

Kumamoto T, Hara T, Iwata T, Ito M.
Improvement of deficient natural killer activity
and delayed bactericidal activity by a thiol
proteinase inhibitor, E-64-d, in leukocytes
from Chediak-Higashi syndrome patients in
vitro.

Int Immunopharmacol. 2009 9:366-70.

2. 学会発表

山下篤哉、金浩範、前川伸哉、何麗敏、
高柳覚、脇田隆宇、榎本信幸、伊藤正彦
細胞骨格を標的とし C 型肝炎ウイルス増殖阻
害剤

第 18 回抗ウイルス療法研究会、鹿児島、平成
20 年 5 月

山下篤哉、松本武久、高谷大輔、
上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、
坂本直哉、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、
榎本信幸、伊藤正彦

In silico screening による HCV NS3 プロテアー
ゼ阻害化合物の検索

第 56 回 日本ウイルス学会、岡山、平成 20 年
10 月

高柳覚、山下篤哉、何麗敏、前川伸哉、
坂本直哉、山本直樹、榎本信幸、伊藤正彦
HIV-1 Protease inhibitor Ritonavir による C 型
肝炎ウイルスの増殖抑制効果とその機序の解
明

第 56 回 日本ウイルス学会、岡山、平成 20 年
10 月

性ホルモンと C 型肝炎病態進行のメカニズム
の解析

何麗敏、山下篤哉、金浩範、高柳覚、

前川伸哉、坂本直哉、榎本信幸、伊藤正彦
第 56 回 日本ウイルス学会、岡山、平成 20 年
10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

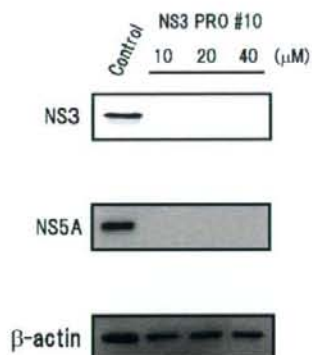
I-表1 Huh7/Rep-Feo細胞 (Genotype 1b HCV-N株)におけるNS3 PRO #10の抑制効果

	EC50(μ M)	CC50(μ M)	Selectivity Index
NS3 PRO #10	7.21 \pm 0.23	137 \pm 5.82	19.0

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

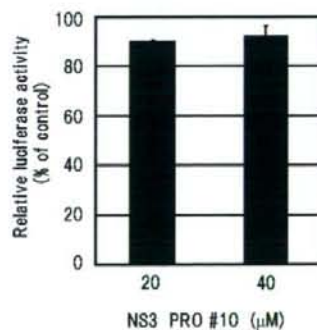
I-図1 Western Blot 法を用いた NS3 PRO #10 の HCV 増殖抑制効果の確認 (HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo)

NS3 PRO #10を10 μ M、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。



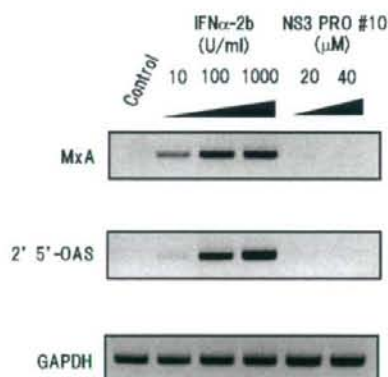
I-図2 NS3 PRO #10 は Luciferase 活性を抑制しない

pEF Fluc IN vector を stable に挿入した Huh7 細胞に、20 μ M および 40 μ M の濃度の NS3 PRO #10 を 72 時間処理後、Luciferase 活性を測定した。



1-図3 NS3 PRO #10 はInterferonの誘導をしない

10, 100, 1000 U/ml IFN α -2b (lane 2~4) 20, 40 μ M NS3 PRO #10 (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。

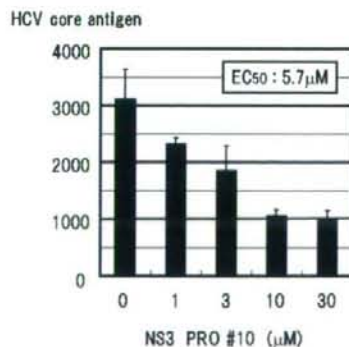


1-表2 様々なreplicon細胞におけるNS3 PRO #10の抑制効果

HCV strain (1b)	Replicon cells	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	SI
<u>Subgenome replicon</u>				
HCV-N	Huh7/Rep-Feo (Huh7)	7.21 \pm 0.23	137 \pm 5.82	19.0
Con1	Huh7 Lunet/Con1 LUN Sb #28 (Huh7 Lunet)	14.48 \pm 2.01	236.95 \pm 2.01	16.4
HCV-O	Huh7#94/ORN 3-5B #24 (Huh7 #94)	11.37 \pm 1.97	>300	> 26.0
<u>Full genome replicon</u>				
HCV-O	OR6 (Huh7 Oc)	13.36 \pm 1.15	174.94 \pm 0.22	13.0

