

Real-time RT-PCR analysis

Total cellular RNA was isolated using ISOGEN (Nippon Gene). Two micrograms of total cellular RNA was used to generate cDNA from each sample using SuperScript II (Invitrogen) reverse transcriptase. Expression of mRNA was quantified using Quanti Tect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN, Valencia, CA) and the ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primers used were as follows: HCV-JFH1 sense (positions 7090 to 7109; 5'-TCA GAC AGA GCC TGA GTC CA-3'), HCV-JFH1 antisense (positions 7404 to 7423; 5'-AGT TGC TGG AGG GCT TCT GA-3'), beta-actin sense (5'-ACA ATG AAG ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT-3'), and beta-actin antisense (5'-TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC-3').

Quantification of HCV core antigen in the culture supernatant

The culture supernatants of JFH1-RNA transfected Huh-7.5.1 cells were collected on the days indicated, passed through a 0.45 µm filter (MILLEX-HA, Millipore, Bedford, MA), and stored at -80 °C. The levels of core antigen in the culture supernatants were measured using a chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) according to the manufacturer's protocol (Lumipulse Ortho HCV Antigen, Ortho-Clinical Diagnostics, Tokyo, Japan).

Western blotting

Western blotting was carried out as described previously (Tanabe et al., 2004; Yokota et al., 2003). Briefly, 10 µg of total cell lysate was separated by SDS-PAGE and blotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) western blotting membrane. The membrane was incubated with the primary antibodies followed by a peroxidase-labeled anti-IgG antibody and visualized by chemiluminescence using the ECL western blotting Analysis System (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). The antibodies used were anti-core mouse monoclonal antibody 2H9 (provided by Dr. Wakita), anti-GRP78 goat monoclonal antibody, anti-GADD153/CHOP rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-eIF2-alpha, anti-phospho-eIF2-alpha rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, CA), and anti-beta-actin antibody (Sigma).

Immunocytochemistry

HCV-JFH1-transfected or infected Huh-7.5.1 cells were cultured in Lab-Tek® Chamber Slide™ (Nalge Nunc International, Rochester, NY) or on 22-mm-round micro cover glasses (Matsunami, Tokyo, Japan). For detection of HCV-core and GRP78, cells were fixed with cold acetone for 15 min. The cells were incubated with the primary antibodies for 1 h at 37 °C and with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG antibody or Alexa Fluor 568 donkey anti-goat IgG antibody (Molecular Probes, Eugene, OR) for 1 h at room temperature. To analyze apoptosis of HCV-JFH1 infected cells, double staining for annexin V-FITC

binding and for cellular DNA using propidium iodide (PI) was performed using an annexin V-Fluorescein Staining Kit (Wako, Osaka, Japan). Cells were visualized by a fluorescence microscopy (BZ-8000, KEYENCE, Osaka, Japan).

Plaque assay

Huh-7.5.1 cells were seeded in collagen-coated 60-mm-diameter plates at a density of $2-4 \times 10^5$ cells per plates and were incubated at 37 °C under 5.0% CO₂ (as described above). After overnight incubation, HCV-infected culture supernatants were serially diluted in a final volume of 2 ml per plates and transferred onto the cell monolayers. After ~5 h of incubation, the inocula were removed, and the cell monolayers were overlaid with 8 ml of culture medium (DMEM, 2 mmol/l L-glutamine and 10% fetal bovine serum) that contained 0.8% methylcellulose. After 7 to 12 days of incubation under normal culture conditions, formation of cytopathic plaque was visualized by staining the cell monolayers with 0.08% crystal violet solution (Sigma). The levels of cytotoxicity were evaluated by counting the plaques and calculating the titer (PFU/ml). Similarly, the titers of infectivity were evaluated by performing immunocytochemistry to detect foci of HCV-core-positive cells and calculating the infectious focus-forming units (FFU/ml).

Sequence analyses

The cDNA from the isolated JFH1 plaque was amplified from cytopathic virus-infected Huh-7.5.1 cells by RT-PCR and subjected to direct sequence determination. Nucleotide sequences were read from both strands using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kits (Applied Biosystems) and an automated DNA sequencer (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Establishment of mutant JFH1 clones

In order to introduce various mutations into the NSSB region of JFH1, plasmid pJFH1 was digested with *Hind*III and the DNA fragment encompassing nt. 8231 to 9731 was subcloned into the pBluescriptII SK+ phagemid vector (Stratagene, La Jolla, CA). The following mutations were introduced into the DNA fragment in the subcloning vector by site-directed mutagenesis (Quick-ChangeII Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene): C9153T and G9295C, respectively. Finally, these *Hind*III-*Hind*III fragments were subcloned back into the parental plasmid pJFH1. The mutation T7662A-introduced PCR fragment (nt. 7421–7839) was subcloned into the T-Vector (pGEM-T Easy Vector Systems; Promega) and digested with *Rsr*II and *Bsr*GI. Finally, these *Rsr*II-*Bsr*GI fragments were subcloned back into the parental plasmid.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Student's *t*-test, and *p*-values of less than 0.05 were considered as statistically significant.


Acknowledgments

We are indebted to Dr. Francis V. Chisari for providing the Huh-7.5.1 cell line. This study was supported by grants from the Japan Society for the Promotion of Science, Miyakawa Memorial Research Foundation, and Viral Hepatitis Research Foundation of Japan.

References

- Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2000. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 7), 1631–1648.
- Benali-Furet, N.L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Icha, F., Rizzuto, R., Paterini-Brechot, P., 2005. Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* 24 (31), 4921–4933.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., Rice, C.M., 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290 (5498), 1972–1974.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 76 (24), 13001–13014.
- Borisevich, V., Seregin, A., Nistler, R., Mutabazi, D., Yamshchikov, V., 2006. Biological properties of chimeric West Nile viruses. *Virology* 349 (2), 371–381.
- Canbay, A., Friedman, S., Gores, G.J., 2004. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 39 (2), 273–278.
- Cerny, A., Chisari, F.V., 1999. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 30 (3), 595–601.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., Dubuisson, J., 1998. Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* 72 (5), 3851–3858.
- Chuma, M., Sakamoto, M., Yamazaki, K., Ohta, T., Ohki, M., Asaka, M., Hirohashi, S., 2003. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 37 (1), 198–207.
- Despres, P., Frenkiel, M.P., Deubel, V., 1993. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196 (1), 209–219.
- Despres, P., Flamand, M., Ceccaldi, P.E., Deubel, V., 1996. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J. Virol.* 70 (6), 4090–4096.
- Ferri, K.F., Kroemer, G., 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3 (11), E255–E263.
- Ghavam, S., Hashemi, M., Kadkhoda, K., Alavian, S.M., Bay, G.H., Los, M., 2005. Apoptosis in liver diseases—detection and therapeutic applications. *Med. Sci. Monit.* 11 (11), RA337–RA345.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., Moradpour, D., 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* 77 (9), 5487–5492.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397 (6716), 271–274.
- He, B., 2006. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ.* 13 (3), 393–403.
- Hinshaw, V.S., Olsen, C.W., Dybdahl-Sissoko, N., Evans, D., 1994. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J. Virol.* 68 (6), 3667–3673.
- Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T.M., Block, T.M., Romano, P.R., 2002. Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J. Virol.* 76 (19), 9588–9599.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., Wakita, T., 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* 64 (3), 334–339.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T., 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125 (6), 1808–1817.
- Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Nozaki, A., Naka, K., Ikeda, M., Shimotohno, K., 2005. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 3), 645–656.
- Kaufman, R.J., 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13 (10), 1211–1233.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2007. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J. Virol.* 81 (2), 588–598.
- Kummerer, B.M., Meyers, G., 2000. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 74 (1), 390–400.
- Leifeld, L., Nattermann, J., Fielenbach, M., Schmitz, V., Sauerbruch, T., Spengler, U., 2006. Intrahepatic activation of caspases in human fulminant hepatic failure. *Liver Int.* 26 (7), 872–879.
- Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., Weber, P.C., 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struct. Biol.* 6 (10), 937–943.
- Liberman, E., Fong, Y.L., Selby, M.J., Choo, Q.L., Couzens, L., Houghton, M., Yen, T.S., 1999. Activation of the gp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Virol.* 73 (5), 3718–3722.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Volk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 (5734), 623–626.
- Lohmann, V., Komer, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285 (5424), 110–113.
- Maekawa, S., Enomoto, N., Sakamoto, N., Kurosaki, M., Ueda, E., Kohashi, T., Watanabe, H., Chen, C.H., Yamashiro, T., Tanabe, Y., Kanazawa, N., Nakagawa, M., Sato, C., Watanabe, M., 2004. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J. Viral Hepatitis* 11 (5), 394–403.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collet, M.S., Rice, C.M., 1998. Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 72 (6), 4737–4745.
- Meyers, G., Thiel, H.J., 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 47, 53–118.
- Mita, A., Hashikura, Y., Tagawa, Y., Nakayama, J., Kawakubo, M., Miyagawa, S., 2005. Expression of Fas ligand by hepatic macrophages in patients with fulminant hepatic failure. *Am. J. Gastroenterol.* 100 (11), 2551–2559.
- Mori, K., 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101 (5), 451–454.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S., Wakita, T., 2007. The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J. Med. Virol.* 79 (6), 714–723.
- Mottola, G., Cardinali, G., Ceceacci, A., Trozzi, C., Bartholomew, L., Torrisi, M.R., Pedrazzini, E., Bonati, S., Migliaccio, G., 2002. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 293 (1), 31–43.
- Munro, S., Pelham, H.R., 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kD glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46 (2), 291–300.
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Tanabe, Y., Koyama, T., Itsuji, Y., Takeda, Y., Chen, C.H., Kakimura, S., Oooka, S., Maekawa, S., Enomoto, N., Watanabe, M., 2005. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129 (3), 1031–1041.
- Pahl, H.L., 1999. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol. Rev.* 79 (3), 683–701.

