

C型慢性肝炎患者に対する リバビリン先行インターフェロン併用療法における リバビリンの作用機序の検討

学位論文内容の要旨

[緒言] Interferon (IFN) / Ribavirin (RBV) 併用療法は Hepatitis C virus (HCV) 感染症に対する標準療法のひとつとなったが, RBV の HCV に対する作用機序は未だ解明されていない. HCV に対する RBV の作用機序を解明するために併用療法開始前に 4 週間の RBV を単独投与し, 治療経過中の免疫学的, ウイルス学的検討を行った.

[対象と方法] C型慢性肝炎患者 25 名を対象とした. 対象患者 25 名のうちの 17 名は genotype 1 で 8 名は genotype 2 であった. IFN との併用療法開始前に 4 週間の RBV 内服治療を先行し, その後 IFN- α 2b を合計 24 週間併用投与した. ウイルス学的治療効果により 2 群に分けた. Early viral responder (EVR) 群は併用療法開始 4 週後に HCV RNA が陰性化した症例群と定義し, non-EVR 群は併用療法開始 4 週後に HCV RNA 陽性のままの症例群と定義した. Survival viral responder (SVR) 群は併用療法終了 24 週間後まで HCV RNA 陰性が継続した患者群と定義した. RBV 単独投与開始前, 併用療法開始前に患者血清を採取し解析に使用した. 末梢血 CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th2 サブセットはフローサイトメトリー法にて測定し, 血清中サイトカイン濃度は ELISA 法にて測定した. 上記治療を施行した C型慢性肝炎患者で genotype 1b の 14 名よりウイルス学的解析を行った. 各血清より HCV RNA を抽出し逆転写反応を行い cDNA を合成した. その後 NS5A-ISDR 領域を nested PCR にて増幅しプラスミドに導入した. 1 サンプルあたり 10 クローンを抽出しシークエンス法にて解析した. 10 本のクローンの測定結果から, それぞれの位置で最も高頻度な配列をコンセンサスシークエンスと定義し, HCV-J と比較し検討した. 次に同一血清中の各クローンとコンセンサスシークエンスとの平均変化数を変異率として算出し, EVR 群と non-EVR 群とで比較検討した.

[結果] 対象患者 25 名を併用療法開始早期のウイルス学的反応により 2 群に分けた. 17 名は EVR で, そのうちの 10 名は最終的に SVR であった. EVR 群と比較して, genotype 1 と高線維化は non-EVR 群において有意に高い傾向を認めた. 治療開始前の Th1/Th2 比, 血清中のサイトカインレベルは両群間で差を認めなかった. 4 週間の RBV 単独投与中, EVR 群において ALT 値は有意に低下したが, non-EVR 群においては軽度の上昇を認めた. Th1/Th2 比は EVR 群で有意に上

昇したが、non-EVR 群では差を認めなかった。IFN- γ は EVR 群において上昇傾向を示したが有意差を認めなかった。IL-10 は EVR 群で有意に低下したが、non-EVR 群では低下傾向であったが有意差を認めなかった。sCD30 は両群共に有意差を持って低下した。治療開始前のコンセンサスシーケンスは HCV-J と比較してヌクレオチドレベルで 120 塩基中平均 10.9 個の変異を、アミノ酸レベルにおいて 40 アミノ酸中平均 1.2 個の変異を認めた。RBV 単独投与後、これらの変異数に有意な変化は認めなかった。治療開始前の変異率は、ヌクレオチドおよびアミノ酸レベルにおいて EVR、non-EVR 両群間に有意差を認めなかった。RBV 単独投与中にヌクレオチドで EVR 群においてのみ有意な変異率の上昇を認めた。

[考察] C 型慢性肝炎への IFN/ RBV 併用療法の導入後、従来の IFN 単独療法と比較して良好な成績が報告されている。IFN は直接的な抗ウイルス効果を発揮するといわれているが RBV の作用機序は未だ解明されていない。C 型慢性肝炎患者に RBV 単独療法を施行すると血清 ALT 値は有意に低下するが HCV RNA 量は変化しないと報告されている。本研究においても血清 ALT 値は EVR 群で RBV 単独投与中に有意な低下を認めたが、non-EVR 群では逆に軽度の上昇を認めた。RBV は Th1 系サイトカインを誘導し、その一方で Th2 系サイトカインを抑制すると報告されている。本研究においては、末梢血 CD4 陽性 T 細胞における Th1/Th2 バランスと血清中の Th1 系サイトカイン (IFN- γ , TNF- α) 及び Th2 系サイトカイン (IL-10, sCD30) につき評価した。4 週間の RBV 単独投与により Th1/Th2 バランスは有意に Th1 側に傾き、Th2 系サイトカインは有意に減少した。これらの免疫学的変化と治療効果の関連性は、EVR 群においてより強く示唆された。この Th1/Th2 バランスの変化が宿主の抗ウイルス性免疫応答を賦活し感染肝細胞排除に関連したと考えられた。NS5A 領域に存在する特定のアミノ酸配列の相違が IFN 感受性と相関していることが報告されており、interferon sensitivity determining region (ISDR) といわれている。4 週間の RBV 単独投与において、大部分の症例ではコンセンサスシーケンスに変化を認めなかった。しかし HCV は生体内において様々な多様性に富む状態で存在しており、そのような HCV 遺伝子の多様性を quasispecies と呼んでいる。本研究では各血清より 10 本のクローンを検索し、各クローンとコンセンサスシーケンスとの差を計測し変異率として算出した。この変異率が大きいほど各クローン間のばらつき、つまり quasispecies が大きいことを示すと考えられる。RBV 投与前の変異率は両群間で差を認めなかったが、投与 4 週後で EVR 群においてヌクレオチドレベルで有意な変異率の上昇を認めた。遺伝子変異がより促進的に起こったと考えられる事例で、RBV が HCV に対して mutagen として作用するという仮説の裏付けとなる可能性が考えられた。本研究の RBV 先行 IFN/ RBV 併用療法における SVR 率は 40% で全ての SVR 患者は EVR 群であった。このことは早期ウイルス排除が SVR に必要な条件と考えられた。Genotype 1 に限ると SVR 率は 23.5% であり、過去の報告と比較しても RBV の先行投与は最終的な治療結果の改善に寄与しなかった。しかし 4 週間の RBV 単独投与中の血清 ALT 値やサイトカイン、HCV 遺伝子配列の変化の解析により、引き続いて施行される併用療法の治療効果の予測が可能と考えられた。RBV の作用機序としては宿主の免疫反応の修飾及び HCV 遺伝子変異共に関与していると考えられ、それらの相互作用によりウイルス排除に作用していると考えられた。

