

200933002A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策  
に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者：榎本信幸

平成22（2010）年3月

**厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業**

**薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策  
に関する研究**

**平成21年度 総括・分担研究報告書**

**主任研究者：榎本信幸**

**平成22（2010）年3月**

# 目 次

I. 総括研究報告		
薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究に関する研究	榎本 信幸	----- 1
II. 分担研究報告		
1. 薬剤耐性HCVに対する新規治療薬候補化合物の検索	伊藤 正彦	----- 14
2. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究	松本 武久	----- 20
3. ペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン(RBV)併用療法におけるHCVコアとNS5A領域遺伝子変異と治療効果の関連	朝比奈靖浩	----- 23
4. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究	今村 道雄	----- 26
5. マウスモデルによる慢性B型肝炎の病態解析	中本 安成	----- 29
6. HCVのインターフェロン耐性及びリバビリン耐性の分子機構、とくにNS5A機能と耐性機構の研究	堀田 博	----- 32
7. 培養細胞系による肝炎ウイルス耐性機構の基盤研究	鈴木 哲朗	----- 39
8. 薬剤耐性及び治療効果に関係するHBV,HCV遺伝子の解析	鈴木 文孝	----- 42
9. インターフェロン誘導遺伝子GBP-1の抗ウイルス機構とHCV蛋白とのクロストーク	中川 美奈	----- 46
10. 核酸アナログ耐性HBVの高感度検出法の開発および治療抵抗性HCVのSNP解析	加藤 直也	----- 50
11. インターフェロン耐性HCVの分子機構に関する研究	加藤 宣之	----- 55
12. HBV、HCV全塩基配列に基づく薬剤耐性機序に関する研究	横須賀 収	----- 61
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 65
IV. 研究成果の刊行物・別刷		----- 88

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究に関する研究

主任研究者 榎本 信幸 山梨大学 教授

研究要旨： B 型肝炎ウイルス（HBV）においては核酸アナログ耐性ウイルスの出現、C 型肝炎ウイルス（HCV）においては Peginterferon/Ribavirin 抵抗性 HCV の存在が治療の障害となっている。本研究の目的はこれらの薬剤耐性肝炎ウイルスの感染病態の解明であり、これにより診断法の確立、耐性機構解明とその克服の基盤形成、さらには新規治療法の開発などを目的とした。治療抵抗性を示す肝炎ウイルスの全ゲノムの経時的解析により治療抵抗性を担うウイルス遺伝子変異領域を解明するとともに、自然免疫系、インターフェロン系分子の解析、HCV 培養細胞系・モデル動物を用いて薬剤耐性・病変進展に関与する宿主側因子の解明を行った。コンピュータ上で肝炎ウイルス蛋白の活性部位に結合する化合物を *in silico* screening で探索、培養細胞系を用いてその抗耐性ウイルス効果を検証した。多数症例で HCV 全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCV コア遺伝子および NS5A 遺伝子の ISDR (interferon sensitivity determining region) および IRRDR (interferon ribavirin resistance determining region) に Peginterferon/Ribavirin 併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを証明した。さらに宿主のインターフェロン反応性を規定する IL28B 遺伝子多型がコア 70 番アミノ酸変異と関連すること、IL28B とコア変異、NS5A 遺伝子の ISDR および IRRDR 変異を組み合わせることにより高精度に治療効果を予測することが可能であることを示し、宿主およびウイルス遺伝子変異検査による診断法開発の基盤を確立した。さらにコア 70 番アミノ酸変異が肝発癌にも関与すること、次世代のプロテアーゼ阻害剤の治療効果にも影響を与える知見を得た。核酸アナログ治療前の HBV 全遺伝子配列の解析を行い、耐性変異出現に preS2 領域のアミノ酸変異が関連することが見出した。一方、治療抵抗性 C 型肝炎の肝内においては RIG-I、IPS-1 を始めとする自然免疫系分子の変動が重要であることを明らかとした。*In silico* screening および *in vitro* における抑制効果判定実験により抗 NS3 活性を持つ阻害剤を同定することに成功した。以上、薬剤耐性あるいは治療抵抗性肝炎ウイルスの病態にはウイルスゲノム構造および宿主因子が重要な役割を持つことを明らかとした。これらの発見は臨床的な治療方針の決定に重要な情報を与えるとともに、その機序の解明が新たな薬剤耐性機構の研究に展開することが予想される。

## A. 研究目的

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

## B. 研究方法

- 核酸アナログ治療中のHBVゲノム全体の経時的解析を行い耐性変異の全体像を明らかにした。

- インターフェロン・リバビリン併用療法に治療抵抗性を示すHCVの全ゲノムを経時的に解析し、治療抵抗性を担うウイルス遺伝子変異領域を解明し、その臨床的意義を多数例により解析した。HCV培養細胞系を用いてウイルス側変異による薬剤感受性の変化の検討、インターフェロン応答抑制に関与するHCV蛋白と標的宿主蛋白を同定を行い、薬剤耐性に関与するウイルス側および宿主側因子の解明を行った。宿主の自然免疫・インターフェロン系分子の解析によりインターフェロン耐性における宿主因子を解析した。

- HBVトランスジェニックマウスモデルにより病態進行に関与する宿主遺伝子群を同定する。感染ヒト肝細胞キメラマウスに薬剤耐性肝炎ウイルスを感染させin vivoでの薬剤耐性モデル系の作成を行った。ウイルス遺伝子変異情報よりコンピューター上でウイルス蛋白の活性部位に結合する化合物をin silico screeningで探索、培養細胞系を用いてその抗

