

Fig. 4. BiFC assays of Cardif and NS4B. The complementary pairs of N- or C-terminally mKG-fused NS4B and Cardif expression plasmids were cotransfected in HEK293T cells. After 24 hours, the cells were fixed and observed by confocal microscopy (A) or subjected to flow cytometry to measure mKG-emitted fluorescence (BiFC signal) and to count BiFC signal-positive cells (B,C). Plasmids expressing p65-mKGN and p50-mKGC individually were used as a BiFC-positive control and plasmids expressing N- or C-terminally mKG-fused Rluc were used as a negative control. The letters N and C denote complimentary N- and C-terminal fragments of mKG, respectively. Assays were performed in triplicate, and error bars indicate the mean \pm SD. Scale bars indicate 10 μ m (A). * $P < 0.05$ compared with corresponding negative controls. (D) Plasmids expressing mKG fragment-fused STING or NS4B were transfected in HEK293T cells. After 24 hours, the cells were fixed and immunostained with anti-mKG antibody. Mitochondria were stained using Mitotracker, and nuclei were stained with DAPI. Cells were observed by confocal microscopy. Scale bars = 5 μ m.

NS4B-N, and C-Cardif and N-NS4B (Fig. 4A,B). The percentage of cells positive for BiFC signal increased with the combination of N-Cardif and NS4B-C, and C-Cardif and NS4B-N (Fig. 4C). Fluorescence microscopy indicated that mKG-Cardif, but not Cardif-mKGC, was partially colocalized with mitochondria, possibly due to disruption of mitochondria anchor

domain by C-terminal fusion with mKGC (Fig. 4D). These results indicate the lack of significant molecular interactions between NS4B and Cardif.

Binding of NS4B to STING Blocks Molecular Interaction Between Cardif and STING. It has been reported that STING binds Cardif directly.^{20,22} Thus, we hypothesized that NS4B, through a competitive

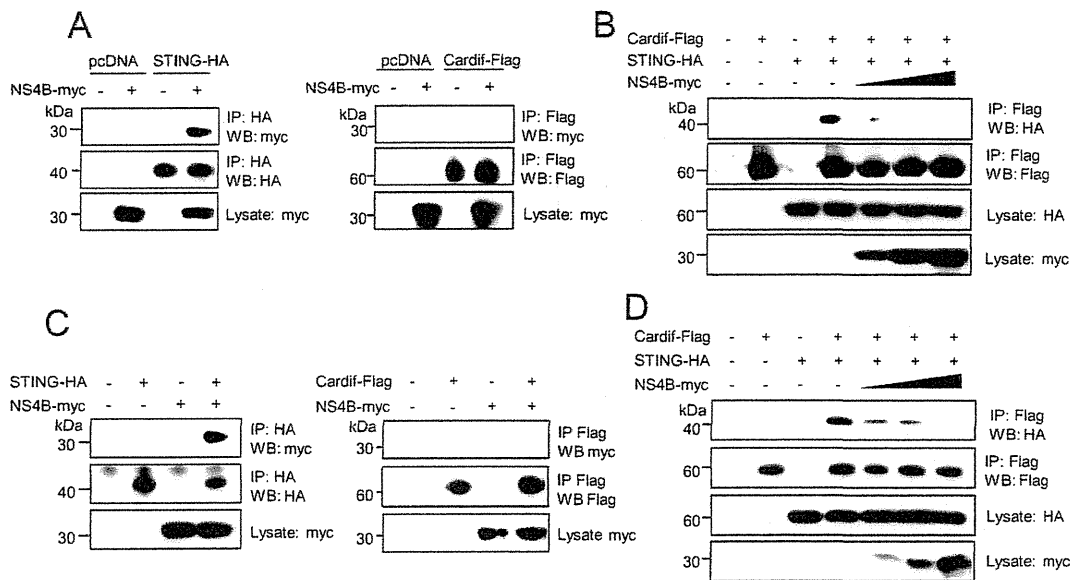


Fig. 5. Binding of NS4B to STING blocks molecular the interaction between Cardif and STING. (A,C) NS4B expression plasmid was cotransfected with STING or Cardif expression plasmid into HEK293T cells (A) or Huh7 cells (C). After 24 hours, cell lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-HA or anti-Flag and were immunoblotted with anti-myc. (B,D) Cardif and STING expression plasmids were cotransfected with various amounts of NS4B plasmid in HEK293T cells (B) or Huh7 cells (D). After 24 hours, cells lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-Flag and were immunoblotted with anti-HA.

interaction with STING, may hinder the direct molecular interaction between Cardif and STING. To verify this hypothesis, we performed immunoprecipitation assays. First, we transfected plasmids that expressed NS4B and Cardif, or NS4B and STING, in HEK293T cells or Huh7 cells, and performed immunoprecipitation. NS4B strongly bound to STING in both HEK293T cells and Huh7 cells, suggesting specific molecular interactions, whereas NS4B and Cardif did not show any obvious interaction (Fig. 5A,C). Consistent with previous reports, STING and Cardif showed significant interaction (Fig. 5B,D). Interestingly, those interactions were decreased by coexpression of NS4B, depending on its input amount, and finally blocked completely in both HEK293T and Huh7 cells (Fig. 5B,D). Collectively, the results above demonstrate that NS4B disrupts the interaction between Cardif and STING possibly through competitive binding to STING.

Effects on HCV Infection and Replication Levels by STING Knockdown and NS4B Overexpression. We next studied the impact of STING-mediated IFN production and its regulation by NS4B on HCV infection and cellular replication. First, we transfected three STING-targeted siRNAs into Huh7/Feo cells (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, STING knockdown cells conferred significantly higher permissibility to HCV replication. We next transfected HCV-JFH1 RNA into Huh7 cells that were transiently transfected with NS4B. As shown

in Fig. 6C, HCV core protein expression was significantly higher in NS4B-overexpressed cells. Furthermore, HCV replication was increased significantly in Huh7/Feo cells overexpressing NS4B (Fig. 6D). Taken together, the results above demonstrate that STING and NS4B may negatively or positively regulate cellular permissiveness to HCV replication.

The N-terminal Domain of NS4B Is Essential for Suppressing IFN- β Promoter Activity Mediated by RIG-I, Cardif, and STING. It has been reported that the N-terminal domain of several forms of flaviviral NS4B shows structural homology with STING.²⁴ We therefore investigated whether the STING homology domain in NS4B is responsible for suppression of IFN- β production. We constructed two truncated NS4B expression plasmids, which covered the N terminus (NS4Bt1-84, amino acids 1 through 84) containing the STING homology domain and the C terminus (NS4Bt85-261, amino acids 85 through 261), respectively (Fig. 7A). Immunoblotting showed that NS4Bt1-84 and NS4Bt85-261 yielded protein bands of ~ 9 kDa and ~ 20 kDa, respectively. Aberrant bands in the truncated NS4B may be due to alternative post-translational processing. HEK293T cells were transfected with Δ RIG-I, Cardif, or STING, and NS3/4A or the truncated NS4B, along with IFN- β -Fluc plasmid, and a reporter assay was performed. NS4Bt1-84 significantly suppressed RIG-I, Cardif, and STING-

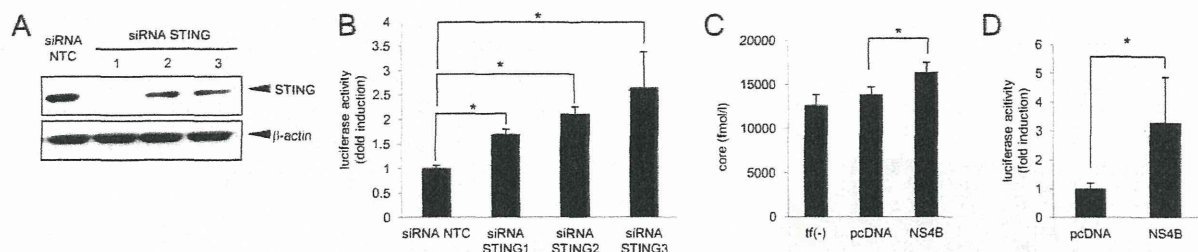


Fig. 6. Effects on HCV replication levels by STING knockdown and NS4B overexpression. (A) Effects of siRNA knockdown of STING by siRNA. Huh7 cells were transfected with STING-targeted siRNAs (siRNA STING-1, -2, and -3, respectively) or negative control siRNA (siRNA NTC). Seventy-two hours after transfection, cells were harvested and expression levels of STING protein were detected by immunoblotting. (B) Huh7 cells expressing HCV-Feo subgenomic replicon (Huh7/Feo)^{27,28} were transfected with STING-targeted siRNAs or negative control siRNA. Seventy-two hours after transfection, cells were harvested, and internal luciferase activities were measured. The y axis indicates luciferase activity shown as a ratio of transfection-negative control. Assays were performed in triplicate, and error bars indicate the mean + SD. **P* < 0.05 compared with corresponding negative controls. (C) Empty plasmid or plasmid expressing NS4B was transfected into Huh7 cells. After 24 hours, HCV JFH1 RNA was transfected into these cells. Seventy-two hours after virus transfection, HCV core antigen levels in culture medium were measured. Assays were performed in triplicate, and error bars indicate the mean + SD. **P* < 0.05 compared with corresponding negative controls. tf(-), transfection-negative control. (D) Huh7 cells expressing HCV-Feo replicon (Huh7/Feo)^{27,28} were transfected with NS4B expressing plasmid or empty plasmid (pcDNA). Forty-eight hours after transfection, internal luciferase activities were measured. The y axis indicates luciferase activity shown as a ratio of the transfection-negative control. Assays were performed in triplicate, and error bars indicate the mean + SD. **P* < 0.05 compared with corresponding negative controls.