[結語]C型慢性肝炎患者に対する RBV 投与は、宿主免疫の賦活、HCV に対する遺伝子変異の促進を促し、IFN 治療の有効性を上昇させると考えられた。IFN/RBV 併用療法に先行する RBV 投与中の血清 ALT 値、Th1/Th2 系サイトカイン、NS5A-ISDR 領域のヌクレオチド変異率の測定は、併用療法開始後の抗ウイルス効果の予測に有用であった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 有 賀 正

学 位 論 文 題 名

C型慢性肝炎患者に対する

リバビリン先行インターフェロン併用療法における

リバビリンの作用機序の検討

近年インターフェロン(IFN)にリバビリン(RBV)を併用することにより、C型肝炎ウイルス(HCV)感染症に対して優れた抗ウイルス効果が得られ難治例に対する標準療法となったが、RBVのHCVに対する作用機序仮説としては免疫学的作用およびウイルス学的作用が報告されているが十分には解明されていない。またRBV単独投与に引き続き施行した併用療法の成績は報告がない。そこでHCVに対するRBVの作用機序を解明するために併用療法開始前に4週間のRBVを単独投与し、治療経過中の免疫学的、ウイルス学的検討を行った。C型慢性肝炎患者25名を対象とし、4週間のRBV連日投与を先行し、その後IFNを合計24週間併用投与した。併用療法開始4週後にHCV RNAが陰性化した症例群をEarly viral responders(EVR)群、HCV RNA陽性のままの症例群をnon-EVR群としてRBV単独投与前後の免疫学的、ウイルス学的変化を比較検討した。免疫学的検討としてRBV単独投与前後のTh1/Th2サブセットおよび血清サイトカインの変化を検討した。4週間のRBV単独投与によりTh1/Th2バランスは有意にTh1側に傾き、Th2系サイトカインは有意に減少した。この免疫学的変化は、EVR群においてより著明であり、このTh1/Th2バランスの変化が抗ウイルス性免疫応答を賦活し、感染肝細胞排除に関連したと考えられた。次にウイルス学的検討としてRBV単独投与前後のInterferon sensitivity determining region(ISDR)領域の遺伝子変異を検討した。患者血清より10クローンのISDR領域の遺伝子配列を解析した。10クローンの最も高頻度な配列をコンセンサスシークエンス、各クローンとコンセンサスシークエンスとの1クローンあたりの平均変化数を変異率と定義した。4週間のRBV単独投与によりコンセンサスシークエンスに有意な変化は認めなかったが、変異率は、EVR群のヌクレオチドレベルにおいて有意な上昇を認めた。遺伝子変異はEVR群でより促進的に起こったと考えられ、RBVによるISDR領域の遺伝子変異の増大は、IFN療法の有効性に関連したと考えられた。RBVは、これらの免疫学的およびウイルス学的作用により、IFNの有効性を上昇させると考えられた。

口頭発表に際し、副査の有賀教授より今回の RBV 先行投与の臨床結果について、ISDR 領域の遺伝子変異の意義、stop codon になる変異の存在の有無についての質問があった。これに対して申請者は、RBV 先行投与では最終的なウイルス排除率には寄与しない事、今回の検討では解析していないが文献的に ISDR 領域が IFN により誘導される酵素の一つである蛋白質リン酸化酵素との関連、現在までにそのような stop codon は解明されていないことを回答した。次いで副査 小池教授より再び IFN 感受性と ISDR 領域の変異の関連、RBV による他部位への変異の可能性、生体の遺伝子への変異の可能性、Th 1 disease へのリバビリン投与、HIV 重複感染へのリバビリン投与についての質問があった。これに対して申請者は、文献的に報告されている ISDR 領域の意義、RBV により他部位にも変異の入る可能性、生体の遺伝子、Th 1 disease への影響の報告はないこと、HIV にも変異を起こす可能性があり重複感染には注意が必要であることを回答した。さらに主査 浅香教授より IFN 同時投与の際の変化、ペグインターフェロン(PEG-IFN)/RBV の併用の有効性、RBV 単独投与の成績、RBV が HCV に使用されるにいたった経緯についての質問があった。これに対して申請者は、同時投与だと IFN の修飾が大きく RBV の作用機序の解明ができないこと、PEG-IFN でも同様の解析が必要なこと、RBV が HCV に対して最初に使われた報告を回答した。

本研究は十分に解明されていなかった RBV の HCV に対する作用機序の一部を解明したことで高く評価され、この研究を足掛かりとして今後の HCV 感染症への治療結果の改善が期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。