

20083/007A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：榎本信幸

平成21（2009）年3月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：榎本信幸

平成21（2009）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	----- 13
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	----- 21
3. 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	朝比奈靖浩	----- 23
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	----- 25
5. マウスモデルによるB型慢性肝炎の病態解析	中本 安成	----- 28
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	----- 30
7. 培養細胞系による薬剤耐性肝炎ウイルスの解析	鈴木 哲朗	----- 35
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	----- 40
9. HCV感染におけるインターフェロン応答を抑制する機構の宿主側因子	中川 美奈	----- 44
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	----- 46
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	----- 49
12. HBV、HCV全塩基配列に基づく薬剤耐性機序に関する研究	横須賀 収	----- 55
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 59
IV. 研究成果の刊行物・別刷		----- 81

I. 総括研究報告

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）
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 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、宿主側因子として自然免疫・インターフェロン系分子の解析、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 についてはペグインターフェロン・リバビリン治療中のウイルス動態と HCV 全遺伝子のゲノムワイド解析を行い、ウイルスの早期消失に関連するのは NS5A 内の ISDR を中心とした領域であることを証明した。また、最終的なウイルス排除には NS5A 末端領域(IRRDR)の変異が関与することが示唆された。一方、ウイルスの減少率が低い場合は core 蛋白の 70 番アミノ酸の変異と強い相関があることを明らかとし、その高感度検出法の開発を行った。治療抵抗性の宿主因子としては培養系において自然免疫系の IPS-1 を HCV-NS4B 蛋白が抑制すること、臨床検体においても RIG-I/IPS-1 発現変動が治療抵抗性に関与することを示した。次世代の治療薬である NS3 プロテアーゼ阻害剤については培養系、感染マウス系および臨床検体を用いて耐性変異の解析を行った。*In silico* screening により NS3/4A プロテアーゼおよび NS2/3 プロテアーゼ阻害物質の同定を行い、その活性を培養系により検証した。HBV については核酸アナログ耐性変異の出現に関与する HBV ゲノム領域の探索により preS 領域にその候補を同定した。また HBV による病変進展には慢性炎症に伴う酸化ストレスの亢進が重要な役割を担うことを明らかとした。以上、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。これらの成果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期待される。

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、宿主の自然免疫・インターフェロン系分子の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析した。

● 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およびHBV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。多数の治療症例の全HCV遺伝子の決定を行い、治療中のウイルス動態に関連するウイルス遺伝子領域を網羅的に同定するため、単一アミノ酸変異の解析はFisher検定により、連続アミノ酸領域の変異数の検定にはsliding window analysisを用いて解析を行った。その結果、まず、RVRに関与するのはISDR内の単一アミノ酸変異およびISDR周辺領域のアミノ酸変異数であることが証明された。同様の傾向は治療開始8週目までの早期ウイルス消失に関与する変異の探索でも認められた。すなわち、ウイルスの治療感受性を担うのはISDRであることがウイルス全遺伝子の網羅的探索により証明された。一方、治療開始12週でもウイルス量の2 log以上の減少の得られない、いわゆるnon EVRに関与する変異はコア蛋白70番の変異が唯一のものであることが示された。すなわち、HCVのPeginterferon/Ribavirin抵抗性はコア蛋白70番変異により担われており、HCVの治療反応性はISDRとcoreの2つの遺伝子領域により決定されていることが解明

された。この結果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、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については、PEG-IFN/RBV 併用療法に抵抗する症例では治療前の肝内 ISG15、USP18RIG-I 発現が亢進していたが、IPS-1 発現は反対にウイルス排除が得られる症例で高値であることを見出し、ISG15/USP18 および RIG-I/IPS-1 系の発現を解析することで PEG-IFN/RBV 併用療法の難要因の機序の解明と治療効果予測が可能と考えられた(朝比奈)。

