

## Results

### *Effect of nelfinavir on HCV replication*

To assess the effects of nelfinavir on intracellular replication of the HCV genome, Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of nelfinavir. The dose-effect correlation and time course of replicon expression were measured using the luciferase assay 48 h after treatment. Culture of Huh7/Rep-Feo cells with nelfinavir, at concentrations ranging from 0–10  $\mu\text{mol/l}$ , showed dose-dependent repression of internal luciferase activity (Fig. 1A). The inhibition of HCV-RNA replication was detectable at concentrations of nelfinavir as low as 2.5  $\mu\text{mol/ml}$ . Western blot hybridization also demonstrated a reduction of the replicon protein levels after nelfinavir treatment (Fig. 1B). To determine the cytotoxic effect of nelfinavir in Huh7/Rep-Feo cells, LDH levels in the supernatants were measured. No significant change in LDH levels was detectable after 48 h incubation (Fig. 1C). MTS assays of the cells cultured with nelfinavir indicated no significant effects on cell viability (Fig. 1D). Nuclear DNA fragmentation in Huh7/Rep-Feo cells, a possible mechanism of nelfinavir induced cytotoxicity, was evaluated by TUNEL staining. No fragmentation of nuclear DNA was observed in Huh7/Rep-Feo cells treated with 5.0  $\mu\text{M}$  nelfinavir (Fig. 1E).

### *Inhibition of HCV RNA replication by IFN alone and in combination with nelfinavir*

Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of IFN, and the dose-effect correlation and time courses of replicon expression were measured by luciferase assay. IFN caused a marked dose-dependent inhibition of HCV RNA replication (Fig. 2A). The inhibition of HCV RNA replication was detectable at concentrations of IFN as low as 0.01 U/ml. In contrast, measurement of LDH levels and the results of the MTS assay suggested that IFN had little effect on cell viability and replication (data not shown). A dose-effect curve for the effects of nelfinavir and IFN on the replicon was generated by treating Huh7/Rep-Feo cells with various concentrations of IFN (1.0 U/ml, 0.1 U/ml, 0.01 U/ml, 0.001 U/ml, and 0 U/ml)

Toma *et al.* - 10

and nelfinavir (5  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , and 0  $\mu\text{mol/l}$ ). The luciferase activities were plotted against the drug concentrations after 48 h incubation. The inhibition curves were shifted to the left with increasing concentrations of nelfinavir (Fig. 2B), demonstrating synergy between the two drugs against the HCV replicon. There were no significant differences in MTS reduction values at the different drug concentrations (data not shown).

#### *Synergistic inhibitory effects of nelfinavir and IFN on the replicon*

We investigated a possible synergistic anti-HCV effect between nelfinavir and IFN, using the isobologram method and CalcuSyn software, as described in Material and methods. A log dose-effect curve and median effect plot were made for both drugs. Both drugs showed linear regression of effect on the logarithms of doses ( $R^2 = 0.94$  for nelfinavir;  $R^2 = 0.99$  for IFN). The  $\text{IC}_{50}$  values were  $9.88 \pm 0.43 \mu\text{mol/l}$  for nelfinavir and  $0.099 \pm 0.14 \text{ U/ml}$  for IFN (Figs. 3A, 3B).

In order to determine if nelfinavir and IFN had a synergistic inhibitory effect on the replicon, Huh7/Rep-Feo cells were treated with combinations of IFN and nelfinavir at various concentrations. Isobolograms were generated based on the two drugs administered in combination at fixed ratios, adjusted for the  $\text{IC}_{50}$  of each drug (FIC ratio): 1:0, 4:1, 1:1, 1:4, and 0:1. Using the CalcuSyn software, each 90% inhibition of HCV replication ( $\text{Fa}=0.90$ ), 75% inhibition of HCV replication ( $\text{Fa}=0.75$ ), and 50% inhibition of HCV replication were plotted on the x and y axes (Fig. 3C). The  $\text{ED}_{90}$ ,  $\text{ED}_{75}$ , and  $\text{ED}_{50}$  plots for each drug ratio fell below the line representing additivity, indicating synergistic effects of the drug combination on intracellular HCV-RNA replication. The CI at an Fa value of 0.5 was 0.58, generated from Figure 3C using CalcuSyn. There was no significant difference in MTS reduction at different drug concentrations (data not shown), suggesting that the synergistic action of nelfinavir and IFN on HCV replication was through their pharmacological effects, and not due to augmentation of cytotoxicity.

## Discussion

The results of this study suggest that nelfinavir inhibits HCV replication at concentrations that show no cytotoxicity, and that nelfinavir and IFN act synergistically against HCV.

Nelfinavir inhibited HCV replication in a concentration dependent manner and its effects could be observed at concentrations as low as  $< 3.0 \mu\text{mol/l}$ . In clinical use, the plasma concentration of nelfinavir ranges from 3.3–6.0  $\mu\text{mol/l}$ . These results support those of Trimoulet et al., who found a reduction in HCV loads in patients treated with HAART including nelfinavir (12). García-Samaniego et al. reported that indinavir, another HIV protease inhibitor, failed to reduce HCV viral titers (4). In a preliminary study using the replicon system, we tested the ability of several unpurified HIV protease inhibitors to inhibit HCV replication: nelfinavir, ritonavir and saquinavir reduced HCV-replication, but indinavir and fosamprenavir had no effect (data not shown). These discrepancies in the effects of different protease inhibitors could explain the different results found in clinical studies.