1-図4 NS3 PRO #10 による JFH-1 ウィルス抑制効果

NS3 PRO #10 を希釈し、Huh7.5.1 細胞に加え、JFH-1 ウィルスを感染させた。ウィルス量は、Core タンパク量を ELISA 法にて測定した。

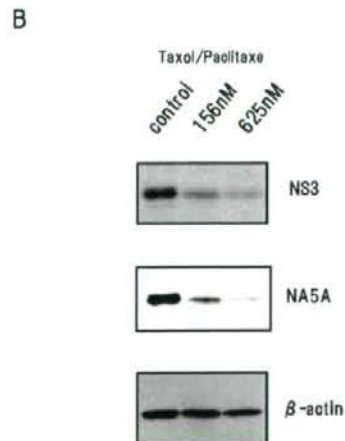
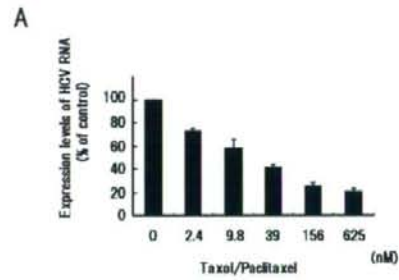


II-表1 Huh7/Rep-Feo細胞 (Genotype 1b HCV-N株)におけるTaxol/Paclitaxelの抑制効果

	EC ₅₀	CC ₅₀	SI
Taxol/Paclitaxel	5.99nM ± 1.04	26.99 μM ± 2.99	4506

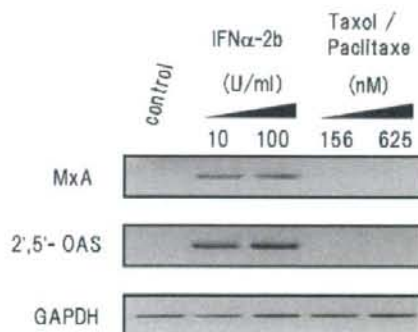
EC₅₀ : 50% effective concentration CC₅₀ : 50% cytotoxicity concentration
 SI : Selectivity Index (CC₅₀/ EC₅₀)

II-図1 Real-Time RT-PCR 及び Western Blot 法を用いた Taxol/Paclitaxel の HCV 増殖抑制効果の確認 (HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo) (A) Taxol/Paclitaxel を 2.4nM~625nM 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) Taxol/Paclitaxel を 156nM および 625nM 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。



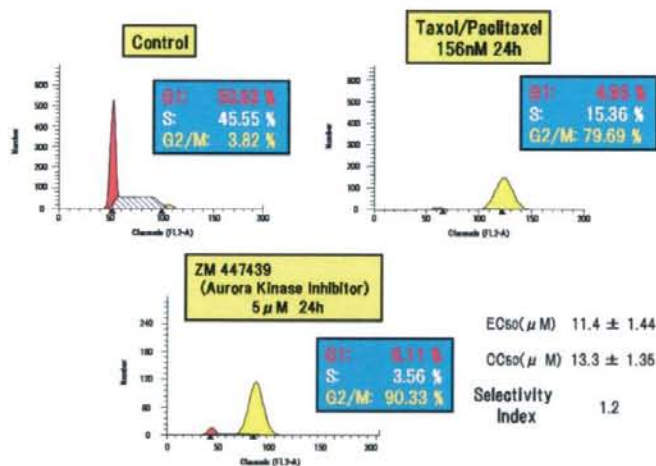
II-図2 Taxol/Paclitaxel は Interferon
の誘導をしない

10, 100 U/ml IFN α -2b (lane 2~3)
156, 625nM Taxol/Paclitaxel (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
Taxol /Paclitaxel の G2/M
arrest の誘導

未処理の Huh7/Rep-Feo の
細胞周期 (Control) Taxol
/Paclitaxel 156nM および
ZM4474395 24 時間処理し
た時の細胞周期



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

(主任又は分担) 研究者 松本 武久 独立行政法人 理化学研究所
生命分子システム基盤研究領域 システム研究チーム 上級研究員

研究要旨

HCVのNS3/4AプロテアーゼおよびNS2/3プロテアーゼを薬剤標的にして、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それぞれ探索した。*in silico*で選り出したNS3/4Aプロテアーゼ活性阻害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したのち、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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

HCVのNS3/4AプロテアーゼあるいはNS2/3プロテアーゼを薬剤標的にして、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アッセイ系を組み立て、*in silico*スクリーニングで選り出されたNS3/4Aプロテアーゼ活性阻害候補化合物を評価した。NS3/4Aプロテアーゼ活性阻害効果と山梨大が実施した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似体のNS3プロテアーゼ活性に対する阻害効果を評価し、HCV subgenome複製阻害活性および細胞毒性試験の結果と照らし合わせた。