● HCV の薬剤耐性機構の基礎的検討

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、その作用エピトープが NS4B の N 末端よりのドメインであることを見出した。HCV 培養系において IFN 誘導遺伝子である GBP-1、IFI27、IFI6-16 が HCV 増殖を特異的に抑制すること、GBP1 と NS5B 蛋白が特異的に結合すること、またその結合エピトープを含むドメインを特定した(中川)。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検討、HCV RNA の遺伝的変異速度は RNA 複製に必須な領域である非構造タンパク質領域では低く、それ以外では高まっていること、長期培養により HCV RNA の GC 含量が増加すること、IFN 抵抗性を示す細胞から得られた HCV ゲノムは、遺伝的系統樹内で一つのクラスターを形成することを見出した。(加藤宣之)。また、HCV JFH-1 株持続感染

細胞を NS3 セリンプロテアーゼ阻害剤 BILN2061 存在下で長期間培養、BILN2061 存在下で約3ヶ月間培養することにより BILN2061 に対して耐性化することを見出した。耐性細胞中の HCV 遺伝子配列を解析した結果、NS3 領域に2カ所のアミノ酸変化を伴う特徴的な変異(V71A、K122R)が見出され、各変異を導入した HCV ゲノム(JFH1V71A、JFH1K122R、JFH1V71AK122R)を作製し変異ウイルスを得た。各ウイルスの感染細胞について BILN2061 による HCV 産生阻害作用を調べることで、各1カ所の変異で BILN2061 に対する感受性の低下傾向が見られ、両変異を有する場合、感受性低下は最も顕著であった。両変異が耐性獲得に重要であることが示唆された(鈴木哲朗)。C型慢性肝炎患者血清あるいは合成 HCV RNA を投与した HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに protease inhibitor, telaprevir を経口投与、患者血清を用いた HCV 感染マウスにおいて telaprevir は著明な抗ウイルス効果を示したが、投与早期に耐性株が出現した。IFN- α と併用することにより、より強い抗ウイルス効果および耐性株出現の抑制効果を認めた。耐性型クローンを投与したマウスでは、野生型クローンを投与したマウスに比べ、血中 HCV RNA は低値であり、耐性株は増殖能が低いことが示唆された。野生株感染マウスでは telaprevir の投与により血中 HCV RNA は低下したが、耐性株感染マウスでは、血中 HCV RNA の低下はわずかのみであった。これらのシステムを用いることにより、患者血中に出現した変異株の増殖能および薬剤耐性の評価が可能であると思われた(今村)。

● 薬剤耐性 HBV の病態解明および検出法開発

エンテカビル耐性ウイルスは HBV ポリメラーゼ領域内の reverse transcriptase(rt)領域の rt184, rt202, rt250 に認められる。これらの変異を検出するために Invader assay による測定系を作成、この測定系を使用してエンテカビル耐性ウイルスの出現を確認している 10 例の血清で検討した。耐性ウイルスのタイプは rtS202G が 5 例、rtT184A/L/F が 5 例であった。Invader assay にて全症例で耐性ウイルスが検出され、PCR-direct sequence での測定時期よりも平均 6、4 ヶ月早期に検出された (鈴木文孝)。一方、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、前がん状態において前初期遺伝子を含めた転写に関わる一群の発現が亢進していた。また、同時期の免疫組織学的検討において、慢性炎症に伴う酸化ストレス (iNOS, 8-ニトログアニン) が亢進していることが観察され、肝がん発生に至る過程で変化する分子病態についての機能的役割が示唆された。(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 NS3/4A プロテアーゼ活性阻害剤候補化合物の中からは、細胞毒性が低く、NS3/4A プロテアーゼ活性と HCV subgenome 複製の両方を強く阻害する化合物を同定、更に最適化するための薬剤設計を実施した。一方、NS2/3 プロテアーゼタンパク質の発現条件ならびに巻き戻し条件を検討した (松本、伊藤)。

D. 考察

● 本年度は、昨年度に引き続き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、Peginterferon /Ribavirin 併用療法においては治療初期の急速なウイルス量の減少が NS5A-ISDR 変異により規定される一方、ウイルス量の減少の見られない、いわゆる null response には core 蛋白 70 番アミノ酸の変異が関与していることが明らかとなった。(榎本)。すなわち、HCV の治療反応性はこの 2 つの遺伝子領域の変異の組み合わせにより規定され、ISDR に変異がなく core 蛋白 70 番アミノ酸に変異を持つ HCV は高度に治療抵抗性となる。一方、治療反応性が中程度の HCV において、治療効果を規定している明確なウイルス側因子は依然として明らかではなく、今後さらなる検討が必要である。

