

- 6) 【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)
- 7) 【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)
- 8) 【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)
- 9) 【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)
- 10) 【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)
- 11) 【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)

2. 学会発表

- 1) 坂本 穰, 井上泰輔, 榎本信幸. ISDR からみた C型慢性肝炎の PEG-IFN/Ribavirin 療法の解析. DDW-Japan 2007 (シンポジウム) 10.18, 2007 神戸
- 2) 北村敬利, 市川智章, 榎本信幸. 肝細胞を特異的に造影する造影剤 Gd-EOB-DTPA(SH L 569 B) を用いた MR 検査の可能性. 第 11 回日本肝臓学会大会 (ワークショップ) 10.18, 2007 神戸
- 3) 前川伸哉, 榎本信幸. HCV 遺伝子構造による自然免疫 RIG-I 経路阻害活性の検討. 第 94 回日本消化器病学会(シンポジウム) 2008.5.8 福岡
- 4) 前川伸哉, 金山明日香, 宮崎千賀子, 雨宮史武, 松井 啓, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCV 全ゲノム検索によるペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療感受性規定領域の決定. 第 44 回日本肝臓学会総会(ワークショップ) 2008.6.6 愛媛
- 5) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異からみた C型慢性肝炎の治療法. JDDW2008(第 50 回日本消化器病学会大会 シンポジウム) 2008.10.1 東京
- 6) 雨宮史武, 坂本 穰, 榎本信幸. 多発肝転移を伴った原発不明腺様嚢胞癌の一例. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 ワークショップ) 2008.10.1 東京
- 7) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. Whole HCV genome sequencing による治療感受性規定領域の

検索. JDDW2008(第 12 回日本肝臓学会大会 ワークショップ) 2008.10.2 東京

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

9) 三浦美香, 坂本 稔, 柏木賢治, 榎本信幸. インターネットを用いた肝炎診療ネットワークシステムの構築. JDDW2008(第 46 回日本消化器がん検診学会大会 (ワークショップ)) 2008.10.2 東京

10) 雨宮史武, 北村敬利, 榎本信幸. 早期肝細胞癌診断における EOB-MRI 検査の有用性. 第 95 回日本消化器病学会総会 (ワークショップ) 2009.5.8 札幌

11) 前川伸哉, 坂本 稔, 榎本信幸. HCV ゲノム多型は抗ウイルス治療効果を規定する. 第 45 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ) 2009.6.4 神戸

12) 三浦美香, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV ゲノム解析による肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 45 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ) 2009.6.5 神戸

13) 坂本 稔, 井上泰輔, 榎本信幸. C 型慢性肝炎に対する治療ガイドラインの検証と個別化医療の可能性. JDDW-2009(シンポジウム) 2009.10.14 京都

