

**厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業**

**薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策
に関する研究**

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：榎本信幸

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総括研究報告

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究に関する研究

榎本 信幸 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 薬剤耐性HCVに対する新規治療薬候補化合物の検索

伊藤 正彦 ----- 8

2. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

松本 武久 ----- 15

3. ペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン(RBV)併用療法における
HCVコアとNS5A領域遺伝子変異と治療効果の関連

泉 並木 ----- 17

4. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

今村 道雄 ----- 19

5. マウスモデルによる慢性B型肝炎の病態解析

中本 安成 ----- 22

6. HCVのインターフェロン耐性及びリバビリン耐性の分子機構、とくに
NS5A機能と耐性機構の研究

堀田 博 ----- 23

7. 培養細胞系による肝炎ウイルス耐性機構の基盤研究

鈴木 哲朗 ----- 27

8. 薬剤耐性及び治療効果に関係するHBV,HCV遺伝子の解析

鈴木 文孝 ----- 31

9. 細胞内インターフェロン発現応答を抑制するHCV蛋白の探索と
機能解析に関する研究

坂本 直哉 ----- 34

10. 核酸アナログ耐性HBVの高感度検出法の開発および治療抵抗性HCV
のSNP解析

加藤 直也 ----- 36

11. インターフェロン耐性HCVの分子機構に関する研究

加藤 宣之 ----- 38

12. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

横須賀 収 ----- 42

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 44

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 55

I. 総括研究報告

平成19年度 総括研究報告書

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究
に関する研究

主任研究者：榎本信幸 山梨大学医学部第1内科 教授

研究要旨

肝炎ウイルスに対する治療は近年急速な進歩を見せているが、B型肝炎ウイルス（HBV）においては核酸アナログ耐性ウイルスの出現、C型肝炎ウイルス（HCV）においてはインターフェロン・リバビリン抵抗性HCVの存在が治療の障害となっている。本研究の目的はこれらの薬剤耐性肝炎ウイルスの感染病態の解明であり、これにより診断法の確立、耐性機構解明とその克服の基盤形成、さらには新規治療法の開発などを行うことを目的としている。治療抵抗性を示す肝炎ウイルスの全ゲノムを経時的解析により治療抵抗性を担うウイルス遺伝子変異領域を解明するとともに、臨床データのデータマイニング解析、インターフェロン系分子のSNP解析、HCV培養細胞系・モデル動物を用いて薬剤耐性に関与する宿主側因子の解明を行った。またコンピューター上で肝炎ウイルス蛋白の活性部位に結合する化合物をin silico screeningで探索、培養細胞系を用いてその抗ウイルス効果を検証した。その結果、HCV NS5A蛋白のISDRに加えコア蛋白にペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを明らかとした。データマイニング解析により肝内脂肪沈着、HDLコレステロール値などの宿主側因子がC型肝炎の治療効果に影響することを見出した。IFN誘導遺伝子であるGBP-1がHCV-NS5B蛋白が特異的に結合しHCV増殖を特異的に抑制すること、病態に関連するインターフェロン系関連分子(TLR3、2,5AS)のSNPを同定した。核酸アナログ耐性HBV遺伝子変異の高感度検出法をTaqmanPCRおよびInvader assayにより開発、またHBV全遺伝子の解析を行いnt1896、nt1287の多型が耐性変異に関与することを明らかとした。In silico screeningによりHCV増殖を強く阻害するリード化合物を同定した。以上、本年度は薬剤耐性あるいは治療抵抗性肝炎ウイルスの病態にはウイルスゲノム構造および宿主因子が重要な役割を持つことを明らかとした。特にHCVコア蛋白のアミノ酸変異が治療効果に強い影響を与える発見は、臨床的な治療方針の決定に重要な情報を与えるとともに、その機序の解明が新たな薬剤耐性機構の研究に展開することが予想される。

A. 研究目的

肝炎ウイルスに対する治療は近年急速な進歩を見せているが、B型肝炎ウイルス（HBV）においては核酸アナログ耐性ウイルスの出現、C型肝炎ウイルス（HCV）においてはインターフェロン・リバビリン抵抗性HCVの存在が治療の障害となっている。本研究の目的はこれらの薬剤耐性肝炎ウイルスの感染病態の解明であり、これにより診断法の確立、耐性機構解明とその克服の基盤形成、さらには新規治療法の開発などを行う。

B. 研究方法

- ・ 核酸アナログ治療中のHBVゲノム全体の経時的解析を行い耐性変異の全体像を明らかにすると同時に、核酸アナログ耐性HBVの高感度検出法の開発を行った。
- ・ インターフェロン・リバビリン併用療法に治療抵抗性を示すHCVの全ゲノムを経時的に解析し、治療抵抗性を担うウイルス遺伝子変異領域を解明し、その臨床的意義を多数例により解析した。HCV培養細胞系を用いてウイルス側変異による薬剤感受性の変化の検討、インターフェロン応答抑制に関与するHCV蛋白と標的宿主蛋白を同定を行い、薬剤耐性に関与するウイルス側および宿主側因子の解明を行った。臨床データのデータマイニング解析、宿主ゲノムのインターフェロン系分子のSNP(single nucleotide polymorphism)解析によりインターフェロン耐性における宿主因子を解明した。
- ・ HBVトランスジェニックマウスモデルにより病態進行に関与する宿主遺伝子群を同定する。感染ヒト肝細胞キメラマウスに薬剤耐性肝炎ウイルスを感染させin vivoでの薬剤耐性モデル系の作成を行った。ウイルス遺伝子変異情報よりコンピューター上でウイルス蛋白の活性部位に結合する化合物をin silico screeningで探索、培養細胞系を用いてその抗ウイルス効果を検証した。

C. 研究結果

- ・ Peginterferon/Ribavirin 併用療法抵抗性HCV感染のウイルス側および宿主側因子の解明
主任研究者である榎本はハイスループットのHCVゲノムワイド解析システムを構築し、