● 横須賀らの検討でも SVR 例と NR 例の全塩基配列の比較により、SVR と関連する遺伝子変異部位として、従来報告されていた Core 70R、91L 以外の新たな部位は抽出できていない。Core の DW と ISDR ≥ 2 を組み合わせることにより、SVR の予測に有用であることが示され、今後は、これらの遺伝子変異が何故ウイルス学的反応性と関連するのか、インターフェロンシグナル伝達系や免疫シグナル伝達系に及ぼす影響を検討する必要がある。実際、加藤直也らは HCV コア aa70 変異の高感度定量法を開発、野生型と変異型の両者を有する患者において、その治療中の動態を解析したところ、ペグインターフェロン+リバビリン治療により、野生型、変異型の両者共に減少したが、減少率は野生型に対し、変異型でより大きく、変異型 HCV がペグインターフェロン+リバビリン治療により耐性であるという結論は得られず更なる検討が必要と考えられた。

● 同様に鈴木文孝らの検討でもこのうちウイルス側因子としての ISDR と HCV core 領域の 70 番目と 91 番目のアミノ酸置換は genotype 1b、高ウイルス量症例に対する PEG-IFN と RBV 併用療法 48 週間投与の治療効果予測に関係する重要な因子となっていた。また NVR においても Core 領域のアミノ酸置換は重要な因子であった。さらに重要なことは Telaprevir (MP-424) と PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間投与の抗ウイルス効果は高く特に naïve 例では中止例を含めても陰性化が持続している症例が多く、Core 領域のアミノ酸置換との関係でも double-wild の方がウイルス量の低下がより得られていた点であり、今後の protease inhibitor 治療においても本研究の明らかとした HCV 遺伝子変異が治療効果を規定する可能性があることが示唆された。

● 堀田らは従来の ISDR に加えて NS5A 末端に IRRDR という新たな Peginterferon/ribavirin 療法に対する抵抗性を規定する領域を同定した。IRRDR・6 は Peginterferon/ribavirin 併用療法開始 1 日後〜4 週間後という非常に早期のウイルス量の減少と相関しており抗ウイルス効果と相関している可能性が示唆され、IRRDR についても今後のより詳細な解析が必要と考えられた。

● Peginterferon/Ribavirin 抵抗性のウイルス学的解析として、加藤宣之らは 2 年間の interferon 存在下の培養により得られた HCV RNA の塩基配列の解析の結果、O2r 細胞内から得られた HCV RNA は解析した NS 領域については HCV クローン間でかなり均一化していることが分かった。この結果は、

HCV RNA というより O2r 細胞が均一化している可能性も考えられることから、O2 細胞や O2r 細胞から HCV RNA を排除したいわゆる治療細胞を作成して IFN のシグナル伝達における効率に違いがないかどうかを調べる必要がある。それと並行して今回の解析では行っていない HCV RNA の前半部 (5kb) についての遺伝子解析および、O2 細胞や O2r 細胞から total RNA を抽出して、O2 や O2r の治療細胞に導入することにより再度全長 HCV RNA 複製細胞を作成して、それらの IFN 感受性に差が出るかどうかの検討も今後必要と考えられた。一方、Protease 阻害剤に対する耐性機構に関して、鈴木哲朗らは培養系により耐性 HCV を作成、そのゲノムを解析にすることにより新たなアミノ酸変異を同定、HCV 持続感染細胞系が薬剤耐性ウイルスの解析に有用であることを示した。

● 治療抵抗性の宿主因子の検討として、朝比奈らは自然免疫系に注目し併用療法に抵抗する症例では治療前の肝内 ISG15、USP18RIG-I 発現が亢進していたが、IPS-1 発現はウイルス排除が得られる症例で高値であり、治療に抵抗する難治例では内因性 IFN の up-regulation が起こっていると考えられた。本現象がウイルス変異などのウイルス側因子に関わっているか否かは今後の検討課題である。また、中川らは IFN 発現応答の抑制蛋白として NS34A 以外に NS4B が同定、その標的蛋白・作用エピトープを特定することは新規クラスの抗ウイルス療法剤の開発につながることを期待された。