- Patel, T., Gores, G.J., 1995. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 21 (6), 1725–1741.
- Pavio, N., Romano, P.R., Graczyk, T.M., Feinstone, S.M., Taylor, D.R., 2003. Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 α kinase PERK. *J. Virol.* 77 (6), 3578–3585.
- Quaresma, J.A., Barros, V.L., Pagliari, C., Fernandes, E.R., Guedes, F., Takakura, C.F., Andrade Jr., H.F., Vasconcelos, P.F., Duarte, M.I., 2006. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. *Virology* 345 (1), 22–30.
- Rodrigues, C.M., Brites, D., Serejo, F., Costa, A., Ramalho, F., De Moura, M.C., 2000. Apoptotic cell death does not parallel other indicators of liver damage in chronic hepatitis C patients. *J. Viral Hepatitis* 7 (3), 175–183.
- Rust, C., Gores, G.J., 2000. Apoptosis and liver disease. *Am. J. Med.* 108 (7), 567–574.
- Ryo, K., Kamogawa, Y., Ikeda, I., Yamauchi, K., Yonehara, S., Nagata, S., Hayashi, N., 2000. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am. J. Gastroenterol.* 95 (8), 2047–2055.
- Sato, H., Takimoto, T., Tanaka, S., Ogura, H., Shiraiishi, K., Tanaka, J., 1989. Cytopathic effects induced by Epstein-Barr virus replication in epithelial nasopharyngeal carcinoma hybrid cells. *J. Virol.* 63 (8), 3555–3559.
- Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T., Hamada, H., 1999. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res.* 59 (14), 3411–3416.
- Shuda, M., Kondoh, N., Imazeki, N., Tanaka, K., Okada, T., Mori, K., Hada, A., Arai, M., Wakatsuki, T., Matsubara, O., Yamamoto, N., Yamamoto, M., 2003. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* 38 (5), 605–614.
- Su, H.L., Liao, C.L., Lin, Y.L., 2002. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J. Virol.* 76 (9), 4162–4171.
- Sumpter Jr., R., Loo, Y.M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., Gale Jr., M., 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79 (5), 2689–2699.
- Takashima, M., Kuramitsu, Y., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Toda, T., Sakaida, I., Okita, K., Oka, M., Nakamura, K., 2003. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 3 (12), 2487–2493.
- Tanabe, Y., Sakamoto, N., Enomoto, N., Kurosaki, M., Ueda, E., Maekawa, S., Yamashiro, T., Nakagawa, M., Chen, C.H., Kanazawa, N., Kakinuma, S., Watanabe, M., 2004. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- α . *J. Infect. Dis.* 189 (7), 1129–1139.
- Tardif, K.D., Mori, K., Siddiqui, A., 2002. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J. Virol.* 76 (15), 7453–7459.
- Tardif, K.D., Mori, K., Kaufman, R.J., Siddiqui, A., 2004. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 279 (17), 17158–17164.
- Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 (5203), 1456–1462.
- Vaughn, D.W., Hoke Jr., C.H., 1992. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol. Rev.* 14, 197–221.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T.J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11 (7), 791–796.
- Waxman, L., Whitley, M., Pollok, B.A., Kuo, L.C., Darke, P.L., 2001. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (24), 13931–13935.
- Yanagiya, A., Jia, Q., Ohka, S., Horie, H., Nomoto, A., 2005. Blockade of the poliovirus-induced cytopathic effect in neural cells by monoclonal antibody against poliovirus or the human poliovirus receptor. *J. Virol.* 79 (3), 1523–1532.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J., Lemon, S.M., 2007. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J. Virol.* 81 (2), 629–638.
- Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M., Mizusawa, H., 2003. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 4 (6), 602–608.
- Yu, C.Y., Hsu, Y.W., Liao, C.L., Lin, Y.L., 2006. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J. Virol.* 80 (23), 11868–118680.
- Zheng, Y., Gao, B., Ye, L., Kong, L., Jing, W., Yang, X., Wu, Z., Ye, L., 2005. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J. Microbiol.* 43 (6), 529–536.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Walzita, T., Chisari, F.V., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (26), 9294–9299.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Chung, J., Stamatakis, Z., Isogawa, M., Cheng, G., McKeating, J.A., Chisari, F.V., 2006. Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J. Virol.* 80 (22), 11082–11093.

 ライフサイエンス出版

TEL(03)3664-7900(代表)

【禁 無断転載・複製】

ウイルス性肝炎：C型肝炎 1

ウイルスの構造と病態

中川美奈 坂本直哉 渡辺 守

なかがわ みな、さかもと なおや：東京医科歯科大学医学部 消化器内科，同大学大学院歯学部総合研究科 分子肝炎制御学講座，わたなべ まもる：同学部 消化器内科

● はじめに

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) は全世界でおよそ 1.7 億人 (国内では 160~200 万人) の感染者がいると推定される^{1,2)}。HCV に感染すると、その多く (70~80%) はウイルスを排除できずに慢性化する。HCV 感染が成立したごく初期にウイルスが排除されることもあるが、いったん慢性肝炎となると自然経過でウイルスが排除されることはきわめてまれで、多くの患者が肝炎の慢性化に伴い、慢性活動性肝炎、肝硬変へと進展し、ひとたび肝硬変になると年率約 7% の症例に肝細胞がんが発生する。

肝病態進展の阻止にウイルス排除は不可欠であり、持続的なウイルス排除を目的として、従来から C 型慢性活動性肝炎患者にインターフェロン (IFN) 療法が施行されてきた。しかし、IFN 単独での著効率は全体で約 20~30% と低く、わが国の HCV 感染者の 70% を占める遺伝子型 (genotype) 1b のうち、ウイルス量が多い難治例にはウイルスの陰性化が期待できないという問題があった。現時点で効果的な治療は IFN とリバビリンの併用療法であり、難治例に対しても著効率は約 50% まで期待できるようになったが、その効果は HCV の遺伝子型や遺伝子構造、およびウイルス量により大きく異なっており、治療効果の予測は日常診療での大きな課題となっている。本稿では、HCV の構造