Peginterferon/Ribavirin併用療法を施行した多数症例でHCV全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCV NS5A蛋白のISDRに加えコア蛋白にPeginterferon/Ribavirin併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを明らかとした（榎本）。これまで主任研究者はHCV NS5A蛋白の2209-2248番目の40アミノ酸領域がHCVのinterferon感受性を決定しており、この領域に変異が多いほどinterferonおよびPeginterferon/Ribavirin併用療法の効果が高いことを明らかとしてきた。本研究においてPeginterferon/Ribavirin併用療法とISDR変異の関連を検討したところISDR2変異以上では80%の症例でウイルス排除に至るのに対して、ISDR0/1変異は高度の治療抵抗性を示しそのウイルス排除率はわずか30%台であった。しかし、このような治療抵抗性HCVにおいてもウイルス排除に至る症例がありその機序はあきらかではなかった。そこでPeginterferon/Ribavirin併用療法抵抗性を示すISDR0/1変異のHCV-1bに感染している症例について治療開始4週後に血中HCV量が100分の1以下に低下するsteep viral responderとHCV量の低下が10分の1未満であるflat viral responderについて血中よりHCVの全遺伝子を増幅しそのアミノ酸配列の相違を検討した。その結果、ウイルス反応に有意に相関するのはcore70番目のアミノ酸の多型のみであり、steep viral responderであるのに対して、flat viral responderではすべてグルタミンであった。さらに多数症例についてcore 70のアミノ酸と治療反応性の関連を検討した結果、core 70グルタミンの場合には大部分の症例で治療抵抗性であるのに対して、core70アルギニンの場合にはISDR0/1変異のinterferon抵抗性HCVであっても、Peginterferon/Ribavirin併用療法で70%の症例がウイルス排除にいたることを明らかとした。コア変異の重要性は他の分担研究者の臨床的検討でも確認された（鈴木文孝、泉、横須賀）。NS5A蛋白についてはISDRの他に、C末端の（IRRDR）のアミノ酸配列多様性がPeginterferon/Ribavirin併用療法の効果予測と関連することを明らかとした（堀田）。一方、Peginterferon/Ribavirin併用療法の治療効果を決定する宿主因子を多数症例のデータマイニング解析により肝内脂肪沈着、

HDLコレステロール値などの宿主側因子がC型肝炎の治療効果に影響することを見出した(泉)。

・ HCVのinterferonおよびribavirin耐性機構の基礎的検討

Interferon耐性機構の解析としてNS5A結合宿主蛋白を探索(堀田)、またIFN誘導遺伝子であるGBP-1がHCV-NS5B蛋白が特異的に結合しHCV増殖を特異的に抑制すること、NS4BがCardif及びその下流のRIG-I依存性インターフェロン β 発現応答を抑制することを確認し、これらの結合エピトープを同定した(坂本)。インターフェロン関連分子(TLR3、2,5AS)のSNPを解析しC型肝炎の病態と関連するSNPを同定した(加藤直也)。さらに全長HCVゲノム複製細胞(5種類)を2年間にわたり継代培養し、それにより生じるHCVゲノムの遺伝的変異動態および細胞の感受性変化を明らかにした(加藤宣之)。またリバビリンに対して耐性の遺伝子型2a HCVを作成し、その耐性獲得にはポリメラーゼ変異が重要であることを明らかにした(鈴木哲朗)。ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCVのISDR変異と感染性の関連を検討、また野生型HCVクローンから、Proteinase inhibitor耐性クローンが出現することを確認した(今村)。

・ 薬剤耐性HBVの病態解明および検出法開発

薬剤耐性B型肝炎ウイルスに関しては、lamivudineおよびentecavirなどの核酸アナログ耐性HBV遺伝子変異の高感度検出法をTaqmanPCRおよびIvader assayにより開発、早期診断を可能とした(加藤直也、鈴木文孝)。また、HBVの核酸アナログ耐性変異はこれまでpolymerase遺伝子を中心に解析されていたが、HBV全遺伝子の解析を行いpolymerase遺伝子変異に加えてlamivudine抵抗性HBVにおいてはnt1896、nt1287の多型が関与することを明らかとした(横須賀)。治療抵抗性のB型肝炎ウイルスによる肝病変進行の制御法を開発するため慢性ウイルス肝炎トランスジェニックマウスモデル系のDNAマイクロアレイ解析により、肝炎の進展に伴い細胞死・増殖因子関連遺伝子に変動が認められることを明らかとした(中本)。

・ 新規抗肝炎ウイルス剤の開発

既存の抗ウイルス治療に抵抗性を示す肝炎ウイルスに対する新規化合物の迅速な探索のためのモデルとして、in silico screeningにより探索したNS3プロテアーゼ活性とHCV subgenomic repliconの両方を強く阻害するリード化合物およびその構造類縁化合物を化合物データベースから探索した(松本)。これらの中から7種のHCV NS3プロテアーゼ阻害化合物のin vitroにおける抑制効果を見出し(伊藤)、さらに抗HCV活性の強い誘導体化合物をin silico screeningおよびin vitro実験により同定した(松本、伊藤)。

D. 考察

・ 本年度は、ハイスループットのHCVゲノムワイド解析システムを構築し多数症例でHCV全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCVコア遺伝子にPeginterferon/Ribavirin併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを明らかとした(榎本)。すなわち、interferonに抵抗性を示すISDR0/1変異のHCVに対するPeginterferon/Ribavirin併用療法においては、core蛋白70番アミノ酸の多型によってHCVの治療に対する反応が全く異なり、core70アルギニンのHCVでは治療中の血中HCVは消失し、48週の標準治療においても70%が著効となる。さらに治療開始12週以降に血中HCVが消失するlate viral responderにおいてもcore70アルギニンであれば72週の延長投与により著効率が改善することが示唆された。一方、core70グルタミンの場合にはHCVはPeginterferon/Ribavirin併用療法でもほとんど減少せず、大部分の症例はnull viral responderとなることが明らかとなった。

・ このcore70および91番のアミノ酸変異の重要性は以前より虎ノ門病院熊田らのグループにより指摘されていたが、本研究はHCV遺伝子全体の多型とPeginterferon/Ribavirin併用療法の効果を相関させるウイルスゲノムワイド解析により、core蛋白70番アミノ酸の多型がすべてのHCVのアミノ酸部位の中で最も強く治療効果に影響を与えていることを決定的に証明した点に大きな意義がある。C型肝炎については、Peginterferon/Ribavirin併用療法によりこれまで難治であったinterferon単独治療抵抗性のHCV-1b