● 治療抵抗性肝炎の動物モデルとして、今村らはヒト肝細胞キメラマウスを用いて telaprevir の抗 HCV 効果の検討、telaprevir の単独投与は著明な抗ウイルス効果を示すが

投与早期に耐性株が出現することを動物モデルでも明らかとした。IFN- α と併用することにより、より強い抗ウイルス効果を認め、耐性株の出現も抑制することが可能であり、HCVクローンを用いることにより、変異株の増殖能および薬剤耐性能の検討も可能であることを示し、今後の Protease 阻害剤耐性機構の研究の基盤を確立した。また、中本らは HBV 持続感染モデルマウスを用い、慢性肝炎からがん化に至る経過において、酸化ストレスの蓄積として反映される発がんポテンシャルの亢進と遺伝子発現プロファイルの相対的關係を明らかとした。特に、肝炎後期に注目した解析において、この時期に遺伝子の変動が顕著となり酸化ストレスが亢進することが明らかとなった。この時期は組織学的に前がん状態と考えられることから、検討結果はがん化に先行する時期の分子病態の特徴とその機能的役割を示唆するものと考えられた。

● 伊藤、松本らは *in silico* screening による HCV プロテアーゼ阻害物質の探索をさらに進展させ、細胞毒性が低く、NS3/4A プロテアーゼ活性と HCV subgenome 複製の両方を強く阻害する化合物を同定した。しかし、バーチャルドッキングスタディに限界もあることから今後は候補化合物 NS3 PRO-3284-53 と NS3/4A プロテアーゼタンパク質との複合体の結晶化とその立体構造の解析をすることによってその情報に基づいて NS3 PRO-3284-53 の構造最適化をする必要があることが考えられた。

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自然免疫系をはじめとする種々の宿主因子が重要な

役割を持つことを明らかとした。特に HCV コア蛋白および NS5A 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

G. 研究発表

著書

榎本信幸. C 型肝炎 正しい治療がわかる本
研友企画出版 2008.8.17

松井 啓, 榎本信幸. からだと水の辞典 3.
病気と水代謝 3.9 肝硬変. 286-293 朝倉書店 2008

北村敬利, 榎本信幸. 25 ウイルス肝炎 病期・病態・重症度からみた 疾患別看護過程+病態関連図 医学書院 461-469, 2008

原著

Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N.

The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy.

J Hepatol. 2008 May;48(5):736-42.
Epub 2008 Feb 26.

Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto

N, Enomoto N, Ito M

Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro.

Hepatol Res. 2008 Sep;38(9):909-18.

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. 2008 Sep; 23(9):1437-47. Epub 2007 Aug 7

Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S.

Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response.

Gastroenterology. 2008 May;134(5): 1396-405. Epub 2008 Feb 1

Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M.

wo flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro

hepatitis C virus replication.

Hepatol Res. 2009 Jan;39(1):60-9. Epub 2008 Jul 20.

北村敬利, 榎本信幸. ウイルス肝炎からの発癌の早期発見 イメージ戦略—最新鋭の肝癌画像診断—. Medical Practice 25(10): 1819-1824, 2008

前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸. Hepatitis Virus Genome Wide Analysis. 肝疾患 Review 2008-2009 92-97, 2008

三浦美香, 井上泰輔, 榎本信幸. 各種疾患の病態と輸液 69.肝不全の輸液. 胃と透析 2007 臨時増刊号 383-388, 2008

三浦美香, 前川伸哉, 榎本信幸. 新しい治療 C 型肝炎に対するプロテアーゼインヒビターとポリメラーゼインヒビター治療. 治療学 42(1): 91-93, 2008

北村敬利, 市川智昭, 相川良人, 佐野芳知, 榎本信幸, 荒木 力. 術前画像診断と Navigation Surgery 2.Navigation Surgery に役立つ新しい画像診断法. 日本外科学会雑誌 109(2), 65-70, 2008

坂本 穰, 榎本信幸. 特集II 高齢者 C 型慢性肝炎に対する治療のあり方 ISDR からみた高齢者の C 型慢性肝炎に対する治療法. 消化器科 46(4): 464-469, 2008 /05/12

坂本穰, 榎本信幸. 特集 C 型肝炎のすべて・2009 Interferon sensitivity determining region: ISDR. 肝胆膵 57 (5) : 773-779, 2008.11