induced IFN- β promoter activity, whereas NS4Bt85-261 did not (Fig. 7B). These results suggest that the N-terminal domain of NS4B is responsible for association with STING. Fluorescent microscopy indicated

that both NS4Bt1-84 and NS4Bt85-261 colocalized with ER and STING (Fig. 7C).

NS4B Suppresses IFN Production Signaling Cooperatively with NS3/4A. It has been reported that

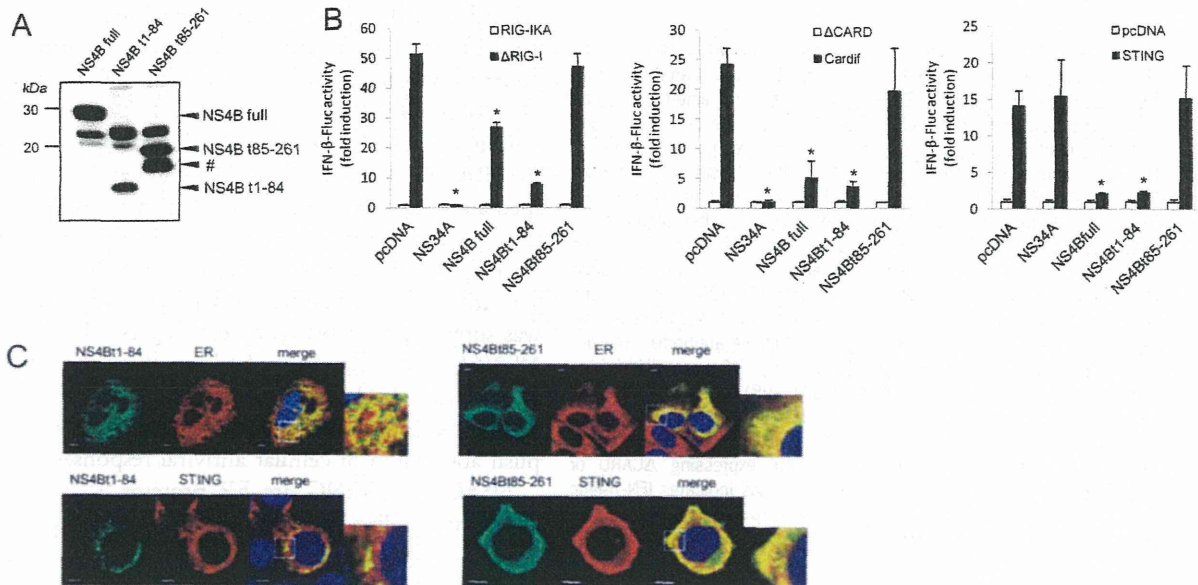


Fig. 7. The N-terminal domain of NS4B is essential for suppressing IFN- β promoter activity induced by RIG-I, Cardif, or STING. (A) Immunoblotting of NS4B and truncated NS4B, NS4B t1-84, and NS4Bt85-261. HEK293T cells were transfected with NS4B or truncated NS4B. After 24 hours, the cells were lysed and immunoblot assays were performed. The band indicated by the pound sign (#) is a truncated NS4B, probably generated via alternative posttranslational processing. (B) Plasmids expressing Δ RIG-I, Cardif, or STING as well as NS3/4A or the indicated truncated form of NS4B were cotransfected with pIFN- β -Fluc and pRL-CMV in HEK293T cells. Dual luciferase assays were performed 24 hours after transfection. Plasmids expressing RIG-IKA, Δ CARD, or pcDNA were used as negative controls. The y axis indicates IFN- β -Fluc activity shown as relative values. Assays were performed in triplicate, and error bars indicate the mean \pm SD. **P* < 0.05 compared with corresponding negative controls. (C) Plasmids expressing NS4Bt1-84-myc or NS4Bt85-261-myc were transfected with or without plasmids expressing HA-STING in HEK293T cells. After 24 hours, the cells were fixed and immunostained. Nuclei were stained with DAPI. Cells were observed by confocal microscopy. Scale bars indicate 5 μ m.

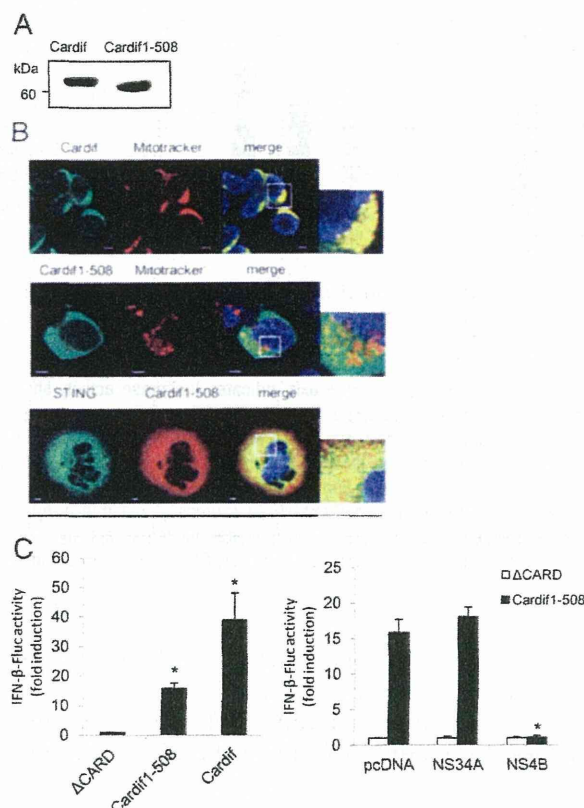


Fig. 8. NS4B suppressed IFN- β production pathway independently of and cooperatively with NS3/4A. (A) Immunoblotting of Cardif and truncated Cardif (Cardif1-508). HEK293T cells were transfected with Cardif or truncated Cardif (Cardif1-508). After 24 hours, the cells were lysed and immunoblot assays were performed. (B) Subcellular localization of Cardif and truncated Cardif (Cardif1-508). HEK293T cells were immunostained with anti-Cardif antibody or HEK293T cells were transfected with myc-tagged truncated Cardif (Cardif1-508-myc), and after 24 hours the cells were immunostained with anti-myc. Mitochondria were stained with Mitotracker (red) and nuclei were stained with DAPI (blue). Plasmid expressing myc-tagged truncated Cardif (Cardif1-508) and plasmid expressing HA-tagged STING were transfected into HEK293T cells. The cells were immunostained with anti-myc and anti-HA antibodies and analyzed by confocal laser microscopy. Scale bars = 10 μ m. (C) Plasmids expressing Cardif or truncated Cardif (Cardif1-508) and pIFN- β -Fluc and pRL-CMV were transfected with or without plasmid expressing NS3/4A or NS4B into HEK293T cells as indicated. Dual luciferase assays were performed 24 hours after transfection. Plasmid expressing Δ CARD or pcDNA was used as a negative control. The y axis indicates IFN- β -Fluc activity shown as relative values. Assays were performed in triplicate, and error bars indicate the mean \pm SD. * P < 0.05.

HCV NS3/4A serine protease cleaves Cardif between Cys-508 and His-509, releases Cardif from the mitochondrial membrane, and blocks RIG-I-induced IFN- β production. We next assessed whether NS4B suppresses IFN- β production in the presence of Cardif cleaved by NS3/4A protease (Cardif1-508, Fig. 8A). The truncation of Cardif-C-terminal residue abolished mitochondrial localization but still colocalized with

STING (Fig. 8B). The reporter assay showed that Cardif1-508 induced weak IFN- β activation. Interestingly, NS4B completely blocked the residual function of the Cardif1-508 protein to activate IFN- β expression, suggesting an additive effect of NS3/4A and NS4B on the RIG-I-activating pathway (Fig. 8C).