感染においても約半数の患者でウイルス排除が得られる状況となっている。しかし、なぜ Peginterferon/Ribavirin併用療法に反応する患者としない患者が存在するのかそのメカニズムは明確ではなかった。本研究はその本質的機序がC型肝炎ウイルスの遺伝子構造の多様性にあることが明らかとしつつある。HCV遺伝子のウイルスゲノムワイド解析により、ISDRがinterferon抵抗性の0/1変異であるHCVのPeginterferon/Ribavirin併用療法に対する反応性をcore蛋白質の70番目のアミノ酸が決定していることが明らかとなった。今後さらに詳細にHCV遺伝子構造と治療反応性および病態との関連を解明する予定である。

- このISDRおよびcore蛋白質のアミノ酸多型のウイルス学的反応における重要性は鈴木文孝、泉、横須賀らの検討でも確認された。一方、Peginterferon/Ribavirin併用療法の最終的な治療効果はウイルス遺伝子以外の因子により影響されることもこれまで示唆されており、本研究におけるこれまでの成果でも種々の臨床因子の関与が示唆されている。しかし、これまではウイルス側因子が十分に解明されていなかったため直接的な解析が困難であった。今年度までの本研究の成果によりウイルス側因子が極めて明確になったため、今後本研究においてウイルス側因子を揃えた上で今後、他の臨床因子あるいは宿主因子の役割を完全に解明する予定である。
- さらに重要なことはISDRを含むHCV NS5A蛋白に加えてcore蛋白のPeginterferon/Ribavirin治療抵抗性における役割を基礎的に解明することが新たに課題として浮上した点である。これまでcore蛋白の機能に関しては種々の基礎的検討がなされてきたが、interferon抵抗性における役割については注目されていなかった。本研究は、臨床的解析に基づくcore蛋白の治療抵抗性における役割の基礎的解析という新たな研究分野を切り開いた。特にcore蛋白70番アミノ酸多型の意義を解明することはPeginterferon/Ribavirin治療に対する無反応の機序の解明とその克服のための非常に重要な今後の本研究計画の研究展開となる。
- HCVの治療抵抗性に関与するウイルス側因

子以外の宿主側因子として本研究で明確となりつつあることは、肝線維化および脂肪化、年齢、性別、AFP、コレステロール、薬剤投与量、投与期間などであるが(泉、鈴木文孝、横須賀)、これまでの検討は治療効果に最も大きい影響を与えるウイルス遺伝子多型を考慮にいれていない解析がほとんどであり、そのために治療効果との関連が不明確、あるいは報告によって相反する結果となっていた。今年度に明らかとなったウイルス遺伝子因子を考慮にいたした上で宿主側臨床因子を詳細に解析することにより、真に治療抵抗性に関与する臨床因子を同定できると考えられる。

- また治療抵抗性に関与するウイルス側因子の基礎的な解析についてもHCV repliconおよびHCV粒子産生系により解析を進めた。Interferon(加藤宣之)およびRibavirin抵抗性HCV(鈴木徹朗)を培養細胞系で確立、その遺伝子を解析することにより特徴的な遺伝子変異が同定した。このような遺伝子変異の役割を基礎的に解析するとともに、臨床症例において同様の遺伝子変異がいかなる影響を与えているかを今後検討することが非常に重要である。また、以前より治療抵抗性に関与することが明らかであったNS5A蛋白に結合する新たなinterferon誘導性宿主蛋白の同定が進みつつある(堀田)。NS5A蛋白変異の治療抵抗性における機能は以前として明確になっておらず本研究においても重要な課題のひとつであり、今後さらに集中的な検討を行う予定である。
- さらに、HCV増殖および治療においては自然免疫系によるinterferon systemの活性化が重要な制御おこなっていることが示唆されてきたが、やはり実際の臨床的治療効果との関連は直接的には明らかとされてこなかった。本研究ではHCV蛋白と自然免疫・interferon系分子の相互作用、interferon誘導蛋白遺伝子のSNPsと治療抵抗性の関連についても解析を進めた。その結果、GBP-1(坂本)、p200(堀田)などのinterferon誘導蛋白とHCV NS4あるいはNS5Aとの相互作用、および2,5AS、TLR3のSNPs(加藤直也)が治療抵抗性に影響を与えていることを基礎的および臨床的に見いだした。今後は上述のようにウイルス遺伝子の多様性とこれら宿主分子の多様性の相互作用が、総体として患者

の治療の転帰にどのようにインパクトを与えているかを読み解く作業が重要となる。

- また、HCVに対する既存のinterferonを機軸とする抗ウイルス治療に抵抗性のHCVにも有効な抗ウイルス治療薬を見出すためin silico screeningによるNS3 proteaseを阻害する化合物の探索に成功した(松本、伊藤)。今後はさらに特異性の高い誘導体の同定を進めるとともに、これまで治療標的となっていないかかったNS2およびNS5Aを標的としたin silico screeningを行う予定である。
- B型肝炎については、lamivudineおよびentecavirなどの核酸アナログ耐性HBV遺伝子変異の高感度検出法をTaqmanPCR (加藤直也) およびIvader assay (鈴木文孝) により開発、早期診断を可能とした。また、HBVの核酸アナログ耐性変異はこれまでpolymerase遺伝子を中心に解析されていたが、HBV全遺伝子の解析を行いpolymerase遺伝子変異に加えてlamivudine抵抗性HBVにおいてはnt1896、nt1287の多型が関与することを明らかとした(横須賀)。今後HBVの耐性変異の出現機構を臨床的および基礎的に解析する予定である。
- 上記の薬剤耐性肝炎ウイルスの臨床症例からの解析と、in vitroの培養細胞系での検討とのギャップを補完するため、肝炎モデルマウスでの検討を行った。すなわち、ヒト肝細胞キメラマウスにHCV プロテアーゼ阻害剤であるテラプレビル耐性変異を導入したHCVを感染させ実際に生体内で耐性を示すことを確認することに成功した(今村)。また、慢性肝炎から肝癌を発症するHBVトランスジェニックマウスモデルを用いて薬剤耐性肝炎ウイルスの持続感染・炎症による病変進展にFasL系が必須であることをしめした(中本)。これらの動物モデルを用いて、今後薬剤耐性肝炎ウイルスの生体内での病態解明を進める予定である。