Combination therapy using ribavirin and IFN is a standard therapy for patients with chronic HCV infection, including HCV/HIV-coinfected patients (8). We previously reported that the use of a clinically achievable concentration of ribavirin, in combination with IFN, showed strong synergistic inhibitory effects on HCV replication using the replicon system (20). In this study, nelfinavir showed similar strong synergy with IFN. These results suggest that nelfinavir could improve the antiviral effects of IFN in HCV/HIV coinfected patients.

HIV protease inhibitors have a strong affinity for the active site of the HIV viral aspartyl protease, and irreversibly inhibit the catalytic activity of the enzyme. However, HIV protease inhibitors are thought not to inhibit HCV viral serine protease. The above-mentioned findings which demonstrate that different HIV protease inhibitors have different effects on HCV replication support this idea because if HIV protease inhibitors inhibited HCV serine

1  
2  
3  
4  
5 protease, then all HIV protease inhibitors should inhibit HCV replication. The mechanism by  
6  
7 which nelfinavir inhibits HCV replication is uncertain: In our study, nelfinavir failed to induce  
8  
9 cytotoxicity or apoptosis at concentrations that inhibited HCV replication. These results  
10  
11 support those of Bruno *et al.* (21), who reported, in a clinical study, that nelfinavir was  
12  
13 associated with the lowest rates of severe hepatotoxicity among the available HIV protease  
14  
15 inhibitors. Several studies have shown that HCV infection alters NF- $\kappa$ B promoter activity,  
16  
17 possibly contributing to the persistence of HCV infection (22-24). Ozlem *et al.* reported that  
18  
19 nelfinavir blocked TLR2-, TLR4-, and TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation (16). Nelfinavir may  
20  
21 play an important role in the regulation of the cellular inflammatory and immune responses  
22  
23 through NF- $\kappa$ B, but further studies are needed to investigate the role of NF- $\kappa$ B promoter  
24  
25 activity in nelfinavir-induced HCV replication inhibition.  
26  
27  
28  
29

30  
31 The implications of our results for understanding the effect of nelfinavir on HCV  
32  
33 replication are limited because this study used an *in vitro* HCV subgenomic replicon system,  
34  
35 which only expresses viral nonstructural, and not structural, proteins. To elucidate the effects  
36  
37 of nelfinavir on full-length, infectious hepatitis C virions, further studies using full genomic  
38  
39 replicons are needed. In addition, the influence of immune reconstitution induced by HAART,  
40  
41 including nelfinavir, on HCV replication needs to be investigated before clinical application  
42  
43 of our data to therapy for HCV/HIV coinfecting patients.  
44  
45  
46

47  
48 Because end-stage chronic liver disease resulting from co-infection with HCV is now  
49  
50 the major cause of death in individuals infected with HIV, our results suggest a potentially  
51  
52 promising approach for improving the standard therapies for chronic hepatitis C in HCV/HIV  
53  
54 coinfecting patients.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Toma et al. - 14

**Footnotes**

The authors report no conflict of interest.

For Peer Review

## References

- 1 Hayashi PH, Flynn N, McCurdy SA, Kuramoto IK, Holland PV, Zeldis JB. Prevalence  
2 of hepatitis C virus antibodies among patients infected with human immunodeficiency virus.  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
- 1 Sherman KE, Rouster SD, Chung RT, Rajcic N. Hepatitis C Virus prevalence among  
2 patients infected with Human Immunodeficiency Virus: a cross-sectional analysis of the US  
3 adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin Infect Dis.* 2002; 34(6):831-7.
- 3 Salmon-Ceron D, Lewden C, Morlat P, *et al.* Liver disease as a major cause of death  
4 among HIV infected patients: role of hepatitis C and B viruses and alcohol. *Journal of*  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
*hepatology.* 2005; 42(6):799-805.
- 4 Soriano V, Martin-Carbonero L, Garcia-Samaniego J, Puoti M. Mortality due to  
5 chronic viral liver disease among patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin*  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
*Infect Dis.* 2001; 33(10):1793-5.
- 5 Valle Tovo C, Alves de Mattos A, Ribeiro de Souza A, *et al.* Impact of human  
6 immunodeficiency virus infection in patients infected with the hepatitis C virus. *Liver Int.*  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
2007; 27(1):40-6.
- 6 Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, *et al.* Liver fibrosis progression in human  
7 immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
*Hepatology (Baltimore, Md.* 1999; 30(4):1054-8.
- 7 Puoti M, Bonacini M, Spinetti A, *et al.* Liver fibrosis progression is related to CD4  
8 cell depletion in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
*The Journal of infectious diseases.* 2001; 183(1):134-7.
- 8 Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment  
9 of hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.* 2004; 39(4):1147-71.