Discussion

It has been reported that viruses, including HCV, target IFN signaling to establish persistent replication in host cells.³⁹ We have reported that NS4B blocks the transcriptional activation of ISRE induced by overexpression of RIG-I and Cardif, but not by TBK1 or IKK ϵ .¹⁹ In the present study, we have shown that NS4B directly and specifically binds STING, an ER-residing scaffolding protein of Cardif and TBK1 and an inducer of IFN- β production (Figs. 3 and 5), and blocked the interaction between STING and Cardif (Fig. 5B,D) resulting in strong suppression of RIG-I-mediated phosphorylation of IRF-3 and expressional induction of IFN- β (Fig. 1). Furthermore, HCV replication was increased by knock-down of STING or overexpression of NS4B (Fig. 6). Taken together, our results demonstrate that HCV-NS4B strongly blocks virus-induced, RIG-I-mediated activation of IFN- β production signaling through targeting STING, which constitutes a novel mechanism of viral evasion from innate immune responses and establishment of persistent viral replication.

Our results also showed that the effects of NS4B on the RIG-I signaling were independent of NS3/4A-mediated cleavage of Cardif. Reporter assays showed that a cleaved form of Cardif (Cardif1-508) partially retained activity for the induction of IFN- β promoter activation. The residual IFN- β promoter activation was suppressed almost completely by NS4B but not by NS3/4A (Fig. 8C). These findings show that there are at least two mechanisms by which HCV can abrogate RIG-I-mediated IFN production signaling to accomplish abrogation of cellular antiviral responses.

NS4B and STING are ER proteins,^{20,21,40} whereas Cardif is localized on the outer mitochondrial membrane.⁹ Consistent with those reports, our immunostaining experiments demonstrated that most NS4B protein colocalized with STING (Fig. 2), and their association was localized on MAM (Fig. 2E). In addition to the significant colocalization of STING and NS4B, STING partially colocalized with Cardif at the boundary region of the two proteins (Fig. 2B). Furthermore, immunoprecipitation experiments showed that overexpression of NS4B completely blocked the interaction of STING with Cardif (Fig. 5B). Ishikawa et al.²⁴ reported

that STING could associate with Cardif by MAM interaction. Castanier et al.⁴¹ reported that Cardif-STING interaction was enhanced in cells with elongated mitochondria. In addition, Horner et al.^{42,43} observed NS3/4A targeting of MAM-anchored synapse and cleavage of Cardif at MAM but not in mitochondria. These results led us to speculate that interaction between STING and Cardif was enhanced by altering their subcellular localization during viral infection and that NS4B inhibits Cardif activation by interfering with the association between STING and Cardif on MAM-like NS3/4A behavior against host innate immunity.

HCV-NS4B is an ER-localized 27-kDa protein with several functions in the HCV life cycle. Cellular expression of NS4B induces convolution of the ER membrane and formation of a membranous web that harbors HCV replicase complex.^{44,45} NS4B also has RNA-binding capacity.⁴⁶ In addition, several point mutations of NS4B were found to alter viral replication activity.^{33,46,47} The studies above indicate that NS4B provides an important protein-protein or protein-RNA interaction platform within the HCV replication complex and is essential for viral RNA replication. However, there are few reports on the involvement of NS4B with antiviral immune responses. Consistent with our previous study, Moriyama et al.⁴⁸ reported that NS4B partially inhibited dsRNA-induced but not TRIF-induced activation of IFN- β . In NS4B-expressing cells, IFN- α induced activation of STAT1 was suppressed.⁴⁹ The present study has demonstrated that NS4B functions against the host IFN response, such that NS4B directly interacts with STING and suppresses downstream signaling, resulting in the induction of IFN production.

STING contains a domain homologous to the N terminus of NS4B derived from several flaviviruses, including HCV. In our previous NS4B truncation assay, the NS4B N-terminal domain (amino acids 1-110) was important for suppression of RIG-I-induced IFN- β expression.¹⁹ Consistent with these results, N-terminally truncated NS4B (NS4Bt1-84) significantly suppressed STING and Cardif-induced IFN- β promoter activation, whereas the C terminus of NS4B (NS4Bt85-261) did not (Fig. 7). These results reinforce our hypothesis that NS4B binds STING at its homology domain and blocks the ability of STING to induce IFN- β production.

A small molecule inhibitor of NS4B has been developed and is under preliminary clinical trials.⁵⁰ Einav et al.⁵¹ identified clemizole hydrochloride, an H1 histamine receptor antagonist, as an inhibitor of the RNA-binding function of NS4B and HCV RNA replication. A phase 1B clinical trial of clemizole in hepatis

C patients has been completed.⁵² Other two NS4B inhibitors which are a compound of amiloride analog and anguizole are under preclinical development.^{53,54} The possibility remains that such NS4B inhibitors may suppress HCV replication partly through inhibiting the ability of NS4B to suppress IFN- β production and restore cellular antiviral responses.

In conclusion, IFN production signaling induced by HCV infection and mediated by RIG-I is suppressed by NS4B through a direct interaction with STING. These virus-host interactions help to elucidate the mechanisms of persistent HCV infection and constitute a potential target to block HCV infection.

Acknowledgment: The authors are indebted to J. Tschopp for providing Cardif, Δ CARD, and CARD and to G. N. Barber for the STING plasmids. This study was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; the Japan Society for the Promotion of Science; Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan; and the Japan Health Sciences Foundation.

References

- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:778-809.
- Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 2002;14:111-116.
- Sakamoto N, Watanabe M. New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2009;44:643-649.
- Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-737.
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Karo H, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-997.
- Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, et al. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008;29:428-440.
- Kawai T. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-988.
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell* 2005;122:669-682.
- Xu LG. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling. *Mol Cell* 2005;19:727-740.
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-1172.
- Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 1998;17:1087-1095.

13. Lin W, Kim SS, Yeung E, Kamegaya Y, Blackard JT, Kim KA, et al. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol* 2006;80:9226-9235.
14. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, et al. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90.
15. Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, et al. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 2011;85:5986-5994.
16. Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, et al. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6001-6006.
17. Li X-D, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17717-17722.
18. Baril M, Racine M-E, Penin F, Lamarre D. MAVS Dimer Is a Crucial Signaling Component of Innate Immunity and the Target of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease. *J. Virol.* 2009;83:1299-1311.
19. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, et al. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007;88:3323-3333.
20. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008;455:674-678.
21. Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8653-8658.
22. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 2008;29:538-550.
23. Jin L. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol* 2008;28:5014-5026.
24. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009;461:788-792.
25. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8738-8743.
26. Lin R, Lacoste J, Nakhai P, Sun Q, Yang L, Paz S, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol* 2006;80:6072-6083.
27. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003;4:602-608.
28. Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, Kurosaki M, Ueda E, Maekawa S, et al. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis* 2004;189:1129-1139.
29. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
30. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623-626.
31. Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, et al. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:42-47.
32. Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Nakagawa M, et al. Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 3. *J Gastroenterol* 2006;41:750-757.
33. Lindstrom H, Lundin M, Haggstrom S, Persson MA. Mutations of the hepatitis C virus protein NS4B on either side of the ER membrane affect the efficiency of subgenomic replicons. *Virus Res* 2006;121:169-178.
34. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 2009;19:81-88.
35. Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA. Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Arch Biochem Biophys* 2002;404:263-270.
36. Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Wan L, Xiang Y, et al. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J* 2005;24:717-729.
37. Kerppola TK. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* 2006;1:1278-1286.
38. Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 2008;37:465-487.
39. Kato H. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-105.
40. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20842-20846.
41. Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* 2009;11:133-138.
42. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14590-14595.
43. Horner SM, Park HS, Gale M Jr. Control of innate immune signaling and membrane targeting by the hepatitis C virus NS3/4A protease are governed by the NS3 helix α . *J Virol* 2012;86:3112-3120.
44. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of Hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-5984.
45. Gretton SN, Taylor AI, McLauchlan J. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* 2005;86:1415-1421.
46. Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78:11288-11295.
47. Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78:11393-11400.
48. Moriyama M, Kato N, Otsuka M, Shao RX, Taniguchi H, Kawabe T, et al. Interferon-beta is activated by hepatitis C virus NS5B and inhibited by NS4A, NS4B, and NS5A. *Hepato Int* 2007;1:302-310.
49. Xu J, Liu S, Xu Y, Tien P, Gao G. Identification of the nonstructural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha. *Virus Res* 2009;141:55-62.
50. Hofmann WP, Zeuzem S. A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:257-264.
51. Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, et al. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotech* 2008;26:1019-1027.
52. Rai R, Deval J. New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: targeting NS4B. *Antiviral Res* 2011;90:93-101.
53. Cho NJ, Dvory-Sobol H, Lee C, Cho SJ, Bryson P, Masek M, et al. Identification of a class of HCV inhibitors directed against the nonstructural protein NS4B. *Sci Transl Med* 2010;2:15ra16.
54. Bryson PD, Cho NJ, Einav S, Lee C, Tai V, Bechtel J, et al. A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution. *Antiviral Res* 2010;87:1-8.