E. 結論

薬剤耐性あるいは治療抵抗性肝炎ウイルスの病態にはウイルスゲノム構造および宿主因子が重要な役割を持つことを明らかとした。特にHCVコア蛋白のアミノ酸変異が治療効果に強い影響を与える発見は、臨床的な治療

方針の決定に重要な情報を与えるとともに、その機序の解明が新たな薬剤耐性機構の研究に展開することが予想される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1: 論文発表

1. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70. PMID: 18248300 [PubMed - indexed for MEDLINE]
2. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol.* 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33. PMID: 18024902 [PubMed - indexed for MEDLINE]
3. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N, Watanabe M. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology.* 2008 Feb 5;371(1):71-85. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17949770 [PubMed - in process]
4. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa

S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.

J Gastroenterol Hepatol. 2007 Aug 7; [Epub ahead of print]

PMID: 17683479 [PubMed - as supplied by publisher]

- 1) 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎治療のコンセンサス Peg-IFN/ribavirin併用療法 ISDRと初期抗ウイルス効果からみた治療効果. コンセンサス肝疾患 B型肝炎・C型肝炎の治療 96-101, 2007
 - 2) 坂本 穰, 榎本信幸. C型慢性肝炎. 消化器疾患最新の治療2007-2008 287-291, 2007
 - 3) 坂本 穰, 井上泰輔, 榎本信幸. ウイルス肝炎の臨床・治療 実地診療におけるC型肝炎の治療の実際 インターフェロン単独療法をどう使うか?—ペグから自己注射までの実際— Medical Practice 24(4): 713-716, 2007
 - 4) 吉田貴史, 坂本 穰, 榎本信幸. リバビリン併用インターフェロン治療抵抗例の病態とその対策 治療効果を規定するウイルス側の要因. Modern Physician 28(1): 35-36, 2007
 - 5) 坂本 穰, 榎本信幸. 特集 ウイルス性慢性肝炎: 診断と治療の進歩 IV. C型慢性肝炎の抗ウイルス療法 1. インターフェロン療法の現況: 標準治療のエビデンス. 日本内科学会雑誌 97(1): 57-63, 2008
 - 6) 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎治療up to date C型慢性肝炎—HCV遺伝子変異と治療効果—. Mebio 25(3): 89, 2008
 - 7) 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス性肝炎のプライマリケア 総論 慢性ウイルス性肝炎の診断と節目検診. 診断と治療 96(3), 2008
2. 学会発表
 - 1) Nobuyuki Enomoto. Treatment of Chronic Hepatitis C in Japan. China-Japan Joint-lab Symposium on Emerging Pathogens and Immunology 2007. August 11, 2007. Beijing, China.
 - 2) Nobuyuki Enomoto. New Therapeutic Targets for HCV infection. 2007 Seoul International Liver Symposium. September 7, 2007. Seoul, Korea.
 - 3) Nobuyuki Enomoto. Treatment Strategy of Hepatitis C in Japan. Asian Hepatitis Forum "Difference and similarity among three countries". December 15, 2007. Tokyo, Japan.
 - 4) Shinya Maekawa, Fumitake Amemiya, Shin-ichi Takano, Akira Matsui, Asuka Kanayama, Chikako Miyazaki, Tatsuya Yamaguchi, Takatoshi Kitmura, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Shun-ichi Okada, Nobuyuki Enomoto. Molecular evolution of hepatitis C virus genome in a patient with liver transplantation. 14th International symposium on hepatitis C virus & related viruses. 9-13 Sept. Glasgow, Scotland, UK.
 - 5) 坂本 穰. ISDRからみたC型慢性肝炎に対するPEG-IFN/Ribavirin (R)併用療法の治療効果. 第81回日本感染症学会総会 4.10-11, 2007 京都
 - 6) 榎本信幸. HCVゲノムと治療に関わる宿主因子. 第81回日本感染症学会総会 4.10-11, 2007 京都
 - 7) 坂本 穰, 井上泰輔, 榎本信幸. ISDRからみた高齢者のC型慢性肝炎患者に対する治療法. 第93回日本消化器病学会総会. 4.19-21, 2007 青森
 - 8) 前川伸哉. HCVの遺伝子構造による自然免疫RIG-I経路阻害、およびウイルス増殖能変化についての検討. 第93回日本消化器病学会総会. 4.19-21, 2007 青森
 - 9) 前川伸哉, 進藤邦明, 山下篤哉, 伊藤正彦, 榎本信幸. ペグインターフェロン・リバビリン併用療法治療効果を規定するHCVゲノム領域の検索. 第17回抗ウイルス療法研究会 5.25, 2007 高松
 - 10) 前川伸哉, 板倉嘉恵, 榎本信幸. C型肝炎ウイルス遺伝子構造による自然免疫回避の検討. 第43回日本肝臓学会総会 (ワークショップ) 5.31, 2007 東京
 - 11) 坂本 穰, 井上泰輔, 雨宮史武, 北村敬利, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. ISDRからみたC型慢性肝炎に対するPEG-IFN+Ribavirin療法の治療効果と72週治療の試み. 第43回日本肝臓学会総会 (ワークショップ) 6.1, 2007 東京
 - 12) 小松信俊, 朝比奈靖浩, 梅田尚季, 細川貴範, 上田 研, 土屋 薫, 中西浩之, 板倉 潤, 黒崎雅之, 内原正勝, 榎本信幸, 泉 並木. 肝細胞癌(HCC)に対するラジオ波治療 (RFA) の合併症とその防止~1403例での経験~.

