

氏 名	小倉 直樹
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬 科 学
学位記授与番号	博乙 第 4492 号
学位授与の日付	平成 30 年 9 月 27 日
学位授与の要件	博士の論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)
学位論文の題目	C 型肝炎ウイルスの新規耐性変異同定法と B 型肝炎ウイルスの新規安定発現細胞系の構築に関する研究
論 文 審 査 委 員	教 授 三好 伸一 (主査) 教 授 澤田 大介 准教授 表 弘志

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

肝臓が炎症を起こし、肝細胞が破壊される肝炎が慢性化した慢性肝炎の主な原因は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 又は B 型肝炎ウイルス (HBV) である。現在の慢性 C 型肝炎治療薬の直接作用型抗ウイルス薬は、薬剤耐性ウイルスが出現するため変異解析による薬効予測が必要であり、また慢性 B 型肝炎治療薬の免疫賦活薬や逆転写酵素阻害薬は、休薬すると HBV が再燃するため新規薬剤が必要である。私は新規肝炎治療薬を迅速に開発するため、HCV 及び HBV 領域の新規評価系に関する研究を行った。

第 1 章では HCV 領域に関する研究として、既存法とは異なる新規耐性変異同定法の確立を目的に、HCV ポリメラーゼ阻害薬の JTK-853 投薬患者血清を用いて耐性変異を解析した。Genotype 1a 又は 1b の HCV 感染患者を 4 コホート (800, 1200, 1600 mg 1 日 2 回, 1200 mg 1 日 3 回) に分けて、JTK-853 を 3 日間経口投与した。HCV ポリメラーゼ領域の population sequencing 解析から、患者 1 例の投薬後に *in vitro* 耐性試験で同定された耐性変異の M414T 変異が認められた。また clonal sequencing 解析から population sequencing 解析で認められた M414T 変異以外に、複数の患者の投薬後で低頻度の割合で耐性変異が検出された。さらに患者由来の HCV ポリメラーゼ遺伝子を有する HCV レプリコン細胞に対する JTK-853 の感受性評価では、M414T 変異が検出された患者レプリコン細胞のみ感受性が減弱した。第 1 章の結果より、今回の耐性変異同定法は JTK-853 の耐性変異が複数の患者で検出され、低頻度の耐性変異も同定可能であったことから、耐性変異を確度高く検出可能であることを明らかにした。

第2章では、HBV領域に関する研究として、化合物スクリーニングに使用可能で、複数 genotype の新規 HBV 安定発現細胞系の構築を目的に、既存細胞 (genotype D) 及び HBV 患者血清 (genotype A, B, C) から新規細胞を構築した。最初に genotype D の新規細胞として、テトラサイクリン誘導型細胞である HepAD38 細胞 (genotype D) からクローニングして Hep38.7-Tet 細胞を選抜した。Hep38.7-Tet 細胞の細胞内及び細胞外複製能は親株の HepAD38 細胞より高く、Hep38.7-Tet 細胞に対して逆転写酵素阻害薬のエンテカビル及び cccDNA 形成阻害剤の CCC-0975 は感受性を示した。また FDA approved drug screening library の 414 化合物中、異なる作用機序を有する 12 化合物が感受性を示した。次に genotype A, B, C の新規細胞として、HBV 感染患者 9 人 (genotype A : 2 人, genotype B : 1 人, genotype C : 6 人) の血清から HBV 遺伝子配列を同定した。同定した患者 HBV 遺伝子を発現する一過性発現系から、reference と比較して細胞内及び細胞外複製能が高い genotype A, B, C の 1 クローンをそれぞれ選抜し、選抜した患者 HBV クローンの遺伝子を発現する HBV 安定発現細胞を取得した。取得した genotype A, B, C の HBV 安定発現細胞は細胞内及び細胞外複製能を有しており、エンテカビル及び複数の抗 HBV 剤に感受性を示した。また genotype A, B, C の HBV 安定発現細胞由来のウイルスを感染させた細胞は感染性及び複製能を有しており、感染細胞に対してエンテカビルは感受性を示した。第2章の結果より、genotype D は Hep38.7-Tet 細胞、genotype A, B, C は患者由来の HBV 安定発現細胞をそれぞれ取得し、取得した細胞は HBV 発現能を有しており、既存薬の阻害も確認されたことから、新規抗 HBV 薬のスクリーニングに使用可能であることを明らかにした。

本研究より、HCV 領域では薬効予測に重要な耐性変異同定法を、HBV 領域では新薬探索に使用可能な細胞系を確立した。これら評価系の確立は迅速な新規肝炎治療薬の創出につながるかと期待できる。

## 論文審査結果の要旨

本論文では、新規肝炎治療薬の迅速開発への応用を目的として、慢性肝炎の主な原因である C 型肝炎ウイルス (HCV) および B 型肝炎ウイルス (HBV) に関する新たな評価系の開発研究を行い、以下に示す結果を得ている。

1) HCV に関しては、低い頻度で出現する耐性変異の確度の高い検出・同定法として、抗ウイルス薬 (JTK-853) が投薬された HCV 患者の血清を用いて HCV ポリメラーゼ領域の遺伝子を増幅し、その後、population sequencing 解析に加えて clonal sequencing 解析を行う方法を開発した。なお、この方法は、患者血清を用いた最初の耐性変異同定法でもある。

2) HBV に関しては、pan-genotypic な化合物スクリーニング法への応用が可能な HBV 発現細胞構築のため、既存細胞からウイルス複製能の高い HBV genotype D の安定発現細胞を選抜した。また HBV 患者の血清から HBV 配列を増幅・選抜し、HBV genotype A, B, C の各々の安定発現細胞を構築した。さらに、構築した安定発現細胞が新規抗 HBV 薬のスクリーニングに応用可能であることも確認した。

これらの新たな評価系の確立に関する研究成果は、HCVあるいはHBV感染に対する新薬創出に直接貢献するとともに、関連する研究領域の更なる発展にも貢献できると期待される。

一方、本論文に記載された研究内容は、学位論文として質・量ともに十分であると認められる。

以上の理由により、本論文を合格とする。