Toma et al. - 16

- 1  
2  
3  
4  
5 9 Yokozaki S, Takamatsu J, Nakano I, et al. Immunologic dynamics in hemophiliac  
6 patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: influence of  
7 antiretroviral therapy. *Blood*. 2000; 96(13):4293-9.  
8  
9  
10  
11 10 Ragni MV, Bontempo FA. Increase in hepatitis C virus load in hemophiliacs during  
12 treatment with highly active antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases*. 1999;  
13 180(6):2027-9.  
14  
15  
16  
17 11 Matsiota-Bernard P, Vriani G, Onody C, Bernard L, de Truchis P, Peronne C. Human  
18 immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors have no effect on hepatitis C virus (HCV)  
19 serum levels of HIV-HCV co-infected patients. *International journal of antimicrobial agents*.  
20 2001; 17(2):155-7.  
21  
22  
23  
24 12 Trimoulet P, Neau D, Le Bail B, et al. Intrahepatic HCV RNA loads in 37 HIV-HCV  
25 co-infected patients with controlled HIV infection. *Journal of medical virology*. 2002;  
26 67(2):143-51.  
27  
28  
29  
30 13 Mitsuya H, Yarchoan R, Kageyama S, Broder S. Targeted therapy of human  
31 immunodeficiency virus-related disease. *Faseb J*. 1991; 5(10):2369-81.  
32  
33  
34  
35 14 Vlahakis SR, Bennett SA, Whitehead SN, Badley AD. HIV protease inhibitors  
36 modulate apoptosis signaling in vitro and in vivo. *Apoptosis*. 2007; 12(5):969-77.  
37  
38  
39  
40 15 Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002; 109  
41 Suppl:S81-96.  
42  
43  
44  
45 16 Equils O, Shapiro A, Madak Z, Liu C, Lu D. Human immunodeficiency virus type 1  
46 protease inhibitors block toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-Induced NF-kappaB  
47 activation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48(10):3905-11.  
48  
49  
50  
51 17 Guo JT, Bichko VV, Seeger C. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus  
52 replicon. *Journal of virology*. 2001; 75(18):8516-23.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5 18 Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, *et al.* Inhibition of intracellular hepatitis C virus  
6 replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO reports*. 2003;  
7 4(6):602-8.  
8  
9  
10  
11 19 Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, *et al.* Negative regulation of intracellular  
12 hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 3. *Journal of gastroenterology*.  
13 2006; 41(8):750-7.  
14  
15  
16 20 Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, *et al.* Synergistic inhibition of intracellular  
17 hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *The Journal of*  
18 *infectious diseases*. 2004; 189(7):1129-39.  
19  
20  
21 21 Bruno R, Sacchi P, Maiocchi L, Zocchetti C, Filice G. Hepatotoxicity and nelfinavir: a  
22 meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3(5):482-8.  
23  
24  
25 22 Chung YM, Park KJ, Choi SY, Hwang SB, Lee SY. Hepatitis C virus core protein  
26 potentiates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation through TRAF2-IKKbeta-dependent  
27 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001; 284(1):15-9.  
28  
29  
30 23 Joo M, Hahn YS, Kwon M, Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW. Hepatitis C  
31 virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by  
32 direct interaction with IkappaB kinase beta. *Journal of virology*. 2005; 79(12):7648-57.  
33  
34  
35 24 Wagoner J, Austin M, Green J, *et al.* Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction  
36 by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *Journal of*  
37 *virology*. 2007; 81(1):309-18.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



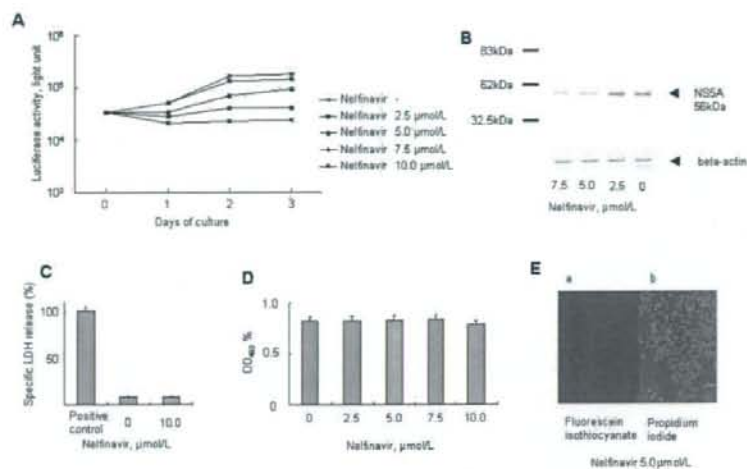
**Figure legends**

**Figure 1.** Dose-dependent inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA replication by nelfinavir. (A) Huh7/Rep-Feo cells were cultured with concentrations of nelfinavir as indicated. (B) Western blotting. The cells were cultured in the presence of nelfinavir, as indicated and were harvested after 48 h exposure. (C) Cytotoxicity assay. Lactate dehydrogenase (LDH) assay of Huh7/Rep-Feo cells cultured with the concentrations of nelfinavir indicated. (D) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium inner salt (MTS) assay of Huh7/Rep-Feo cells cultured with the concentrations of nelfinavir indicated. (E) Nuclear DNA fragmentation in Huh7/Rep-Feo cells detected by the TUNEL method. Cells were observed using a confocal laser scanning microscopy (all 200 ×). Nuclear DNA fragmentation is shown in green (a: fluorescein isothiocyanate staining), and Huh7/Rep-Feo cell nuclei in red (b: propidium iodide staining).

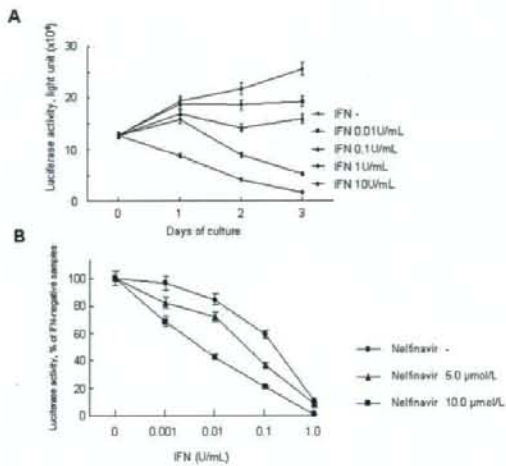
**Figure 2.** Dose-dependent inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA replication by IFN. (A) Huh7/Rep-Feo cells were cultured with concentrations of IFN as indicated. (B) Dose-inhibition curves for IFN combined with the concentrations of nelfinavir indicated. Luciferase activities are displayed as percentages of the IFN-negative samples.