ウイルス効果を検証した。

## C. 研究結果

### ● Peginterferon/Ribavirin 併用療法抵抗性 HCV 感染のウイルス側および宿主側因子の解明

主任研究者である榎本はハイスループットのHCVおよびHBVゲノムワイド解析システムを構築し、Peginterferon/Ribavirin 併用療法を施行した多数症例でHCV全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCV NS5A蛋白のISDRに加えコア蛋白にPeginterferon/Ribavirin 併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを明らかとしてきた。多数の治療症例の全HCV遺伝子の決定を行い、治療中のウイルス動態に関連するウイルス遺伝子領域を網羅的に同定するため、単一アミノ酸変異の解析はFisher検定により、連続アミノ酸領域の変異数の検定にはsliding window analysisを用いて解析を行った。その結果、まず、RVRに関与するのはISDR内およびISDR周辺領域のアミノ酸変異数であることが証明された。同様の傾向は治療開始8週目までの早期ウイルス消失に関与する変異の探索でも認められた。すなわち、ウイルスの治療感受性を担うのはISDRであることがウイルス全遺伝子の網羅的探索により証明された。一方、治療開始12週でもウイルス量の2 log以上の減少の得られない、いわゆるnon EVRに関与する変異はコア蛋白70番の変異が唯一のものであることが示された。すなわち、HCVのPeginterferon/Ribavirin 抵抗性はコア蛋白70番変異により担われており、HCVの治療反応性はISDRとcoreの2つの遺伝子領域により決定されていることが解明された。

本年度はさらにPeginterferon/Ribavirin治療の最終効果に与えるHCV遺伝子領域およびその変異を全HCVゲノムから探索した。そ

の結果、48 週標準治療の最終的なウイルス排除に関連する HCV 遺伝子領域は NS5A 蛋白の C 末端に存在する IRRDR (interferon ribavirin resistance determining region) の変異数であることが判明した。治療中のウイルス動態の解析によりこの IRRDR 領域の変異は 48 週治療での再燃を規定していた。これは 48 週標準治療では 70-80% の症例が end of treatment response を達成したのちその約半数が再燃することから、再燃に寄与する因子が最終効果に最も強く影響を与えることによる。抵抗性はコア 70 番変異に関連し、ISDR 変異は高感受性に関連するが、再燃の有無という低感受性症例の予後を左右するのは IRRDR 変異であることが明らかとなった。すなわち ISDR 変異を認めない低感受性 HCV においては IRRDR 変異によって感受性が規定されており、IRRDR に多数の変異を認める症例ではある程度の感受性があり (中感受性)、再燃を認めないのに対して、IRRDR の変異の少ない低感受性 HCV は再燃すると考えられる。

一方、peginterferon/ribavirin 治療の感受性を決定する宿主因子として 2009 年に日米欧より報告された IL28B 多型とウイルス遺伝子変異との関連についても解析を進めた。IL28B 変異型アリルを持つ場合には高率に null viral responder (NVR) となることが確認されたが、本研究により HCV 全ゲノムの中では IL28B 変異はコア 70 番変異と非常に強く相関していることが明らかとなった。治療抵抗性は IL28B とより強く相関しており、コア 70 番変異による治療抵抗性は IL28B 変異を反映したものである可能性が示唆された。実際、大部分の症例で core70 番アミノ酸の変異型および野生型ウイルスは同一宿主内で混在状態にあり治療時には両者は平行して減少することが明らかとなり、臨床的にも core70 番変異は直接的に治療反応性を規定していない可能

性が示唆された (加藤直也)。IL28B は HCV の自然排除・慢性化にも関与していると報告されており、特定の HCV ゲノム構造が宿主因子とリンクしていることは宿主の特定の環境下において特定の機能を持った HCV が選択されることを示唆しており、治療反応性、病態形成に大きな影響を与えていることが考えられる。実際、コア 70 番変異は肝病変の進展とともに変異率が高まることを見出しており、HCV の肝障害発生機構の解明の重要な手がかりとなることが予想される。

また、本年度は HCV-2a/2b についても peginterferon/ribavirin 治療効果と HCV 全ゲノムの関連解析を行い、HCV-2a については core110 番アミノ酸の変異および NS5A-ISDR 周辺の変異が治療効果に関連することを明らかとした (榎本)。また IRRDR を含む NS5A の多様性と IFN 感受性/抵抗性との相関についても比較検討し、HCV-1b と同様に IRRDR 相当領域の変異が治療効果に関連していることを明らかとした、本領域に変異を認めない場合はこれらの genotype においてもある程度の治療抵抗性が予想されるため、治療期間の延長などを考慮することが考えられた (堀田)。

コア 70 番アミノ酸変異を導入した発現 plasmid を作成し、肝癌細胞株 HepG2 に遺伝子導入し stable cell line を作成し機能解析を行い、real-time PCR による検討で一部のサイトカイン関連遺伝子の発現レベルに違いを認め、今後更なる検討が必要であると考えられた (横須賀)。

次世代治療薬であるプロテアーゼ阻害剤 Telaprevir (MP-424) と PEG-IFN+RBV 12 週間併用療法を施行した 20 例では、SVR 率は 70% であり naive 例では Core aa70 が wild である症例で SVR 率が高いことを見出した。現在 Telaprevir (MP-424) と

PEG-IFN+RBV 併用療法は最も効果が期待される治療薬であり、今後ウイルス学的因子、生体側因子(遺伝子多型など)を含め、総合的に治療効果を予測し、テーラーメイドの医療を行なう必要があると考えられた(鈴木文孝)。