- 第43回日本肝臓学会総会 (ワークショップ) 6.1、2007 東京
- 13) 中川美奈, 坂本直哉, 陳 正新, 井津井康浩, 箴島裕子, 田坂めぐみ, 櫻井 幸, 小貫優子, 須田剛生, 渡辺秀樹, 榎本信幸, 渡辺 守. 高齢者C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の安全性と有効性. 第43回日本肝臓学会総会 5.31、2007 東京
- 14) 中西裕之, 黒崎雅之, 朝比奈靖浩, 中西かおる, 野田隆政, 穴見公隆, 小松信俊, 梅田尚季, 細川貴範, 上田 研, 土谷 薫, 北村敬利, 板倉 潤, 内原正勝, 三宅祥三, 樋口輝彦, 榎本信幸, 泉 並木. 顕性及び潜在性肝性脳症の診断におけるNIRSの有用性の検討. 第43回日本肝臓学会総会 5.31、2007 東京
- 15) 須田剛生, 中川美奈, 坂本直哉, 陳 正新, 井津井康浩, 箴島裕子, 田坂めぐみ, 櫻井 幸, 小貫優子, 榎本信幸, 渡辺 守. C型慢性肝炎に対するPeg-IFN α 2b/Ribavirin併用療法の早期治療効果予測因子の解析. 第43回日本肝臓学会総会 6.1、2007 東京
- 16) 小貫優子, 中川美奈, 坂本直哉, 陳 正新, 井津井康浩, 箴島裕子, 田坂めぐみ, 櫻井 幸, 渡辺秀樹, 榎本信幸, 渡辺 守. Genotype2のC型慢性肝炎に対するinterferon投与プロトコールと治療効果の比較. 第43回日本肝臓学会総会 6.1、2007 東京
- 17) 箴島裕子, 坂本直哉, 中川美奈, 田坂めぐみ, 櫻井 幸, 井津井康浩, 陳 正新, 榎本信幸, 脇田隆字, 渡辺 守. Plaque-forming assayを用いた細胞障害性HCVの選択と昨日解析. 第43回日本肝臓学会総会 6.1、2007 東京
- 18) 田坂めぐみ, 坂本直哉, 中川美奈, 井津井康浩, 箴島裕子, 櫻井 幸, 陳 正新, 榎本信幸, 渡辺 守. HCV-NS4B蛋白によるinterferon発現応答抑制機構の解析. 第43回日本肝臓学会総会 6.1、2007 東京
- 19) 雨宮史武, 前川伸哉, 金山明日香, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. 細胞内脂質制御によるC型肝炎治療の可能性. 第43回日本肝臓学会総会 6.1、2007 東京
- 20) 坂本 穰. Y-PERSにおける治療効果規定因子の解析. 第1回東京肝疾患研究会 (PERFECT) 6.23, 2007 東京
- 21) 坂本 穰, 井上泰輔, 榎本信幸. ISDRからみたC型慢性肝炎のPEG-IFN/Ribavirin療法の解析. DDW-Japan 2007 (シンポジウム) 10.18, 2007 神戸
- 22) 前川伸哉, 金山明日香, 雨宮史武, 高野伸一, 松井 啓, 宮崎千賀子, 山口達也, 進藤邦明, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. 肝移植症例におけるHCV遺伝子構造変化の解析. 第11回日本肝臓学会大会 (ポスター) 10.18, 2007 神戸
- 23) 雨宮史武, 前川伸哉, 金山明日香, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCVレプリコンに対する脂質代謝抑制剤の効果. 第11回日本肝臓学会大会 (ポスター) 10.18, 2007 神戸
- 24) 井上泰輔, 坂本 穰, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α 2a単独療法の治療成績. 第11回日本肝臓学会大会 (ポスター) 10.18, 2007 神戸
- 25) 柏木賢治, 志村浩己, 小林哲郎, 今村俊一, 増山敬祐, 坂本 穰, 榎本信幸, 塚原重雄. インターネットを用いた慢性疾患診療支援システムの現状. 第27回医療情報学連合大会 11, 2007 神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

II. 分担研究報告

薬剤耐性 HCV に対する新規治療薬候補化合物の検索

分担研究者 伊藤 正彦 山梨大学・医学部・微生物学

研究協力者 山下 篤哉 山梨大学・医学部・微生物学

研究要旨

- 1) NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を、in silico screening system を用いて、97 種類の候補化合物を選択した後、その効果を HCV replicon を用いて確認をした。その結果、7 種の抑制効果のある化合物を見出した。そのうちの一つは、感染性 HCV JFH-1 についても、抑制効果を示した。
- 2) 抗真菌剤 Griseofulvin に、HCV RNA 増殖抑制効果があることを見出した。更に、HCV replicon において、interferon との相乗効果が見られた。その作用機序は、HCV 翻訳過程ではないことが示唆された。

A. 研究目的

薬剤耐性 HCV に対する新規治療薬候補化合物を見出すため、第一番目に in silico screening system を用いて NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物の検索を行った。第二番目に、既存の薬剤の中から抗 HCV 活性を持つ薬剤の検索を行った。

B. 研究方法

1). HCV 増殖抑制試験

1b 型ウイルス HCV-N 株由来の sub genomic replicon 細胞である Huh7/Rep-Feo を用いて、HCV 効果を検討した。抗 HCV 効果は、検討薬剤を replicon 細胞の培養液中に添加後、所定の時間培養し、ルンフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

感染性 HCV JFH-1 については、Core 抗原 ELISA 法および間接蛍光抗体法を用い

て、抑制効果を検討した。

2). 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、検討薬剤を replicon 細胞の培養液中に添加し、72 時間後に、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega 社) を用いて検討した。

3). 細胞周期

細胞を、エタノール固定、RNase 処理、及び propidium iodide 染色後、FACS にて解析を行った。

4). RNA 解析

HCV RNA の定量については、real time RT-PCR 法を用いて行った。

化合物の interferon 誘導能については、2', 5'-OAS、MxA の発現の有無について、RT-PCR 法にて確認を行った。

5). Western Blotting

HCV タンパクの定量については、抗 NS3

抗体および抗 NS5A 抗体を用いて、Western Blot 法により行った。

C. 研究結果

1). In silico screening system を用いた NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物