**Figure 3.** CalcuSyn analysis of the interferon (IFN)/nelfinavir combination effects on intracellular hepatitis C virus (HCV) replication. Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of nelfinavir and IFN. Luciferase activities of the cell lysates were measured after 48 h exposure. The CalcuSyn median-effect plot was generated from three separate experiments in triplicate with SD <20% (Fa: affected fraction, Fu: unaffected fraction, D concentration of drug used). (A) Log dose-effect curve and median effect plot for nelfinavir. Median effect plot has the form of a straight line,  $y = 2.47x + 0.43$ . (B) Log dose-effect curve and median effect plot for IFN. Median effect plot has the form of a straight line,  $y = 1.12x -$

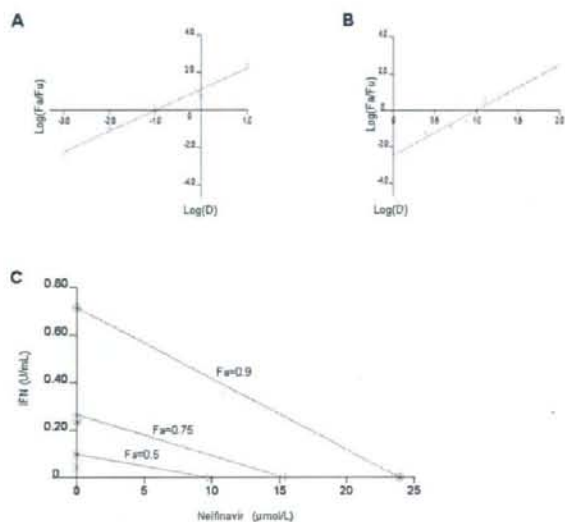
1  
2  
3  
4  
5 0.14. (C) Isobologram analysis of the combination of IFN and nelfinavir in Huh7/Rep-Feo  
6 cells. The individual doses of IFN and nelfinavir required to achieve 90% inhibition of HCV-  
7 replication (Fa=0.90), 75% inhibition of HCV-replication (Fa=0.75), 50% inhibition of HCV-  
8 replication were plotted on the x and y axes. Combination index (CI) values calculated using  
9 the Calcsyn software are represented by points above (indicate antagonism between drugs) or  
10 below the lines (indicate synergy). (X symbol) ED50, (plus sign) ED75 and (open dotted  
11 circle) ED90.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Dose-dependent inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA replication by nelfinavir. (A) Huh7/Rep-Feo cells were cultured with concentrations of nelfinavir as indicated. (B) Western blotting. The cells were cultured in the presence of nelfinavir, as indicated and were harvested after 48 h exposure. (C) Cytotoxicity assay. Lactate dehydrogenase (LDH) assay of Huh7/Rep-Feo cells cultured with the concentrations of nelfinavir indicated. (D) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium inner salt (MTS) assay of Huh7/Rep-Feo cells cultured with the concentrations of nelfinavir indicated. (E) Nuclear DNA fragmentation in Huh7/Rep-Feo cells detected by the TUNEL method. Cells were observed using a confocal laser scanning microscopy (all 200  $\times$ ). Nuclear DNA fragmentation is shown in green (a: fluorescein isothiocyanate staining), and Huh7/Rep-Feo cell nuclei in red (b: propidium iodide staining) 254x190mm (96  $\times$  96 DPI)



Dose-dependent inhibition of hepatitis C virus (HCV) RNA replication by IFN. (A) Huh7/Rep-Feo cells were cultured with concentrations of IFN as indicated. (B) Dose-inhibition curves for IFN combined with the concentrations of nelfinavir indicated. Luciferase activities are displayed as percentages of the IFN-negative samples.  
 254x190mm (96 x 96 DPI)



CalcuSyn analysis of the interferon (IFN)/nelfinavir combination effects on intracellular hepatitis C virus (HCV) replication. Huh7/Rep-Feo cells were cultured with various concentrations of nelfinavir and IFN. Luciferase activities of the cell lysates were measured after 48 h exposure. The CalcuSyn median-effect plot was generated from three separate experiments in triplicate with SD <20% (Fa: affected fraction, Fu: unaffected fraction, D concentration of drug used). (A) Log dose-effect curve and median effect plot for nelfinavir. Median effect plot has the form of a straight line,  $y = 2.47x + 0.43$ . (B) Log dose-effect curve and median effect plot for IFN. Median effect plot has the form of a straight line,  $y = 1.12x - 0.14$ . (C) Isobologram analysis of the combination of IFN and nelfinavir in Huh7/Rep-Feo cells. The individual doses of IFN and nelfinavir required to achieve 90% inhibition of HCV-replication (Fa=0.90), 75% inhibition of HCV-replication (Fa=0.75), 50% inhibition of HCV-replication were plotted on the x and y axes. Combination index (CI) values calculated using the CalcuSyn software are represented by points above (indicate antagonism between drugs) or below the lines (indicate synergy). (X symbol) ED50, (+ sign) ED75 and (open dotted circle) ED90.