NS2/3プロテアーゼタンパク質を大腸菌で発現させ、封入体を塩酸グアニジンで可溶化して精製した後、タンパク質の巻き戻し条件を検討した。

(倫理面への配慮)
該当せず

C. 研究結果

(1)前年度にヒット化合物の構造類似体のなかでNS3/4Aプロテアーゼ阻害活性とHCV subgenome複製阻害活性が高く、細胞毒性が低いNS3 PRO-3284-53と標的タンパク質とのバーチャルドッキングスタディから新たな類似体を設計し、4種類の化合物を新規に合成したが、これらの化合物のNS3プロテアーゼ阻害活性はNS3 PRO-3284-53と大差がなく、subgenome複製阻害活性は逆に低下した。また一次スクリーニングで細胞毒性が低く、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が、NS3 PRO-0032, NS3 PRO-0084とは母核構造がまったく異なる化合物NS3 PRO-0078の構造内に存在する臭素基を他のハロゲン基(塩素、フッ素)あるいは水素基に置換した類似体3種類を合成し、それらのNS3/4Aプロテアーゼ阻害活性を比較した結果、いずれの化合物にも際立った活性は見られなかった。

NS2/3プロテアーゼタンパク質(904-1206 a. a.)を大腸菌で大量に発現させ精製することに成功したが、プロテアーゼ活性を示すタンパク質の巻き戻し条件を得ることはできなかった。

E. 結論

バーチャルドッキングスタディからはNS3 PRO-3284-53およびNS3 PRO-0078のさらなる構造最適化はできなかった。

大腸菌で発現させたNS2/3プロテアーゼタンパク質の巻き戻し条件を得ることはできなかった。

*in silico*スクリーニングでNS2/3プロテアーゼ阻害候補化合物を探索し、構造類似性からクラスター分類して、そのクラスターごとに代表化合物を選り出し、56種類の化合物を入手した。

D. 考察

バーチャルドッキングスタディに限界があることから、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。また化合物のアッセイ系にそのまま利用することも考え、NS2/3プロテアーゼタンパク質の発現をセルフリータンパク質発現系を利用した合成条件を探索する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山下篤哉、松本武久、上條加寿恵、高谷大輔、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆字、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦「In silico screeningによるHCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索」第56回日本ウイルス学会学術集会 / 岡山. 2008年 10月. 発表形式: 一般(ワークショップ)

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

なし

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 朝比奈靖浩 武蔵野赤十字病院消化器科副部長

研究要旨：HCV 1b型におけるPEG-interferon (IFN)/ribavirin (RBV) 併用療法の約20%はnull responderで抵抗性を示す。しかし、本治療開始前における効果予測は困難で、また治療抵抗性の機序も不明である。HCV排除には自然免疫系の関与が重要で、RIG-I/IPS-1系やISG15/USP18制御系はウイルス排除機構に深く関与すると考えられるが、これらと抗ウイルス療法の治療効果との関連は不明で、ヒトにおける臨床的意義は解明されていない。今回臨床検体を用いてこれらとPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果との関連を検討し、PEG-IFN/RBV併用療法に抵抗する症例では治療前の肝内ISG15、USP18/RIG-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た。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。今後、自然免疫系を標的とした治療法の開発に有益な情報を与えるものと考えられる。

A. 研究目的

HCV 1b型におけるPEG-interferon (IFN)/ribavirin (RBV) 併用療法の約20%はnull responderで抵抗性を示す。しかし、本治療開始前における効果予測は困難で、また治療抵抗性の機序も不明である。HCV排除には自然免疫系の関与が重要だが、HCV感染は細胞内のRIG-Iによって探知され、IPS-1を介して自然免疫が作動する。また、ubiquitin様蛋白であるISG15はSTAT1やJak1と結合しIFNシグナル伝達を修飾する一方、USP18はISG15とその結合蛋白とを解離させることで抑制的に働く。これらin vitroの検討から、ISG15/USP18制御系やRIG-I/IPS-1系は、ウイルス排除機構に深く関与すると考えられるが、これらと抗ウイルス療法の治療効果との関連は不明で、ヒトにおける臨床的意義は解明されていない。今回臨床検体を用いて、これらとPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

PEG-IFN/RBV併用療法を施行した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎74例を対象とした。治療直前に肝生検を施行し、総RNAを抽出後RTD-PCRを用いて肝内ISG15、USP18、RIG-I及びIPS-1 mRNAの発現を、GAPDHを内部controlとして定量した。また、非HCV肝疾患についても同様に解析した。ウイルス学的治療効果は著効(SVR: n=30)、再燃(TR: n=24)及び治療中HCVが全く消失しない無効(NVR: n=20)に分類した。

(倫理面への配慮)

当施設において必要な各種倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

C型慢性肝炎例ではISG15、USP18およびRIG-I発現量は、非HCV肝疾患例に比し明らかに高値であったが(HCV=0.4, 0.6, 0.6; 非HCV=0.05, 0.1, 0.2/GAPDH)、IPS-1発現には差がなかった。ISG15、USP18およびRIG-Iは、NVR群で有意に高発現し、SVRでは極めて低値であった(ISG15、USP18、RIG-I: NVR=0.8, 1.0, 0.9; TR=0.3, 0.6, 0.6; SVR=0.2, 0.4, 0.4/GAPDH, $p < 0.05$, Fisher PLSD)。反対にCardif発現量はNVR群で有意に低かった(NVR=0.6; TR=0.9; SVR=1.1/GAPDH, $p < 0.05$, Fisher PLSD)。ISG15、USP18はHCV dynamicsの第1相・第2相のHCV減少率と有意に負相関していたが、IPS-1/RIG-I比は有意に正相関していた。多変量解析では、ISG15またはUSP18発現およびCardif/RIG-I比と血小板数がNVRに関与する因子であった。ROC解析ではISG15、USP18発現およびIPS-1/RIG-I比のAzは0.9以上で、治療効果予測に有用と考えられた。