共同研究者である理化学研究所・松本武久先生のグループにより、in silico screening system を用いて、約 300 万種の化合物の中から、97 種類の NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を選択した。その効果について、HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo を用いて確認をしたところ、7 種の抑制効果のある化合物を見出した(I-表1)。また、その中で、#10 は、HCV 感染ウイルスである JFH-1 についても抑制効果を示した(I-図1)。

2). 抗真菌剤 Griseofulvin による HCV 増殖抑制効果

既に、医薬品として使用されている様々な薬剤について、抗 HCV 効果の有無を、HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo を用いて検討した。その結果、抗真菌剤 Griseofulvin が、抗 HCV 効果を有することが判った。他の経口抗真菌剤である Fluconazole、Itraconazole についても同様に検討を行ったが、これらの薬剤は、抗 HCV 効果は無かった(II-表1)。次に、Griseofulvin 処理によるウイルスの RNA やタンパクに量的変化についても検討を行ったところ、HCV replicon 細胞における HCV RNA 量およびタンパク量が減少した(II-図1)。

抑制効果のメカニズムを検討するため、まず、Griseofulvin によって interferon が誘導されるか否かについて、interferon inducible gene である 2', 5'-OAS、MxA の発現を RT-PCR により検討した。その結果、両遺伝子とも発現・誘導されることは無かった(II-図2)。次に、

Griseofulvin と interferon との作用が、相加的、相乗的、あるいは拮抗的に働くかについて検討を加えた。その結果、相乗的に働くことが判った。従って、Griseofulvin の HCV の増殖抑制機序は、interferon 誘導によるものではないことが示唆された(II-図3)。

Griseofulvin は、ある種の細胞を G2/M 期に arrest することが報告されている。そこで、Huh7/Rep-Feo も同様に G2/M 期に arrest するかについて検討を行った。その結果、G2/M 期に arrest することが判った(II-図4)。次に、細胞周期と HCV IRES 依存的翻訳機構の関連性について、既に報告されていることから、II-図 5A 示すような vector 系を構築し、Griseofulvin と細胞周期および HCV IRES 依存的翻訳機構との関連性について検討を行った。その結果、Griseofulvin の HCV の増殖抑制機序は、HCV IRES 依存的翻訳機構抑制によるものではないことが示唆された(図5B)。

これまでの解析は、1b 型ウイルス HCV-N 株由来の subgenomic replicon 細胞である Huh7/Rep-Feo を用いて行っていたため、次に、感染性の HCV ウイルスである JFH-1 を用いて、Griseofulvin が抑制するか否か検討を行った。その結果、Griseofulvin は、JFH-1 についても増殖抑制効果があることが判った。

D. 考察

1). In silico screening system を用いた NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物

約 300 万種の化合物の中から、97 種類の NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を in silico screening system 選択した。この 97 種類の候補化合物を NS3 Protease assay および Huh7/Rep-Feo 細胞にて、抗 HCV 効果を確認したところ 7 種の化合物に抑制効果が見られ

た(I-表1)。有効性の高い化合物の誘導体作製は現在、共同研究者である理化学研究所・松本武久先生のグループよりデザイン・作製中である。また、#10は、その抗 HCV 抑制効果は強くはないが、1b型の subgenomic replicon と2a型の JFH-1 の双方とも抑制効果を示した唯一の化合物であった。今後は、他のウイルス株を含め、その抑制効果について詳細な解析を行っていく予定である。

2). 抗真菌剤 Griseofulvin による HCV 増殖抑制効果

抗真菌剤 Griseofulvin が、1b型の subgenomic replicon と2a型の JFH-1 の双方とも抑制効果を示した。更に、Griseofulvin は replicon 細胞において、interferon- α と相乗的に HCV を抑制することも見出した。

Griseofulvin は、replicon 細胞を G2/M 期に arrest することを見出した。HCV IRES 依存的な翻訳は、細胞周期に依存するとの報告があるため、Griseofulvin による G2/M arrest が HCV IRES 依存的な翻訳活性に影響を及ぼすか検討した。その結果、影響を及ぼさないことが判った。Griseofulvin の細胞に対する影響として、微小管の重合を阻害するという報告がある。また、nocodazole や vinblastine sulfate といった微小管の重合を阻害する化合物が、HCV の増殖を抑制するといった報告がある。従って、Griseofulvin の HCV 増殖抑制の機序は、微小管の重合を阻害する結果起こるものと予想される。今後、微小管の構造変化と HCV のウイルス増殖との関連性について、更に、研究を進めていく予定である。

E. 結論

1). In silico screening system を用いることにより、7 種の NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化

合物を見出した。その1種は、1b、2a両方のウイルス型を抑制することを見出した。

2). 抗真菌剤 griseofulvin が HCV 増殖を抑制することを見出した。その作用機序は、HCV IRES 依存的な翻訳過程の阻害ではないことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Morimoto M, Tanabe F, Kasai H, Ito M. Effect of a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, on susceptibility to infection with *Staphylococcus aureus* in Chediak-Higashi syndrome (beige) mice. *Int Immunopharmacol.* 2007 7 :973-980

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Ito M, Enomoto N.

Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 197 :361-370

Okuyama T, Kurata S, Tomimori Y, Fukunishi N, Sato S, Osada M, Tsukinoki K, Jin HF, Yamashita A, Ito M, Kobayashi S, Hata RI, Ikawa Y, Katoh I.

p63(TP63) elicits strong trans-activation of the MFG-E8/lactadherin/BA46 gene through interactions between the TA and DeltaN isoforms. *Oncogene.* 2008 27:308-317.

Yang PT, Xiao WG, Zhao LJ, Lu J, He LM, Kasai H, Ito M. Increase in the level of

macrophage colony-stimulating factor in patients with systemic lupus erythematosus.