254x190mm (96 x 96 DPI)

## HCVエントリー・粒子形成阻害剤： 新規クラス薬剤スクリーニング

武部 豊 上西理恵

索引用語：HCVエントリー阻害剤, JFH-1, 阻害剤スクリーニング,  
HCVccアッセイ, HCVppアッセイ

要旨：ウイルスエントリーは重要な創薬標的である。しかしHCVに関しては、これまでよい細胞培養系が存在しなかったことから、HCVエントリーやウイルス増殖の最後期過程を標的とする阻害剤の探索は、ほとんど未開拓な分野として残されてきた。しかし、感染性分子クローンJFH-1を用いた細胞培養(HCVcc)アッセイや、シェード粒子を用いた(HCVpp)アッセイ系が確立・整備されてきたことで、新しいタイプのエントリー阻害剤や粒子形成阻害剤の探索が可能となってきた。

### 1 はじめに

これまで、HCV阻害剤スクリーニングやその薬効評価には、HCVサブゲノムを用いたレプリコン・アッセイ<sup>1)</sup>が汎用されてきたが、レプリコン・アッセイによっては、ウイルスの吸着、エントリー、脱殻などの感染初期過程や、ウイルス粒子のアッセブリーから粒子放出に至る感染の最後期過程の阻害剤の探索・評価はできないという原理的問題があった(図1)。

しかし、脇田らによって樹立された感染性HCV分子クローン(pJFH-1)<sup>2)</sup>に基づく

HCVの細胞培養系(HCVccアッセイ)が開発されたことにより、HCV感染からウイルス放出までのHCV増殖サイクルのいずれのステップに対する阻害剤も同定・評価できるようになった。

一般に、抗ウイルス剤開発の標的としてまず第一に取り上げられるターゲットは、ウイルスゲノムにコードされ、かつウイルス増殖に必須な機能(酵素活性)をもつウイルスタンパク質である。HCVでは、そのような標的タンパク質として、NS3/NS4A遺伝子でコードされるプロテアーゼおよびNS5B遺伝子でコードされるRNAポリメラーゼの2つがあ

Yutaka TAKABE and Rie UENISHI: Novel HCV entry inhibitors: Strategy for screening and characterization  
国立感染症研究所エイズ研究センター [〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1]

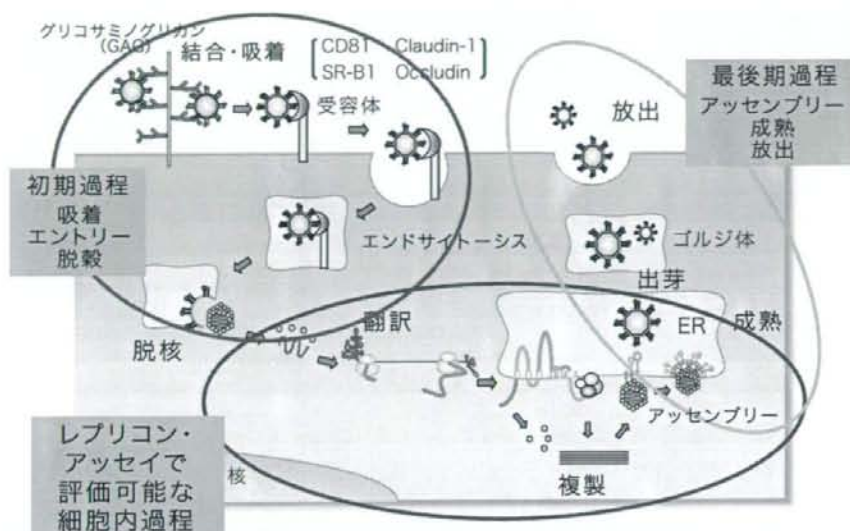


図1 HCV生活環(ライフサイクル)とレプリコン・アッセイによって可能な阻害剤探索の範囲  
背景の原図は松浦善治・鈴木哲雄博士の好意による

り、これら酵素タンパク質に対する阻害剤開発がHCV治療薬開発研究の中心となっている。それに対して、これら2種のウイルスタンパク質以外を標的とする開発研究は現時点では非常に限られている。なかでも、HCV エントリー阻害剤の開発は魅力的な研究課題であるが、ほとんど未開拓のまま残されている。本小論文では、HCV エントリーを標的とする治療薬開発の現状と、エントリー阻害剤探索の戦略に関して、われわれの経験を交えながら概説したいと考える。

## 2 HCVエントリー阻害剤の探索システム

### 1. HCV 阻害剤アッセイ

#### (a) HCV レプリコン・アッセイ

レプリコン・アッセイは、HCVの感染初期過程をバイパスしたアッセイであり、エントリー後段階(post-entry)の細胞内でのウイルス複製過程を標的とする阻害剤の探索評価に非常に便利なシステムである。ハイスルー

ット (high throughput) 化が可能であり、阻害剤の大規模な探索・評価に広く用いられている。しかし、エントリー過程をバイパスしたアッセイのため、ウイルスエントリーを阻害するような薬剤の探索はできないという難点がある。しかし、後述するように、他のアッセイで抗HCV活性がみられ、一方レプリコン・アッセイで活性が検出されない場合、その薬剤の作用段階が、感染初期あるいは感染最後期段階にあると推定できる。レプリコン・アッセイの結果はエントリー阻害剤を探索する上で、有力なクライテリアとなる。

(b) HCV シュード粒子 (HCVpp) アッセイ  
HCVppアッセイは、HCVエンベロープを被ったシュード粒子を用いることによってHCVエントリー(ウイルスの吸着、受容体結合、細胞侵入、膜融合、脱殻までの過程)を直接評価できる系である。シュード粒子は本来のエンベロープタンパク質の代わりに、他のウイルスのエンベロープタンパク質を