Peginterferon/Ribavirin 併用療法の治療効果を決定する宿主因子として自然免疫系分子の変動を解析、肝内 RIG-I/IPS-1 比は NVR と関連を認めた。一方、HCV コア変異(R70Q)も NVR に関与していたが、多変量解析では ISG15 または USP18 発現および RIG-I/IPS-1 比と血小板数が NVR に関与する有意因子であった。PBMC 中の RIG-I、ISG15 の PEG-IFN/RBV 投与中の発現誘導は NVR 例に比し SVR 例で高かった(朝比奈)。

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

遺伝子型 1b で O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞について樹立時と 2 年間培養後における細胞の IFN 感受性試験を行い 2 年間培養した全長 HCVRNA 複製細胞から得られた IFN 抵抗性細胞由来の HCV ゲノムは樹立時由来の HCV ゲノムと比較すると遺伝的系統樹において一群のクラスターを形成していることが分かった。また IFN 抵抗性細胞由来の Total RNA を HCV が排除された細胞(治療細胞)に再度導入して得られた HCV RNA 複製細胞(第 2 世代)を用いた IFN 感受性試験により、IFN 抵抗性の獲得は HCV 側と宿主側因子の両方が関与していることが示唆された(加藤宣之)。

C 型肝炎ウイルス感染におけるインターフェロン関連蛋白とウイルスの相互作用を解析し、抗ウイルス療法のあらたな標的宿主蛋白を同定することを目的に研究を行い、HCV 培養系において IFN 誘導遺伝子である GBP-1、IFI27、IFI6-16 が HCV 増殖を特異的に抑制

することを新たに見出し、GBP1 と NS5B 蛋白が特異的に結合すること、またその結合エピソードを含むドメインを特定した。また、NS5B が GBP-1 のもつ GTPase 活性を阻害すること、さらに NS5B 自体が GBP-1 蛋白発現を抑制することを見いだした(中川美奈)。

昨年度、C 型肝炎ウイルス(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することにより、NS3 領域に 2 カ所の耐性変異(V71A、K122R)が同定された。今回、この薬剤耐性ウイルスについてさらに解析を進め、この耐性変異は HCV の複製効率に影響を与えないこと、BILN2061 非存在下での 1 ヶ月間の培養後も両変異は完全に維持されることを見出した。また、この変異ウイルスは、別のプロテアーゼ阻害剤 VX-950 には耐性でないことなどから薬剤選択性の高い耐性変異である可能性が示された(鈴木哲朗)。

#### ● 薬剤耐性 HBV の病態解明

Lamivudine 耐性化には HBV 遺伝子の preS2 領域の変異が関連することを明らかにした(榎本)。また、過去に核酸アナログ製剤を使用していないエンテカビル投与症例 371 例からは 2 例にエンテカビル耐性ウイルスの出現を認めた。ラミブジン単独投与中に YMDD motif mutation の出現が疑われた 390 例からのアデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現は 8 例(2%)であった。さらにラミブジン耐性ウイルスに対してエンテカビルを投与した 66 症例からのエンテカビル耐性出現は 10 例(15%)であった(鈴木文孝)。

#### ● 動物モデルを用いた薬剤耐性肝炎ウイルス感染の解析

慢性肝炎から発がんに至る B 型肝炎マウス



モデルを用いて、慢性炎症およびがん化過程のそれぞれに関わる宿主因子の相互関係について検討、慢性炎症の誘導はCD8陽性細胞障害性Tリンパ球（CTL）が直接関与していた。経時的観察において、慢性肝炎の前期には炎症反応や細胞障害・再生に関与する遺伝子群の変動が観察された。後期になると遺伝子の転写に関わる一群が有意に変動した。さらに、発がん期には腫瘍組織特有な遺伝子群が検出されたが、約60%は肝炎の前期と共通していた。これより、CTLが誘導する慢性肝炎に伴って宿主因子の相互作用が惹起され、がん化への分子病態が構築されていく過程が示された（中本安成）。

ヒト肝細胞キメラマウスにC型肝炎ウイルス(HCV)陽性患者血清を投与し、HCV感染マウスを作製、HCV感染マウスにprotease阻害剤(telaprevir, 200 mg/kg, 1日2回)あるいはRNA polymerase阻害剤(MK-0609, 3 mg/kg, 1日2回)を単独あるいは併用投与した。両薬剤とも単独投与にて著明にマウス血中HCV RNAを低下させたが、投与中、それぞれに耐性ウイルス(NS3領域のV36A変異ウイルス, NS5B領域のS282T変異ウイルス)が出現し、HCV RNA値の再上昇を認めた。両薬剤を併用投与したところ、投与2週後にはHCV RNAは感度以下まで低下し、投与中の耐性ウイルスの出現が予防された。Telaprevirに高用量のMK-0609(50 mg/kg)を4週間併用投与したところ、投与1週後にHCV RNAは感度以下に低下し、観察した投与終了18週後まで再上昇を認めず、おそらく完全排除されたものと思われた。これらの結果から異なるHCV蛋白を標的とした薬剤を組み合わせることにより、インターフェロン製剤を使用せずともHCVを感染排除することが可能であることが示唆された（今村道雄）。

## ● 新規抗肝炎ウイルス剤の開発

HCVの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探索した。NS2/3プロテアーゼタンパク質は大腸菌で大量に発現するが、封入体を形成し不溶化するため、その巻き戻し条件を複数検討した。細胞レベルでの阻害剤アッセイ系を確立するため、NS2/NS3/NS4A下流にGAL4結合ドメインとVP-16との融合タンパク質を発現する遺伝子を導入した細胞の作製に着手した（松本）。In silico screening systemを用いて選び出したNS3プロテアーゼ阻害剤候補化合物のうち2つが共通構造を有していた。この構造を基に、様々な誘導体を作製し、そのうちのひとつが、より高いHCV増殖抑制活性を有していた（伊藤）。