と病態および治療効果について述べる。

● C型肝炎ウイルス遺伝子構造

HCV は約 9.6 kb の長さの 1 本鎖 RNA ウィルスであり、*flavivirus* 属に属し、hepatitis G virus や黄熱、デング熱のウィルスに近い^{1,3,4)}。その遺伝子は約 3000 アミノ酸からなる open reading frame (ORF) をコードし、1 つの蛋白 (polyprotein) として翻訳後に、HCV 自らの、あるいは宿主細胞のプロテアーゼ (protease) によって切断され、10 個の蛋白、すなわちコア、エンベロープ (E1, E2)、疎水性蛋白 (p7)、非構造 (non-structure: NS) 蛋白である NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B となる (図 1)。コア、E1, E2 はウイルス粒子を構成している構造蛋白である。NS3~NS5B は HCV RNA 複製に関与している。HCV 遺伝子にコードされている酵素活性としては、protease (NS2, NS3, NS4)、ヘリカーゼ (helicase) (NS3)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (polymerase) (NS5B) などが知られており、抗ウイルス療法の標的として研究されている⁵⁾。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の protease とは異なり、HCV の場合、これら酵素の active binding site は平坦で浅く、特徴がないため、特異的な阻害薬の開発は困難とされていたが、近年 HCV 治療薬としてプロテアーゼ阻害薬とポリメラーゼ阻害薬が開発され、現

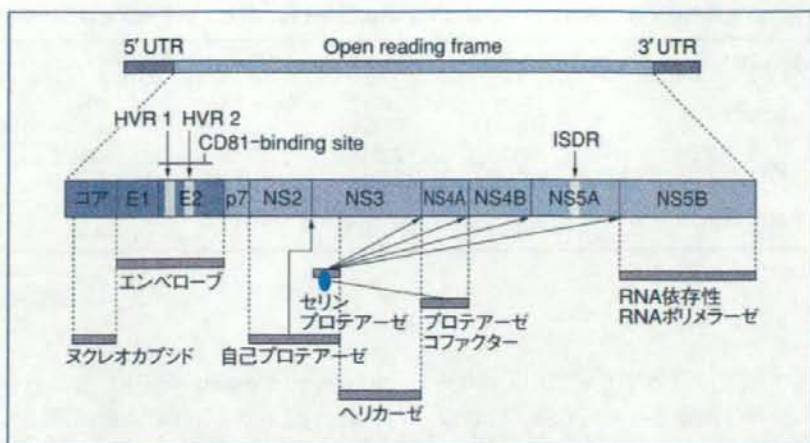


図 1 C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムと蛋白 (文献 1 より引用)

HCV は約 9.6 kb の長さの 1 本鎖 RNA ウイルスであり、1 つの蛋白 (polyprotein) として翻訳後、HCV 自らの、あるいは宿主細胞のプロテアーゼによって切断され 10 個の蛋白となる。E2 には超可変領域 (hypervariable region: HVR) とよばれる 2 つの領域、HVR1 と HVR2 とが存在し、分離株間で塩基配列の多様性が特に著しい。E2 には CD81-binding site とよばれる領域も存在し、HCV の接着機構に関与していると考えられている。非構造 (NS) 蛋白においては、プロテアーゼ (NS2, NS3, NS4)、ヘリカーゼ (NS3)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (NS5B) として作用する領域の構造が明らかにされ、ウイルス RNA の複製に関与していると考えられる。また、NS5A には interferon sensitivity determining region (ISDR) が存在し、インターフェロン耐性機序に関与すると考えられている。

在海外でフェーズ II 試験が進行中である。

HCV が複製する際には、HCV の NS5B 領域にコードされる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが用いられると考えられているが、一般に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは誤った塩基の取り込みに対する修復機構をもたないため、高頻度に塩基の置換が生じる。この結果、多様な遺伝子変異を有する多数の変異株が存在し、これらの遺伝子配列の多様性は 4 つのヒエラルキー、すなわち遺伝子型 (genotype)、亜型 (subtype)、分離型 (isolate)、疑似型 (quasispecies) に分けられている。

HCV genotype は塩基配列の相同性により分類されるが、Simmonds の分類⁶⁾が一般的に使用されている。まず約 60% の相同性を認める 6 種類の genotype 1~6 に大きく分けられ、さらに約 80% の相同性を認める 40 種類以上の subtype a, b, c, などに分けられる。世界の地域により genotype の分布は大きく異なり、米国や西欧諸国では genotype 1a, 1b が最も一般的

で、genotype 2, 3 がそれに続く。他の genotype はこれらの国々ではみられないが、genotype 4 はエジプト、genotype 5 は南アフリカ、genotype 6 は東南アジアでみられる。日本では、前述したように 1b が約 70% と大勢を占め、2a が約 20%、2b が約 10% 認められ、それ以外の型は 1% 以下である。

● C型肝炎ウイルス遺伝子型とインターフェロン単独療法の効果

HCV genotype の相違は IFN 治療効果に大きく影響している。表 1 に十分量の IFN を投与した自験例 259 例での HCV genotype と血中ウイルス量 (bDNA 法 Ver1.0) 別の IFN 著効率を示す。IFN 著効率は全体では 37% であるが、genotype 別にみると 1b が 20%、2a が 68%、2b が 53% と大きく異なっている。一般に IFN 効果が低いとされる genotype 1b でも低ウイルス量では著効率は高く、ウイルス量が増えるにしたがって著効率も低下している。5.0 mEq/mL 以

表 1 C 型肝炎ウイルス遺伝子型 (genotype) およびウイルス量とインターフェロンの効果

ウイルス量 (bDNA 法) (mEq/mL)	0.5 未満	0.5~1.0 未満	1.0~5.0 未満	5.0 以上	総数
genotype 1b	64% (18/28)	26% (6/23)	15% (7/46)	0% (0/60)	20% (31/157)
genotype 2a	81% (39/48)	27% (3/11)	60% (6/10)	33% (1/3)	68% (49/72)
genotype 2b	83% (10/12)	25% (1/4)	30% (3/10)	50% (2/4)	53% (16/30)

著効率%
(著効例/総数)

上の高ウイルス量では著効率 0% と、IFN 単独でのウイルス排除は困難と考えられる。これよりウイルス量が低ければどの genotype でも IFN 著効率は高いが、高ウイルス量では 2a, 2b でなければ IFN 単独でのウイルス排除は困難であり、HCV の genotype とウイルス量を知ることにより IFN 治療効果のある程度予測することが可能と考えられる。

このように IFN 抵抗性と考えられる genotype 1b でも、ウイルス量により IFN 効果は異なっており、genotype 1b のなかでも遺伝子構造の相違により IFN 感受性やウイルス量に影響を与えている可能性がある。そこで、Enomoto らは single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を用いて宿主内の HCV (genotype 1b) quasispecies の経時変化を分析し、IFN 投与に伴って特定の集団が選択される症例を見いだした。このような症例について、HCV の全遺伝子配列を IFN 投与直前および投与中に polymerase chain reaction (PCR) 産物のダイレクトシーケンシング (direct sequencing) により決定すると、同一宿主内で検出された IFN 感受性 HCV quasispecies と抵抗性 HCV quasispecies のアミノ酸配列の相違は NS5A 領域の C 末端側に集中しており、HCV 増殖に関与する非構造蛋白のひとつである NS5A 蛋白の変異は IFN 感受性に関与していることを見いだした。さらに、プロトタイプ HCV である HCV-J の配列と比較すると、IFN 著効例では NS5A 内の領域 (aa2209-2248) に多数のアミノ酸変異を認めたとのに対して、IFN 無効例ではほとんど変異を認めず、この領域を interferon sensitivity

determining region (ISDR) と命名した^{7,8)}。

血中 genotype 1b HCV RNA 陽性である C 型慢性肝炎 334 例の NS5A 領域 (ISDR) のアミノ酸配列を決定し、同領域のアミノ酸変異数により野生型 (wild type: 変異数 0)、中間型 (intermediate type: 変異数 1~3 個)、変異型 (mutant type: 変異数 4 個以上) の 3 種類に分類すると、wild type 145 例 (43%)、intermediate type 135 例 (40%)、mutant type 54 例 (16%) であった。IFN 著効率は wild type 6% (8/145)、intermediate type 15% (20/135)、mutant type 91% (49/54) であり、mutant type は wild type、intermediate type に比べ有意に著効率が高値であった ($p < 0.0001$)。さらに変異数ごとに著効率をみると、0 個 6% (8/145)、1 個 13% (13/102)、2 個 17% (4/23)、3 個 30% (3/10)、4 個 78% (7/9)、5 個以上 93% (42/45) であり、変異数が増加するに従い著効率も上昇しており、intermediate type のなかでも変異数 1 個の症例は wild type と同程度に著効率が低いのにに対し、変異数が 3 個の症例は著効率 30% と比較的高値であった (図 2)⁹⁾。したがって、ISDR に変異をもたない HCV genotype 1b は IFN 抵抗性 HCV であり、変異数が増加するにつれ IFN 感受性が増すと考えられた。