Ann Rheum Dis. 2008 67:429-430

2. 学会発表

山下篤哉、金浩範、前川伸哉、榎本信幸、

伊藤正彦

抗真菌剤 Griseofulvin による HCV RNA の増殖抑制効果とその機序の解明

第 17 回抗ウイルス療法研究会、高松、平成 19 年 5 月

山下篤哉、金浩範、前川伸哉、榎本信幸、

伊藤正彦

抗真菌剤 Griseofulvin による HCV RNA の増殖抑制効果とその機序の解明

第 55 回 日本ウイルス学会、札幌、平成 19 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

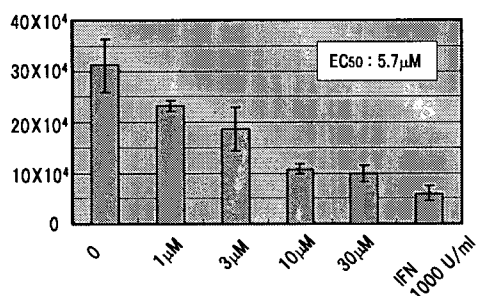
なし

I-表1 抗 NS3 Protease 阻害剤 候補化合物の抑制効果

	EC ₅₀	CC ₅₀	SI (CC ₅₀ / EC ₅₀)
NS3 PRO 0010	12 μ M	>160 μ M	> 13
NS3 PRO 0028	3 μ M	41 μ M	14
NS3 PRO 0032	13 μ M	116 μ M	9
NS3 PRO 0067	14 μ M	28 μ M	2
NS3 PRO 0071	14 μ M	37 μ M	3
NS3 PRO 0078	2.7 μ M	233 μ M	86
NS3 PRO 0084	23 μ M	149 μ M	4

EC₅₀ : 50% effective concentration CC₅₀ : 50% cytotoxicity concentration
 SI : Selectivity Index (CC₅₀ / EC₅₀)

I-図1 NS3 protease 阻害剤候補化合物 #10 による JFH-1 ウイルス抑制効果
 NS3 PRO #10 を希釈し、Huh7.5.1 細胞に加え、JFH-1 ウイルスを感染させた。ウイルス量は、Core タンパク量を ELISA 法にて測定した。



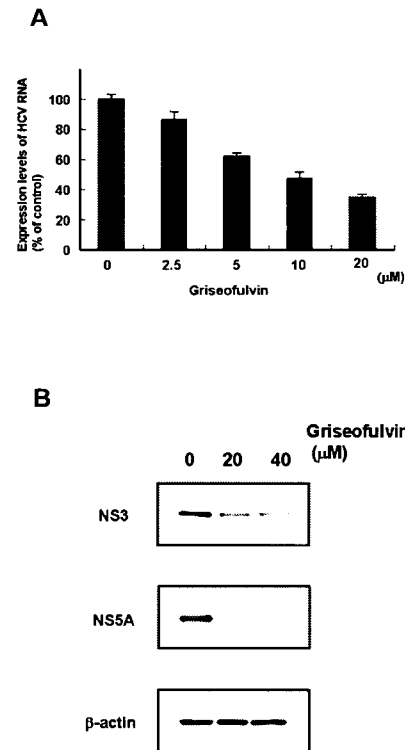
II-表1 経口抗真菌剤によるHCV増殖抑制効果

	EC ₅₀ ^a (μ M)	CC ₅₀ ^b (μ M)	SI ^c
Griseofulvin	6.13 \pm 0.17	217.93 \pm 3.49	35.5
Fluconazole	135.6 \pm 1.25	159.06 \pm 1.07	1.2
Itraconazole	1.24 \pm 0.21	3.35 \pm 0.17	2.7

a. Fifty percent effective concentration based on the inhibition of HCV replication.
 b. Fifty percent cytotoxicity concentration based on the reduction of cell viability.
 c. Selectivity Index (CC₅₀ / EC₅₀).

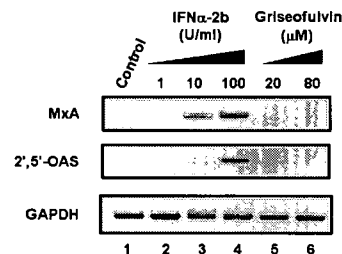
II-図1

Real-Time RT-PCR 及び Western Blot 法を用いた Griseofulvin の HCV 増殖抑制効果の確認 (HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo) (A) Griseofulvin を、2.5 μ M~20 μ M の濃度にし、72 時間培養後、Real-Time RT-PCRを用いて RNA 量の定量を行った。(B) Griseofulvin を 20 μ M および 40 μ M の濃度にし、72 時間培養後、抗 NS3 抗体、抗 NS5A 抗体を用いた Western Blot 法によりウイルスタンパク量の定量を行った。



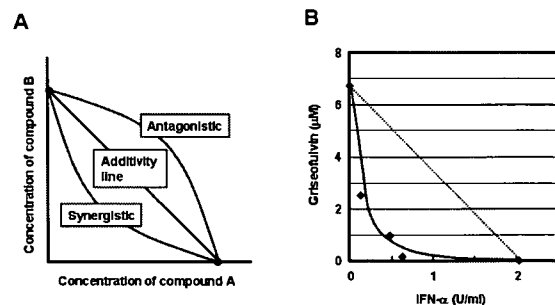
II-図2

Griseofulvin は Interferon の誘導をしない
 1, 10, 100 U/ml IFN α -2b (lane 2~4)
 20, 80 μ M griseofulvin (lane 5, 6)
 MxA (upper panel), 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2', 5'-OAS) (middle panel), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (lower panel)は、RT-PCR 法にて確認を行った。



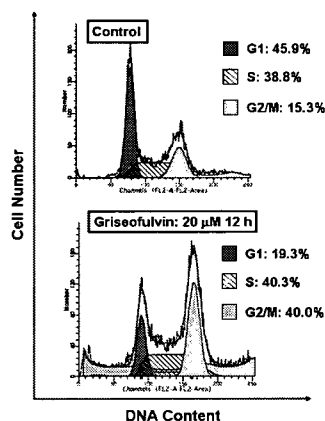
II-図3

HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo における griseofulvin と IFN- α の相乗作用 (A) 2 種の薬剤を混合したときの Isobologram の例 (B) griseofulvin と IFN- α を混合した時の Isobole plot