坂本穰, 榎本信幸. 特集 日本におけるC型肝炎治療のコンセンサス 5. ISDR により治療効果はどう変わるか? Progress in Medicine 28(11): 2647- 2651, 2008.11

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): 422-428, 2008

論文解説

山口達也, 高野伸一, 榎本信幸. ①BRCA2 の遺伝子内欠失によって生じる治療抵抗性 (Edwards SL, Brough R, Lord CR et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. Nature 451: 1111-1115, 2008/06/20) ②BRCA2 変異癌でのシスプラチン耐性の機序の一つは二次変異である (Sakai W, Swisher EM, Karlan BY et al, Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2- mutated cancers. Nature 451: 1116-1120, 2008)

学会発表

1) 前川伸哉, 榎本信幸. HCV 遺伝子構造による自然免疫 RIG-I 経路阻害活性の検討. 第 94 回日本消化器病学会(シンポジウム) 2008.5.8 福岡
2) 坂本 穰, 前川伸哉, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 岡田俊一, 榎本信幸. ISDR とコア領域のアミノ酸変異による PEG-IFN/Ribavirin 併用療法の治療効果予測. 第 94 回日本消化器病学会 2008.5.9 福岡
3) 津久井雄也, 井上泰輔, 植竹智義, 横田雄大, 三浦美香, 雨宮史武, 高野伸一, 北村敬利, 坂本 穰, 大塚博之, 岡田俊一, 佐藤 公, 榎本信幸. 門脈血流シャントを伴う肝性脳症に対

する B-RTO が有用であった 2 例. 第 42 回日本消化器病学会甲信越支部例会 2008.5.17 新潟

4) 井上泰輔, 岡田俊一, 北村敬利, 雨宮史武, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 当科における進行肝細胞癌に対するリザーバー動注化学療法 of 検討. 第 44 回日本肝癌研究会 (ポスター) 2008.5.22 大阪

5) 北村敬利, 山本健夫, 岡田俊一, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 浅川真巳, 松田政徳, 藤井秀樹, 榎本信幸. C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療著効後 6 年に発症した混合型肝癌の一例. 第 44 回日本肝癌研究会 (ポスター) 2008.5.22 大阪

6) 北村敬利, 岡田俊一, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 大西 洋, 荒木 力, 榎本信幸. 定位的放射線治療により根治で来た肝細胞癌の 2 例. 第 44 回日本肝癌研究会 (ポスター) 2008.5.22 大阪

7) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異からみた C 型慢性肝炎に対する治療方針. 第 44 回日本肝臓学会総会(シンポジウム) 2008.6.5 愛媛

8) 中西裕之, 土谷 薫, 朝比奈靖浩, 佐藤光明, 田中智大, 小松信俊, 梅田尚季, 上田 研, 板倉 潤, 高橋有香, 黒崎雅之, 榎本信幸, 泉並木. 肝細胞癌に対する Realtime virtual sonography(RVS)下 RFA と Sonazoid 造影超音波下 RFA の有用性の比較. 第 44 回日本肝臓学会総会 2008.6.5 愛媛

9) 小松信俊, 朝比奈靖浩, 佐藤光明, 田中智大, 平山慈子, 安井 豊, 梅田尚季, 細川貴範, 上田 研, 土谷 薫, 中西裕之, 板倉 潤, 黒崎雅之, 前川伸哉, 榎本信幸. C 型慢性肝炎に対する PEG-interferon /ribavirin 投与中の viral breakthrough に関する全長 HCV 遺伝子変異の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会 (ポスター) 2008.6.5 愛媛

10) 岡田俊一, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 原発性胆汁性肝硬変の長期予測について. 第 44 回日本肝臓学会総会(ボスター) 2008.6.6 愛媛

11) 前川伸哉, 金山明日香, 宮崎千賀子, 雨宮史武, 松井 啓, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCV 全ゲノム検索によるペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療感受性規定領域の決定. 第 44 回日本肝臓学会総会(ワークショップ) 2008.6.6 愛媛