● インターフェロンとリバビリンの併用療法

前述のように IFN 単独での著効率は全体で 20~30% と低く、わが国の HCV 感染者の 7 割を占める genotype 1b のうち、ウイルス量が多い症例にはウイルスの陰性化が期待できないという問題があった。こうした、IFN 単独での低

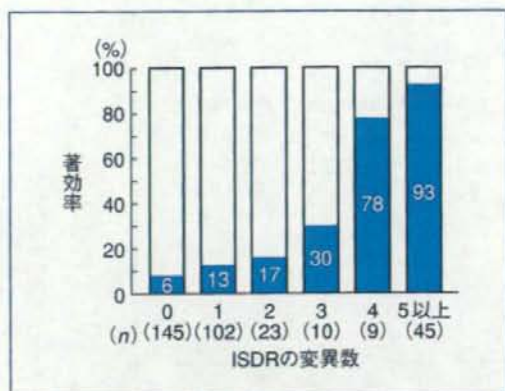


図2 interferon sensitivity determining region (ISDR) 変異数とインターフェロン (IFN) 効果 (文献9より引用)

ISDRの変異数別に著効率を検討すると、変異数が増えるに従って著効率が上昇していた。intermediate typeのなかでも変異数1個の症例はwild typeと同程度に著効率が低いに対し、変異数が3個の症例は著効率30%と比較的高値であり、変異数が4以上のmutant typeはwild type, intermediate typeに比べ有意に著効率が高値であった ($p < 0.0001$)。

い有効率を向上させるため、リバビリンとの併用療法や新しいタイプのIFNの開発など、さまざまな治療戦略が考えられ臨床に応用されている。

リバビリン(1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide)は1972年にWitkowskiらによって呼吸器感染症などに効果のある抗ウイルス薬として報告された薬剤である。*in vitro*ではDNAウイルスやRNAウイルスに広範囲に抗ウイルス活性を示し、以前からインフルエンザやrespiratory syncytial (RS)ウイルスなどによる呼吸器感染症、ラッサ熱などに使われていたが、C型慢性肝炎に対して使用されるようになってからは10年余になる。その作用機序はまだまだ十分に明らかにされていないが、ウイルスに対する直接作用と免疫を介した間接作用が想定されている²⁾。

IFN/リバビリン併用療法の効果を検証する臨床試験は1990年台に入りさまざまな施設で行われた。リバビリン単独投与では、ALT低下や肝細胞壊死所見の改善は認められるもののHCV-RNA陰性化は期待できず、対症療法とし

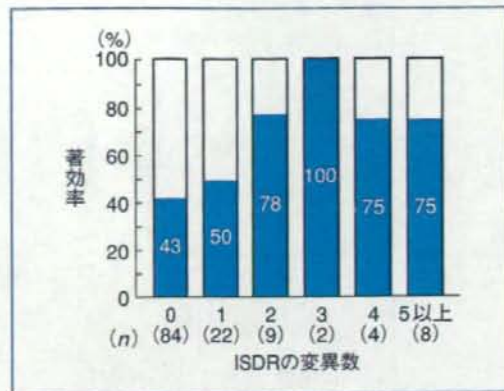


図3 interferon sensitivity determining region (ISDR) 変異数とペグインターフェロン (Peg-IFN) /リバビリン併用療法 (自験例)

自験例129例の解析ではPeg-IFNとリバビリン併用療法でもIFN単独療法同様、ISDR変異数が増加するにつれて著効率の上昇を認め、変異数が2以上の症例では1以下の症例と比較し有意に著効率は上昇した ($p < 0.01$)。

ては有用だが抗ウイルス療法としては不十分と考えられた。しかし、IFNと併用することにより、IFNが無効であった症例や、従来は効果が期待できなかった症例に対しても、治療の有効性が次々と報告されるようになった。

また、従来のIFNは半減期が短く、HCVのターンオーバーが数時間ときわめて短いことから、IFNを投与しない間にウイルス増殖が生じる可能性があった。Peg (polyethylene glycol)-IFNは持続型IFN製剤であり、polyethylene glycolと蛋白を共有結合させるpegylation(ペグ化)という技術を用いることで、ペグ化された蛋白は分子量が増し、その排除が遅延するとともに、免疫原性が低下することが報告された¹⁰⁾。従来より半減期が長いこと持続的に高い血中濃度を保つことが可能なPeg-IFNとリバビリンの併用療法が2004年ようやくわが国でも承認され、難治とされるgenotype 1高ウイルス症例でも約50%の症例で著効が得られるようになったが、自験例129例の解析ではPeg-IFNとリバビリン併用療法でもIFN単独療法同様、ISDR変異数が増加するにつれて著効率の上昇を認め、変異数が2以上の症例では1以下の症例と比較し有意に著効率は上昇した(図3)。

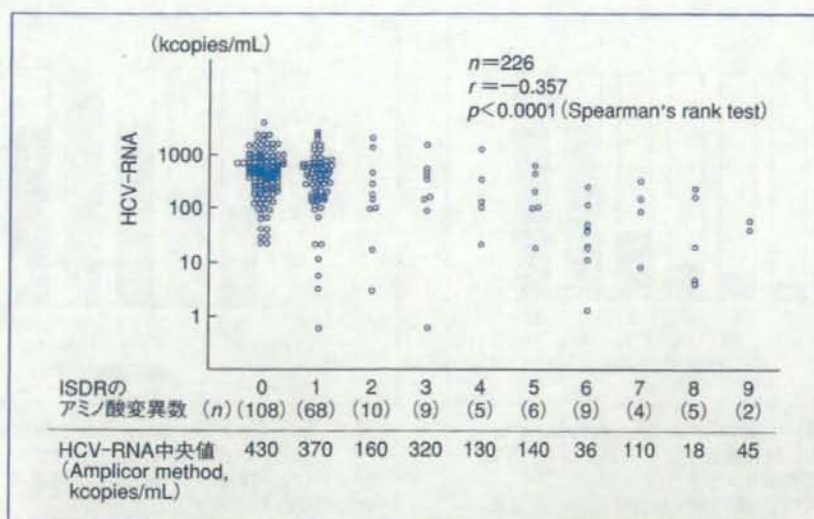


図4 interferon sensitivity determining region (ISDR) 変異数とウイルス量
(文献9より引用)

ISDRのアミノ酸変異数が増加するに従い、有意にウイルス量は低下しており、ISDR変異数と血中ウイルス量は逆相関していた。しかしながら、低ウイルス量、高ウイルス量別に検討しても、mutant typeはwild type、intermediate typeに比し有意にIFN著効率が高値であり、ISDR変異数および血中ウイルス量の両者を測定することにより、より正確なIFN効果を予測することが可能と考えられた。

● interferon sensitivity determining region (ISDR) 変異数と血中ウイルス量

このようにISDRの変異数と治療効果に密接な関連を認め、ISDR変異数と血中ウイルス量の相関についてさらに検討した。その結果、ISDRの変異数が増加するに従い、有意にウイルス量は低下しており、ISDR変異数と血中ウイルス量は逆相関していた(図4)¹¹⁾。これは、ISDRがHCV増殖に重要な役割をもっていると同時に、IFN感受性を規定している可能性が考えられる。しかしながら、wild typeにもかかわらず低ウイルス量の症例や、逆にmutant typeにもかかわらず高ウイルス量の症例も例外的に認められる。また多変量解析するとISDR変異数と血中ウイルス量はそれぞれ著効に相関する独立した因子としてウイルス排除と関連することから、ISDR変異数および血中ウイルス量の両者を測定することにより、より正確なIFN効果を予測することが可能と考えられた。