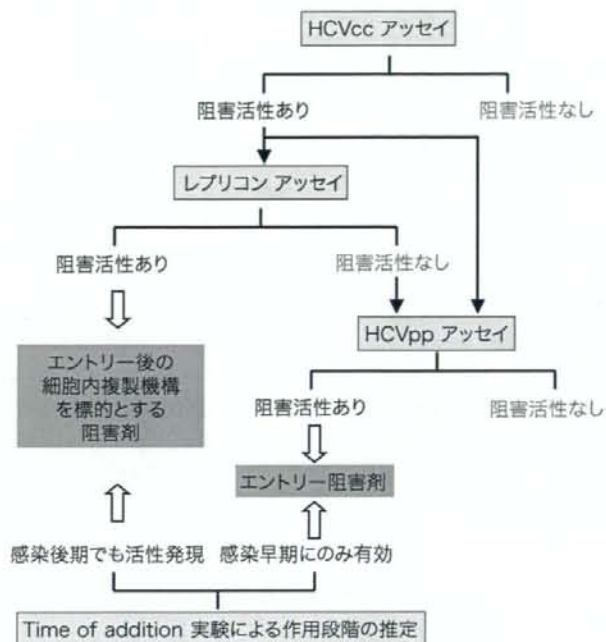


図2 HCVエンタリー阻害剤の探索戦略

被ったウイルスのことを指すもので、水疱性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus, VSV)<sup>3)</sup>あるいはレトロウイルス由来のものがあるが、われわれはレトロウイルス・ベクターを用いた系を利用している。その場合、HCVエンベロープタンパク質E1/E2を被ったキャプシドの中にレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)がパッケージングされていて、HCVエンベロープタンパク質に依存した細胞へのウイルスエンタリーをレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)の発現量で簡便に評価することができる<sup>4)</sup>。

(c)細胞培養系を用いた(HCVcc)アッセイ  
先に述べたようにHCVccアッセイが樹立されたことによって、現在汎用されているレプリコン・アッセイでは可能でなかったエンタリー過程を含むHCV増殖環のすべてのステップに対する阻害剤の探索を実現することができようになった。HCVで細胞培養系が

樹立される前には、HCVのモデルとして、近縁のウシウイルス性下痢症ウイルスBovine viral diarrhea virus (BVDV)<sup>5)</sup>が用いられ、BVDVをHCVのサロゲート surrogate モデルとした阻害剤の評価が行われてきた<sup>5)</sup>。脇田らによるJFH-1クローンの樹立<sup>2)</sup>は、この分野での文字通りの大きなブレイクスルーである。しかし、現時点では、細胞培養系によって十分に強力(robust)なウイルス増殖が可能なのは、HCVジェノタイプ2aのJFH-1クローンに限られる<sup>6)</sup>。特に現行のインターフェロン/リバビリン療法に難治性のジェノタイプ1bを含む多様なジェノタイプのウイルス株による増殖系の確立は重要な意味がある。HCV阻害剤の感受性は、ジェノタイプの違いによって異なる場合が往々にしてあり、様々なジェノタイプのHCVに対する増殖(HCVcc)アッセイ・システムの整備が待たれる。



表1 これまでに知られているHCVエントリー・粒子形成阻害剤

阻害剤(標的)クラス	阻害剤	標的・作用機構	備考
非特異的HCVエントリー阻害剤			
糖鎖結合因子(CBAs)			
ペプチド性(CBP)	シアノピリン-N (CV-N)	エンベロープタンパク質E1/E2結合N-グリカンへの結合による吸着阻害	ドメイン・スワップド=量体(図5A-1).単量体としての分子量約11,000
非ペプチド性	ブラジミシン(PRM-A) ベナノミシン(BNM-A)	同上	
$\alpha$ -グリコシダーゼ阻害剤	N-ブチル-デオキシノジリマイシン(NB-DNJ) N-ノニル-デオキシノジリマイシン(NN-DNJ) セルゴシビル(MX-3253)	エンベロープタンパク質E1/E2の糖鎖異常を引き起こし、その結果としてウイルス粒子の感染性が失われる	IFN $\alpha$ /リバビリン併用での第2相試験(Migenix社). カスタノスベルミン誘導体
その他	$\alpha$ -アルビドール(ARB)	膜融合阻害?	
特異的HCVエントリー阻害剤			
CD81拮抗剤	-		
SR-B1拮抗剤	-		
Claudin-1拮抗剤	-		
その他	-		

-: 報告なし

## 2. HCVエントリー阻害剤探索の戦略

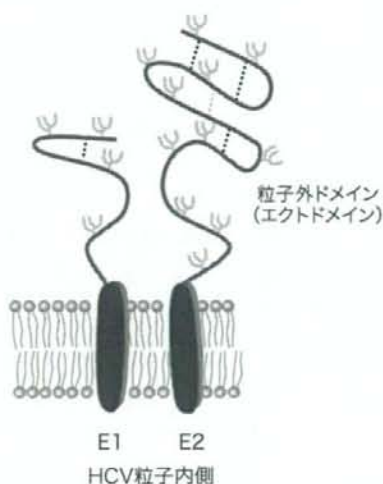
ある薬剤がウイルスエントリーに作用するかどうかは、いくつかのアッセイを組み合わせてその性質を調べることによって検証することができる。われわれは、図2に示すように、HCVccアッセイ、レプリコン・アッセイ、HCVppアッセイ、さらにいわゆる“Time of addition”実験を組み合わせることによって、阻害剤の作用点を組織的に推定・分類する戦略をとっている。

表1に示すように、もし同定された阻害剤の作用点がウイルスエントリーにある場合、HCVccアッセイおよびHCVppアッセイでは

活性を示すが、レプリコン・アッセイによっては活性が検出されないという結果が期待される。図2は、このような原理に基づき、われわれが現在行っているHCV阻害剤アッセイの流れと、作用機構推定のためのフロー・チャートをdecision tree(決定木)として示したものである。

