

201423027A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 降幡 知巳

平成27（2015）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 降幡 知己

平成27（2015）年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定 降幡 知巳	3
--	---

## II. 分担研究報告

### 1. 薬物間相互作用回避に向けた直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランス ポーター阻害機序の解析

千葉 寛	11
------	----

### 2. 網羅的遺伝子発現解析による日本人C型肝炎患者の治療奏効にかかわる新たな宿主分 子の同定

坪田 昭人	18
-------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	28
-----------------	----

## I. 総括研究報告

### 厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）） 総括研究報告書

#### 肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏効因子の同定

研究代表者 降幡 知巳

#### 研究要旨

本研究事業では、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体（トランスポーター）の機能に着目することにより、難治性肝炎の奏効率を規定する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じ、平成26年度は、B型肝炎治療薬エンテカビルおよびテノフォビルの肝細胞取り込み輸送体の同定、直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランスポーターに対する新たな阻害機序の解析、C型肝炎患者由来試料を用いた新たな治療奏効規定因子の探索をおこなった。これらはそれぞれ、B型肝炎核酸アナログ治療にける応答性の個人差の要因解明やC型肝炎治療における薬物間相互作用のリスク回避、C型肝炎治療の応答性の個人差の要因解明につながると期待される。本報告書では、各項目の担当研究者より主に得られた成果について報告する。

#### 研究分担者

千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室  
教授 千葉 寛

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター  
基盤研究施設 分子細胞生物学  
教授 坪田 昭人

#### A. 研究目的

本研究事業では、B型およびC型肝炎治療薬の取り込みトランスポーターの機能に着目することにより、肝炎治療に貢献する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じて平成26年度は（1）B型肝炎治療薬エンテカビルおよびテノフォビルの肝細胞内取り込みトランスポーターの同定、（2）直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランスポーターに対する新たな阻害機序の解析、（3）C型肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と新たな治療奏効率規定因子の探索をおこなった。上記のうち降幡が担当した（1）に該当する項目について、得られた主な研究成果についてここに報告する。

慢性B型肝炎に用いられる核酸誘導体は、HBVの複製を直接阻害することにより血中HBV DNA量の大きな低下をもたらすことが知られている。特に、エンテカビル（entecavir、ETV）およびテノ

フォビル（tenofovir、TFV）は、従来の核酸誘導体と比較して高い血中HBV DNA陰性化効果に加え、低い耐性変異出現率を示すことから、現在、本邦においてB型肝炎治療の第一選択薬として用いられている。しかし、これら薬剤の薬効発現には、依然として大きな個人差が存在することが知られている。したがって、このような薬効発現の個人差の原因を明らかとするためには、まず、薬剤の薬効発現に関わる機序を一つ一つ明らかとする必要がある。

ETVおよびTFVは、肝細胞内に取り込まれた後に抗ウイルス活性を示すと考えられている。したがって、ウイルス複製の場である肝細胞内への移行は、これら薬剤が薬効を発揮する上で必須の過程であると言える。ETVおよびTFVは水溶性が高く、細胞膜を透過するためには膜上に発現するトランスポーターの介助が必要であると考えられる。これまで、ETVおよびTFVは腎臓に発現するorganic anion transporter 1（OAT1）およびOAT3の基質となることが報告されているが、これらOATsは肝臓に発現していない。したがって、肝臓においてもETVおよびTFVはトランスポーターを介して肝細胞内へ取り込まれる可能性は考えられるものの、これらを基質とする肝取り込みトランスポーターは同定されていない。

一方で、核酸誘導体の中には、その薬効発現に関与する機序として、種々の遺伝子の発現を変動させる作用を有する薬剤があることが知られている。これまでにTFVにおいてもマウスマクロファ

ージやヒト末梢血単核細胞において、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 複製を阻害するサイトカインやケモカインの分泌を増加させることが報告されている。したがってヒト肝細胞においても、ETV や TFV が何らかの遺伝子の発現を変動させることで間接的に抗 HBV 活性を示す可能性が考えられるが、これら薬剤のヒト肝細胞遺伝子の発現に対する影響は不明である。