● 動物モデルと培養細胞系

HCVは効率的な培養細胞系が少なく、ウイルスの感染および複製機構解明の障壁となっていた。現状では依然としてチンパンジー以外のHCV感染実験系は確立しておらず、動物モデルとして使用するには数も限られ、高費用であるため、その使用は限られていた³⁾。しかし、1999年BartenschlagerらによりHCVレプリコンシステム(replicon system)が開発され¹²⁾、従来不可能であったHCV非構造蛋白による肝細胞内HCV-RNA複製増殖機構を培養細胞で安定して再現することが可能となった。HCVレプリコンは、HCV構造蛋白領域をネオマイシン耐性遺伝子に置換したsubgenomic RNAであり、Huh7細胞に導入しG418存在下に培養することにより、HCVレプリコン恒常発現細胞株を樹立することができる。その後、Wakitaらにより感染細胞内で高効率に増殖しウイルス粒子を形成することが確認できる培養系が開発された¹³⁾。このようなHCV *in vitro* モデルの確立によりHCV蛋白に関する研究は急速な進展を遂

げており、新薬開発の強力な手段となっている。

興味深いことに、HCV レプリコンの細胞内持続発現を達成するには、HCV-NS5A 領域の ISDR 近傍の特定の部位に適応的突然変異 (adaptive mutation) とよばれる変異を必要とする。NS5A 領域の変異は臨床において血中ウイルス量、IFN 治療効果に直接関連することから、NS5A は HCV 増殖を制御していると考えられ、レプリコン増殖に対する NS5A 蛋白および ISDR の作用を解析することは、HCV の IFN 耐性機序の解明につながる可能性があると考えられる。

● おわりに

HCV による慢性肝疾患の病態や治療効果は、その遺伝子構造に密接に関連していると考えられる。HCV レプリコンシステムの登場により、臨床的に検出される種々の HCV 遺伝子変異が、分子病態、薬物治療効果に与える影響を *in vitro* で解析することが可能となり、今後 HCV 研究および治療の開発に新たな展開をもたらすことが期待される。

謝辞：原稿執筆にあたり、山梨大学医学部第一内科の榎本信幸先生のご指導に深謝いたします。

文献

- 1) Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001 ; 345 : 41-52.
- 2) Lau JY, Tam RC, Liang TJ, et al. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic

HCV infection. *Hepatology* 2002 ; 35 : 1002-9.

- 3) Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000 ; 81 : 1631-48.
- 4) Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Research* 2001 ; 52 : 1-17.
- 5) Di Bisceglie AM, McHutchison J, Rice CM. New therapeutic strategies for hepatitis C. *Hepatology* 2002 ; 35 : 224-31.
- 6) Simmonds P, Alberti A, Alter H, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994 ; 19 : 1321.
- 7) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 224-30.
- 8) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutation in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 77-81.
- 9) Watanabe H, Enomoto N, Watanabe M, et al. Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity-determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection. *J Infect Dis* 2001 ; 183 : 1195-203.
- 10) Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002 ; 36 : S121-7.
- 11) Watanabe H, Enomoto N, Watanabe M, et al. Sequence elements correlating with circulating viral load in genotype 1b hepatitis C virus infection. *Virology* 2003 ; 311 : 376-83.
- 12) Lohmann V, Körner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999 ; 285 : 110-3.
- 13) Wakita T, Bartenschlager R, Liang TJ, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791-6.

Medical Practice

2008 vol. 25 no.10

テラプレビル

—すべてを解決する夢の新薬か—

坂本直哉

東京 文光堂 本郷

テラプレビル

—すべてを解決する夢の新薬か—

坂本直哉

東京医科歯科大学消化器内科/分子肝炎制御学講座/さかもと・なおや

はじめに●

HCV 感染症は、リバビリン(RBV)、PEG インターフェロン(IFN)製剤の登場により治療成績が格段に向上したが、依然ウイルス排除率は50%弱に留まり、さらに約20%強の症例は治療中もウイルス陰性化の得られない null responder である。以上の状況から安全かつ有効な新規クラス薬剤の登場が待たれている。現在欧米を中心に、HCV 感染の基礎知見に基づいた STAT-C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for chronic hepatitis C) と総称される、ウイルス蛋白を直接標的にした一連の薬剤の開発・治験が進行している。その中で現在最も治験の進んでいるのがテラプレビル(TPV, VX-950, 国内ではMP-424)をはじめとする HCV プロテアーゼ阻害薬である。

HCV ゲノムと NS3 プロテアーゼ●

HCV ゲノムはプラス鎖 RNA であり、約3,000 アミノ酸をコードする単一の翻訳フレームを持つ(図1)。翻訳される蛋白前駆体は N 末端より3個

の構造蛋白(C, E1, E2)、および7個の非構造蛋白(P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)が含まれる。非構造領域には蛋白前駆体をさらに切断する2種のプロテアーゼが存在する。一つはNS2~3にまたがった領域にコードされるプロテアーゼであり、NS2~3の境界を cis 切断する。もう一つがNS3蛋白であり、N末端側約1/3がセリン・プロテアーゼ、C末端側2/3がヘリカーゼ活性を持つ。NS3プロテアーゼはC末端側のNS4Aとの境界を cis 切断、NS4AからNS5Bのそれぞれの蛋白の境界を trans 切断する。生成されたそれぞれの非構造蛋白は小胞体に局在・集積し、ウイルスゲノム増殖複合体を形成する。したがって、NS3プロテアーゼの活性を阻害することによりウイルスゲノムの増殖に必要なすべての蛋白の産生を抑制し得る。さらにNS3プロテアーゼは、細胞内のウイルス増殖により誘導される内在性インターフェロンの産生にかかわるシグナル分子であるIPS-1を切断し不活化し、HCVの細胞内での持続増殖の成立に関与していることが報告されている¹⁾。以上の知見

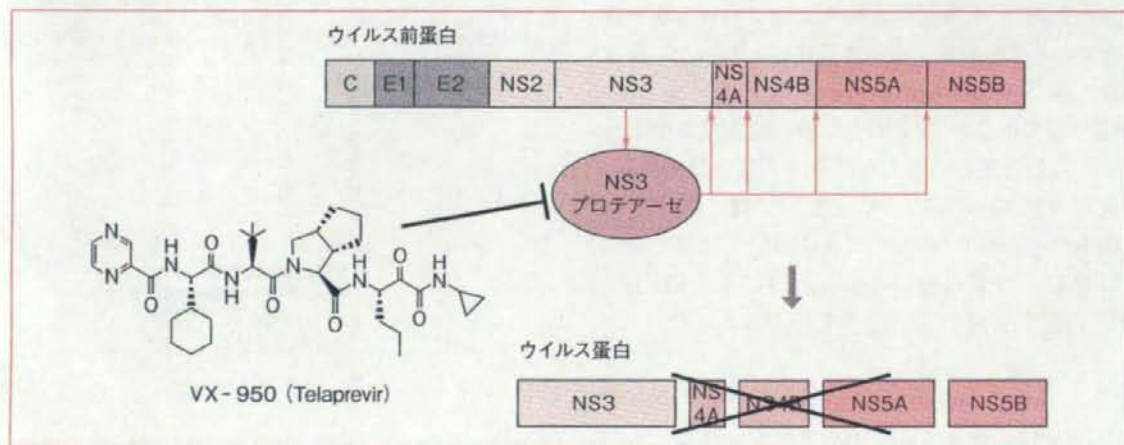


図1 HCV蛋白とNS3プロテアーゼ阻害薬

- NS3 プロテアーゼ阻害薬は HCV 増殖に必要な非構造蛋白の産生を阻害する。
- 現在テラプレビルを含む複数のプロテアーゼ阻害薬の臨床試験が欧米で進行している。
- プロテアーゼ阻害薬は経口投与による急速な血中ウイルス減衰が特徴である。

表1 プロテアーゼ阻害薬の特徴と開発状況

BILN 2061 (Boehringer Ingelheim)	開発中止
VX-950/Telaprevir (Vertex/J&J)	Phase III
Boceprevir (Schering-Plough)	Phase II
ITMN191 (Intermune/Rosche)	Phase I
TMC435350 (Tibotec/Medivir)	Phase I
ACH-806 (Gilead/Achillon)	Phase I