肝炎ウイルス学 近年の進歩

- C型肝炎ウイルス
- B型肝炎ウイルス
- HCV培養系
- IL28B

Author さかもと なおや
坂本直哉*

*北海道大学大学院医学研究科消化器内科学分野

Headline

1. HBV粒子は内部には不完全二重鎖HBV DNAゲノムをもつ球形粒子である。
2. ゲノムワイド解析により、HBV慢性持続感染には、HLA-DPA1とHLA-DPB1遺伝子多型が強く関連することが報告されている。
3. HCVの増殖培養系は、HCVレプリコンシステムおよび、HCV-JFH1細胞培養系が、感染動物モデルとしてヒト肝細胞移植キメラマウスが広く利用されている。
4. HCVコア蛋白は肝の脂肪化をきたし、肝発がん、インターフェロン治療抵抗性への原因となる。
5. HCV治療効果に関連するウイルス遺伝子としてコア蛋白70番、91番アミノ酸変異が、宿主遺伝子としてIL28B遺伝子多型が強く関連することが知られている。

はじめに

B型肝炎ウイルスは様々な病態を示すことが知られている。成人期の感染では、細胞でのウイルス増殖に引き続く宿主の免疫反応により急性肝炎を引き起こす。しかしB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) 陽性妊婦の分娩時における垂直感染、あるいは幼少期の水平感染の場合、持続性感染となりキャリアとなる。HBVキャリアの多くは20歳代前後に一過性の肝炎とともにウイルス増殖が抑制され臨床的治癒と言われる状態になるが、一部は慢性肝炎から肝硬変、肝がんに至る疾患を発症する。

わが国では母子感染予防対策により垂直感染によるHBVキャリアは減少しているが、幼少期の水平感染、成人期以降のおもに性行為に起因する急性感染に対する対策、つまりユニバーサルワクチン化は世界各国の後塵を拝している。HBVキャリアは世界では依然として約4億人存在すると推定される地球規模の感染症であり、HBV感染予防策の徹底とウ

イルス排除を可能とする治療法の開発が望まれている。

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) は国内に約130~150万人の感染者が存在し、肝細胞がん発症の最大の高危険群である。これらの発症を防ぐため、ウイルス発見後早期からインターフェロン (interferon; IFN) 投与を基本とした抗ウイルス療法が行われており、2004年に認可されたペグインターフェロン (pegylated interferon; PEG-IFN) + リバビリン (ribavirin; RBV) 併用療法によりウイルス排除率は約50%にまで向上している。さらにプロテアーゼ阻害薬をはじめとしたウイルス蛋白を直接標的とした新規薬剤の臨床試験も加速している。本稿ではHBVおよびHCVの感染増殖機構をはじめとした基礎的な知見について解説を行う。

HBV遺伝子構造 (図1)

HBV粒子はDane粒子ともよばれる、直径42 nmの球形粒子である。エンベロープを有し、内部に正20面体のヌクレオキャプシドが

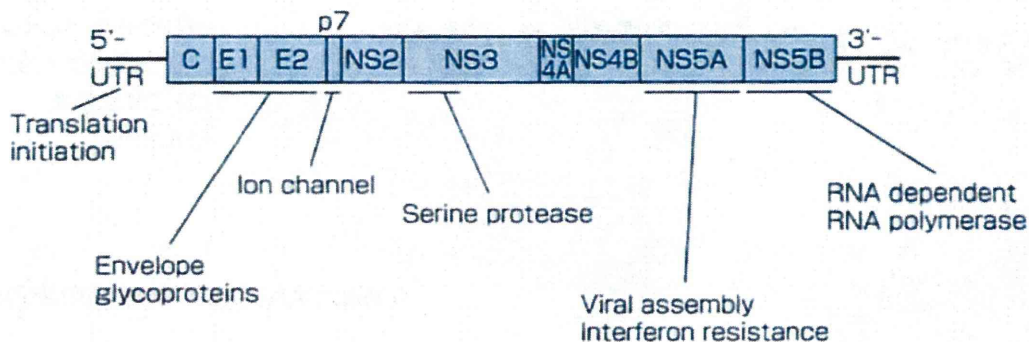


図1 HCVゲノムの構造

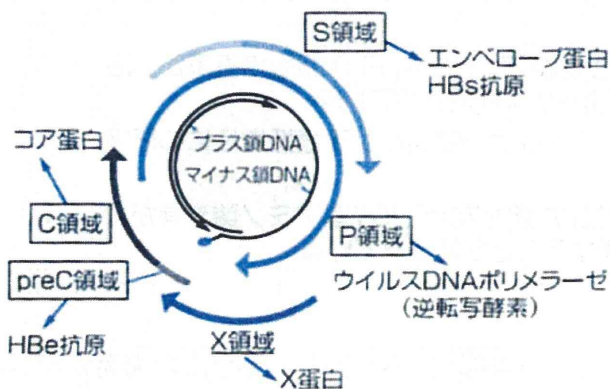


図2 HBVゲノムの構造

存在する。ヌクレオキャプシドは120対のコア蛋白質の二量体により形成され、内部には不完全二重鎖HBV-DNAゲノムが1コピーとそれに共有結合したポリメラーゼ蛋白質がパッケージされている。エンベロープは、large, middle, small surface proteinの3種類の表面蛋白と脂質二重膜よりなる。ウイルス粒子中に含まれるゲノムのマイナス鎖DNAは完全長だが、プラス鎖はマイナス鎖の平均2/3をカバーするのみである。HBVゲノムは4個の蛋白翻訳領域が存在し、全てが同じ方向を向き、部分的あるいは完全に重複しているが、アミノ酸翻訳コドンのフレームをずらすことにより全く異なる蛋白が生成される。

HBV感染の経過にかかわる宿主因子

HBV感染時の免疫応答、ウイルス排除ある

いは感染持続においては、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility antigen; MHC) 分子が重要な役割を果たしていると考えられている。近年、ゲノムワイド関連分析 (genome-wide association study; GWAS) を用いてHLA-DP 遺伝子多型がアジア人におけるB型慢性感染に関連することを見出した¹⁾。まず、B型慢性肝炎患者群と健常群を対象に候補遺伝子のスクリーニングが行われ、強い関連を示す遺伝子多型としてHLA-DPA1とHLA-DPB1が抽出されたあと、三つの日本人集団とタイ人集団でreplication studyが行われその再現性が確認された。さらにハプロタイプ解析により、B型慢性化年のリスク (HLA-DPA1*02:02-DPB1*05:01と、HLA-DPA1*02:02-DPB1*0301)、および防御 (HLA-DPA1*0103-DPB1*0402とHLA-DPA1*0103-DPB1*0401) に関連する表現形質がそれぞれ明らかにされた。

HCVの遺伝子構造 (図2)

HCVはFlavivirus科のHepacivirus属に属する約9,600塩基の一本鎖(プラス鎖)RNAウイルスである。ウイルスゲノムであるHCV-RNAは約3,000アミノ酸からなる前駆体蛋白をコードする単一の翻訳領域からなり、その5'および3'端にはそれぞれ固有の二次構造を有する非翻訳領域(untranslated region; UTR)が存在する。5'-UTRに存在する internal

ribosome entry site (IRES) から翻訳された前駆体蛋白のN末端側1/3は小胞体膜のシグナルペプチダーゼによりCore, E1, E2, p7の4個の構造蛋白が切り出される。一方C末端側2/3はウイルスメノムの複製に必要な非構造蛋白がコードされNS2, NS3の2個のプロテアーゼにより切断・処理される。