## D. 考察

● 本年度までのHCV全ゲノム解析研究の成果により、HCVのpeginterferon/ribavirin治療の感受性を決定しているのはISDRおよびIRRDRの2つのNS5A蛋白領域およびcore蛋白70番アミノ酸変異であることが解明された。ISDR変異が2個以上あるHCVは高感受性、ISDR変異が0/1個のHCVは低感受性であるが、この中でもIRRDR変異の多いHCVは中等度の感受性を示すのに対して、IRRDR変異の少ない症例は低感受性であり多くが治療終了後に再燃することが判明した。一方、core蛋白70番に変異のあるHCVは抵抗性を示し、NVRとなる可能性が高い。このようにこれら3つのHCV遺伝子領域は階層的にHCVのpeginterferon/ribavirin感受性を規定している。これを利用して治療効果を予測するアルゴリズムを作成可能であり、今後その実証が重要となると考えられた。

● 一方、治療抵抗性に関しては国内外の研究グループより IL28B 多型が報告され、本研究においてもこの宿主遺伝子多型は NS5A 変異とは独立に治療効果を規定することが明らかとなった。core70 番アミノ酸変異と IL28B 多型は強く相関しており、core70 番変異による治療抵抗性は IL28B 遺伝子多型を反映している可能性が考えられた。一方、この core70 番変異は肝病変の進展、肝発癌にも関与しており、宿主とウイルス遺伝子変異の相互作用により治療反応性、病態が形成されることが示唆され今後さらに詳細な解析が必要と考えられた。

● 本年度は HCV-2a/2b における治療抵抗性のウイルス変異についても解析を進めた。HCV-2a の全ゲノム解析では core 蛋白 110 番アミノ酸の変異が治療反応性に関連することを見出し、genotype 1b 同様、2a においても core 蛋白が重要な役割を担っていることが示唆された。今後、これらの変異の機能的な解析が重要と考えられる。一方、NS5A 蛋白においては ISDR および IRRDR 領域がやはり治療反応性に関連しており、今後症例を集積して治療アルゴリズムの確立を目指す基礎的知見を得た。

● 70 番アミノ酸変異の培養細胞内発現実験では、細胞のインターフェロン反応性に明らかな差異がみられなかったが、Real-time PCR による検討では一部の Cytokine 関連遺伝子 (CHUK, HSPD1) の発現レベルに違いがみられたことから、今後これらの遺伝子産物の治療効果、病態形成における役割についての解析が重要であると考えられた。

● プロテアーゼ阻害剤 telaprevir と peginterferon/ribavirin の 3 剤併用療法においても core 蛋白 70 番アミノ酸変異は治療

効果に影響しており、70 番アミノ酸野生型において著効率が高かった。今後、IL28B 多型との関連を明らかにする必要があると考えられる。

● HCV の治療抵抗性の宿主因子として臨床症例における自然免疫系分子の動態を解析したところ、PEG-IFN/RBV 併用療法の難治例では、治療前の肝内自然免疫系発現が亢進していた。これは内因性 IFN による IFN 誘導遺伝子の発現誘導が、難治例では高いためと考えられた。一方、外因性 IFN によるこれらの遺伝子誘導は、難治例では低く外因性 IFN への遺伝子発現段階における不応性が難治要因に関与していると考えられた。そして、これら自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の不応性は難治要因を規定する HCV 変異とは独立して関与していることが分かった。従って、難治性 C 型肝炎を克服するためには、IFN 誘導の不応性に対する対策と、ウイルス変異によりもたらされる難治要因への対策が別個に必要と考えられた。

● 全長 HCV RNA 複製細胞を 2 年間培養すると、HCV ゲノムの多様性が増大し、系統樹解析を行うと、オリジナルの O2 細胞由来の HCV クローン群とは離れた位置に IFN 耐性の O2r 細胞由来の HCV クローンが遺伝的クラスターを作ることが判明した。STAT1 のリン酸化実験においては、O2 細胞と O2r 細胞では IFN 応答性に差がなかったことから、両細胞における IFN のシグナル伝達効率に違いはないものと考えられる。従って、HCV ゲノムのどこかに IFN 感受性を規定する領域の存在が予想されることから、IFN により誘導される宿主遺伝子群 (ISGs) の発現レベルに差が出ないかどうかについても今後調べる必要があると考えられた。IFN に対する感受性が宿主側

因子とウイルス側因子の両方であつ様々な割合で効いていることを示しているものと考えられる。今後、第2世代の HCVRNA 複製細胞から得られた IFN 抵抗性細胞内で複製している HCV ゲノムや細胞の IFN への応答性を詳細に調べていくことにより結論が得られるのではないと思われた。

● NS5BがGBP-1のもつGTPase活性を阻害すること、さらにNS5B存在下ではGBP-1蛋白発現が抑制されることが確認され、生体内の防御機構とHCVウイルス蛋白の相互作用がウイルス排除あるいは持続感染に関与していることを明らかとした。今後、抗ウイルス蛋白に拮抗するウイルス側の蛋白・エピトープを特定することにより、IFN抵抗性を解除する新たな抗ウイルス分子標的療法創出へ応用可能となる可能際がある。