より、NS3 プロテアーゼ活性の阻害はウイルス増殖を抑制するのみならず、HCV 感染細胞におけるインターフェロン不応状態を回復しうることが示唆されている。

HCV プロテアーゼ阻害薬の開発●

HCV プロテアーゼ阻害薬は、NS3 プロテアーゼ・ドメインの結晶構造解析をもとに設計・開発され、現在数種類の臨床試験が進行している(表1)。当初 Boehringer Ingelheim 社の BILN2061 の開発が先行し、2003 年に HCV 感染者に対する同薬の抗ウイルス効果が世界で初めて報告され、NS3 プロテアーゼ阻害効果の proof of concept を果たした²⁾。しかし、前臨床試験における実験動物での心毒性発現のため開発中止となった。現在最も開発が進行しているのはテラプレビル(TPV)である。TPV の主な特徴は、投与開始早期からの急速かつ強力な抗ウイルス効果である。従来の PEG-IFN α -2a 単独投与では、14 日目の血中ウイルスレベルが 1.1 log の低下に留まるのに対し、TPV 単独で 4.0 log、さらに PEG-IFN と TPV の併用で 5.5 log の低下がみられた。

テラプレビルの臨床効果●

TPV は、後述するウイルス耐性変異などの問題から、単独使用によるウイルス排除は期待でき

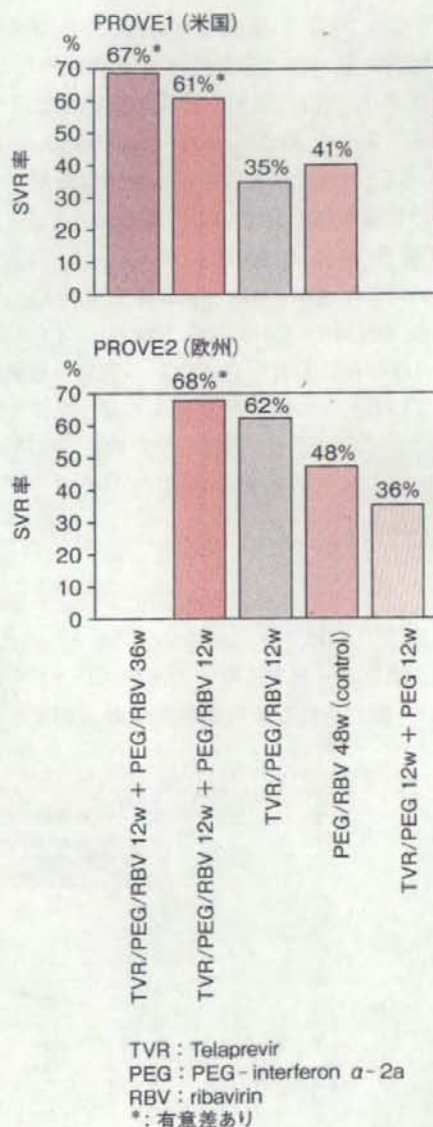


図2 Telaprevir, PEG-IFN, ribavirin 併用療法 SVR 率 : PROVE1, PROVE2 study

- テラプレビル・インターフェロン・リバビリン三者併用 24 週療法で約 70% 弱の SVR が得られる。
- プロテアーゼ阻害薬に対する耐性変異ウイルスが投与早期から出現する。
- テラプレビル継続投与により発疹などの副作用が報告されている。

表 2 HCV プロテアーゼ阻害薬の耐性変異

	Telaprevir	BILN2061	SCH503034	ITMN-191
<i>in vitro</i>	A156S/V/T	R155Q A156V/T D168V/A/Y	A156S/T T54A V170A	D168A
<i>in vivo</i>	V36M/A T54A R155K/T A156S/V/T	no data	T54A	no data

(文献 6)より改変引用)

ず、もっぱら PEG-IFN, RBV 併用での治験が進んでいる。現在, genotype 1, 高ウイルス量, 初回治療例を対象に, TPV と PEG-IFN α -2a, RBV 三者併用の第 2 相試験が, 米国・欧州のそれぞれを拠点に行われ(それぞれ PROVE1, PROVE2), 最終抗ウイルス効果(SVR)が報告された(図 2)^{3,4)}。

PROVE1 study: PEG-IFN α -2a + RBV 併用 48 週治療群を対照群(A 群)として, 治療開始より TPV を 12 週併用後, 総治療期間 48 週(B 群), さらに 4 週目ウイルス陰性化(RVR)例に, 24 週(C 群), 12 週(D 群)の治療が行われた。SVR 率は対照群(A) 41% に対し, TPV 併用 48 週(B) 67%, 同 24 週(C) 61%, 12 週(D) 35% であり, TPV 併用 24 および 48 週群で有意に高率であった³⁾。

PROVE2 study: PEG-IFN α -2a + RBV 併用 48 週治療を対照群(A 群)として, TPV12 週併用後, 総治療期間 24 週(B 群), 12 週(C 群)治療に加え, TPV + PEG-IFN の二者併用 12 週 + PEG-IFN 単独 36 週投与(D 群)を行った。SVR 率は対照群(A) 48% に対し, TVR 併用 24 週(B) 68%, 12 週(C) 62% と有意に高率である一方, RBV 非使用群(D)では 36% と低率であった⁴⁾。

以上の結果より, TPV を含む三者併用抗ウイ

ルス療法は 24 週の治療で, 現行の PEG-IFN+RBV48 週治療に較べ著効率を 20% 以上向上させ, 約 7 割弱の症例でウイルス排除を達成しうることが実証された。一方, TPV 投与の最大効果を得るためには IFN に加え RBV の併用が必要であることが示された。

薬剤耐性変異●

HCV-RNA の複製を担う NS5B RNA ポリメラーゼは proofreading 活性を持たないため, ウイルスゲノムに高頻度に変異が導入され(10^{-4} ~ 10^{-5} /nucleotide/replication), 血中で quasispecies と呼ばれる変異ウイルスの集合体を構成する。感染個体では 1 日約 10^{12} 個のウイルス粒子が産生されることから, 1 日で HCV ゲノムのすべての部位の変異ウイルスが生まれる計算となる。TPV を始めとするプロテアーゼ阻害薬は *in vitro* (HCV レプリコン系)および *in vivo* で薬剤耐性変異が同定・報告されている(表 2)^{5,6)}。これらの耐性変異は, TPV 単独投与 14 日目においてすでに血中 HCV quasispecies の 50~75% に出現する⁶⁾。PROVE2 study においても, 治療 12 週以内に, PEG-IFN/RBV/TPV 三者併用群 163 例中 5 例で, また PEG-IFN/TPV 二者併用

- プロテアーゼ阻害薬はウイルス自身を標的にする全く新しいクラスの薬剤である。
- インターフェロン・リビリン既治療例での効果は未だ報告されていない。
- 副作用・服薬コンプライアンス・耐性ウイルス・日本の症例における効果など検証すべき問題も多い。

78 例中 24 例で血中ウイルスの breakthrough がみられ、TPV 耐性変異が出現した⁴⁾。

テラプレビル治療の問題点・副作用●

TPV 750mg, 1日3回8時間ごとの投与では、4log 以上の血中 HCV 低下がみられたのに対し、TPV 1,250mg 12時間ごと投与では、約 3log の低下に留まった⁷⁾。以上のように TPV の最大効果を得るためには薬剤の有効血中濃度(トラフ値)を高く維持することが必要であり、最低1日3回の定時服用を継続することが肝要となる。また、TPV は IFN, RBV 併用継続投与により、皮疹を始めとする種々の副作用が報告されている。投与開始12週以内の中止例は PEG/RIBA 療法3% に対し TPR/PEG/RBV 療法では 13%、前治療期間では PEG/RIBA 11% に対し 21% が中止に至っている³⁾。