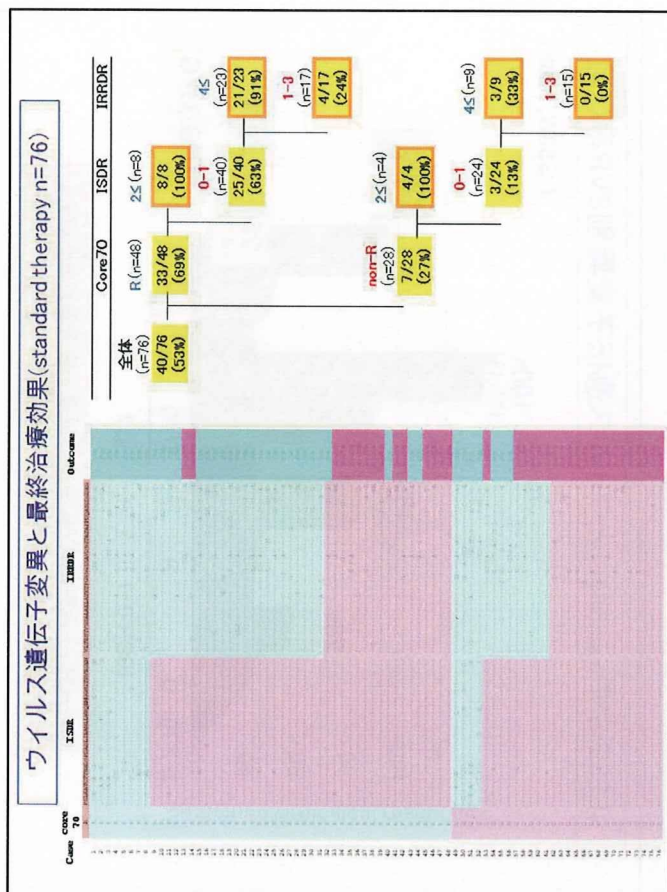
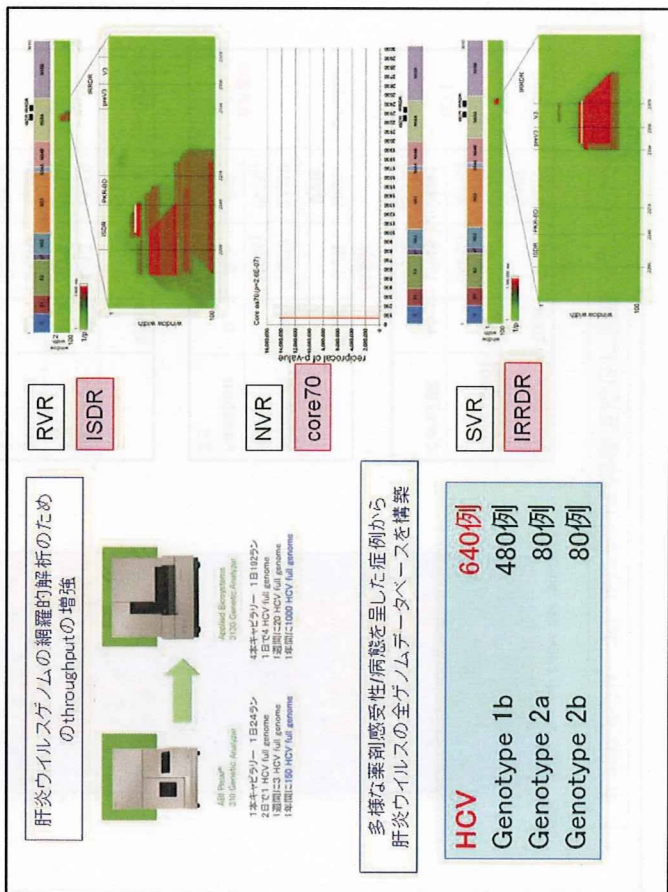
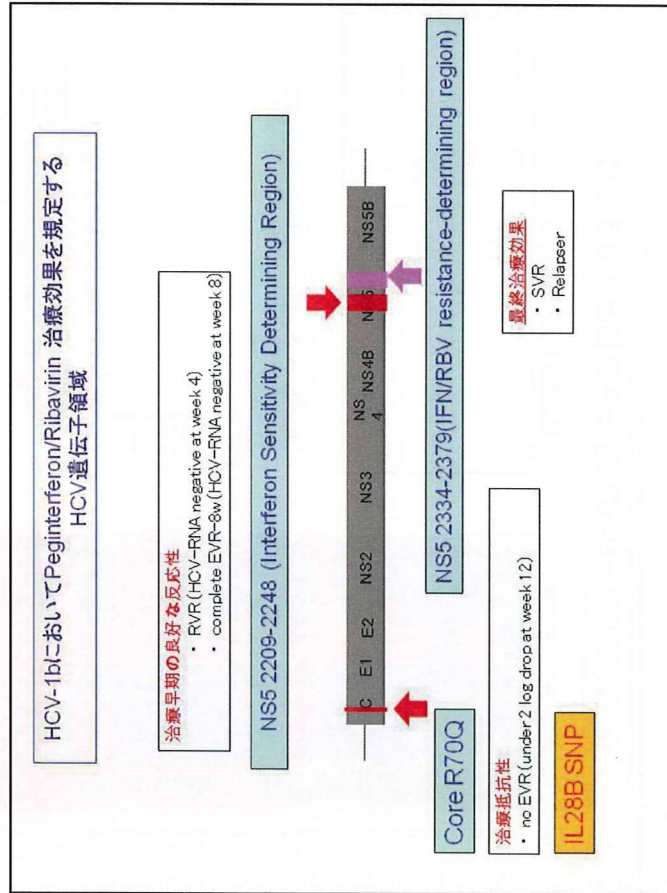
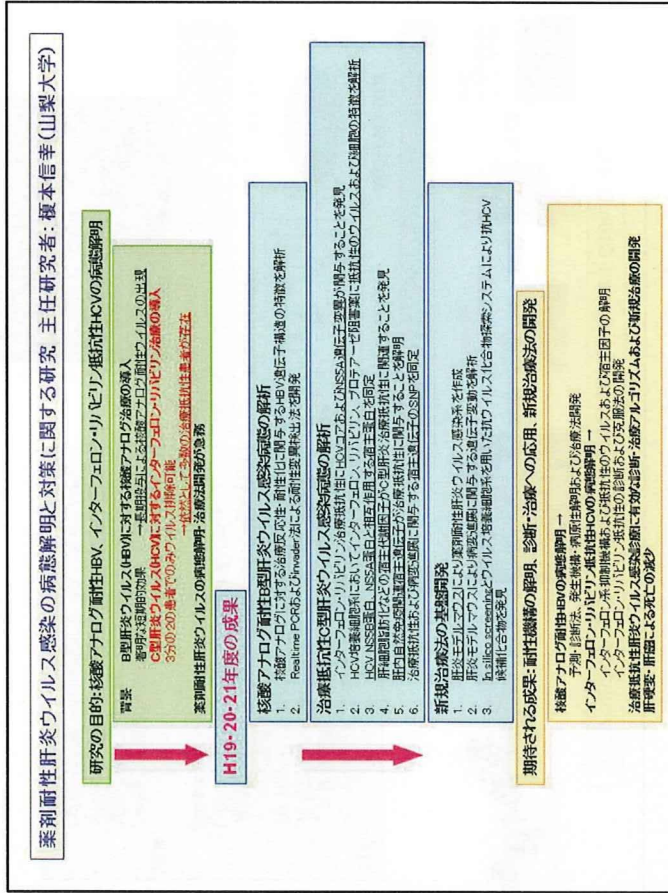
14) 前川伸哉, 坂本 稔, 榎本信幸. 肝炎の進行と治療感受性を規定するウイルス領域の包括的検討. JDDW-2009(シンポジウム) 2009.10.15 京都

G. 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



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

($\leq 53W$, n=69)



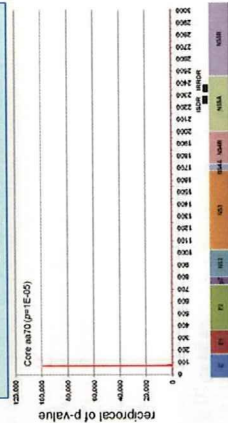
HCV遺伝子変異とIL28B SNPの両者が治療効果を規定する
IRRDR解析の導入によりさらに治療効果を正確に予測可能