12) 北村敬利, 市川智章, 鈴木響子, 佐野勝廣, 曹 博信, 熊谷博司, 榎本信幸, 荒木 力. ガドキセト酸ナトリウム(Gd-EOB-DTPA)造影 MRI による肝臓体積測定 of 初期検討. 第 36 回日本磁気共鳴医学大会 2008.9.11 旭川

13) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異からみた C 型慢性肝炎の治療法. JDDW2008(第 50 回日本消化器病学会大会 シンポジウム) 2008.10.1 東京

14) 雨宮史武, 坂本 穰, 榎本信幸. 多発肝転移を伴った原発不明腺様嚢胞癌の一例. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 ワークショップ) 2008.10.1 東京

15) 雨宮史武, 金山明日香, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 前川伸哉, 榎本信幸. 細胞内脂質と HCV 増殖の関連性. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 秀逸ボスター) 2008.10.1 東京

16) 井上泰輔, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. B 型慢性肝炎に対するエンテカビル療法の検討. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 ボスター) 2008.10.1 東京

17) 坂本 穰. Y-PERS が明らかにした PEG-IFN α 2b+Ribavirin 併用療法における ISDR と Core 領域変異による治療効果予測因子. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 サ

ライトシンポジウム) 2008.10.1 東京

18) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. Whole HCV genome sequencing による治療感受性規定領域の検索. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 ワークショップ) 2008.10.2 東京

19) 坂本 穰, 井上泰輔, 榎本信幸. 遺伝子変異からみた 1b 型の C 型慢性肝炎に対するインターフェロンのテーラーメイド治療の可能性. JDDW2008(第 50 回日本消化器病学会大会 シンポジウム) 2008.10.2 東京

20) 津久井雄也, 北村敬利, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 大西 洋, 荒木 力, 榎本信幸. 定位放射線治療を行った肝細胞癌の 4 例. 第 43 回日本消化器病学会甲信越支部例会 第 65 回日本消化器内視鏡学会甲信越地方会 2008.11.16 新潟

21) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主因子を考慮した PEG-IFN/Ribavirin 療法の個別化治療. 第 37 回日本肝臓学会東部会 2008.12.4 東京

22) 北村敬利, 佐野勝廣, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 市川智章, 荒木 力, 榎本信幸. Gd-EOB-DTPA による肝細胞癌の血流診断. 第 37 回日本肝臓学会東部会 2008.12.4 東京

23) 雨宮史武, 北村敬利, 岡田俊一, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 浅川真己, 松田政徳, 藤井秀樹, 佐野勝廣, 市川智章, 荒木 力, 榎本信幸. Gd-EOB-DTPA 造影 MR 検査の肝臓診療に与えるインパクト CTAP/CTHA で検出できない肝細胞相で染まる結節・抜ける結節. 第 37 回日本肝臓学会東部会 2008.12.4 東京

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?—ベ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, 箆島裕子, 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, 箆島裕子, 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, 箆島裕子, 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) 箆島裕子, 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, 箆島裕子, 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) In silico screening system を用いて選び出した NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物のうちの一つが、いくつかの異なった株の1b型 HCV レプリコン及び感染性ウイルス JFH-1 に対して抑制効果を示した。
- 2) 抗癌剤 Taxol/Paclitaxel に、HCV RNA 増殖抑制効果があることを見出した。

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 型ウイルスレプリコン細胞は、HCV-N 株、HCV-O 株および HCV-Con1 株由来の subgenomic replicon 細胞、また HCV-O 株由来の full genome replicon 細胞を用いた。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、ルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。

感染性 HCV JFH-1 については、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、Core 抗原 ELISA 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(昨年度報告済み)。本年度は、その中で、NS3 PRO #10 とした化合物の抗 HCV 作用について、更に、詳細な解析を進めた。

Genotype 1b 型 N 株由来の subgenomic replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo 細胞では、NS3 PRO #10 の EC50 は $7.21 \pm 0.23 \mu\text{M}$ 、CC50 は $137 \pm 5.82 \mu\text{M}$ 、その Selectivity Index は 19 であった(I-表 1)。次に、NS3 PRO #10 処理によるウイルスのタンパクの量的変化についても検討を行ったところ、Huh7/Rep-Feo 細胞においてウイルスタンパク量の減少が見られた(I-図1)。更に、NS3 PRO #10 が Luciferase の活性を抑制するかについて検討を行ったところ、その抑制活性は見られなかった(I-図2)。