II-図4

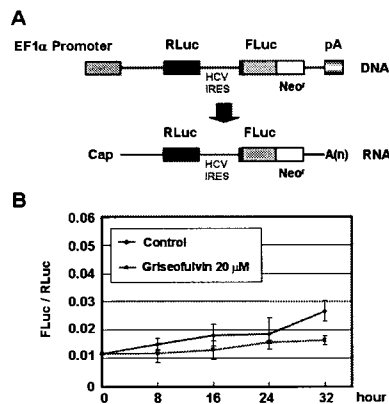
HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo における griseofulvin の G2/M arrest の誘導
未処理の Huh7/Rep-Feo の細胞周期 (Control) griseofulvin 20uM 12 時間処理した時の細胞周期



II-図5

Griseofulvin は HCV IRES の翻訳活性に影響を及ぼさない

(A) pEF-Rluc-HCV IRES Feo. の構造
Renilla luciferase は Cap 依存的に翻訳され、firefly luciferase は HCV IRES 依存的に翻訳される。(B) pEF-Rluc-HCV IRES Feo. が導入された Huh7 細胞の未処理の状態 (Control) と griseofulvin 20uM 処理して 8 時間おきに回収し、Renilla luciferase および Firefly luciferase の活性を測定。その比を求めた。

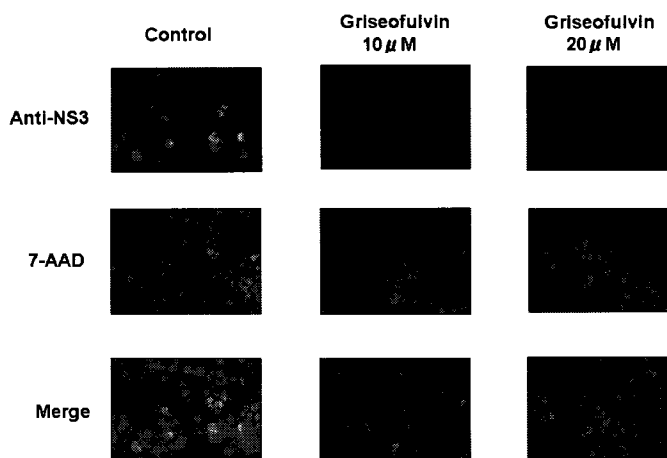


II-図6

Griseofulvin の JFH-1 増殖抑制効果

Griseofulvin を 10uM および 20uM の濃度にし、72 時間培養後、抗 NS3 抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法によりウイルスタンパク量の定量を行った。

7-AAD は対比染色として核の染色に用いた。



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

分担研究者 松本 武久 独立行政法人理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター
タンパク質基盤研究グループ 上級研究員

研究要旨;既存の治療に耐性のHCVに対しても有効な新規薬剤で、且つC型肝炎患者に経済的負担を強いる高価なインターフェロンに代わる安価な低分子化合物薬を開発することを目標とする。HCVのNS3プロテアーゼタンパク質を薬剤標的にして、その活性ポケット部位の立体構造情報に基づいて、コンピューター上(*in silico*)でプロテアーゼ活性部位に結合する化合物を探索し、細胞毒性が低く、NS3プロテアーゼ活性とHCV subgenomic replicon 増殖の両方を強く阻害する化合物を同定したのち、更に最適化するための薬剤設計を実施した。

A. 研究目的

HCV 治療においてはインターフェロン・リバビリン併用療法の導入により、3分の2の患者ではウイルスの完全排除が可能となったが、インターフェロン・リバビリン治療抵抗性HCV感染により、治療中にまったくウイルスが消失しないか、あるいは治療中・治療後にウイルスが再出現する患者が多数存在する。従って、本研究では既存治療に耐性の肝炎ウイルスに対しても有効な新規治療薬を開発する。

B. 研究方法

これまでに理研ではHCVのNS3プロテアーゼタンパク質を薬剤標的にして、その活性ポケット部位の立体構造情報に基づいて、コンピューター上(*in silico*)で活性部位に結合する化合物を探索した。遺伝子組換え大腸菌で合成させたNS4A-NS3 protease ドメイン融合タンパク質と消光性蛍光標識ペプチド基質を用いたNS3プロテアーゼ阻害活性アッセイ系を組み立て、*in silico*スクリーニングで選ばれてきた化合物のHCV NS3プロテアーゼ阻害活性を評価してきた。本研究開始前までに、100 μ M 濃度で、NS3プロテアーゼ活性を50%以上阻害する化合物が27種類判明していた。山梨大が実施したHCV

subgenomic replicon assay および細胞毒性試験の結果とも照らし合わせ、ヒット化合物を絞り込み、さらにこれらのヒット化合物の構造類縁体のNS3プロテアーゼ活性に対する阻害効果を評価し、HCV subgenomic replicon 増殖阻害活性および細胞毒性試験の結果と照らし合わせた。

(倫理面への配慮)
該当せず

C. 研究結果

本研究開始前の予備的研究でヒットした27化合物のうち、HCV subgenomic replicon 増殖阻害活性および細胞毒性を参照して、7種類の化合物(NS3 PRO-0010, -28, -0032, -67, -71, -78, -0084)には細胞毒性が低く、NS3プロテアーゼ活性とHCV subgenomic replicon 増殖の両方を強く阻害することが判明した。これら7種類の化合物のうち、最も有効なNS3 PRO-0032, -0084の構造類縁体をデータベースから探索した。そのうち市販されている172種類の化合物を調達し、NS3プロテアーゼ活性に対する化合物の阻害効果を評価したところ、19種類の化合物に80%以上の阻害活性があることが判明した。HCV subgenomic replicon 増殖阻害活性および細胞毒

性とも照らし合わせると、NS3 PRO-0032 と NS3 PRO-0084 の共通の構造類縁体である NS3 PRO-3284-53 が最も期待できる化合物であることが判明した。

E. 結論

HCV の NS3 プロテアーゼタンパク質を薬剤標的にした HCV 治療薬候補化合物候補として NS3 PRO-3284-53 を同定した。本化合物と NS3 プロテアーゼタンパク質とのバーチャル結合様式から本化合物をさらに最適化するための設計を実施し、5 種類の新たな化合物を合成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし