります。プロテアーゼ阻害剤は現在でも経口 DAA 治療で使われますが、単独投与ではすぐに HCV が耐性化するためペグインターフェロン・リバビリンが併用されました。第一世代の「テラプレビル」とあわせて 3 剤で 12 週間投与し、その後ペグインターフェロン・リバビリンを 12 週間という内容です。難治例の「ゲノタイプ 1b・高ウイルス量」に対してもウイルス除去成功率が 80% 近くになる画期的な治療でした。ただし、非常に副作用が強く、実際に治療した印象としては、大げさかもしれませんが、最初の 12 週はまるで白血病や悪性リンパ腫に対する化学療法のような感じなのです。また、重篤な皮膚障害を起こすこともあるため皮膚科常勤医が対応できる施設に限るという制限もありました。その後、奏効率が同等以上で副作用が軽い第二世代の「シメプレビル」が登場してインターフェロン時代の最後を飾ることになりました。そして、NS5A や NS5B に対する DAA が作られると、DAA の組み合わせのみでほぼ完全に HCV 除去が可能になり、ついにインターフェロンは不要になりました。

次号は、飯塚病院肝臓内科のインターフェロン治療の集計結果です。

	月	火	水	木	金
本村 健太		○/●	○/●	●	
矢田 雅佳		○/●		○/●	●
田中 紘介		●	○/●	●	
栗野 哲史	○		●		●
森田 祐輔	●				○/● (10:30~)
増本 陽秀	●				●

□外来スケジュール 受付時間 (○初診・●再診) 8:00~11:00