IL28B SNPおよびHCV遺伝子変異と治療反応性

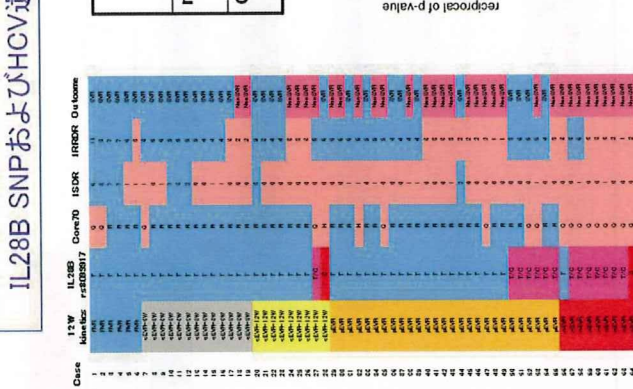
IL28B SNPとnon-EVR

Total	IL28B T/T	IL28B T/G or G/G	p-value
non-EVR	1 (2%)	8 (50%)	0.0005
Others	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 (57%)	3/7 (43%)	0.71	
Core70 Q/H	41	17/41 (41%)	24/41 (59%)		

Case	IL28B rs8099917	Outcome	ISDR		p-value
			SVR	Non-SVR	
Total	39	18/39 (46%)	21/39 (54%)	6.0 E-3	
Mutation 0-1	9	9/9 (100%)	0/9 (0%)		

Case	IL28B rs8099917	Outcome	IRRDR		p-value
			SVR	Non-SVR	
Total	18	3/18 (17%)	15/18 (83%)	6.0 E-5	
Mutation 0-3	30	24/30 (80%)	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_O31
 NS3-PRO-0071
 IC₅₀: 10 nM
 IC₅₀: 600 nM

特徴:
 ・インターフェロン・リビ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S.cNS4A-NS3 proteaseタンパク質を試用したセリンプロテア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IC₅₀ 6 nMを、S.cNS4A-NS3 protease 活性に対してIC₅₀ 600 nMを示した。

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 NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物の検索・デザインを行い、HCV 増殖抑制活性を有する化合物を見出した。
- 2) 既知の医薬品の中から、HCV 増殖抑制活性を有する 3 種の化合物 Griseofulvin、Taxol/Paclitaxel および Ritonavir を見出した。

分担研究者:伊藤 正彦

山梨大学・医学部・微生物学・教授

研究協力者:山下 篤哉

山梨大学・医学部・微生物学・助教

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). 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ので、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、EC₅₀ は数 μ 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). 既存の医薬品における HCV 増殖抑制効果

既に、医薬品として使用されている様々な薬剤について、抗 HCV 効果の有無を、HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo を用いて検討した。その結果、抗真菌剤 Griseofulvin が、抗 HCV 効果を有することが判った。その作用機序は、微小管重合阻害によるものと推測し、微小管重合阻害剤について HCV 抑制活性の有無について検討したところ、Taxol/Paclitaxel が抗 HCV 抑制活性を有することを見出した(II-表1)。

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、HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo を用いて検討した。その結果、Ritonavir の抑制効果が高かった。Ritonavir の EC₅₀ の濃度は、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あった(II-表1)。

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 処理前後の replicon 細胞における HSP90 タンパク発現の変化について、western blot 法で確認をした。その結果、Ritonavir 処理後の HSP90 タンパクの減少が見られた(II-図1)。

D. 考察

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

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 screening および In silico による化合物のデザインに行った。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た。しかし、selectivity index が 11~18 と治療薬候補となるまでの数値には達していなかった。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。

2). 既存の医薬品における HCV 増殖抑制効果

既に、医薬品として使用されている様々な薬剤について、抗 HCV 効果の有無を、HCV replicon 細胞 Huh7/Rep-Feo を用いて検討した。その結果、抗真菌剤 Griseofulvin が、抗 HCV 効果を有することが判った。その作用機序は、微小管重合阻害によるものと推測し、微小管重合阻害剤について HCV 抑制活性の有無について検討したところ、Taxol/Paclitaxel が抗 HCV 抑制活性を有することを見出した (II-表1)。現在、HCV の複製・増殖と微小管との関連性について解析中である。

HIV protease 阻害剤の抗 HCV 効果について検討したところ、Ritonavir が HCV 増殖抑制効果が高かった。いくつかの 1b 型の replicon 細胞における EC₅₀ は、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 (5 μM~15 μM、最大投与時: 48 μM) であった。その作用機序であるが、今回の実験から、Ritonavir 処理により、replicon 細胞の HSP90 タンパクの減少を確認した。従って、

HCV 複製複合体が不安定となり、ウイルス RNA の複製・増殖が低下することによるものと考えられる。現在、さらなる解析を行っている。

E. 結論

- 1). In silico screening のヒット化合物 2 種の共通構造を基に、デザインされた化合物 HCV71_con_CG1 は、基となった 2 つの化合物より、高い抗 HCV 効果を有した。
- 2). 既知の医薬品の中から、HCV 増殖抑制活性を有する 3 種の化合物 Griseofulvin、Taxol/Paclitaxel および Ritonavir を見出した。その作用機序は、Griseofulvin、Taxol/Paclitaxel は、微小管の構造変化によるものと推測され、Ritonavir による HSP90 タンパクの発現抑制によるものと示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Morimoto M, Tanabe F, Kasai H, Ito M. Effect of a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, on susceptibility to infection with *Staphylococcus aureus* in Chediak-Higashi syndrome (beige) mice. *Int Immunopharmacol.* 2007 7 :973-980

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Ito M, Enomoto N.

Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 197 :361-370

Okuyama T, Kurata S, Tomimori Y, Fukunishi

N, Sato S, Osada M, Tsukinoki K, Jin HF, Yamashita A, Ito M, Kobayashi S, Hata RI, Ikawa Y, Katoh I.

p63(TP63) elicits strong trans-activation of the MFG-E8/lactadherin/BA46 gene through interactions between the TA and DeltaN isoforms. **Oncogene**. 2008 27:308-317.