そこで本研究では、B 型肝炎治療薬の薬効発現に関わる機序を明らかとするため、B 型肝炎治療薬の肝取り込みトランスポーターを同定すること、および TFV により発現が変動するヒト肝細胞遺伝子を同定することを目的とした。

## B. 研究方法

### 試薬

[<sup>3</sup>H]TFV および非標識 TFV は、Moravec Biochemicals (Brea, CA, USA) および Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada) より購入した。[<sup>3</sup>H]ETV および非標識 ETV は、American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA) および Toronto Research Chemicals より購入した。Organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 の基質である [<sup>3</sup>H]estradiol-17 β-D-glucuronide (E<sub>2</sub>G) および非標識 E<sub>2</sub>G は、American Radiolabeled Chemicals および Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。OATP1B3 の基質である [<sup>3</sup>H]cholecystokinin-octapeptide sulfated (CCK-8) および非標識 CCK-8 は、PerkinElmer Life Science (Boston, MA, USA) およびペプチド研究所 (大阪) より購入した。OATP2B1 の基質である [<sup>3</sup>H]estrone-3-sulfate (E3S) および非標識 E3S は、PerkinElmer Life Science および Sigma-Aldrich より購入した。OAT2 の基質である [<sup>3</sup>H]guanosine 3', 5' -cyclic monophosphate (cGMP) および非標識 cGMP は、Moravec Biochemicals および Sigma-Aldrich より購入した。Equilibrative nucleoside transporter (ENT) の基質である [<sup>3</sup>H]adenosine (Ado) および非標識 Ado は、Moravec Biochemicals および Sigma-Aldrich より購入した。

OATP1B1 阻害剤である rifampicin (RIF) は和光純薬工業より購入した。OATP および OAT2 阻害剤である bromosulphophthalein (BSP) は Sigma-Aldrich より購入した。OAT2 阻害剤である indomethacin (IDM) は Sigma-Aldrich より購入した。ENT 阻害剤である (4-nitrobenzyl) mercaptopurine riboside (NBMPR) は和光純薬工業より購入した。

### 細胞および細胞培養

白人種5検体混合凍結肝細胞 (lot number XOK) は Bioreclamation IVT (Baltimore, MD, USA) より購入した。また、単一ドナー白人種凍結肝細胞 (lot number BHL) は Celsis IVT (Baltimore, MD, USA) より購入した。

ヒト胎児腎臓由来 human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞は HUMAN SCIENCE (東京) より入手し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞センター (仙台) より入手した。これらの細胞は、10% 非動化 fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) および 50 units/mL penicillin-50 mg/mL streptomycin (Pen/St, 和光純薬工業) を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (和光純薬工業) を用いて、5% CO<sub>2</sub> / 95% air を気相とした 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

### ヒト遊離肝細胞における ETV および TFV 取り込み活性解析

#### ヒト遊離肝細胞の調製

白人種5検体混合凍結肝細胞の融解はプロトコール通りにおこなった。その後、37°C に加温した In Vitro GRO HT Medium (Bioreclamation IVT) に肝細胞を懸濁し、遠沈管に移して、50 × g、室温で5分間遠心分離した。上清を取り除き、沈殿した細胞を In Vitro GRO KHB buffer (Bioreclamation IVT) で再懸濁した。Trypan blue 染色で生存率が80%以上あること確認し、これをヒト遊離肝細胞とした。

#### ヒト遊離肝細胞を用いた suspension transport assay

ヒト遊離肝細胞を In Vitro GRO KHB buffer を用いて 2 × 10<sup>6</sup> cells/mL の濃度に調製し、氷上に静置した。この細胞溶液を 37°C で3分間プレインキュベーションした後、細胞溶液 150 μL に ETV もしくは TFV を含む In Vitro GRO KHB buffer 150 μL を加え assay を開始した。ETV および TFV の最終基質濃度および最終放射線濃度はともに 1 μM および 0.4 μCi/mL とし、取り込み時間は 1.5 分とした。阻害実験では上記の In Vitro GRO KHB buffer に BSP (200 μM)、NBMPR (100 μM) または溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) を加え、培地中の最終 DMSO 濃度は 0.2% とした。インキュベーション後、下層に 2N NaOH 50 μL、上層に mixture oil (mineral oil: silicone oil = 1:5.4 (w/w), 共に Sigma-Aldrich) を充填した 0.4 mL チューブ (アシスト、東京) に