● HCV JFH-1 が安定的に持続感染増殖する Huh7 細胞系を作製し、プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 を長期間添加した結果、耐性ウイルスを取得し、その責任変異 V71A、K122R を同定した。この変異による薬剤耐性獲得のメカニズムを考察するため、変異 NS3-BILN2061 のドッキングシミュレーションを行った。その結果、71 番目アラニン、122 番目リジンとも BILN2061 の予想結合部位から 10Å 以上離れていると推定され、通常、二者間の相互作用が期待される 3Å 以下に比べ離れている可能性が高いことが示され未知の耐性獲得機構の存在が示唆された。BILN2061、VX950 とも NS3 蛋白のセリンプロテアーゼ活性中心の近傍に結合するものと推定されているが、両化合物の構造の違いにより、結合に伴うプロテアーゼ活性への影響が異なる可能性が考えら今後のプロテアーゼ阻害剤耐性 HCV に対策の基礎的知見を得た。

● HBV に関しは現在は耐性ウイルスの出現率の少ないエンテカビルの使用例が主体となっている。naive 例に対する成績では 371 例中 2 例にのみエンテカビル耐性ウイルスが検出されており、今後より長期の成績が検討される必要がある。一方ラミブジンは、YMDD motif 以外の rt 領域にも種々の変異を起こす。今回の検討では、頻度は少ないもののアデフォビル耐性と関係する変異が認められており、ラミブジン耐性ウイルスにアデフォビルを投与した症例で抗ウイルス効果が少ない症例では、HBV の遺伝子配列を検討する必要がある。

● 慢性 B 型肝炎マウスモデルで慢性肝炎の遺伝子発現プロファイルを経時的に観察することによって、慢性炎症の単純な持続ではなく時間の経過とともに分子病態の特徴が変化していく様子が観察され、慢性肝炎の経過と併せて検討することによって、炎症と相関する遺伝子群に加えて、炎症と相関しないがん組織にユニークな遺伝子群が同定され、新たな概念に基づく標的分子が含まれる可能性が示唆された。

● 慢性 C 型肝炎マウスモデルではプロテアーゼ阻害剤およびポリメラーゼ阻害剤とも単独投与では耐性ウイルスの出現を認めたが、標的の異なるこれら 2 剤を併用することにより、耐性ウイルスの出現が予防され、より強い抗ウイルス効果を認めた。さらには HCV の完全排除も可能であった。今後、各種抗ウイルス薬を併用投与することで更なる治療効果の向上が期待された。

● In silico screening で探索してきた化合物による NS2/3 プロテアーゼタンパク質阻害剤の開発では NS2/3 プロテアーゼ阻害活性の評価には細胞レベルでのアッセイ系を利用す

ることが不可欠と考えられた。今後、NS2/NS3/NS4A 下流に GAL4 結合ドメインと VP-16 との融合タンパク質を発現する遺伝子を Huh-7 細胞に導入し、細胞レベルでの阻害剤アッセイ系を完成させる予定である。

● NS3/4A プロテアーゼ阻害物質の in silico screening のヒット化合物 2 種の共通構造を基に、再度の In silico による化合物のデザインに行い、その結果、HCV71\_con\_CG1 と名付けた化合物は、1 回目の In silico screening のヒット化合物 2 種より、高い HCV 増殖抑制効果が得られ、現在、更になる最適化を行うための情報を得るため、化合物と NS3 protease の共結晶構造解析を行っている。

#### E. 結論

HCV の peginterferon/ribavirin 治療に対する感受性を決定しているウイルス因子は NS5A の ISDR および IRRDR を中心とした領域であることが明らかとなった。ISDR に変異により感受性は大きく決定され、同じ ISDR 変異であれば感受性は IRRDR 変異によりさらに細かく規定されていると考えられた。一方、core 蛋白変異は、宿主の IL28B 多型、肝病変進展と関連しており宿主因子との相互作用により治療反応性・病態を規定していることが示唆された。今後、これらの知見の臨床アルゴリズムへの応用、機能解明が重要になるものと考えられる。特に治療抵抗性に関わるウイルス因子と宿主因子（自然免疫系、IL28B 系）の関連を培養細胞系、モデル動物系で解析してゆくことがますます重要になると予想される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

著書

ウイルス性肝炎の最新の治療と展望

Author: 榎本信幸(山梨大学 第一内科)

Source: 日本内科学会雑誌(0021-5384)99 巻 3 号 Page499-505(2010.03)

論文種類: 解説

【ウイルス肝炎の最新実地診療 抗ウイルス療法のコツと落とし穴】 ウイルス肝炎診療に必要な知見 Up to Date 最新の検査と臨床肝炎ウイルスの遺伝子解析 病態・治療効果との関連 C 型肝炎ウイルス(HCV)

Author: 三浦美香(山梨大学 医学部第 1 内科), 坂本穰, 榎本信幸

Source: Medical Practice(0910-1551)27 巻 1 号 Page65-68(2010.01)

論文種類: 解説/特集

【新しい臨床検査】 消化器 B 型肝炎マーカー

Author: 井上泰輔(山梨大学 医学部内科学講座第 1 教室), 榎本信幸

Source: 診断と治療(0370-999X)97 巻 9 号 Page1817-1822(2009.09)

論文種類: 解説/特集

【C 型慢性肝炎のペグインターフェロンとリバビリン療法の治療成績と投与の工夫】 ウイルス変異からみた C 型慢性肝炎の治療法

Author: 坂本穰(山梨大学 大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学講座), 榎本信幸

Source: 消化器科(0289-8756)49 巻 1 号 Page79-84(2009.07)