Yang PT, Xiao WG, Zhao LJ, Lu J, He LM, Kasai H, Ito M. Increase in the level of macrophage colony-stimulating factor in patients with systemic lupus erythematosus.

Ann Rheum Dis. 2008 67:429-430

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

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

Hepatol Res. 38:909-18

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

Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV

J Immunol. 2008 180:3297-304

Tanabe F, Kasai H, He L, Kin T, Fujikado T, Kumamoto T, Hara T, Iwata T, Ito M.

Improvement of deficient natural killer activity and delayed bactericidal activity by a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, in leukocytes from Chediak-Higashi syndrome patients in

vitro.

Int Immunopharmacol. 2009 9:366-70.

Ogawa Y, Kawamura T, Kimura T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S.

Gram-positive bacteria enhance HIV-1 susceptibility in Langerhans cells, but not in dendritic cells, via Toll-like receptor activation

Blood. 2009 113 :5157-66

2. 学会発表

山下篤哉、金浩範、前川伸哉、榎本信幸、伊藤正彦

抗真菌剤 Griseofulvin による HCV RNA の増殖抑制効果とその機序の解明

第 17 回抗ウイルス療法研究会、高松、平成 19 年 5 月

山下篤哉、金浩範、前川伸哉、榎本信幸、伊藤正彦

抗真菌剤 Griseofulvin による HCV RNA の増殖抑制効果とその機序の解明

第 55 回 日本ウイルス学会、札幌、平成 19 年 10 月

山下篤哉、金浩範、前川伸哉、何麗敏、高柳覚、脇田隆字、榎本信幸、伊藤正彦

細胞骨格を標的とし C 型肝炎ウイルス増殖阻害剤

第 18 回抗ウイルス療法研究会、鹿児島、平成 20 年 5 月

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

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

10 月

第 56 回 日本ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月

松田泰嘉、谷英典、藤田統、古田篤史、常田聡、秋光信佳、田中淳一、前川信哉、榎本信幸、山下篤哉、伊藤正彦、関口 勇地、野田 尚宏

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

海洋生物抽出液ライブラリーからの C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 活性阻害物質の探索
第 57 回日本ウイルス学会、東京、平成 21 年 10 月

第 56 回 日本ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

性ホルモンと C 型肝炎病態進行のメカニズムの解析

何麗敏、山下篤哉、金浩範、高柳覚、前川伸哉、坂本直哉、榎本信幸、伊藤正彦
第 56 回 日本ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月

山下篤哉、高柳覚、何麗敏、松本武久、上條加寿恵、前川伸哉、坂本直哉、山本直樹、榎本信幸、伊藤正彦

HIV-1 Protease inhibitor Ritonavir による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制効果とその機序の解明

第 19 回抗ウイルス療法研究会、東京、平成 21 年 6 月

山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、池田正徳、加藤宣之、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦

In silico screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索(第 2 報)

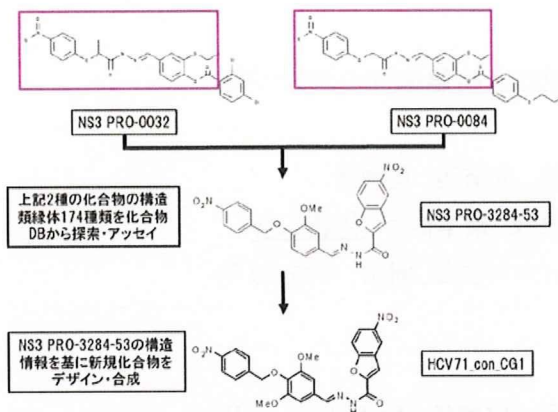
第 57 回日本ウイルス学会、東京、平成 21 年

表1 抗 NS3 Protease 阻害剤 候補化合物の抑制効果のまとめ

	EC ₅₀	CC ₅₀	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	NS3 protease activity at 100nM (% of control)
NS3 PRO 0020	3 μ M	15 μ M	5	11
NS3 PRO 0027	18 μ M	101 μ M	5.6	54
NS3 PRO 0028	3 μ M	41 μ M	13	24
NS3 PRO 0032	13 μ M	116 μ M	9	38
NS3 PRO 0034	25 μ M	60 μ M	2.5	38
NS3 PRO 0048	0.7 μ M	3 μ M	4.3	23
NS3 PRO 0050	4.6 μ M	15 μ M	3.3	31
NS3 PRO 0067	14 μ M	28 μ M	2	9
NS3 PRO 0071	14 μ M	37 μ M	3	41
NS3 PRO 0078	2.7 μ M	233 μ M	86	56
NS3 PRO 0084	23 μ M	149 μ M	6.5	43

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

I-図1
誘導体作製の流れ



I-図2
In vitro NS3 protease assay
における化合物 HCV71_con_ CG1 の抑制効果

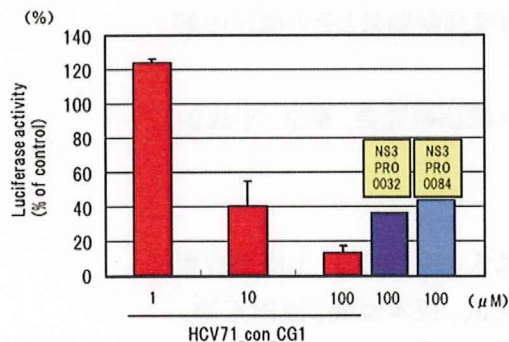
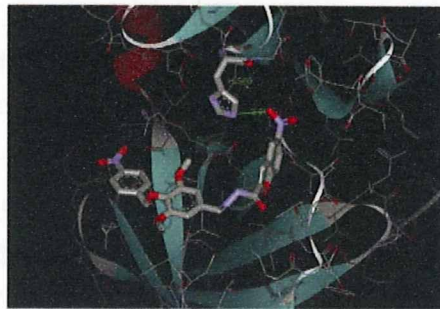