D. 考察

PEG-IFN/RBV併用療法に抵抗する症例では治療前の肝内ISG15、USP18/RIG-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った。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。一方、難治例ではIPS-1が転写レベルでも抑制されていることが示唆され、難治要因の機序の解明に有用な情報と考えられる。

E. 結論

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。今後、自然免疫系を標的とした治療法の開発に有益な情報を与えるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

2. **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.

2. 学会発表

1. ●第50回日本消化器病学会大会 シンポジウム

C型肝炎 PEG-Riba治療のコンセンサス
C型肝炎に対するPEG-IFN/Ribavirin併用療法における治療成績と難治例に対する対策

朝比奈靖浩, 板倉潤, 泉並木
日本消化器病学会雑誌105巻臨増大会 PageA462(2008.09)

2. ●第12回肝臓学会大会 シンポジウム

肝炎ウイルス感染と免疫 自然免疫系分子の治療前および治療中の経時的遺伝子発現とPEG-IFN/ribavirin併用療法の治療効果

朝比奈靖浩, 泉並木
肝臓(0451-4203)49巻Suppl.2 PageA447 (2008.09)
肝臓49巻A12(2008.6)

3. ●第44回日本肝臓学会総会シンポジウム

C型肝炎に対するPEG-IFN/Ribavirin併用療法における治療成績と難治要因の検討

朝比奈靖浩, 泉並木, 三宅祥三

4. ●第94回日本消化器病学会総会シンポジウム

細胞内ウイルスセンサーおよび自然免疫系制御分子とPEG-IFN/ribavirin併用療法の治療効果

朝比奈靖浩, 泉並木, 三宅祥三
日本消化器病学会誌105巻A75(2008.3)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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
なし

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班

分担研究者 今村 道雄 広島大学病院消化器内科・助教

研究要旨：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を経口投与した。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能の評価が可能であると思われた。

A. 研究目的

Protease inhibitorは、著明な抗HCV効果を示し、C型慢性肝炎患者に対する新しい抗ウイルス剤として期待されている。一方、Protease inhibitorの投与により、早期に耐性株が出現し、Breakthroughが生じる症例も報告されており、今後の課題と考えられている。本研究においてわれわれは、C型肝炎患者血清あるいはHCVクローンを感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いてtelaprevirの抗HCV効果および耐性株の検討を行った。

B. 研究方法

Genotype 1b 患者血清から作成したHCV

全長cDNAよりin vitro transcriptionによってHCV RNAを合成し、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接投与しHCV感染を惹起した。またこのcDNAにProtease inhibitor耐性であるNS3領域のA156S変異を挿入した耐性型クローンも投与した。これらのクローンを用いて作成したHCV感染マウスにtelaprevir 200 mg/kgを連日経口投与した。またC型肝炎患者血清を用いたHCV感染マウスにtelaprevir 200 mg/kgあるいはinterferon (IFN)- α 1500 IU/gを連日皮下投与後、2週おきにマウス血液を採取し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。

C. 結果

野生型 (KT9) あるいは変異型HCVクローン (KT9-NS3-A156S) を肝臓内注入することによりマウス血中HCV RNAは陽性となり、HCV感染が確認された。変異型クローンを投与したマウスではHCV RNAは野生型に比べ明らかに低値であり、変異型HCVは野生型に比べ複製効率が低いことが示唆された。これらの感染マウスに200-300 mg/kgのtelaprevirを投与したところ、野生型感染マウスでは血中HCV RNAは著明に低下したが、耐性株感染マウスではHCV RNAの低下はわずかであった。これらの結果からNS3のA156S変異は明らかにtelaprevir耐性であり、今後、C型肝炎患者にtelaprevir投与中、変異株が出現した場合、これらのシステムを用いてその変異株が薬剤耐性であるか否かの検討が可能になると思われた。

C型慢性肝炎患者 (genotype 1b)の血清を投与して作成したHCV感染マウスにIFN- α , telaprevir, あるいは両者の併用投与を行い抗ウイルス効果を検討した。IFN- α , telaprevirともにマウス血中HCV RNAを低下させたが、telaprevir単独投与では、投与早期に耐性株 (V36A) が出現し、HCV RNAが再上昇するマウスが存在した。IFN- α とtelaprevirの併用投与により、より強い抗ウイルス効果を認め、耐性株の出現を抑制することが可能であった。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いてtelaprevirの抗HCV効果の検討が可能であった。telaprevir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った。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った。

E. 結論

TelaprevirはIFN- α と併用することにより著明な抗ウイルス効果および耐性株出現の抑制が可能である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol.* 2007;79:1811-7.
- Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H,

- Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008;89:2108-13.
- Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. A randomized trial of high-dose interferon- α -2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 2009, in press.
 - Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Infectious Dis*. 2009, in press.
2. 学会発表
- 今村道雄, 岩尾英治, 茶山一彰. HCV 感染モデルマウスを用いた VX-950 の治療効果および耐性株出現の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.
 - 木村俊之, 今村道雄, 平賀信彦ら. HCV クローンを用いた genotype 1b 型 HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウス. 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.
 - 三木大樹, 今村道雄, 木村俊之ら. HCV 感染モデルマウスを用いた HCV Core および ISDR 領域のアミノ酸変異とウイルス感染性の検討. 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし

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

マウスモデルによるB型慢性肝炎の病態解析

分担研究者 中本 安成 金沢大学附属病院消化器内科 講師

研究要旨：慢性肝炎から発がんに至るB型肝炎ウイルス（HBV）トランスジェニックマウスモデルの経過において包括的に発現遺伝子を解析した。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た。これより、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。

A. 研究目的

薬剤耐性HCV・HBV持続感染の分子病態に関して、慢性肝炎→前がん状態→肝がんと発がんへのプロセスを進展するHBV持続感染マウスモデルを用いて検討した。特に、肝がん組織に特徴的な遺伝子発現プロファイルに至るまでの経時的な変化を炎症の程度、酸化ストレスとの関連に注目して解析した。

B. 研究方法

HBVトランスジェニックマウスモデルは、ウイルス抗原で刺激した脾細胞（リンパ球）を移植することによって肝炎を発症し、急性炎症期（＜1ヵ月）を経て軽度の炎症細胞浸潤が持続する慢性肝炎前期（3～6ヵ月）に至る。さらに肝細胞の異型性が顕著になる慢性肝炎後期（9～12ヵ月）を経過して肝がんが発生してくる（発がん期；15～18ヵ月）。経時的に得られた肝組織の遺伝子発現プロファイルはDNAマイクロアレイ、Real-time定量的RT-PCR法を用いて検討した。また、酸化ストレスに関して誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、酸化（8-OHdG）およびニトロ化DNA損傷塩基（8-ニトログアニン）を検出した。

C. 研究結果

肝がんに至る慢性肝炎の経過に伴って変動した遺伝子の発現変化を観察すると、遺伝子の変動は9ヵ月目から顕著になることが観察され、この時期は組織学的に前がん結節が出現してくる時期に一致していた。また、酸化ストレスに関する免疫組織学的検討において、前がん状態からがん化への進展に伴いiNOSの活性化や8-OHdGおよび8-ニトログアニンが蓄積されてくることが

分かった。さらに、同時期における肝組織の遺伝子発現プロファイルを検討すると、前初期遺伝子を含めた転写に関わるものが顕著であった。

D. 考察

本モデルにおける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が明らかになった。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。

E. 結論

HBV慢性肝炎モデルを用いた検討において、肝がん発生に至る前がん状態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。

G. 研究発表

- 論文発表
- Iida, N., Nakamoto, Y., Baba, T., Kakinoki, K., Li, Y. Y., Wu, Y., Matsu shima, K., Kaneko, S., and Mukaida, N: Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 84: 1001-1010, 2008.
- Mizukoshi, E., Honda, M., Arai, K., Yamashita, T., Nakamoto, Y., and Kaneko, S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and

cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, 49: 946-954, 2008.

3. Sakai, Y., Honda, M., Fujinaga, H., Tatsumi, I., Mizukoshi, E., Nakamoto, Y., and Kaneko, S: Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. **Cancer Res.**, 68: 10267-10279, 2008.
4. Tsuchiyama, T., Nakamoto, Y., Sakai, Y., Mukaida, N., and Kaneko, S: Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. **Cancer Sci.**, 99: 2075-2082, 2008.

2. 学会発表

1. Nakamoto Y., Mizukoshi E, Kitahara M, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #125; Prolonged recurrence-free survival following combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; **第59回American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 48 (4, Suppl.) 361A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008
2. Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y., Honda M, Kaneko S: #82; Cellular immune responses to multidrug resistance-associated protein 3 in the patients with hepatocellular carcinoma.; **第25回International Association for the Study of the Liver (IASL) Biennial Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 48 (4, Suppl.) 343A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明とその対策に関する研究
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

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）による慢性肝炎の治療にインターフェロン（IFN）とリバビリンの併用療法が用いられているが、HCV サブタイプ 1b（HCV-1b）高ウイルス量の患者では、約半数の症例でウイルスを完全に排除することができない。我々はこれまでに、HCV 非構造タンパク質 NS5A の IRRDR と名付けた領域（aa 362～407）のアミノ酸配列の多様性が臨床的に IFN/リバビリン治療に対する感受性/抵抗性と相関する可能性を報告してきた。また近年、HCV コアタンパク質の 70 位及び 91 位の多様性も IFN 感受性/抵抗性と相関することが報告された。一方、これらの相関は地域によって異なる可能性も報告されている。本研究では、我が国の異なる 2 地域（兵庫県と山形県）における IRRDR 及びコアタンパク質 70 位、91 位と、IFN 感受性/抵抗性との相関について、比較検討した。