論文種類: 解説/特集

【ここが知りたいウイルス性肝炎への抗ウイルス療法の問題点と将来展望】 C 型肝炎 PEG-IFN/Riba 治療の治療効果予測

Author：榎本信幸(山梨大学 医学部内科学講座第1教室), 坂本穰, 前川伸哉

Source：肝・胆・膵(0389-4991)58 巻 5 号

Page635-640(2009.05)

論文種類：解説/特集

【ウイルス性肝炎 最新治療コンセンサス】 C 型肝炎 C 型肝炎ウイルス変異に基づく治療戦略

Author：坂本穰(山梨大学 大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学講座), 榎本信幸

Source：医学のあゆみ(0039-2359)229 巻 1 号 Page59-63(2009.04)

論文種類：解説/特集

【患者さんの背景・病態で考える 薬の選び方・使い方のエッセンス】 肝・胆・膵 C 型慢性肝炎

Author：榎本信幸(山梨大学 医学部内科学講座第1教室), 坂本穰

Source：治療(0022-5207)91 巻 4 月増刊 Page962-967(2009.04)

論文種類：解説/特集

【C 型肝炎の新しい治療】 遺伝子変異からみた C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果予測

Author：坂本穰(山梨大学 大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学講座), 榎本信幸

Source：日本消化器病学会雑誌 (0446-6586)106 巻 4 号 Page 485 - 492 (2009.04)

論文種類：解説/特集

【C 型肝炎難治例の治療をどう行うか 治療効果の向上を目指して】 C 型肝炎難治例の治療の実際 治療効果向上のための工夫をどう行うか

治療効果予測とテーラーメイド治療の可能性

Author：坂本穰(山梨大学 大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学講座), 榎本信幸

Source：消化器の臨床(1344-3070)12 巻 1 号 Page68-73(2009.02)

論文種類：解説/特集

【抗ウイルス薬 2009 Update】 C 型肝炎に対する新規治療薬剤の開発状況

Author：前川伸哉(山梨大学 医学部第一内科), 榎本信幸

Source：Virus Report(1349-6956)5 巻 2 号 Page40-44(2008.12)

論文種類：解説/特集

【C 型肝炎のすべて・2009】 ウイルスゲノム・ヒトゲノム情報の治療への応用 Interferon sensitivity determining region ISDR

Author：坂本穰(山梨大学 大学院肝疾患地域先端医療システム学), 榎本信幸

Source：肝・胆・膵(0389-4991)57 巻 5 号 Page773-779(2008.11)

論文種類：解説/特集

【日本における C 型肝炎治療のコンセンサス】 ISDR により治療効果はどう変わるか?

Author：坂本穰(山梨大学 大学院肝疾患地域先端医療システム学), 榎本信幸

Source：Progress in Medicine (0287-3648)28 巻 11 号 Page 2647-2651(2008.11)

論文種類：解説/特集

1. Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection.

Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M.

J Gastroenterol. 2010 Jan 30.

2. A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis.

Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N.

Hepatol Res. 2010 Mar 1;40(3):251-60. Epub 2010 Jan 11.

3. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy.

Enomoto N, Maekawa S.

Intervirology. 2010;53(1):66-9. Epub 2010 Jan 5.

4. Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells.

Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, Mogushi K, Nagaie S, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G, Mishima K, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Azuma S, Sekine-Osajima Y, Kakinuma S, Tsuchiya K, Enomoto N, Tanaka H, Watanabe M.

J Gastroenterol. 2010 May;45(5):523-36. Epub 2009 Dec 12.

5. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan.

Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M; PERFECT Study Group.

Hepatol Res. 2010 Feb;40(2):135-44. Epub 2009 Sep 25.

6. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy.

Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, Ikejima K, Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S.

J Gastroenterol. 2010 Feb; 45(2): 195-203. Epub 2009 Sep 17.

7. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C.

Maekawa S, Enomoto N.

J Gastroenterol. 2009;44(10):1009-15.

Review.

8. Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication.

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

### 肝炎ウイルスゲノムの網羅的解析のための throughput の増強

**Applied Biosystems 350 Genetic Analyzer**

4本キヤピラリー 1日182ラン  
25000 reads per run  
1時間以内 HCV full genome  
1時間以内 HCV full genome

**ABIPrise® 350 Genetic Analyzer**

1本キヤピラリー 1日24ラン  
25000 reads per run  
1時間以内 HCV full genome  
1時間以内 HCV full genome

多様な薬剤感受性病態を呈した症例から  
肝炎ウイルスの全ゲノムデータベースを構築

<b>HCV</b>	<b>640例</b>
Genotype 1b	480例
Genotype 2a	80例
Genotype 2b	80例

RVR, ISDR, NVR, core70, SVR, IRRDR

### ウイルス遺伝子変異と最終治療効果(standard therapy n=76)

Genotype	RVR	ISDR	ISVR	IRRDR	最終治療効果
全体 (n=76)	40/76 (53%)	33/48 (69%)	8/8 (100%)	25/40 (63%)	15/15 (100%)
Genotype 1b	33/48 (69%)	21/23 (91%)	4/4 (100%)	15/17 (88%)	15/15 (100%)
Genotype 2a	0/1 (0%)	2/4 (50%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Genotype 2b	7/28 (25%)	10/15 (67%)	4/4 (100%)	10/15 (67%)	10/15 (67%)

### 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 主任研究者: 榎本信幸(山梨大学)

**研究の目的: 移植アナログ耐性HCV、インターフェロン/レシクリン低抵抗性HCVの病態解明**

**H19・20・21年度の成果**

**移植アナログ耐性HCVの病態解明**

- Realtime PCRおよびNext-Seqによる耐性変異検出と発現
- ...