HCV感染モデル

HCVの感染宿主はヒトと一部の霊長類に限定され、近年までチンパンジー以外の動物モデルは存在しなかった。また通常のHCV株は培養細胞でほとんど増殖せず基礎研究の障害になっていたが、1999年Lohman, Bartenschlagerらにより、細胞内で増殖可能なHCVミニゲノムであるHCVレプリコンシステムが報告され、ウイルスメノムの細胞内複製機構を培養細胞で解析することが可能になった²⁾。2005年には脇田らによりHCV-JFH1細胞培養系が報告された^{3,4)}。HCV感染症動物モデルとしては、ヒト肝細胞を移植したAlubumin-uPA/SCIDマウスが開発され薬剤の*in vivo*効果の解析などに応用されている⁵⁾。

HCV感染ライフサイクルと脂質代謝

肝内にHCVコア蛋白を発現するトランスジェニックマウスでは肝の脂肪化をきたし、高頻度に肝がんを発生する⁶⁾。また、細胞内に強制発現したコア蛋白が一部脂肪滴周囲に局在することが知られていたが、宮成らはHCV-JFH1培養系を用いて、HCV感染細胞内においても脂肪的周囲にコア蛋白が局在していることを示し、さらに、その周囲にNS5AをはじめとするHCV非構造蛋白が集積することを明らかとした⁷⁾。脂肪滴膜上におけるNS5A蛋白とコア蛋白との特異的結合は、感染性ウイルス粒子に必須である。以上のとお

りHCVは肝細胞内の脂肪滴を感染性ウイルス粒子形成の足場として利用する。HCVレプリコンを用いた解析でも脂質合成系遺伝子発現の亢進している細胞ではHCV発現増殖が有意に高い⁸⁾。さらに、HCVは感染細胞におけるfatty acid synthetaseの発現を誘導(upregulate)し、さらに同蛋白はHCVの感染受容体の一つであるclaudin-1の発現を上昇させることから⁹⁾、脂質代謝系とHCV増殖は相互にポジティブフィードバックをきたすことが示唆される。临床上も、C型肝炎では肝脂肪化を高頻度に合併すること、肝脂肪化、肥満、インスリン抵抗性合併例では著効率が低いこと、さらにIL-28B多型(後述)が治療抵抗性の症例では肝脂肪化、 γ -GTP高値例の頻度が有意に高いことが報告されている。以上の知見より、脂質代謝系を調節する種々の薬剤が抗ウイルス療法の効果を増強あるいは減弱しうることが示唆される。

HCV治療効果に関連する宿主遺伝子

芥田らはHCV 1b症例に対するPEG-IFN・リバビリン併用療法症例のウイルス遺伝子解析により、治療無効例においてはコア蛋白領域191アミノ酸のうちR70QおよびL91Mの置換が有意に多発し、IFN/リバビリン治療効果に寄与する独立因子であった¹⁰⁾。コア蛋白70変異はテラプレビル(telaprevir; TVR) + PEG-IFN + RBVの3剤併用療法においても、難治要因であることが報告されている¹¹⁾。IL28B SNP: 田中らはGWASから、IL28B遺伝子多型がIFN治療効果と強く関連することを報告した¹²⁾。すなわち、IL28B(rs8099917:TT/TG/GG)のTG/GG型の患者群は、TT型の患者群に比べ強い有意差をもってPEG-IFN + RBV療法が無効(null response)であった($p = 2.68 \times 10^{-32}$)。

おわりに

B型肝炎に対する核酸アナログ製剤の導入によりB型肝炎の治療は著しく進歩したが、いまだにHBV関連HCCの発症を予防するための決定的な指標はない。しかし、分子生物学的手法を用いることで、B型肝炎の病態やHCC発症に寄与する様々なウイルス側因子が明らかにされてきた。今後、GWASなどの新しい手法を用いて宿主側因子の解明がさらに進むことにより、HCC発症の有用な指標や

オーダーメイド治療を含む新たな治療法の開発が期待される。

C型肝炎ウイルスも同様にここ数年間の研究の進歩は著しく、特記すべきは基礎・臨床両面にわたって日本の研究者の貢献が大きい点である。現在HCV研究は“知る”ための研究から“治す”研究に大きくシフトし、撲滅への道筋が示されつつある。今後も基礎、臨床における新知見、新規治療の導入などを日々見据えていくことが肝要である。

- 文献
- 1) Mbarek H, et al.: A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 20:3884-3892, 2011
 - 2) Lohmann V, et al.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113, 1999
 - 3) Wakita T, et al.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796, 2005
 - 4) Lindenbach BD, et al.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626, 2005
 - 5) Mercer DF, et al.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7:927-933, 2001
 - 6) Moriya K, et al.: The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4:1065-1067, 1998
 - 7) Miyanari Y, et al.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9:1089-1097, 2007
 - 8) Nishimura-Sakurai Y, et al.: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 45:523-536, 2010
 - 9) Yang W, et al.: Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* 48:1396-1403, 2008
 - 10) Akuta N, et al.: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48:372-380, 2005
 - 11) Akuta N, et al.: Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J Med Virol* 82:575-582, 2010
 - 12) Tanaka Y, et al.: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105-1109, 2009

著者連絡先 (〒060-8638) 北海道札幌市北区北15条西7
北海道大学大学院医学研究科消化器内科学分野 坂本直哉

ウイルス肝炎のすべて

Ⅲ 血液感染するウイルス肝炎

2. C型肝炎

(5) C型肝炎の近未来治療

坂本 直哉*

HCVに対する抗ウイルス療法成績はテラプレビルの登場で約70%まで向上した。しかし、副作用は従来のペグインターフェロン・リバビリン2剤併用に増して多く、高齢・合併症などの理由で治療の恩恵を受けられない患者も多い。現在、ウイルスタンパクを直接標的に開発されたDAA (Direct Antiviral Agents) と呼ばれる一連の薬剤の臨床試験が進行しており、おもに、NS3プロテアーゼ阻害薬、NS5Bポリメラーゼ阻害薬、およびNS5A阻害薬の開発が先行している。また、複数の経口DAA薬剤の併用治療の臨床試験も進行している。わが国においては、世界に際立って感染者の高齢化が進行しており、経口薬治療の発展次第では治療対照群が大きく拡大する可能性があり期待される。

Key Words : DAA, STAT-C, 耐性変異

I 抗HCV薬剤の開発状況

HCV (C型肝炎ウイルス) に対する抗ウイルス療法は1992年にインターフェロン α / β 療法が保険認可となって以来、その成績は着実に向上してきた。インターフェロン単独24週療法を施行当時10%前後であった著効率は、2001年のリバビリン(RBV)併用療法の導入、ペグインターフェロン(PEG-IFN)製剤・RBVの48週投与法の確立(2004年)により、それぞれ約20%ずつ向上し、50%前後となった。

さらに、2011年12月に発売された最初のプロテアーゼ阻害薬であるテラプレビル(TPV: テラビック®)により、ウイルス排除率は約70%に達する見込みである。しかし、TPV併用にともなって出現するさまざまな副作用による中止脱落例は従来のPEG-IFN/RBV 2剤併用に増して多く、高齢・合併症などの理由で治療の恩恵を受けられない患者も多い。さらに、PEG-IFNとRBVの2剤併用療法でnull-responseであった症例はTPV併用治療を行っても依然高い著効率は期待できない。以上の状況より、副作用の少ない、よ

Perspectives of future therapies for hepatitis C

*北海道大学医学系研究科消化器内科学講座 Naoya Sakamoto

り有効な薬剤、治療法の登場が待ち望まれている。

ここ数年、欧米を中心に HCV 感染ライフサイクルの基礎知見に基づいてウイルスタンパクを直接標的に開発された STAT-C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C) または DAA (Direct Antiviral Agents) と呼ばれる一連の薬剤の臨床試験が進行している¹⁾。NIH (米国国立衛生研究所) の臨床試験登録 web サイトである *Clinicaltrials.gov* には現在、54 種の DAA および関連薬剤に対する 228 件の臨床試験が登録され進行中である。

表 1 に示すとおり、DAA のうち多種類の候補薬剤が開発され臨床試験が進んでいる主要なクラスは、(NS3) プロテアーゼ阻害薬、(NS5B) ポリメラーゼ阻害薬、および NS5A 阻害薬である。この 1 年間で phase III に進んだ薬剤は、TMC435, BI201335 (プロテアーゼ阻害薬)、BMS-790052 (NS5A 阻害薬)、Alisporivir (DEBIO-025)、PEG-IFN29 (IFN- λ)、Silymarin であり、一部は国内においても並行して治験が進められている。また、NS5A 阻害薬、核酸型ポリメラーゼ阻害薬はここ 1 年間で多数の候補薬剤が開発臨床試験に投入されており、期待のほどがうかがわれる。