IFN/リバビリン併用療法を受けた兵庫県の HCV-1b 慢性 C 型肝炎患者（50 名）のうち 46% が SVR、残る 54% が Non-SVR であった。IRRDR 変異数が 6 またはそれ以上（IRRDR \geq 6）及びコアタンパク質 70 位及び 91 位の野生型（Arg⁷⁰/Leu⁹¹）が SVR と、また、IRRDR \leq 5 及びコアタンパク質変異型（Gln⁷⁰ and/or Met⁹¹）が Non-SVR と有意に相関した。多変量解析により、IRRDR \geq 6 と Arg⁷⁰/Leu⁹¹ は互いに独立して SVR と相関した。また、IRRDR \geq 6 と Arg⁷⁰/Leu⁹¹ は IFN/リバビリン治療開始ごく早期のウイルス量の減少と有意に相関した。一方、山形県の HCV-1b 慢性 C 型肝炎患者（57 名）では 56% が SVR、残る 44% が Non-SVR であった。この患者集団では IRRDR \geq 4 が SVR と有意に相関したが、Arg⁷⁰/Leu⁹¹ は相関を認めなかった。また、Gln⁷⁰ が Non-SVR と有意に相関した。以上の結果より、IRRDR \geq 6 は SVR 予測因子として、また、Gln⁷⁰ は Non-SVR の予測因子として、それぞれ利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）による慢性肝炎の治療にインターフェロン（IFN）が用いられており、現在の標準的治療法である Peg-IFN とリバビリンの併用療法により、多くの症例でウイルスの完全排除（SVR）が得られるようになってきた。しかし、HCV サブタイプ 1b（HCV-1b）

高ウイルス血症の症例では、上記併用療法でも、なお半数近い症例でウイルスの完全排除が望めない（Non-SVR）。治療抵抗性を規定する因子は患者側とウイルス側の双方にあると考えられるが、その具体的な指標は未だ明確ではない。

我々は、これまでに、Peg-IFN/リバビリン

併用療法によるウイルス排除と相関するウイルス側の因子として、HCV 非構造タンパク質 NS5A の特定領域 (IRRDR: IFN/ribavirin resistance-determining region; aa 362~407) のアミノ酸配列の多様性が関与することを報告してきた。同様に、NS5A の中央部に ISDR (IFN sensitivity-determining region; aa 237~276) とよばれる IFN 感受性と相関するアミノ酸配列が存在することがよく知られている²⁾。一方、HCV コアタンパク質の 70 位及び 91 位のアミノ酸残基の多様性が Peg-IFN/リバビリン治療応答性と相関する可能性があることも最近報告された³⁾。

さらに、NS5A やコアタンパク質の多様性と Peg-IFN/リバビリン治療応答性の相関は、地域によってみられないこともあると指摘されている。

本研究では、NS5A やコアタンパク質のアミノ酸配列多様性 (変異) が HCV の Peg-IFN/リバビリン治療感受性 (または抵抗性) と相関するか否かについて、兵庫県と山形県の患者サンプルを用いて検討した。

B. 研究方法

1) 患者: HCV-1b 感染慢性肝炎の治療のため、48 週間の Peg-IFN/リバビリン併用療法を受け、その後 24 週間の経過観察により治療効果を判定できた兵庫県の患者 50 名及び山形県の患者 57 名。Peg-IFN/リバビリン併用療法後 24 週間の経過観察により、ウイルス陰性者 (SVR) と陽性者 (Non-SVR) に分類した。

2) HCV 遺伝子の解析: RT-PCR 法により、治療開始前の血清中 HCV の種々の遺伝子領域 (IRRDR, ISDR, コアタンパク質) を増幅し、その塩基配列と推定アミノ酸配列を求め、コンセンサス配列と比較して、変異の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

患者からの血清の採取はインフォームドコンセントを得て行った。すべての実験はバイオセーフティー指針に準拠して行った。

C. 研究結果

1) 兵庫県の患者集団における IRRDR 多様性とコア変異の検討:

兵庫県の患者集団においては、SVR は 23/50 (46%)、Non-SVR は 27/50 (54%) であった。

IRRDR 高変異 (≥ 6) は、SVR の 16/23 (70%)、Non-SVR の 3/27 (11%) に見られ、IRRDR ≥ 6 と Peg-IFN/リバビリン感受性の間に有意の相関が認められた ($P=0.0001$)。また、IRRDR 内の特定のアミノ酸変異について検討したところ、Ala³⁸⁸ が SVR の 10/23 (43%)、Non-SVR の 3/27 (11%) に認められた ($P=0.02$)。