おわりに：テラプレビルは夢の新薬か？●

プロテアーゼ阻害薬はウイルスを標的にする全く新しいクラスの薬剤であり、強力かつ急速な抗ウイルス効果、三者併用抗ウイルス療法における高いウイルス排除(SVR)率より、待ち望まれた新薬であることには相違ない。一方、ウイルス排除を達成するには依然 IFN および RBV の併用が必要であり、これらの薬剤の非適応例には使用できない。また、現在治療を切望している PEG-IFN/RBV 再発・無効症例に対する TPV 治療成績は現在のところ未知数である。さらに、新規に出現する副作用や服薬コンプライアンス、耐性ウイルスなど検証・解決すべき課題も多い。今後数年の間に TPV を含む複数の新規クラス抗 HCV 薬剤が登場することが予想される。それらの新規

薬剤開発の動向を視野に入れながら、この“第一世代”の STAT-C である TPV 治療の展開を期待を持って見守りたい(平成20年8月25日著)。

文 献

- 1) Foy, E., Li, K., Wang, C. et al. : Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300 : 1145-1148, 2003
- 2) Lamarre, D., Anderson, P.C., Bailey, M. et al. : An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426 : 186-189, 2003
- 3) McHutchison, J.G., Everson, G.T., Gordon, S.C. et al. : PROVE1 : Results from a phase 2 study of telaprevir with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naïve subjects with hepatitis C. 42rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Volume 48, Milan, Italy, 2008 : S4
- 4) Dusheiko, G.M., Hezode, C., Pol, S. et al. : Treatment of chronic hepatitis C with telaprevir (TVR) in combination with peginterferon-alfa-2a with or without ribavirin : further interim analysis results of the PROVE2 study. 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Volume 48, Milan, Italy, 2008 : S26
- 5) Pawlotsky, J.M., Chevaliez, S., McHutchison, J.G. : The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132 : 1979-1998, 2007
- 6) Sarrazin, C., Kieffer, T.L., Bartels, D. et al. : Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132 : 1767-1777, 2007
- 7) Reesink, H.W., Zeuzem, S., Weegink, C.J. et al. : Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950 : a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 131 : 997-1002, 2006

抗ウイルス薬臨床試験の現況overview

坂本直哉*

索引用語：臨床試験, C型肝炎, STAT-C

1 抗HCV薬剤開発：世界の動向

HCV感染症は、リバビリン(RBV)、PEGインターフェロン(IFN)製剤の登場により、その治療成績は格段に向上したが、依然ウイルス排除率は治療例の50%弱に留まり、約1/3弱の症例は治療中もウイルス排除の得られないnull responderである。さらに日本においては世界に際立って感染者の高齢化が進行しており、より身体的負担の少なく有効な新規クラス治療薬剤の登場が待ち望まれる。現在欧米を中心に、HCV感染機構の基礎知見に基づいたSTAT-C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for chronic hepatitis C)と呼ばれる一連の薬剤を初めてとする多くの新規薬剤の開発・臨床試験が進行している。

米国で2002年施行の“Guidance for Industry: Information Program on Clinical Trials for Serious or Life-Threatening Diseases and Conditions”により、現在薬剤承認を目的としたすべての臨床試験は患者登録開始時に事前登録を必要とする。米国NIHの登録サイ

トであるclinicaltrials.govには2008年8月現在、HCVに対する78薬剤の154件の(IFN, PEG-IFN, RBVを除く)臨床試験が登録されている(表1に抜粋)。新規薬剤の臨床試験はその6割が米国・カナダ・EU諸国で施行されており、日本から登録されている臨床試験は僅か1.7%である(図1)。以下に各クラス薬剤と臨床試験を中心とした開発状況の概略を述べる。

2 プロテアーゼ阻害薬

HCVプロテアーゼ阻害薬は、HCV-NS3ドメインN端1/3のセリン・プロテアーゼの立体構造をもとに設計・開発された。2003年にBILN2061のHCV感染者に対する抗ウイルス効果が世界で初めて報告され、薬剤のProof of conceptを果たしたり、しかし、動物実験における心毒性発現のため開発中止となった。現在最も開発が進行しているのはテラプレビル(VX-950, 国内ではMP-424)である。プロテアーゼ阻害薬の特徴は、投与早期からの急速かつ強力な抗ウイルス効果であ

Naoya SAKAMOTO: Current status of HCV clinical trials

*東京医科歯科大学・消化器内科/分子肝炎制御学講座 [〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45]

表1 HCVに対して治験中の抗ウイルス療法・薬剤
(Clinicaltrials.gov, searched on 18-July-2008)

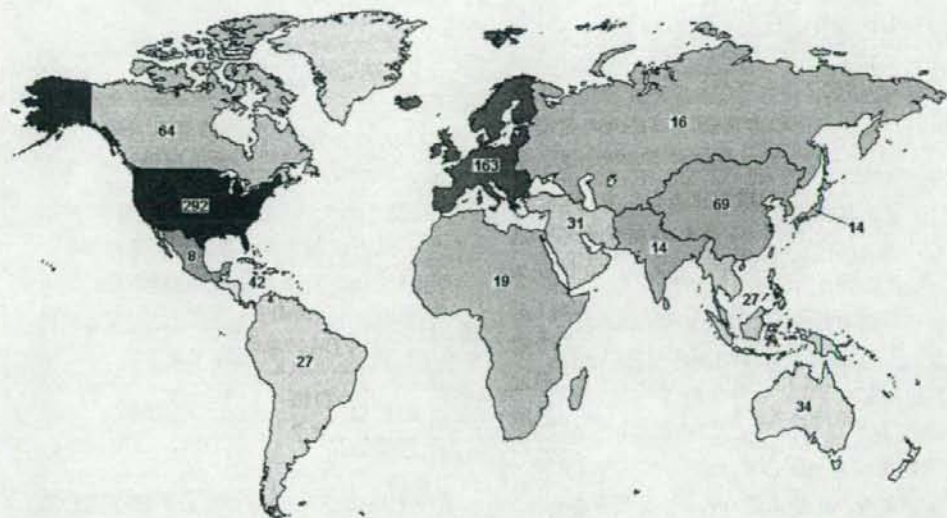
STAT-C		ワクチン	
プロテアーゼ阻害薬		IC41	Phase II
Telaprevir	Phase III	CHRONVAC-C	Phase II
Boceprevir	Phase III	TG4040	Phase I
TMC435350	Phase II	免疫制御薬	
MK7009	Phase I	thymosin alpha 1	Phase III
VBY 376	Phase I	KRN7000	Phase II
ポリメラーゼ阻害薬		SCV-07	Phase II
R1626	Phase II	MDX-1106	phase I
VCH916	Phase II	宿主細胞標的薬	
RO5024048	Phase II	Viramidine	Phase II
ABT-333	Phase I	Fluvastatin+IFN/RBV	Phase II
PF-00868554	Phase I	Cyclosporins	
XTL-2125	Phase I	Debio-025	Phase II
GS-9190	Phase I	NIM811	Phase II
ACH-0137171	Phase I	Celgosivir	Phase II
N5SA 阻害薬, A-831	Phase II	Nitazoxanide	Phase III
IRES 阻害薬, VGX-410C	Phase II	脂肪化抑制薬	
インターフェロン製剤		PPAR γ 作動薬	Phase II-IV
Albuferon	Phase III	Metformin	Phase IV
cIFN + RBV	Phase III	Xenical	Phase IV
Omega interferon	Phase II		
Locteron	Phase II		
Oral IFN	Phase II		

る。Telaprevir 単独 14 日投与で 4-log, さらに PEG-IFN と Telaprevir の併用で 5.5-log の血中 HCV 低下が見られた。現在, genotype 1 初回治療例を対象に, Telaprevir と PEG-IFN α 2a, Ribavirin 併用試験が, 米国・欧州のそれぞれを拠点に行われた (PROVE1, PROVE2)^{2,3)}。その効果は 3 者併用 12 週投与後 PEG-IFN/RBV 12 週で, SVR が 67% (PROVE1) および 68% (PROVE2) と, 標準治療に比して格段に高率であった。

3 ポリメラーゼ阻害薬

HCV の NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを標的とした薬剤で, 核酸型 (R1626,