NS3 PRO #10 の HCV 複製・増殖抑制効果のメカニズムを検討するために、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(I-図3)。

Genotype 1b 型の他の株(O 株および Con1 株)の subgenomic replicon 細胞および Full genome replicon 細胞を用いて、NS3 PRO #10 の HCV 複製・増殖抑制効果を検討した。その結果、Huh7/Rep-Feo 細胞とほぼ同等の抑制活性が見られた。更に、HCV 感染ウイル

スである JFH-1 でも抑制活性が見られるかについて検討を行ったところ、EC50 が $5.7 \mu\text{M}$ の抑制効果を示した(I-図4)。

2). 抗癌剤 Taxol/Paclitaxel による HCV 増殖抑制効果

昨年度、抗真菌剤 Griseofulvin が、抗 HCV 効果を有することを報告した。その作用機序については、細胞の微小管重合の阻害によるものと推定した。そこで、本年度は、微小管重合の阻害する他の化合物について、HCV 抑制活性の有無について検討したところ、Taxol/Paclitaxel が抗 HCV 抑制活性を有することが判った。具体的には、Huh7/Rep-Feo 細胞において、EC50 が $5.99 \pm 1.04 \text{ nM}$ 、CC50 が $26.99 \pm 2.99 \mu\text{M}$ 、その Selectivity Index は 4506 であった(II-表 1)。次に、Taxol / Paclitaxel 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、Taxol/Paclitaxel 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)。

Taxol/Paclitaxel は、Griseofulvin 同様、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 細胞も Taxol/Paclitaxel 処理により、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3)。更に、G2/M 期に arrest することが、HCV の複製・増殖を抑制に関与するかについて、作用機序の異なる薬剤で比較検討を行った。

ZM4474395 は、Aurora kinase の阻害剤であり、細胞を G2/M 期に arrest する。この薬剤で Huh7/Rep-Feo 細胞を処理したところ、G2/M 期に arrest した。その際、HCV の複製・増殖は抑制しなかった(II-図3)。従って、HCV の複製・増殖抑制と細胞が G2/M 期に arrest することは関連性がないことが示唆された。

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

今年度の研究で、NS3 PRO # 10は、1b型の数株の replicon と 2a 型の JFH-1 抑制効果を示す化合物であることが判明した。その抑制効果は、EC50 が 7-14 μ M と強いものではない。しかし、現在、治療薬として使われようとしている Telaprevir (VX 950) のレプリコン細胞での EC50 は 1 μ M くらいであることから、治療薬開発のためのリード化合物を見つけないという現段階においては、研究は前進しているものと考えられる。

2). 抗真菌剤 Griseofulvin による HCV 増殖抑制効果

昨年度、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ことを報告した。その抑制効果の機序は、微小管の重合を阻害することであることが示唆された。そこで、本年度は、このことについて更なる確証を得るために、微小管の構造変化を与える抗癌剤 Taxol/Paclitaxel が HCV の複製・増殖を抑制するか否かについて検討を行った。その結果、Selectivity Index は 4506 であり、強い抑制効果を示すことが判った。更に、その抑制機序は、Aurora kinase の阻害剤 ZM4474395 との比較実験から、G2/M 期に arrest することとは関連性がないということの更

なる確証が得られた。今後は、微小管の構造とウイルスの複製・増殖との関係について更なる検討を進めていく。

E. 結論

- 1). In silico screening system を用いて選び出した NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物のうちの NS3 PRO # 10としたものが、いくつかの異なった株の 1b 型 HCV レプリコン及び感染性ウイルス JFH-1 に対して抑制効果を示した。
- 2). 抗癌剤 Taxol/Paclitaxel が subgenomic replicon 細胞において HCV の増殖・増殖を抑制することを見出した。その作用機序は、細胞が G2/M 期に arrest とは関連性がないことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M.

Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro.

Hepatol Res. 38:909-18

Kawamura T, Koyanagi Y, Nakamura Y, Ogawa Y, Yamashita A, Iwamoto T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S.

Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV
J Immunol. 2008 180:3297-304

Tanabe F, Kasai H, He L, Kin T, Fujikado T,