表2 Subgenome replicon細胞 及びFull genome replicon細胞における化合物HCV71_con.CG1のHCV複製・増殖抑制効果

HCV strain (1b)	Replicon cells	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Selectivity Index
Subgenome replicon				
HCV-N	HCV/Rep Feo	8.4±0.6	150.5±6.3	18
Con1	Huh7 Lunet/ Con1 LUN Sb #28	5.8±2.1	81.2±2.3	14
HCV-O	Huh7#94/ ORN 3-5B #24	4.4±0.3	44.0±6.8	11
Full genome replicon				
HCV-O	OR6	3.6±0.4	61.0±4	17
HCV-N	HCV/Rep Feo			
	NS3 PRO 0032	13	116	9
	NS3 PRO 0084	23	149	6.5

I-図3

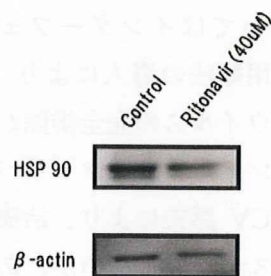
HCV NS3 protease に対する化合物HCV71_con.CG1の結合状態の予想



II-表1. Huh7/Rep-Feo細胞 (Genotype 1b HCV-N株)におけるGriseofulvin, Taxol/Paclitaxel および Ritonavirの抗HCV効果

	EC ₅₀	CC ₅₀	Selectivity Index
Griseofulvin (抗真菌剤)	6.13±0.17(μM)	217.93±3.49 (μM)	36
Taxol/Paclitaxel (抗癌剤)	5.99±1.04 (nM)	26.99±2.99 (μM)	4505
Ritonavir (HIV-1 Protease inhibitor)	10.49±0.37(μM)	63.02±4.61 (μM)	6

II- 図 1 Ritonavir 処理による replicon細胞のHSP90タンパク発現の変化



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

研究代表者 榎本 信幸 山梨大学 教授

研究要旨

既存の治療に耐性の HCV に対しても有効な新規薬剤で、且つ C 型肝炎患者に経済的負担を強いる高価なインターフェロンに代わる安価な低分子化合物薬を開発することを目標とする。HCV の NS3/4A プロテアーゼおよび NS2/3 プロテアーゼを薬剤標的にして、その活性ポケット部位の立体構造情報に基づいて、コンピューター上 (*in silico*) でプロテアーゼ活性部位に結合する化合物をそれぞれ探索した。*in silico* で選び出した NS3/4A プロテアーゼ活性阻害剤候補化合物の中からは、細胞毒性が低く、NS3/4A プロテアーゼ活性と HCV subgenome 複製の両方を強く阻害する化合物を同定したのち、更に最適化するための薬剤設計を実施した。一方、NS2/3 プロテアーゼタンパク質は大腸菌で大量に発現はするものの、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が、好条件を発見することはできなかった。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と GAL4 結合ドメインと VP-16 で転写を促進されるレポーター遺伝子とを導入した細胞を現在、製作中である。

分担研究分担者氏名：松本 武久

所属研究機関名：

独立行政法人理化学研究所

職名：上級研究員

は既存治療に耐性の肝炎ウイルスに対しても有効で、且つ C 型肝炎患者に経済的負担を強いる高価なインターフェロンに代わる安価な低分子化合物薬を開発する。

A. 研究目的

A. 研究目的

HCV 治療においてはインターフェロン・リバビリン併用療法の導入により、3 分の 2 の患者ではウイルスの完全排除が可能となったが、インターフェロン・リバビリン治療抵抗性 HCV 感染により、治療中にまったくウイルスが消失しないか、あるいは治療中・治療後にウイルスが再出現する患者が多数存在する。従って、本研究で

B. 研究方法

HCV の NS3/4A プロテアーゼタンパク質を薬剤標的にして、その活性ポケット部位の立体構造情報に基づいて、コンピューター上 (*in silico*) で活性部位に結合する化合物を探索した。遺伝子組換え大腸菌で合成させた NS4A-NS3 protease ドメイン融合タンパク質と消光性蛍光標識ペプチド基質を用いた NS3/4A プロテアーゼ阻害活性アッセイ系を組み立て、*in silico* スク

リーニングで選ばれてきた化合物の HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害活性を評価した。本研究開始前の予備的研究で 100 μ M 濃度で、NS3 プロテアーゼ活性を 50%以上阻害する化合物が 27 種類判明していた。HCV subgenomic replicon assay および細胞毒性試験の結果とも照らし合わせ、ヒット化合物を絞り込んだ。さらにこれらのヒット化合物の構造類縁体の NS3/4A プロテアーゼ活性に対する阻害効果を評価し、HCV subgenomic replicon 増殖阻害活性および細胞毒性試験の結果と照らし合わせ、ヒット化合物の化学構造の最適化を実施した。

また、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（触媒部位）の立体構造情報（PDB ID: 2HD0）に基づいて、コンピューター上（in silico）で触媒部位に結合する阻害剤候補化合物を探索して、56 種類の化合物を選んだ。触媒部位 C 末端の Leu217 の誘導適合を仮定し、Leu217 をフィンガープリントとすることに加え、疎水ポケットをみたく医薬品（セリンプロテアーゼ subtilisin の阻害剤である Eglin-C、等）をフィンガープリントとすることで、上記 56 種類の化合物の NS2/3 プロテアーゼ活性ポケットへのバーチャルドッキングを実施し、化合物の阻害剤としての妥当性を評価した。