一方、治験の最終段階に進んでいながら、効果不十分・副作用等により開発中止に至る薬剤も少なからず存在する。以下におもなクラスの候補薬剤と、臨床試験を中心とした開発状況の概略と最近の状況について述べる。

II 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。NS3 プロテアーゼはそれより C 末端側に存在するウイルス・ゲノムの増殖・ウイルス粒子形成に必要な HCV 非構造タンパクのそれぞれの境界を切断する。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増殖に必要なすべてのタンパクの産生を抑制する。

プロテアーゼ阻害薬を始めとする DAA の宿命として、個々の薬剤に固有の薬剤耐性変異を高率に生じる問題がある²⁾。プロテアーゼ阻害薬はその耐性変異のパターンから 2 群に分けられる。ひとつは、分枝のない直鎖状の構造を取る TPV と、それと類似構造を取る boceprevir と SCH900518 であり、もう 1 群は、分子内に環状構造 (macrocyclic) または分岐構造をもつ一連の薬剤である (表 1)。

TPV のほか現在、欧米・アジア (わが国を除く) では boceprevir (vectralis[®]) が使用されている。Boceprevir は PEG-IFN, RBV 3 者併用 48 週投与で、貧血に対し erythropoietin を投与するプロトコルが設定されている。現在、TPV, boceprevir に続き第二世代の薬剤が国内外で治験中であり、TMC435, MK7009 (vaniprevir), BI201335 の 3 剤は国内外で phase III 試験が進行している。これらは血中薬物動態が向上しており、1 日 1 ~ 2 回の経口投与で効果を発現し、直鎖型の 2 剤で出現する貧血、皮疹などをはじめとした副作用も少ない。

III 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、核酸型と非核酸型に分けられる。核酸型はウイルス RNA 合

HCV (C型肝炎ウイルス) RBV (リバビリン) PEG-IFN (ペグインターフェロン) TPV (テラプレビル)
 STAT-C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C) DAA (Direct Antiviral Agents)
 NIH (米国国立衛生研究所)

III 血液感染するウイルス肝炎

表1 海外でのHCVに対する新薬開発臨床試験の実施状況

薬剤クラス	薬剤名 (製造元)	開発段階	
プロテアーゼ阻害薬	Telaprevir (Vertex)	承認	
	Boceprevir (Merk)	承認	
	TMC435 (Tibotec)	Phase 3	
	Vaniprevir/MK7009 (Merck)	Phase 3	
	BI201335 (Boehringer Ingelheim)	Phase 3	
	BMS-650032 (Bristol-Myers Squibb)	Phase 2	
	GS-9451 (Gilead Sciences)	Phase 2	
	Danoprevir/RO5190591 (Hoffmann-La Roche)	Phase 2	
	ABT-450 (Abbott)	Phase 2	
	BMS-791325 (Bristol-Myers Squibb)	Phase 2	
	MK5172 (Merck)	Phase 2	
	GS-9256 (Gilead Sciences)	Phase 2	
	ACH-0141625 (Achillion)	Phase 2	
	SCH900518 (Merck)	Phase 1	
	VBY376 (Virobay)	Phase 1	
	VX-985 (Vertex)	Phase 1	
ポリメラーゼ阻害薬, 核酸型	IDX184 (Idenix)	Phase 2	
	PSI-7977 (Pharmasset)	Phase 2	
	RO5024048 (Roche)	Phase 2	
	INX-08189 (Idenix)	Phase 2	
	PSI-352938 (Pharmasset)	Phase 2	
	GS-6620 (Gilead Sciences)	Phase 1	
	TMC649128 (Tibotec)	Phase 1	
	ポリメラーゼ阻害薬, 非核酸型	GS-9190/Tegobuvir (Gilead Sciences)	Phase 2
PF-00868554 (Pfizer)		Phase 2	
ABT-072 (Abbott)		Phase 2	
ABT-333 (Abbott)		Phase 2	
ANA598 (Anadys)		Phase 2	
VCH-222/VX-222 (Vertex)		Phase 2	
BI207127 (Boehringer Ingelheim)		Phase 1	
XTL-2125 (Hadassah Medical)		Phase 1	
GS-9669 (Gilead Sciences)		Phase 1	
VCH-759 (Vertex)		Phase 2	
VCH916 (Vertex)		Phase 2	
NS5A 阻害薬		BMS-790052 (Bristol-Myers Squibb)	Phase 3
		GS-5885 (Gilead Sciences)	Phase 2
	ABT-267 (Abbott)	Phase 2	
	GSK2336805 (GlaxoSmithKline)	Phase 2	
	BMS-824393 (Bristol-Myers Squibb)	Phase 2	
	AZD7295 (Arrow Therapeutics)	Phase 1	
	PPI-461 (Presidio)	Phase 1	
	PPI-668 (Presidio)	Phase 1	

(次頁へ続く)

表1 海外でのHCVに対する新薬開発臨床試験の実施状況(続き)

薬剤クラス	薬剤名(製造元)	開発段階
NS4B 阻害薬	Clemizole (Eiger BioPharmaceuticals)	Phase 1
シクロフィリン阻害薬	Alisporivir/Debio025 (Novartis)	Phase 3
	SCY-635 (SYNEXIS)	Phase 2
	NIM811 (Novartis)	Phase 2
インターフェロン製剤	PEG-IL29 (Bristol-Myers Squibb)	Phase 3
	Omega interferon (Intarcia)	Phase 2
	Locteron (Biolex)	Phase 2
その他	Nitazoxanide (Romark)	Phase 3
	Silymarin (NCCAM)	Phase 3
	Celgosivir (BioWest)	Phase 2
	DGAT-1 阻害薬/LCQ908 (Novartis)	Phase 2
	IdB1016 (NCCAM)	Phase 2

各クラスの主要な薬剤とその欧米での開発状況を示す。

HCV: C型肝炎ウイルス

(NIHの臨床試験登録webサイト: *Clinicaltrials.gov* より検索)

成の基質としてNS5Bポリメラーゼに取り込まれ、chain terminationを起こすことによりウイルスゲノム増殖を阻害する。非核酸型はNS5Bの触媒ドメインに結合しポリメラーゼ活性を阻害する。

非核酸型ポリメラーゼ阻害薬はプロテアーゼ阻害薬同様、投与早期に高率に薬剤耐性変異を生じることが報告されており、ゲノタイプ1型以外への効果は著しく劣る⁵⁾。また、薬剤の標的とするNS5Bエピトープに対応して固有の耐性変異を比較的高率に生じる。一方、核酸型ポリメラーゼ阻害薬は耐性変異を生じにくく、複数のHCVゲノタイプに対し活性を有する。

以上の知見から、昨年から今年にかけて臨床試験に進んだポリメラーゼ阻害薬はほとんどが核酸型であり、今後、主流になるとと思われる。ポリメラーゼ阻害薬はPEG-IFN、RBVとの併用療法に加え、他のDAAとの併用IFN療法やIFNを使用しないDAA多剤併用療法薬として開発治験が進められている。

近年、核酸型ポリメラーゼ阻害薬であるPIS-7977のゲノタイプを超えた強力なウイルス排除効果が報告され話題を呼んでいる。

IV NS5A 阻害薬

NS5AタンパクはN末端に膜貫通ドメインをもつER局在タンパクであり、2量体として存在し酵素活性は報告されていない。N末端寄り1/3のドメイン3にはインターフェロン治療効果に影響を及ぼすISDR (interferon sensitivity determining lesion) やPKR (二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ) 結合ドメインなど、インターフェロン応答性を制御するエピトープが存在し、実際、同部位の変異は細胞内ウイルス増殖に大きく影響する。

NS5A阻害薬であるBMS-790052はNS5Aのドメイン1に結合する薬剤として設計されたものであり、種々のゲノタイプのHCVレプリコンに対する作用濃度は9~146 pMであり、プロテアーゼ阻害薬の作用の度に比

ISDR (interferon sensitivity determining lesion)

PKR (二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ)

Ⅲ 血液感染するウイルス肝炎

し10～1,000倍少量で効果を発揮する。HCV感染者に対する単回投与においても急速かつ持続的な血中ウイルス減少効果が報告されている⁷⁾。

Ⅴ DAA 多剤併用臨床試験

HCVに対する治療は現在まで必ずIFNとの併用で行われてきた。TPV, boceprevirにおいても単独投与で高率に生じる薬剤耐性変異を抑え最大治療効果を上げるため、IFNと