コアタンパク質の解析では、野生型 (Arg⁷⁰/Leu⁹¹) が SVR の 17/23 (74%)、Non-SVR の 9/27 (33%) に見られ、Arg⁷⁰/Leu⁹¹ と Peg-IFN/リバビリン感受性の間に有意の相関が認められた ($P=0.01$)。Arg⁷⁰ 単独あるいは Leu⁹¹ 単独では有意の相関は認められなかった。IRRDR ≥ 6 及び R⁷⁰/L⁹¹ は、Peg-IFN/リバビリン併用療法開始 1 日後 (1 Log)、1 週間後 (1 Log)、2 週間後 (1.5 Log) 及び 4 週間後 (2 Log) の HCV コア抗原量の減少を示す患者に有意に多く認められた。

一方、コアタンパク質変異型 (Gln⁷⁰ and/or Met⁹¹) は SVR の 5/23 (22%)、Non-SVR の 18/27 (67%) に見られ、コアタンパク質変異型と Peg-IFN/リバビリン抵抗性の間に有意の相関を認めた ($P=0.002$)。Gln⁷⁰ 単独 ($P=0.06$) あるいは Met⁹¹ 単独 ($P=0.11$) では有意の相関は認められなかったが、解析対象症例を増やすことによって、Gln⁷⁰ が Peg-IFN/リバビリン抵抗性と有意の相関を示す可能性が考えられた。

ISDR 多様性についても検討したが、変異数が ≥ 4 、 ≥ 2 、 ≥ 1 のいずれの場合でも、Peg-IFN/リバビリン治療応答性との有意の相関は認められなかった。

多変量解析により、ウイルス側要因として IRRDR 変異及びコア変異が、また、宿主側要因として血小板数が、それぞれ Peg-IFN/リバ

ピリン治療応答性の独立予測因子であることが示された。

2) 山形県の患者集団における IRRDR 多様性とコア変異の検討:

山形県の患者集団においては、SVR は 32/57 (56%)、Non-SVR は 25/57 (44%)であった。

山形県の症例では、兵庫県の場合と異なって、IRRDR \geq 4 と IRRDR \leq 3 に分けるのが最適である事が receiver operating characteristic curve (ROC) 解析でわかった。そこで、山形県の患者集団においては、IRRDR \geq 4 を指標にして検討した。IRRDR \geq 4 は、SVR の 27/32 (84%)、Non-SVR の 13/25 (52%)に見られ、IRRDR \geq 4 と Peg-IFN/リバビリン感受性の間に有意の相関が認められた ($P=0.01$)。Ala³⁸⁸では有意な相関は認められなかった

コアタンパク質の解析では、野生型 (Arg⁷⁰/Leu⁹¹) は SVR の 15/32 (49%)、Non-SVR の 9/25 (36%)であり、Arg⁷⁰/Leu⁹¹ と Peg-IFN/リバビリン感受性の間に有意の相関は認められなかった ($P=0.4$)。Arg⁷⁰単独あるいは Leu⁹¹単独でも有意の相関は認めなかった。一方、コアタンパク質 2 重変異型 (Gln⁷⁰/Met⁹¹) は SVR で 0/32 (0%)、Non-SVR で 7/25 (28%)に見られ、Gln⁷⁰/Met⁹¹ と Peg-IFN/リバビリン抵抗性の間に有意の相関が認められた ($P=0.002$)。また、Gln⁷⁰単独は SVR で 4/32 (13%)、Non-SVR で 10/25 (40%)に見られ、Gln⁷⁰ と Peg-IFN/リバビリン抵抗性に有意の相関が認められた ($P=0.03$)。

ISDR の解析では、ISDR \geq 1 は SVR で 22/32 (69%)、Non-SVR で 9/25 (36%)に見られ、ISDR \geq 1 と Peg-IFN/リバビリン感受性に有意の相関が認められた ($P=0.02$)。

D. 考察

本研究により、HCV NS5A の IRRDR の多様性及びコアタンパク質 70 位と 91 位の多様性が、Peg-IFN/リバビリン治療応答性と有意に相関することが明らかになった。そして、IRRDR \geq 6

は SVR の予測因子として、また、Gln⁷⁰ は Non-SVR の予測因子として、それぞれ有用であることが示された。

IRRDR \geq 6 (及び兵庫県では Arg⁷⁰/Leu⁹¹ も) は、Peg-IFN/リバビリン併用療法開始 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た事から、主に Peg-IFN による抗ウイルス効果と相関している可能性が示唆された。しかし、リバビリンの直接的抗ウイルス効果の関与の可能性も完全に排除されたわけではなく、今後のより詳細な解析が必要と考えられた。

E. 結論

HCV-1b による慢性 C 型肝炎患者の Peg-IFN/リバビリン併用療法において、IRRDR \geq 6 は SVR 予測因子として、また、Gln⁷⁰ は Non-SVR の予測因子として、それぞれ利用できる可能性が示唆された。

[参考文献]

1. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47, 2008.
2. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81, 1996.
3. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors

of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 46:403-410, 2007.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47, 2008.
2. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol* 82:10375-10385, 2008.
3. Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hotta H, Shoji I, El-Shamy A, Kawada N, Kudo M, Hayashi Y. Usefulness of new immuno-radiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology* 51(Suppl 1):70-75, 2008.
4. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* 89:1231-1242, 2008.
5. Kim SR, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis. *Digestion* (in press).
6. 金守良, 井本勉, 婦木秀一, 金啓二, 谷口美幸, 長野基子, 堀田博, 勝二郁夫, 寒原芳浩, 前川陽子, 工藤正俊, 林祥剛. 1b型高ウイルス量高齢者C型慢性肝炎に対するPEG IFN α -2b/リバビリン治療(併用療法)の検討. *肝臓* 49(4):145-152, 2008.