タンパク質レベルでの NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニングアッセイ系を構築するため、N 端の膜貫通ドメインを欠如した NS2 と NS3 プロテアーゼドメインとの融合タンパク質(904-1206 a.a.)を大腸菌で封入体を形成させたまま発現させ、一旦、変性剤である 6 M 塩酸グアニジンある

いは高濃度尿素で可溶化して精製した後、NS2/3 プロテアーゼの活性化体構造を得るため、複数の巻き戻し条件を検討した。巻き戻し条件には、界面活性剤と高重合度シクロアミロースを用いる方法、還元剤 DTT 存在下でのグルタチオン酸化還元システムを用いる方法、高濃度尿素でアンフォールディング状態のまま可溶化した後、DTT 存在下で尿素を除去する方法を試行した。の融合タンパク質の合成条件を検討した。

さらに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させるためのコンストラクトを作製した。

（倫理面への配慮）

該当せず

C. 研究結果

本研究開始前の予備的研究でヒットした 27 化合物のうち、HCV subgenomic replicon 増殖阻害活性および細胞毒性を参照した結果、7 種類の化合物（NS3 PRO-0010, -28, -0032, -67, -71, -78, -0084）には細胞毒性が低く、NS3/4A プロテアーゼ活性と HCV subgenomic replicon 増殖の両方を強く阻害することが判明した。これら 7 種類の化合物のうち、NS3 PRO-0032, -0084 は共通の母核構造を有していたことから、両化合物の構造類縁体をデータベースから探索した。そのうち市販されている 172 種類の化合物を調達し、NS3 プロテアーゼ活性に対する化合物の阻害効果を評価したと

ころ、19 種類の化合物に 80%以上の阻害活性があることが判明した。HCV subgenomic replicon 増殖阻害活性および細胞毒性とも照らし合わせると、NS3 PRO-0032 と NS3 PRO-0084 の共通の構造類縁体である NS3 PRO-3284-53 が有望な化合物であることが判明した。さらに本化合物と NS3 プロテアーゼタンパク質とのバーチャル結合様式から本化合物をさらに最適化するための設計を実施し、5 種類の新たな化合物を合成して、NS3/4A プロテアーゼ活性と HCV subgenomic replicon 増殖に対する阻害活性を測定した結果、HCV71_con_CG1 にわずかに阻害活性の上昇が見られた。

NS2/3 プロテアーゼの活性ポケットに水素結合し、またその近傍の 2 箇所の疎水ポケットと相互作用すると予測される化合物のドッキング結果を基に選んだ 56 種類の化合物が、触媒部位 C 端の Leu217 をフィンガープリントに、また疎水ポケットをみたく医薬品をフィンガープリントにした探索法でも、NS2/3 プロテアーゼ阻害剤として有望であることを確認した。

大腸菌で発現させ、封入体から変性状態で可溶化した NS2/3 プロテアーゼタンパク質が、プロテアーゼ活性を示すような巻き戻し条件を得ることはできなかった。また大腸菌抽出液あるいは小麦胚芽抽出液を利用したいずれのセルフリータンパク質発現系でも、目的とするタンパク質の発現を観察することはできなかった。したがって、NS2/3 プロテアーゼ

タンパク質を直接用いた阻害剤アッセイ系に代わる細胞レベルでのアッセイ系を構築する目的で 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コンストラクトを作製した。

D. 考察

NS3/4A プロテアーゼ阻害剤としてヒットしてきた NS3 PRO-0032, -0084 の構造類縁体 172 種類のうち 19 種類の化合物に、100 μ M で 80%以上の NS3/4A プロテアーゼ阻害活性があったことから、NS3 PRO-0032, -0084 の化学構造に共通に含まれる母核構造は、NS3/4A プロテアーゼの活性ポケットに結合する可能性があり、これらの化合物と NS3/4A プロテアーゼタンパク質との複合体の結晶構造を解析することは、HCV71_con_CG1 の構造をさらに最適化する上でも必要である。また NS3 PRO-0071 は、NS3/4A プロテアーゼ活性に対する 50%阻害濃度は 600 nM、HCV subgenomic replicon 増殖に対する 50%阻害濃度は 14 μ M で、今後の最適化に期待が持てるため、本化合物と NS3/4A プロテアーゼタンパク質との複合体の結晶構造を解析することは重要である。

NS2/3 プロテアーゼタンパク質の巻き戻し条件を決定できなかったこと、またセルフリータンパク質発現系でも NS2/3 プロテアーゼタンパク質を発現する条件を得られなかったことから、in silico で探索してきた化合物の 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る。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 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と、GAL4 結合
ドメインと VP-16 で転写を促進されるレ
ポーター遺伝子の両方を 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。

E. 結論

HCV の NS3 プロテアーゼタンパク質
を薬剤標的にした HCV 治療薬候補化合物
候補として HCV71_con_CG1 を同定した。
また NS3 PRO-0071 は NS3/4A プロテ
アーゼ活性に対する 50%阻害濃度は 600
nM、HCV

subgenomic replicon 増殖に対する
50%阻害濃度は、14 μ M で、今後の最適
化が期待された。

大腸菌で発現させた NS2/3 プロテア
ーゼタンパク質の巻き戻し条件を得るこ
とはできなかった。またセルフリータンパク質
発現系でも NS2/3 プロテアーゼタンパク
質を発現できなかった。

in silico で探索してきた NS2/3 プロ
テアーゼ阻害剤候補化合物の NS2/3 プロ
テアーゼ阻害活性の評価には細胞レベルで
のアッセイ系が不可欠であることが結論付
けられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加
寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、
池田正徳、加藤宣之、梅山秀明、横山茂之、
榎本信幸、伊藤正彦「In silico screening
による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合
物の検索 (第 2 報)」第 57 回日本ウイル
ス学会学術集会 / 東京、2009 年 10 月、発
表形式：ポスター