RBVの併用が必要である。一方、IFN併用あるいは非併用下で標的の異なる複数のクラスのDAAを併用することで耐性変異ウイルスの出現を抑えつつ、最終的なウイルス排除を狙う併用治療が数種、臨床試験中である(表2)。特に後発のDAAの臨床開発試験の多くは特定の薬剤の多剤併用に特化して進められている。

最初に報告されたプロテアーゼ阻害薬ITMN191とポリメラーゼ阻害薬R7128の

表2 インターフェロン非併用DAA多剤併用臨床試験の実施状況

薬剤	開発段階	対象(症例数)	実施期間	進行状況
1. Danoprevir(PRO) + RO5024048(NI) + / - RBV (Hoffmann-La Roche)	Phase I	CH-C,G1(88)	2008年11月～2010年3月	終了
	Phase II	CH-C,G1(200)	2011年2月～	登録中
2. BMS-650032(PRO) + BMS-790052(NS5A) (Bristol-Myers Squibb)	Phase I	健常者(28)	2009年5～7月	終了
	Phase II(日本)	CH-C,G1(40)	2010年4月～	進行中
3. Telaprevir(PRO) + VCH-222(NNI) (Vertex)	Phase I	健常者(30)	2009年8月～2010年1月	停止中
4. BI201335(PRO) + BI207127(NNI) + / - RBV (Boehringer Ingelheim)	Phase I～II	CH-C,G1(466)	2010年4月～	登録中
5. IDX320(PRO) + IDX184(NI) (Idenix)	Phase I	健常者(20)	2010年6月～8月	中止
6. PSI-7977(NI) + BMS-790052(NS5A) + / - RBV (Bristol-Myers Squibb/Pharmasset)	Phase II	CH-C(84)	2011年2月～	登録中
7. PSI-352938(NI) + PSI-7977(NI) + RBV (Pharmasset/Quintiles)	Phase II	CH-C(450)	2011年9月	登録中
8. GS-9451(PRO) + GS-9190(NNI) + GS-5885(NS5A) + RBV (Gilead Sciences)	Phase II	CH-C,G1(120)	2011年5月～	登録中
	Phase II	CH-C,G1(150)	2011年9月～	登録中
	Phase II	CH-C,G1(150)	2011年9月～	登録中

これまで実施されたDAA併用、インターフェロン非併用治療プロトコル臨床試験の実施状況を示す。

DAA: Direct Antiviral Agents, CHC: 慢性C型肝炎, G1: ゲノタイプ1型, PRO: プロテアーゼ阻害薬, NI: 核酸型ポリメラーゼ阻害薬, NNI: 非核酸型ポリメラーゼ阻害薬, NS5A: NS5A阻害薬, RBV: リバビリン, PEG: PEGインターフェロン

(NIHの臨床試験登録webサイト: *Clinicaltrials.gov* より検索)

SVR (ウイルス学的著効) SOC (standard of care)

併用投与を2週間行った試験では、最大5.2 logの血中ウイルス低下がみられ、2週目には63%の症例に血中ウイルス陰性化が認められ、投与期間中に耐性変異は検出されなかった⁹⁾。

DAAの多くは難治であるgenotype 1型HCVを標的に開発されているが、薬剤設計・構造展開の過程で、1999年に報告されたCon1と呼ばれるHCV genotype 1bレプリコン・システムを使用している⁹⁾。そのため、作用機構によらず多くの薬剤がgenotype 1a型に比べ1b型に高い効果をもち、*in vitro*、*in vivo*療法における薬剤耐性変異の出現率、種類も1b型で、1a型より明らかに少ない¹⁰⁾。このため、海外で現在まで行われたgenotype 1aを主体または1a/2bを混在しているDAA併用投与試験ではいずれも、IFNを併用しないと耐性ウイルスの出現によるブレイクスルーをきたしている¹¹⁾。

これらの結果より、欧米ではDAA 2剤にIFN、RBVを併用する4剤併用療法、QUAD therapyまたは5剤併用の試験が進められている。一方、genotype 1型症例のほとんどが1b型であるわが国で行われたプロテアーゼ阻害薬とNS5A阻害薬併用投与試験では、ほぼ全例でSVR(ウイルス学的著効)を達成した¹²⁾。一方、海外においても上述のごとく、強力な核酸型ポリメラーゼ阻害薬(PSI-7977)のゲノタイプを超えた効果が報告されており、今後は国内外ともに数種類の経口薬中心の治療に収束していくものとみられる。

VI おわりに

現在前述のごとく、多くのDAA臨床試験が行われており、従来の治療に比べ着実に優れた効果が報告されている。今後、新規薬剤の開発臨床試験においては、新たに標準治療(standard of care: SOC)となったTPV、PEG-IFN、RBV3剤併用療法に対する有効性あるいは安全性に関する優位性が要求される。

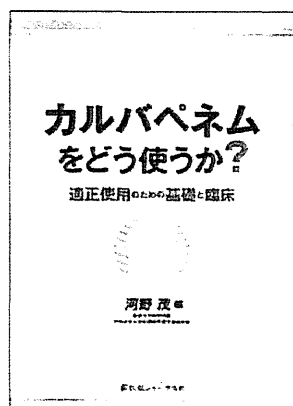
一方、わが国においては世界に際立って感染者の高齢化が進行しており、より身体的負担の少なく、有効な新規クラス治療薬剤の登場が待ち望まれる。したがって、IFN非併用DAA多剤併用療法の開発試験の進行具合によっては治療対照群が大きく拡大する可能性を秘めている。臨床試験の動向を視野に入れながら、新規治療薬剤の展開を期待したい。

文 献

- 1) Sakamoto N, Watanabe M: New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* **44**: 643-649, 2009.
- 2) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* **41**: 1105-1109, 2009.
- 3) Pagliaccetti NE, Eduardo R, Kleinstein SH, et al: Interleukin-29 functions cooperatively with interferon to induce antiviral gene expression and inhibit hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* **283**:30079-30089, 2008.
- 4) Sarrazin C, Zeuzem S: Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **138**:447-462, 2009.
- 5) McCown MF, Rajyaguru S, Le Pogam S, et al: The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase or protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1604-1612, 2008.
- 6) Sarrazin C, Kieffer TL, 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) Gao M, Nettles RE, Belema M, et al: Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**: 96-100, 2010.
- 8) Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, et al:

III 血液感染するウイルス肝炎

- Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1) : a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* **376** : 1467-1475, 2010.
- 9) Lohmann V, Köerner F, Koch J, et al: Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* **285** : 110-113, 1999.
- 10) Fridell RA, Qiu D, Wang C, et al : Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* **54** : 3641-3650, 2010.
- 11) Foster GR, Buggisch P, Marcellin P, et al : Four-wkk treatment with GS-9256 and Tego buvir (GS-9190), ± RBV ± PEG, results in enhanced viral suppression on follow-up PEG/RBV therapy, in genotype 1a/1b HCV patients. *J Hepatol* **54** : S172, 2011.
- 12) Chayama K, Takahashi S, Toyota J, et al : Dual therapy with the NS5A inhibitor BMS-790052 and the NS3 protease inhibitor BMS-650032 in HCV genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2011 (in press).



カルバペネムをどう使うか?


~適正使用のための基礎と臨床~

長崎大学病院院長/長崎大学大学院感染免疫学講座教授 河野 茂 編

A5判 192頁 定価 3,360円 (本体 3,200円+税5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2458-6 C3047

おもな内容

- | | |
|---|--|
| <p>I. 基礎編</p> <p>1. 化学構造上の特徴と分類</p> <p>2. 抗菌活性と耐性化</p> <p>3. 安全性と薬物相互作用</p> <p>II. 臨床編</p> <p>1. 呼吸器科領域</p> <p>2. 血液内科領域
-発熱性好中球減少症 (Febrile Neutropenia) を中心に-</p> <p>3. 外科領域</p> <p>4. 泌尿器科領域</p> | <p>5. 救急救命領域</p> <p>6. 小児科領域</p> <p>III. 使用法の工夫</p> <p>1. ニューキノロン系抗菌薬との使い分け</p> <p>2. マクロライド系抗菌薬併用の意義</p> <p>3. De-escalation</p> <p>4. PK-PD理論に基づくカルバペネム系抗菌薬の適正使用</p> <p>5. ミキシング・サイクリング</p> |
|---|--|


株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 00910-1-33353
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索、ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