反応液100  $\mu$ Lを分取し、10,000  $\times$  gで30秒間室温にて遠心し反応を停止した。チューブを室温にて一晩静置し、細胞を可溶化した。その後mixture oil層を切断し、NaOH層をscintillation vialに移し、Clear-sol II (ナカライテスク、京都) 2 mLを加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-6100, Aloka Co., Ltd. 東京) にて放射活性を測定した。また、タンパク質濃度は細胞溶解液10  $\mu$ Lを用いて、Pierce<sup>®</sup> BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit (タカラバイオ、滋賀) を用いて測定した。<sup>[3H]</sup>ETVおよび<sup>[3H]</sup>TFVの細胞内取り込み速度は式[1]を用いて算出した。

式[1]

[取り込み活性 (pmol/mg protein/min)]  
=[放射能 (dpm)]/[基質溶液放射能 (dpm/nmol)]/[採取量 (mL)] $\times$ [全量 (mL)]  
 $\times$ [1000 (pmol/nmol)]/[タンパク濃度 (mg protein/mL)] $\times$ [全量 (mL)]/[取り込み時間 (min)]

#### OATP安定発現HEK293細胞

OATP1B1、OATP1B3およびOATP2B1安定発現HEK293細胞 (OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293およびOATP2B1/HEK293) および空ベクター導入HEK293細胞 (Mock-Zeo/HEK293およびMock-Neo/HEK293) はこれまでに樹立したものをを用いた。OATP1B1/HEK293およびMock-Zeo/HEK293の培養では、Zeocin (Invivogen, Carlsbad, CA, USA) を300  $\mu$ g/mLの濃度で培地に添加し、また、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293、およびMock-Neo/HEK293の培養ではG418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) を400  $\mu$ g/mLの濃度で培地に添加した。これらの細胞は5% CO<sub>2</sub> / 95% airを気相とした37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

#### OAT2 cDNAクローニングおよびOAT2発現プラスミドベクターの作製

ヒトOAT2、transcript variant 1 (OAT2-546aa) (GenBank accession No. NM\_006672) のcDNAクローニングは、ヒト肝cDNAをテンプレートとし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ) を用いたpolymerase chain reaction (PCR) によりおこなった。得られたPCR産物はZero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen) へ挿入し、これをOAT2/TOPOとした。作製したプラスミドDNAの塩基配列の解析は、オペロンバイオテクノロジー (東京) に委託した。

続いて、作製したOAT2/TOPOをテンプレートとして、BamHIおよびXhoI処理をおこないOAT2/cDNAを切り出した。得られたDNA断片を、同様に制限酵素処理したpcDNA3.1/Neo(-) vector (Invitrogen) とライゲーションさせ、OAT2/pcDNA3.1を作製した。作製したプラスミドDNAの塩基配列の解析は、オペロンバイオテクノロジー (東京) に委託した。

#### OAT2安定発現HEK293細胞の樹立

OAT2安定発現HEK293細胞 (OAT2/HEK293) は、OAT2/pcDNA3.1をreverse-transfection法によりHEK293細胞に導入し、G418 disulfate saltで薬剤選択をおこなうことにより樹立した。また、細胞単一化はコロニーフォーメーション法によりおこなった。樹立したOAT2/HEK293は、G418 disulfate saltを400  $\mu$ g/mLの濃度で添加した培地を用い、5% CO<sub>2</sub> / 95% airを気相とした37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

#### OAT1 cDNA クローニングおよびOAT1発現プラスミドベクターの作製

ヒトOAT1、transcript variant 2 (GenBank accession No. NM\_153276.2) のcDNAクローニングは、ヒト腎cDNAをテンプレートとし、PrimeSTAR HS DNA polymeraseを用いたPCRによりおこなった。得られたPCR産物をテンプレートとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase を用いてPCRをおこなうことにより、OAT1/cDNAに制限酵素配列を付加した。これをXbaIおよびBamHIで処理し、同様に制限酵素処理したpcDNA3.1/Neo(-) vectorとライゲーションさせることにより、OAT1/pcDNA3.1を作製した。作製したプラスミドは上記に述べた方法で塩基配列の解析をおこなった。