“Time of addition”実験は、ウイルス感染に対して、薬剤を添加するタイミングをずらして行って(例えば1時間毎に)、薬剤が効果を発揮できる時間条件を検討することで、ウイルスの増殖環における薬剤の作用時期を推定するための実験である。ある薬剤が薬効を

A. HCVエンベロープタンパク質E1/E2は高度の糖鎖修飾を受けている



B. 高マンノース型N-グリカンの構造と糖鎖結合因子(CBA)の作用標的

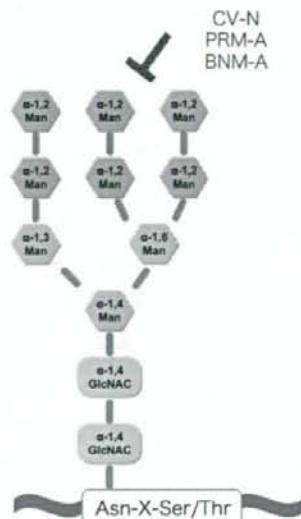


図3 HCVエンベロープタンパク質E1/E2の糖鎖構造

HCVエンベロープタンパク質E1, E2はそれぞれ4, 11個のN-結合糖鎖結合サイトを持ち、高度の糖鎖修飾を受けている(A)。結合糖鎖は、宿主細胞にはほとんどみられない高マンノース型N-グリカン(B)である。シアノビルン-N (CV-N)、プラジミシンA (PRM-A)、ペナノミシンA (BNM-A)は高マンノース型N-グリカンの末端 $\alpha$ -1,2マンノース残基に結合する。

発揮するために、薬剤をウイルス感染前あるいはその直後に添加する必要がある場合、その薬剤はウイルスエントリーを含む感染初期過程に作用点があると推定できる。一方、試験薬剤をウイルス感染の数時間後に添加した場合にでも、薬効が発揮される場合、その薬剤はウイルスエントリーが完了したのちの細胞内複製過程のどこかを標的としているものと推定できる。

われわれは、図2に示すように、HCVccアッセイで抗HCV活性を示すが、レプリコン・アッセイでは活性を示さないというクライテリアからエントリー阻害剤候補を絞り込み、ついでHCVppアッセイ、“Time of addition”実験で検証するような手順を取っている。

むしろHCVppアッセイで最初からエント

リー阻害剤を探索する方法もその一つと考えられるが、われわれは、HCVppアッセイはあくまでもHCVエントリーのサロゲート・surrogateアッセイ(HCVエントリーを完全には反映しない可能性がある)と考えている点と、大規模スクリーニングに必要なHCVシールド粒子を準備・調製することが必ずしも容易でないこと、また、エントリー阻害剤以外のさまざまな治療薬シーズをより広く探索する目的で、HCVccアッセイによるunbiased (バイアスなし)のアッセイをスクリーニング戦略の中心におく、“Brutal force”による方法を取ってとっている。

### 3 HCVエントリー阻害剤開発の現状

#### 1. ウイルス粒子側に作用する薬剤

##### (a) 糖結合因子(carbohydrate binding

agents; CBAs)

HCVの標的細胞への感染には、HCVのエンベロープ糖タンパク質E1、E2が重要な役割を果たしている。E1、E2にはそれぞれ少なくとも4個、11個のN-結合糖鎖(N-グリカン)が付加している(図3A)。これら糖鎖は、エンベロープタンパク質の適正な折り畳み(フォールディング)、アッセンブリーに必須で、ウイルス粒子が感染性をもつためには不可欠である。また、N-グリカンは、構成する糖鎖構造の違いから、トリ-アンテナ型(tri-antennary complex-type)、ハイブリッド型(hybrid-type)と高マンノース型(high-mannose-type)の3種に分類されるが、このうち、高マンノース型N-グリカン(図3B)は、HCVやHIVなどのエンベロープウイルスに豊富にみいだされるもので、細胞側の糖鎖にはほとんどみいだせないという特徴があり、したがって、特に高マンノース型N-グリカンに特異的に結合する薬剤は抗ウイルス剤として望ましい性質を持っている可能性が期待される。

CBAsにはペプチド性(タンパク質性)のもの、非ペプチド性のものがある。前者は糖結合タンパク質(carbohydrate binding proteins, CBPs)であり、いわゆる糖結合性生物活性物質レクチンが含まれる。このカテゴリーに属する代表的な物質がシアノピリン-N(CV-N)である。後者にはブラジミシンA(PRM-A)<sup>7)</sup>やベナノミシンA(BNM-A)などもともと抗真菌剤として知られていた抗生物質が知られている。これらのCBAsはいずれも高マンノース型N-グリカン末端の $\alpha$ (1,2)マンノースに対して特異的結合能を持っている(図3B)<sup>8)</sup>。

CV-Nはシアノバクテリアには由来する抗ウイルス性レクチンで、分子量は11,000(単

量体で)、2量体として機能する。HIV、インフルエンザウイルス、SARS-コロナウイルス(SARS-CoV)など多くのエンベロープ・ウイルスの感染を強力に阻害することが知られている<sup>9,10)</sup>。HCVにおいてはHCVppアッセイ法により様々なジェノタイプのHCVエントリーをナノモル濃度で阻害することが明らかにされている<sup>11)</sup>。