2. 学会発表

1. El-Shamy A, Apichartpiyakul C, Kim SR, Adachi T, Shoji I, Hotta H. Polymorphism of HCV-1b core protein and interferon/ribavirin resistance-determining region (IRRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2008. San Antonio, Texas, USA.
2. Hotta H. Sequence variation of the hepatitis C virus genome and its correlation with viral pathogenicity. 8th Asia Pacific Congress of Medical

Virology, February 26-28, 2009. Hong Kong.

3. 堀田博, El-Shamy Ahmed, 長野基子, 勝二郁夫, 笹瀬典子, 井本勉, 金守良. ペグインターフェロン/リバビリン併用療法におけるウイルス側のSVR予測因子の検討. 第44回日本肝臓学会総会, 2008. 松山.
4. 金守良, 井本勉, 婦木秀一, 堀田博, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子. PEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)の治療効果予測におけるウイルスdynamicsの検討. 第44回日本肝臓学会総会, 2008. 松山.
5. エルシャーミアームド, 足達哲也, 犬伏祥子, 勝二郁夫, 堀田博. ペグインターフェロン/リバビリン併用療法におけるHCV CoreおよびNS5Aの多様性によるSVR予測因子とNon-SVR予測因子の検討. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008. 岡山.
6. 金守良, 井本勉, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. ペグインターフェロン+リバビリン併用療法(併用療法)で急性肝炎を合併し、16週で中断したが、著効となった1b型高ウイルス量C型慢性肝炎の一症例. 第12回日本肝臓学会大会, 2008. 東京.
7. 金守良, 井本勉, 堀田博. ペグインターフェロンを用いた慢性C型肝炎治療 ペグインターフェロン+リバビリン併用療法(併用療法)におけるウイルス側SVR, Non-SVR予測因子の検討及び早期ウイルスダイナミクスとの関係. 第37回日本肝臓学会東部会, 2008. 東京.
8. 金守良, 井本勉, 堀田博. 1b型高ウイルス量高齢者C型肝炎に対するPEG IFN α -2b/リバビリン併用療法(併用療法)の検討: 発癌抑制と中断対策を中心に. 第37回日本肝臓学会東部会, 2008. 東京.
9. 斎藤貴史, 堀田博, 河田純男. C型肝炎の近

未来治療: HCV NS3蛋白質二次構造の多型性とペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果予測. 第12回日本肝臓学会大会, 2008. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

培養細胞系による薬剤耐性肝炎ウイルスの解析

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

研究要旨 抗C型肝炎ウイルス（HCV）薬に対する耐性ウイルスの特徴及び耐性獲得の分子機構を明らかにするため、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した。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）が見出された。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により、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。

A. 研究目的

抗ウイルス薬に対する耐性ウイルスの出現は、多くのウイルス感染症の治療において問題となっている。C型肝炎治療においても抗C型肝炎ウイルス（HCV）薬の長期間投与に伴う耐性ウイルスの出現が懸念されているものの、各治療薬に対する耐性 HCV の特徴は十分には明らかにされていない。本研究では、現行の治療薬、開発中のウイルス酵素阻害剤、また今後、創薬化の可能性のある化合物に対する耐性 HCV を HCV 複製細胞系または感染増殖系を用いて同定し、薬剤耐性獲得の分子機構を解析する。本年度は HCV プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 に対して耐性の遺伝子型 2a HCV を同定とその耐性獲得に必要な遺伝子変異を明らかにした。

B. 研究方法

HCV 遺伝子型 2a JFH-1 株のゲノム cDNA プラスミド（pJFH1）を XbaI 切断により直鎖化し精製後、これを鋳型として試験管内にて RNA 合成

を行った。得られた RNA をエレクトロポレーション法により Huh7 細胞へ導入し HCV 粒子を産生させた。細胞内外の HCV Core 蛋白質及び RNA を ELISA 法、リアルタイム RT-PCR 法でそれぞれ定量した。

HCV NS3 変異ゲノム（pJFH1-V71A、-K122R、-V71AK122R）は PCR を利用した部位特異的変異導入法によって作製した。

HCV NS3 プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 は Boehringer Ingelheim 社から分与された。

C. 研究結果

HCV JFH-1 株を Huh7 細胞へ感染させ、3-5 日に一度継代することにより、細胞内 HCV RNA レベル $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ copies/ μg total RNA の持続感染細胞株を取得した。この HCV 持続感染細胞系での BILN2061 の抗 HCV 活性を評価するため、種々の濃度で添加し3日後の細胞内ウイルス RNA を測定した。その結果、HCV RNA レベルは 25 nM で陰性対照の 44%、100 nM では 7%ま