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

研究代表者 榎本 信幸 山梨大学 教授

研究要旨

【目的】PEG-IFN/ribavirin(RBV)併用療法の約 20%は治療中 HCV が減衰しない不応例(NVR)であるが、この機序は不明で治療前予測も困難である。HCV 排除には細胞内ウイルスセンサーRIG-I とアダプター分子 IPS-1 を介する自然免疫が重要であり、HCV は IPS-1 を標的として自然免疫から逃避することが *in vitro* で示されている。しかし RIG-I/IPS-1 系およびその調節因子と、治療効果さらに HCV 変異との関連は不明であり、臨床的意義は未解明である。今回臨床検体を用いこれらを検討した。【方法】PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した C 型慢性肝炎例を対象とし、治療直前の生検肝組織における RIG-I、IPS-1、MDA5、LGP-2、特異的 ubiquitin-E3 ligase (RNF125)、ubiquitin 様修飾蛋白(ISG15) やその解離分子(USP18)の mRNA 発現を RTD-PCR 法により定量し、HCV 変異および治療効果との関連を検討し、さらに治療中の末梢血単核球(PBMC)中の遺伝子発現を経時的に解析した。【成績】C 型慢性肝炎における IPS-1 以外の肝内発現量は、非 HCV 肝疾患に比し 2-8 倍高値で、PEG-IFN/RBV 投与により 6 から 102 倍の PBMC 中の誘導を認めた。RIG-I、MDA5、LGP-2、ISG15 および USP18 は、NVR 群で SVR 群に比し有意に 1.5-4 倍高発現していたが、IPS-1 と RNF125 は NVR 群で有意に低発現で、特に RIG-I/IPS-1 比または RNF125 比は NVR と関連を認めた(NVR: SVR=1.3:0.4、2.3:0.8)。一方、HCV コア変異 (R70Q、L91M) 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。ROC 解析では ISG15、USP18 発現および RIG-I/IPS-1 比の Az は 0.9 以上で、治療効果予測に有用であった。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。【結論】PEG-IFN/RBV 療法 NVR では治療前の肝内 RIG-I、ISG15、USP18 発現が亢進していたが、IPS-1 および RNF125 発現は低値であった。RIG-I/IPS-1 系の遺伝子発現は HCV 抵抗性と密接に関与しており、これらの解析は治療効果予測に有用と考えられた。

分担研究者氏名：朝比奈靖浩
武蔵野赤十字病院
消化器科 部長

A. 研究目的

- (1) HCV 1b 型における PEG-interferon (IFN)/ribavirin(RBV)併用療法の約 20% は null responder で抵抗性を示す。しかし、本治療開始前における効果予測は困難で、また治療抵抗性の機序も不明である。
- (2) これまでの in vitro の検討から HCV 排除には自然免疫系、特に RIG-I/IPS-1 系の関与が重要と考えられていたが、臨床的意義は明らかでなかった。
- (3) 難治例に対する対策を講じるために、これら自然免疫系の要因とウイルス学的要因の関連を解明する。

B. 研究方法

- (1) PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した 1b 高ウイルス量の C 型慢性肝炎 74 例を対象とした。治療直前に肝生検を施行し、総 RNA を抽出後 RTD-PCR を用いて肝内 ISG15、USP18、RIG-I 及び IPS-1 mRNA の発現を、GAPDH を内部 control として定量した。また、非 HCV 肝疾患についても同様に解析した。ウイルス学的治療効果は著効(SVR: n=30)、再燃(TR: n=24)及び治療中 HCV が全く消失しない無効(NVR: n=20)に分類した。
- (2) PEG-IFN/RBV 治療例において自然免疫系遺伝子の抹消血単核球 (PBMC) 中における経時的発現動態と治療効果を解析した。
- (3) これら自然免疫要因と HCV genotype や変異などウイルス要因との関連を解明し

た。

(倫理面への配慮)

所属施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

- (1) C 型慢性肝炎例では ISG15、USP18 および RIG-I 発現量は、非 HCV 肝疾患例に比し明らかに高値であったが(HCV=0.4, 0.6, 0.6; 非 HCV= 0.05, 0.1, 0.2/GAPDH)、IPS-1 発現には差がなかった。ISG15、USP18 および RIG-I は、NVR 群で有意に高発現し、SVR では極めて低値であった(ISG15, USP18, RIG-I: NVR=0.8, 1.0, 0.9; TR=0.3, 0.6, 0.6; SVR=0.2, 0.4, 0.4/GAPDH, $p < 0.05$, Fisher PLSD)。反対に Cardif 発現量は NVR 群で有意に低かった (NVR=0.6; TR=0.9; SVR=1.1 /GAPDH, $p < 0.05$, Fisher PLSD)。ISG15、USP18 は HCV dynamics の第 1 相・第 2 相の HCV 減少率と有意に負相関していたが、IPS-1/RIG-I 比は有意に正相関していた。多変量解析では、ISG15 または USP18 発現および Cardif/RIG-I 比と血小板数が NVR に関与する因子であった。ROC 解析では ISG15、USP18 発現および IPS-1/RIG-I 比の Az は 0.9 以上で、治療効果予測に有用と考えられた。
- (2) PEG-IFN/RBV 投与中の RIG-I などの IFN 誘導遺伝子の末梢血単核球中における発現動態は著効例で強く誘導され、難治例では PEG-IFN/RBV による発現誘導が低かった。
- (3) これら genotype 1b で見出された結果は、genotype 2 の難治例でも同様であった。

(4)これら難治例における RIG-I 系および IFN 誘導遺伝子の肝内高発現は、HCV コア変異とは独立して NVR に関与していた。

D. 考察

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。

E. 結論

宿主自然免疫系は C 型肝炎における難治要因に関連しており、宿主自然免疫系の解析は難治例の予測と難治性の機序の解明に有用で、同病態を標的とした新規治療の開発や難治例の克服に重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

(2) 朝比奈靖浩「ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の難治要因」医学のあゆみ 229、77、2009

(4) 朝比奈靖浩、泉並木「C 型肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法における治療成績と難治例に対する対策」消化器科、49、91、2009

(5) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Biosystems. 2010 Jan;99(1):70-8.