C型肝炎治療薬 テラプレビル

Key Points

坂本 直哉

東京医科大学 消化器内科/分子肝炎制御学講座 准教授

- ⊕ HCVプロテアーゼ阻害薬テラプレビルは、PEGインターフェロン、リバビリンと併用24週投与を行うことでゲノタイプ1型C型肝炎未治療例のウイルス学的効果を有意に改善する。
- ⊕ 前治療非著効例に対するテラプレビル併用再治療においては、前治療再燃例では83～88%と高い著効率を示すが、前治療無効例では29～33%と低率である。
- ⊕ テラプレビル併用期間の8週間への短縮により副作用は軽減せず、最大効果達成には12週併用が必要である。

HCVに対する抗ウイルス療法の進歩と現行標準治療の限界

C型肝炎は国内に約130～150万人の患者が存在し、その多くに肝硬変、肝がんが高率に発症する“21世紀の国民病”である。C型肝炎に対する抗ウイルス療法は、1992年にインターフェロン(IFN) α/β 療法が保険適用となって以来、リバビリン併用療法の導入(2001年)、PEG化インターフェロン(PEG-IFN)製剤による長期投与法の確立(2004年)と着実に進歩し、PEG-IFN + リバビリン併用48～72週療法により、ウイルス排除率は約50%にまで向上した。一方、わが国では症例の多くが治療抵抗性であるHCVゲノタイプ1型であり、年齢や合併症のための治療非適応症例が依然存在する。さらに、近年明らかになったIL28B遺伝子多型の解析から、IFN

を基軸とした治療ではウイルス消失が期待できない患者が一定数存在することが明らかとなっている^{1,2)}。以上の状況より、新しい作用機構に基づく治療薬の開発が急務であり、その登場が長く待たれていた。

プロテアーゼ阻害薬

現在、欧米を中心に、HCV感染ライフサイクルの基礎知見に基づいて、ウイルスタンパクを直接標的にするよう開発されたSTAT-C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C) またはDAA (Direct Antiviral Agents) と呼ばれる一連の薬剤について臨床試験が進行している^{3,4)}。

NS3プロテアーゼ阻害薬は、ウイルス遺伝子のNS3領域にコードされた、それぞれのウイルスタンパクを切り出すセリンプロテアー

ゼの立体構造をもとに設計・開発された。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タンパク質の産生を抑制することができる⁵⁾。2011年5月に海外で2種の薬剤、テラプレビルと boceprevir (Victrelis[®]) が承認され使用されている。わが国でもテラプレビルが昨年の9月に承認され、臨床の現場に導入されている。また、“第2世代”といわれるプロテアーゼ阻害薬も治験中であり、TMC435, MK7009 (vaniprevir), BI201335の3剤が国内外で第Ⅲ相試験が進行している。これらは血中薬物動態が向上しており、1日1~2回の経口投与で効果を発現し、直鎖型の2剤で出現する貧血、皮疹などをはじめとした副作用も少ないとされている。

第Ⅱ相臨床試験(PROVE1, PROVE2, PROVE3 Studies)

テラプレビルのPhaseⅡ相開発治験として、米国、欧州で独立してHCVゲノタイプ1型症例の初回治療例を対象としたテラプレビル、PEG-IFN α 2a, およびリバビリン3者併用療法の無作為臨床試験(PROVE1, PROVE2)が行われている^{6,7)}。これらの試験によると、現行のPEG-IFN、リバビリン併用48週療法の著効率41% (PROVE1), 46% (PROVE2) に比して、テラプレビル/PEG-IFN/リバビリン3者併用12週投与にPEG-IFN/リバビリン併用12週投与を続けて合計24週治療を行うことにより、61% (PROVE1) および69% (PROVE2) の著効率を達成した。これらの結果より、テラプレビル併用療法はPEG-IFN/リバビリン48週療法の半分の治療期間で約20%著効率が向上すること、また、最大効果の発現にはリバビリンの併用が必要であることが明らかとなった。

PEG-IFN、リバビリン併用48週療法非著効例に対しても、テラプレビル含3者併用療法の無作為試験(PROVE3)が行われた⁸⁾。前治療再発例ではPEG-IFN/リバビリン48週再治療の有効率20%に対し、テラプレビル/PEG-IFN/リバビリン3者併用24週投与では69%であり、初回治療とほとんど変わらない成績を示した。一方、前治療無効例では3者併用24週治療で39%であった。

C型肝炎無治療例に対するテラプレビル併用試験(ADVANCE Study)

先行して行われたPROVE Studiesの結果をもとに欧米で3つの第Ⅲ相試験が施行され、その結果が報告された。ADVANCE Study⁹⁾では、テラプレビルの副作用を軽減するため、テラプレビル併用期間の短縮が可能かどうか検証された。また、治療中の血中ウイルス(HCV-RNA)消失時期により治療期間を設定するResponse-guideプロトコルが設定された。ゲノタイプ1型C型肝炎未治療1,088例を、PEG-IFN/リバビリン/テラプレビル併用投与12週群(T12PR)、PEG-IFN/リバビリン/テラプレビル併用投与8週群(T8PR)、PEG-IFN/リバビリン48週対照群(PR48)の3群に無作為割り付けを行った(表1, 図1^④)。その結果、ウイルス排除率は、T12PR, T8PR群のほうがPR48群より有意に高かった(75%, 69%, 44%, 図1^⑤)。貧血、消化器系の副作用、皮疹などの有害事象による治療中断率は、T12PR, T8PR群ではそれぞれ10%と同程度であり、PR48群7%に対し有意に高率であった。

以上の結果より、テラプレビル併用期間の短縮により副作用は軽減せず、最大効果発現には12週間の併用が必要であることが示された。

前治療非著効例に対する テラプレビル併用再治療試験 (REALIZE Study)

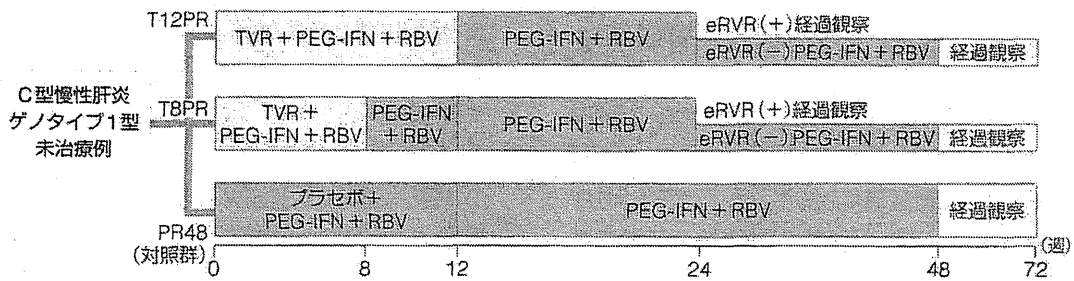
PEG-IFN/リバビリン48週治療で著効に至らなかったHCVゲノタイプ1型663例を3群

に無作為割り付けを行った。テラプレビル/PEG-IFN/リバビリン3剤併用12週投与後にPEG-IFN/リバビリン2剤を継続して計48週治療を行う群(T12PR48)、T12PR48群においてPEG+リバビリン2剤併用4週間分を“lead-in”としてテラプレビル/PEG-IFN/リ

表1 C型肝炎に対するインターフェロン治療における効果判定基準

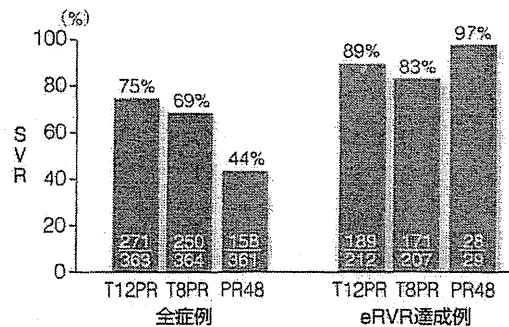
著効(SVR)	治療終了24週後に血中HCV-RNAが陰性
再燃(Relapse)	治療終了時に血中HCV-RNAが陰性となるが、治療終了24週後に血中HCV-RNAが陽性
無効(No response)	治療中に一度も血中HCV-RNAが陰性にならない
RVR (Rapid Viral Response)	治療開始4週目で血中HCV-RNA陰性
EVR (Early Viral Response)	治療開始12週目で血中HCV-RNA陰性
eRVR (extended Rapid Viral Response)	治療開始4週目と12週目で血中HCV-RNA陰性

図 ADVANCE Study : 治療プロトコル



TVR : テラプレビル 2,250mg/日
PEG-IFN : PEG-インターフェロンα 2a 180μg/週
RBV : リバビリン1,000~1,200mg/日

図 ADVANCE Study : 治療効果



SVR : 持続性ウイルス陰性化
eRVR : 治療開始4週かつ12週時点におけるHCV-RNA陰性化

図 ADVANCE Study

(文献9)より引用)