RO5024048 など) 非核酸型 (VCH759, VCH916, XTL-2125 など) に分けられる。昨年从今年 にかけて Valopicitabine, HCV796, ACH-0137171 など Phase I-II まで行われたいくつかの薬剤が副作用などを理由に開発中止となった。現在 R1626 の試験が最も先行しており, Phase IIb の中間結果が発表されている。PEG-IFN, Ribavirin と R1626 1,500 mg/日 の 4 週併用後 PEG+RBV 40 週投与により投与終了時に 84% にウイルス消失が認められ, PEG + RBV 群 65% に較べ有意に高率であったが, R1626 群に血球減少を主体とする副作用が出現した⁴⁾。



Colors indicate number of studies with locations in that region
 Least Most
 Labels give exact study count

図1 各国地域別HCV関連臨床試験数

4 インターフェロン製剤

現在PEG-IFN週1回投与が標準治療となっているが、さらに長時間作用型のIFNの開発・治験が進行している。AlbupheronはIFN- α とアルブミンの組換え型融合蛋白であり、2週ないし4週間隔の投与が可能とされている。Phase II成績では対象群(PEG+RIBA48週)がSVR 58.9%に対しAlbupheron 2週または4週間隔投与+RBV併用48週群ではそれぞれ58.5%、50.9%とほぼ同等の成績であった⁵⁾。その他Drug delivery systemを用いた徐放型IFN (Locteron, Omega Interferon)なども試験が行われている。

5 ワクチン

感染防御を目的としたワクチンは1994年にE1E1組み換え蛋白ワクチンが報告され

ンバンジーでの効果が実証された⁶⁾。しかしその効果は普遍的でなく異なるゲノタイプの株を防御できないというものであった。HCVは急性感染後70~90%が慢性感染に移行するが、軽快例に比べ慢性化例では細胞性免疫応答が十分でないことが知られている⁷⁾。そこで現在、慢性感染者に対しウイルス抗原に対する細胞性免疫応答を惹起し肝炎の沈静化・進展抑止を計る治療ワクチンとして数種類の臨床試験が進行している。GI500およびIC41は繰り返し投与により0.5~1.5 logの血中HCV低下がみられたとされている。現在PEG-IFN/RBV療法との併用効果を確かめるPhase IIb試験が進行中である。

6 シクロスポリン誘導体

HCV増殖・培養系を用いた初期の研究で、免疫抑制剤であるシクロスポリンA (CsA)

が臨床血中濃度域でHCV増殖を特異的に抑制することがみいだされ、筆者らとWatashiら日本の研究グループからそれぞれ報告された^{8,9)}。さらにその作用機序はCsAの免疫抑制経路とは独立した、細胞内受容体であるシクロフィリン蛋白の機能阻害を介することが明らかとなった¹⁰⁾。これらの結果からCsA本来の免疫抑制作用をまったく持たないシクロスポリン誘導体、DEBIO-025やNIM811が開発され、*in vitro*および*in vivo*でHCV増殖を特異的に抑制することが実証された。最近HCV/HIV共感染者に対するDEBIO-025単独投与の効果がFlisiakらにより、ゲノタイプによらず血中ウイルス量を約3 Log低下させることが報告された¹¹⁾。現在DEBIO-025とPEG-IFN併用でのPhase II試験が進行中で、治療4週目においてPEG-IFN単独群、2.5 Logに対しPEG-IFN、DEBIO-025併用群では最大4.75 Logと両剤の相加的な抗ウイルス効果が報告されている¹²⁾。シクロスポリン誘導体は宿主因子を標的とした薬剤であることから耐性ウイルスの出現が低いことが知られており、期待できる薬剤の一つである

7 Nitazoxanide

NitazoxanideはCryptosporidiumおよびランブル鞭毛虫の治療薬として2002年にFDA承認された薬剤である。HIV、HCVおよびHBV重感染例でのCryptosporidium治療でHBVおよびHCVに対する抗ウイルス効果が見いだされた¹³⁾。Genotype 4、低ウイルス量症例に対するnitazoxanide単独24週投与においてETR30%、SVR17%を認めた¹⁴⁾。また、PEG-IFN、RBVとの3者併用48週投与では、SVRが79%であり、標準治療群50%に対し有意に高率であったと報告された¹⁵⁾。本薬剤のHCVに対する作用機構は未だ十分にわ

かっていない。

8 補助治療

トロンボエチン受容体薬であるLGD-4665はPhase Iが終了し、血小板増加効果と安全性が確認された。EltrombopagはHCV感染を対象とした試験で血小板増加効果によりインターフェロン治療の開始・継続を可能とすることが報告された。現在ITPに対する試験が終了しFDAに承認申請中である。

9 おわりに：新規クラス薬剤の展望は？

現在上述のごとく多くの化合物が抗HCV薬候補として開発・臨床試験が行われているが、新規薬剤は常に現行の標準治療(PEG-IFN + RBV)に対する優位性が要求される。一般に実験室レベルで効果を認めた薬剤が臨床試験に至るのは約1,000化合物に1個であり、さらに臨床試験を施行した薬剤のうちFDAの認可を受け臨床の現場に登場するのは1/5とされる。また、新規薬剤の臨床試験Phase I, II, IIIを経て申請・承認を得るのに平均8.5年の年月が費やされる。今後数年間で少なくともプロテアーゼ阻害薬などの新規クラス抗HCV薬剤が登場することが予想されるが、それらの新規薬剤の動向を視野に入れながら、これら新規治療薬剤の展開を期待を持って見守りたい。

文 献

- 1) Lamarre D, Anderson PC, Bailey M et al : An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426 : 186-189, 2003
- 2) McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC et al : PROVE1: Results from a phase 2 study of telaprevir with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naive subjects with hepatitis C. In:

- 42rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milan, Italy S4, 2008
- 3) Dusheiko GM, Hezode C, Pol S et al : Treatment of chronic hepatitis C with telaprevir (TVR) in combination with peginterferon-alfa-2a with or without ribavirin: further interim analysis results of the PROVE2 study. In: 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milan, Italy S26, 2008
 - 4) Lalezari J, Gané E, Rodriguez-Torres M et al : POTENT ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE HCV NUCLEOSIDE POLYMERASE INHIBITOR R7128 WITH PEG-IFN AND RIBAVIRIN: INTERIM RESULTS OF R7128 500MG BID FOR 28 DAYS. In: 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milan, Italy S29, 2008
 - 5) Bain V, Kaita K, Yoshida E et al : A Phase I/II study evaluating escalating doses of recombinant human albumin-interferon-alpha fusion protein in chronic hepatitis C patients who have failed previous interferon-alpha-based therapy. *Antiviral Therapy* 11 : 35-45, 2006
 - 6) Choo QL, Kuo G, Ralston R et al : Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 1294-1298, 1994
 - 7) Thimme R, Oldach D, Chang K et al : Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194 : 1395-1406, 2001
 - 8) Watahi K, Hijikata M, Hosaka M et al : Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38 : 1282-1288, 2003
 - 9) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N et al : Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 42-47, 2004
 - 10) Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y et al : Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129 : 1031-1041, 2005
 - 11) Flisiak R, Horban A, Gallay P et al : The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 47 : 817-826, 2008
 - 12) Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M et al : EFFICACY AND SAFETY OF INCREASING DOSES OF THE CYCLOPHILIN INHIBITOR DEBIO 025 IN COMBINATION WITH PEGYLATED INTERFERON ALPHA-2A IN TREATMENT NAIVE CHRONIC HCV PATIENTS. In: 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milan, Italy S62, 2008
 - 13) Korba BE, Montero AB, Farrar K et al : Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antiviral Res* 77 : 56-63, 2008
 - 14) Rossignol J, Kabil S, El-Gohary Y et al : Clinical trial: randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide monotherapy for the treatment of patients with chronic hepatitis C genotype 4. *Aliment Pharmacol Ther* 2008
 - 15) Rossignol JF, Elfert A, El-Gohary Y et al : RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL OF NITAZOXANIDE-PEGINTERFERON-RIBAVIRIN, NITAZOXANIDE-PEGINTERFERON AND PEGINTERFERON-RIBAVIRIN IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C GENOTYPE 4. In: 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milan, Italy S30, 2008

* * *