(6) Asahina Y, Nakanishi H, Izumi N. Laparoscopic radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. Dig Endosc. 2009 Apr;21(2):67-72.

(7)西口修平、泉並木、日野啓輔、鈴木文孝、熊田博光、伊藤義人、朝比奈靖浩、田守昭博、平松直樹、林紀夫、工藤正俊。日本肝臓学会コンセンサス神戸 2009：C 型肝炎の診断と治療

2. 著作・著書

(1)朝比奈靖浩。C 型肝炎の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと抗ウイルス療法の治療効果。犬山シンポジウム記録刊行会編。Medical Tribune 2009

3. 学会発表

1. 第 50 回日本消化器病学会大会 シンポジウム

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

朝比奈靖浩, 板倉潤, 泉並木

日本消化器病学会雑誌 105 巻臨増大会
PageA462(2008.09)

2. 第 12 回肝臓学会大会 シンポジウム 肝炎ウイルス感染と免疫 自然免疫系分子 の治療前および治療中の経時的遺伝子発現 と PEG-IFN/ribavirin 併用療法の治療効果

朝比奈靖浩, 泉並木

肝臓(0451-4203)49 巻 Suppl.2 PageA
447 (2008.09)

3. 第 44 回日本肝臓学会総会 シンポジ ウム

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

朝比奈靖浩, 泉並木, 三宅祥三

肝臓 49 巻 A12 (2008.6)

4. 第 94 回日本消化器病学会総会 シンポ ジウム

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

朝比奈靖浩, 泉並木, 三宅祥三

日本消化器病学会誌 105 巻 A75(2008.3)

5. 第 13 回 日本肝臓学会大会 ワークシ ョップ 肝疾患診療対策における大都市で の問題点と対策。肝臓 2009.50.A487

6. 第 13 回 日本肝臓学会大会 シンポジ
ウム C 型肝炎の長期予後と治療成績から
みたガイドラインの妥当性の検討。肝臓
2009.50.A420

第 45 回 日本肝臓学会総会 コンセンサ
スミーティング C 型肝炎治療：ペグイン
ターフェロン・リバビリン併用療法 肝臓
2009.50.A41

7. 第 45 回 日本肝臓学会総会 シンポジ
ウム C 型慢性肝炎の難治要因とテラプレ
ビルの抗ウイルス効果および自然免疫に与
える影響 肝臓 2009.50.A21

8. 第 95 回日本消化器病学会総会 パネル
ディスカッション B 型慢性肝炎に対する
核酸アナログの治療成績と高感度
HBVDNA 測定系の臨床的意義 日本消化
器病学会雑誌 2009.106.A78

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究班

研究代表者 榎本 信幸 山梨大学 教授

研究要旨：近年，HCV 蛋白を標的とした薬剤が開発されており，今後，C 型慢性肝炎治療の中心的役割を担うと考えられている．これらの薬剤は単独で著明な抗 HCV 効果を持つ反面，耐性ウイルスの出現が問題である．われわれは HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて，これら HCV 蛋白阻害剤の治療効果，耐性ウイルスの出現，治療法の開発を行った．HCV 蛋白阻害剤は単独投与により，著明にマウス血中 HCV RNA 量を低下させたが，投与中，耐性株の出現により，breakthrough が生じた．Breakthrough の予防には IFN-a との併用あるいは，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予防できた．また異なる HCV 蛋白を標的とした薬剤の併用投与により，IFN 製剤を使用せずとも HCV の排除が可能であることを見いだした．さらに，野生型あるいは変異型 HCV クローンを投与した HCV 感染マウスを用いて，変異ウイルスの増殖能あるいは薬剤耐性能が可能なシステムを構築した．

分担研究者 今村道雄
広島大学病院消化器・代謝内科 助教

A. 研究目的

HCV 蛋白を標的とした薬剤の抗 HCV 効果，耐性株出現を検討し，より有効な治療法を開発するとともに，薬剤耐性ウイルスの分子生物学的検討あるいはこれらに対する治療法の開発に有用な動物モデルシステムを開発する．

B. 研究方法

1) ヒト肝細胞キメラマウスに genotype 1b 型 HCV 患者血清を静脈内投与し，HCV 感染を惹起した．これら HCV 感染マウスに 28 日間，protease inhibitor (telaprevir, 200 mg/kg, 1 日 2-3 回，連日経口投与)，RNA polymerase inhibitor (MK-0609, 3

mg/kg, 1 日 2 回，連日経口投与：) 単独，両者併用，あるいは IFN-a と組み合わせ投与し，マウス血中 HCV RNA 量の測定および NS3, NS5B 領域のアミノ酸配列を解析した．

2) Genotype 1b 患者血清から作成した HCV 全長 cDNA (KT9) より in vitro transcription によって HCV RNA を合成し，ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接投与し HCV 感染を惹起した．またこの cDNA に protease inhibitor 耐性である NS3 領域の A156S 変異を挿入した耐性型クローン (KT9-NS3-A156S) も投与した．これらのクローンを用いて作成した HCV 感染マウスに telaprevir を連日経口投与した．