**治療抵抗性HCVの病態解明**

- インターフェロン/レシクリン低抵抗性HCVの病態解明
- ...

**新規治療法の基礎的検討**

- 肝炎マウスモデルによる耐性HCVウイルス感染モデルの構築
- ...

**期待される成果: 耐性機序の解明、診断・治療への応用、新規治療法の開発**

### HCV-1bにおいてPeginterferon/Ribavirin 治療効果を規定する HCV遺伝子領域

**治療早期の良好な反応性**

- RVR (HCV-RNA negative at week 4)
- complete EVR-8w (HCV-RNA negative at week 8)

**NS5 2209-2248 (Interferon Sensitivity Determining Region)**

**Core R70Q**

**NS5 2334-2379 (IFN/RBV resistance-determining region)**

**IL28B SNP**

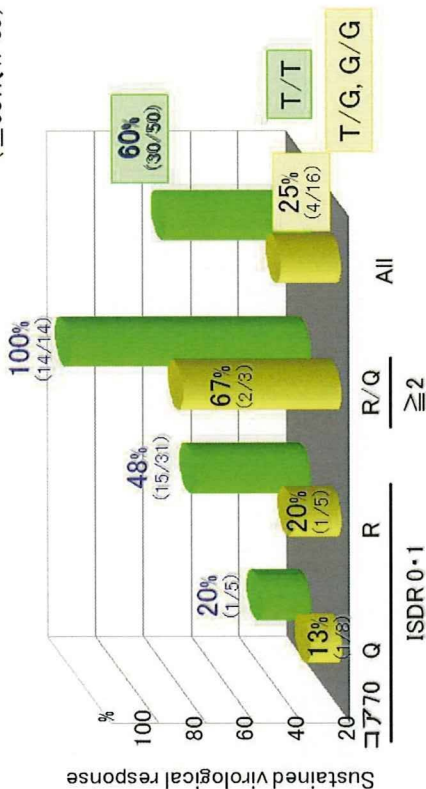
**最終治療効果**

- SVR
- Relasser



### IL28B SNP (rs8099917)とウイルス遺伝子変異別SVR率 (1b)

(≦53W, n=69)



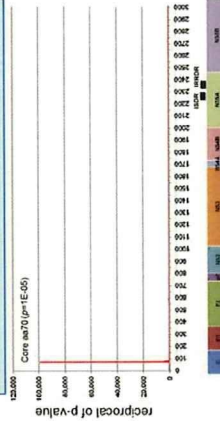
HCV遺伝子変異とIL28B SNPの両者が治療効果を規定する  
IRRDR解析の導入によりさらに治療効果を正確に予測可能

### IL28B SNPおよびHCV遺伝子変異と治療反応性

#### IL28B SNPとnon-EVR

	Total	IL28B T/T	IL28B T/G or G/G	p-value
non-EVR	9	1 (2%)	8 (50%)	<b>0.0005</b>
Others	55	47 (98%)	8 (50%)	

#### IL28B SNPと関連するHCV変異の検索



IL28B SNPとcore70は強く関連

### IL28B メジャーアレルにおいて治療反応性に関連するウイルス因子

Case	IL28B rs8099917	Outcome	Core70		p-value
			SVR	Non-SVR	
Total	7	4/7	3/7	(43%)	0.71
Core70QH	41	17/41	24/41	(59%)	

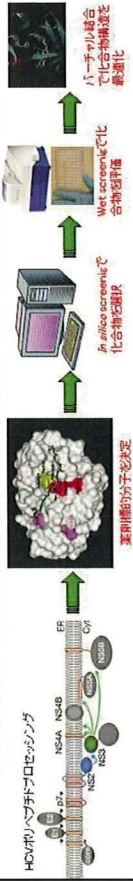
  

Case	IL28B rs8099917	Outcome	ISDR		p-value
			SVR	Non-SVR	
Total	39	18/39	21/39	(54%)	<b>6.0E-3</b>
Mutation 0-1	9	9/9	0/9	(0%)	

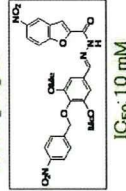
Case	IL28B rs8099917	Outcome	IRRDR		p-value
			SVR	Non-SVR	
Total	18	3/18	15/18	(83%)	<b>6.0E-5</b>
Mutation 0-3	30	24/30	6/30	(20%)	

### HCV NS3/4A proteaseを標的としたStructure-Based Drug Design



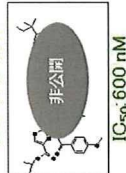
本研究で発見したNS3/4A protease/活性阻害剤

HCV71\_con\_CG1



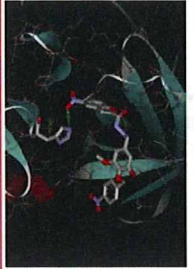
IC<sub>50</sub>: 10 nM

NS3-PRO-0071



IC<sub>50</sub>: 600 nM

NS3 protease (PDBID:1RGO) リボンモデルと  
HCV71\_con\_CG1との予測結合状態



**特徴:**  
 ・インターフェロン・リビペリン併用治療抵抗性ウイルス株の出現に対処。  
 ・化合物はMDL CMCライブラリから、北里大・梅山秀明教授が開発したGENIUSで探索し、NS3/4A protease阻害剤候補化合物7個を選択。  
 ・高活性型NS3/4A-NS3 proteaseタンパク質を試用したセラリブプロアーマーゼ活性阻害試験とHCV subgenomic repliconアッセイで評価。