非ペプチド性のもので知られているPRM-AやBNM-Aは、有効濃度がマイクロモル・レベルで必ずしも強力なものではないものの、HIVやHCV双方に対する阻害活性をもっており、これらをリードとしてより有効性の高い薬剤の開発が計画されている。

なお、CBPはタンパク質性のため、大量調製・精製にコストがかかることや、長期投与によってそれに対する抗体が作られ、活性が減弱するおそれや、過敏反応のような副作用の危険性が予測される。しかし、その高い抗ウイルス効果から粘膜面での感染阻害を目的とするマイクロピサイドとして、とりわけ魅力的な特性をもっている。また、タンパク質であるため、良好な経口吸収性や薬理動態 pharmacokinetics は期待できないが、皮下注射や経鼻噴霧によって、インフルエンザウイルスやSARS-CoVなどの感染を阻止できるという観察がなされているという(私信)。

#### (b) $\alpha$ -グリコシダーゼ阻害剤

小胞体(ER)でのHCVエンベロープタンパク質が機能的な分子として成熟するには、 $\alpha$ -グリコシダーゼによって糖鎖が適正に付加・解裂し、レクチン様(糖鎖結合性)のERシャペロンタンパク質であるカルネキシン calnexin に結合し、正しく折り畳まれる必要がある。したがって、 $\alpha$ -グリコシダーゼを阻害すると、HCVエンベロープタンパク質の糖鎖修飾に異常が起こり、エンベロープタンパ

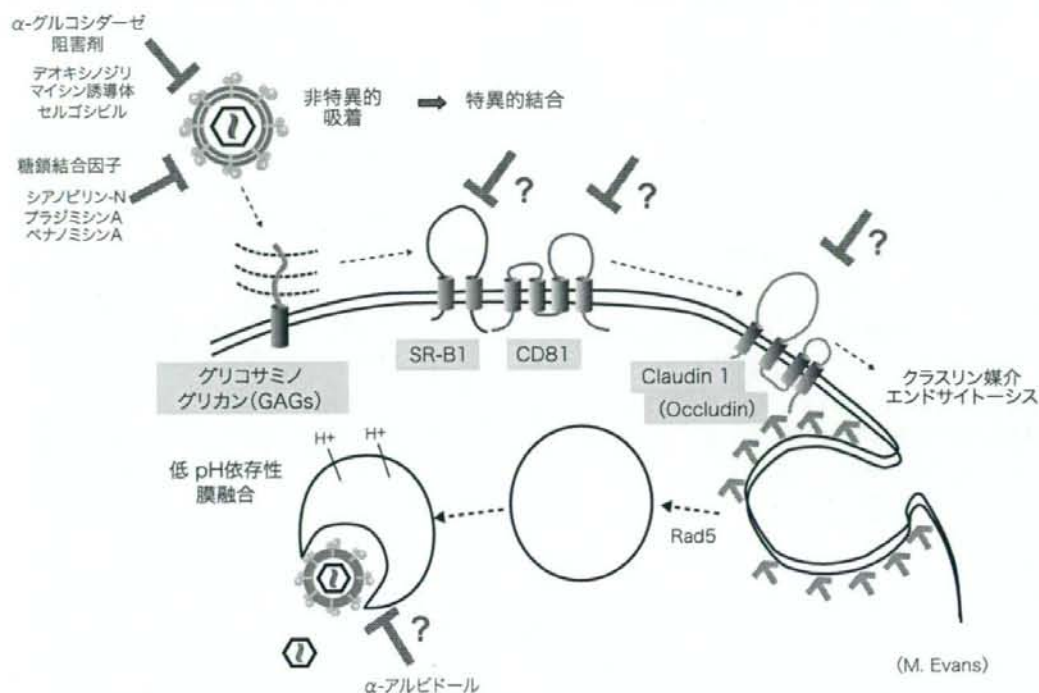


図4 HCV エントリー機構と阻害剤標的

ク質の適正な折り畳み、アッセムブリーが阻害され、その結果としてウイルスの感染性が失われるために、エントリー阻害剤としての活性を発現する。

α-グリコシダーゼ阻害剤として、糖のアナログ(イミノ糖 iminosugar)であるデオキシノジリマイシン(DNJ)が知られている。DNJ そのものは、ほとんどHCV阻害活性を示さないが、長鎖アルキル鎖をもつDNJ誘導体[N-ブチル-デオキシノジリマイシン(NB-DNJ), N-ノニル-デオキシノジリマイシン(NN-DNJ)]は、HCVのエントリーをマイクロモル濃度で阻害する<sup>12)</sup>。同様な作用機構をもつ薬剤として、セルゴシビル CELGOSIVIR (MX-3253, Migenix社)<sup>13)</sup>が臨床応用を目的として開発されている。セルゴシビルはα-グリコシダーゼ阻害剤の一つであるカスタノ

スペルミン(castanospermine)のプロドラッグである。単独の薬効はさほど高くないが、現在Peg-IFN・リバビリンとの併用による第2相治験が進行中である。

なお、HCVがコードするウイルスタンパク質p7は、陽イオン・チャネルの機能を持ち、ウイルス粒子の成熟・放出に関与するいわゆる viroporin ファミリー(ウイルス由来のチャネルタンパク質)の一つと考えられているが、長鎖アルキル側鎖をもつイミノ糖(NN-DNJなど)は、このイオンチャネルの阻害剤としての機能を持つことが報告されている<sup>14)</sup>。したがって、DNJ誘導体の抗HCV活性は、α-グリコシダーゼ阻害活性とイオンチャネル阻害活性の双方によるものと考えられる。しかし、これらの薬剤の抗HCV作用はそれほど強力なものではなく(マイクロモ