**成果:**  
 2系統の細胞毒性が低い阻害剤を見出した。最も活性の高い化合物NS3-PRO-0071は、HCV subgenomic repliconアッセイでIC<sub>50</sub> 6 nMを、S-ns3/4A-NS3 protease 活性に対してIC<sub>50</sub> 600 nMを示した。

## Ⅱ. 分担研究報告

## 薬剤耐性 HCV に対する新規治療薬候補化合物の検索

分担研究者 伊藤 正彦 山梨大学・医学部・微生物学

研究協力者 山下 篤哉 山梨大学・医学部・微生物学

### 研究要旨

- 1) In silico screening system を用いて選び出した NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物のうち2つが共通構造を有していた。この構造を基に、様々な誘導体を作製し、そのうちのひとつが、より高い HCV 増殖抑制活性を有した。
- 2) AIDS 治療薬 Ritonavir が HCV 増殖抑制活性を有することを見出した。

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

#### 1). HCV 増殖抑制試験

1b 型ウイルスレプリコン細胞は、HCV-N 株、HCV-O 株および HCV-Con1 株由来の subgenomic replicon 細胞、また HCV-O 株由来の full genome replicon 細胞を用いた。抗 HCV 効果は、検討薬剤を replicon 細胞の培養液中に添加後、所定の時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。

#### 2). 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、検討薬剤を replicon 細胞の培養液中に添加し、72 時間後に、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell

Proliferation Assay Kit (Promega 社) を用いて検討した。

#### 3). RNA 解析

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

#### 4). Western Blotting

HCV タンパクの定量については、抗 NS3 抗体および抗 NS5A 抗体を用いて、Western Blot 法により行った。HSP90 タンパクの定量については、抗 HSP90 抗体を用いて、Western Blot 法により行った。

### C. 研究結果

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

共同研究者である理化学研究所・松本武久先生のグループにより、in silico screening system を用いて、約 300 万種の化合物の中から、97 種類の NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を選択した。その候補化合物を、In vitro NS3 Protease assay 及び HCV replicon 細胞

Huh7/Rep-Feo を用いて抑制効果を確認したところ、表 1 に示すような化合物に抑制効果が見られた。抑制効果の見られた化合物のうち NS3 PRO 0032 と NS3 PRO 0084 という2つの化合物に共通の構造が存在するために、この構造情報を基に、更に、in silico screening を進めた。その結果、174 種の候補化合物の中から、NS3 PRO 3284-53 という候補化合物が得られた(I-図1)。この化合物を基に、いくつかの化合物を、in silico によりデザインし、合成、効果の判定を行った結果、化合物 HCV71\_con\_CG1 が最も効果が高かったため、以後、この化合物について詳細な解析を進めた(I-図1)。

In vitro NS3 protease assay の結果、HCV71\_con\_CG1 は、基となった NS3 PRO 0032、NS3 PRO 0084 の10分の1の量で、同等の NS3 protease 抑制活性が見られるようになった。次に、Genotype 1b 型 N 株、Con1 株、O 株由来の subgenomic replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo 細胞および O 株由来の Full genome replicon 細胞を用いて、HCV71\_con\_CG1 の HCV 複製・増殖抑制効果を検討した。その結果、いずれの replicon 細胞においても、EC<sub>50</sub> は数  $\mu$  M オーダーとなり、基となった NS3 PRO 0032、NS3 PRO 0084 の2~3分の1のオーダーとなった。また、selectivity index も NS3 PRO 0032、NS3 PRO 0084 より2~3 倍になり、より高い HCV 増殖抑制活性を有した(I-表2)。

HCV71\_con\_CG1 が NS3 protease がどのように結合しているかについては、ChooseLD 法を用いて、ドッキングシミュレーションを行った。その結果については、I-図3に示す。

## 2). AIDS 治療薬 Ritonavir による HCV

### 増殖抑制効果

HCV と HIV の重複感染者の肝組織内 HCV RNA が、核酸系逆転写酵素阻害剤と HIV protease 阻害剤を治療薬として用いた方が核酸系逆転写酵素阻害剤と非逆転写酵素阻害剤を用いた方が優位に減少しているとの報告がある。そこで、いくつかの HIV protease 阻害剤の抗 HCV 効果について検討したところ、Ritonavir の抑制効果が高かったため、以後の解析を進めた。Genotype 1b 型 N 株、Con1 株、O 株由来の subgenomic replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo 細胞および O 株由来の Full genome replicon 細胞を用いて、Ritonavir の HCV 複製・増殖抑制効果を検討した。その結果を II-表 1 に示す。EC<sub>50</sub> は、いずれの replicon 細胞においても、実際臨床で使われている投与量における、血液中の濃度と同程度のものではなかった。

抑制効果のメカニズムを検討するため、まず、Ritonavir によって interferon が誘導されるか否かについて、interferon inducible gene である 2', 5'-OAS、MxA の発現を RT-PCR により検討した。その結果、両遺伝子とも発現・誘導されることはなかった(II-図1)。

次に、Ritonavir が HCV NS3 protease の活性を抑制するかについて in vitro NS3 protease assay 検討を行った。その結果、replicon 細胞で抑制している濃度では、抑制効果は見られなかった(II-図2)。

HCV の複製・増殖には HSP90 タンパクが関与していることが知られている。更に、Breast cancer 由来の細胞株を Ritonavir で処理すると HSP90 のタンパク発現が抑制されるとの報告がある。そこで、Ritonavir の HCV の抑制メカニズムにおいて、HSP90 の関与の有無について検討を行った。具体的には、Ritonavir 処理