#### Total RNA 抽出およびcDNA合成

各細胞からのtotal RNA抽出はISOGEN with spin column (Nippon Gene, 東京) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。Total RNA中のゲノムDNAの混入の有無は、human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子のプロモーター領域を検出するプライマーを用いたPCR反応により確認した。ゲノムDNAの混入が認められた場合にはDNaseI処理により除去した。cDNA合成はtotal RNA (1.0  $\mu$ g) をテンプレートとし、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。

## Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

上記で調製したcDNAをテンプレートとし、PCR反応によりOATP1B1/HEK293におけるOATP1B1 mRNA、OATP1B3/HEK293におけるOATP1B3 mRNA、OATP2B1/HEK293におけるOATP2B1 mRNA、OAT2/HEK293におけるOAT2 mRNAを解析した。また、Mock-Zeo/HEK293およびMock-Neo/HEK293における上記トランスポーター mRNA発現、そして上記各細胞におけるGAPDH mRNAの発現を同様に解析した。

トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞を用いた標準基質取り込み活性解析

各トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞における基質取り込み活性は以下の方法により解析した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293、OAT2/HEK293、Mock-Zeo/HEK293またはMock-Neo/HEK293をそれぞれ $4.0 \times 10^5$  cells/mLで、HepG2細胞を $3.0 \times 10^5$  cells/mLで、collagen type-I (Sigma-Aldrich) でコートした24-well plateに播種した。その24時間後にsodium butyrate (Sigma-Aldrich) を最終濃度10 mMで曝露し、さらにその24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayにおけるOATP1B1の基質溶液は、Na<sup>+</sup>-plus Krebs-Hesselei buffer (Na<sup>+</sup>-KHB) (pH 7.4) に [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>Gおよび非標識E<sub>2</sub>Gを溶解し、最終基質濃度0.1 μM、最終放射線濃度0.1 μCi/mLとすることにより調製した。OATP1B3の基質溶液はNa<sup>+</sup>-plus KHB (pH 7.4) に [<sup>3</sup>H]CCK-8および非標識CCK-8を溶解し、最終基質濃度0.01 μM、最終放射線濃度0.25 μCi/mLとすることにより調製した。OATP2B1の基質溶液はNa<sup>+</sup>-plus KHB (pH 6.5) に [<sup>3</sup>H]E3Sおよび非標識E3Sを溶解し、最終基質濃度50 μMおよび最終放射線濃度0.25 μCi/mLとすることにより調製した。OAT2の基質溶液はNa<sup>+</sup>-plus KHB (pH 7.4) に [<sup>3</sup>H]cGMPおよび非標識cGMPを溶解し、最終基質濃度2 μMおよび最終放射線濃度0.1 μCi/mLとすることにより調製した。ENTの基質溶液はNa<sup>+</sup>-plus KHB (pH 7.4) に [<sup>3</sup>H]Adoおよび非標識Adoを溶解し、最終基質濃度10 μMおよび最終放射線濃度0.2 μCi/mLとすることにより調製した。

阻害実験では、OATP1B1に対する典型的阻害剤としてRIFを最終阻害剤濃度10 μMの濃度で、OATP1B3およびOATP2B1に対する典型的阻害剤としてBSPを最終阻害剤濃度100 μMの濃度で、OAT2に対する典型的阻害剤としてIDMを最終阻害剤濃度100 μMの濃度で、ENTに対する典型的阻害剤としてNBMPRを最終濃度100 μMの濃度で、そしてコントロールとし

て溶媒であるDMSOを最終濃度0.1%の濃度でそれぞれ基質溶液に加えた。

Transport assayでは、細胞を37°CのNa<sup>+</sup>-plus KHBで1回リンスした後、上記の基質溶液200 μLを加えて37°Cで取り込み反応を開始した。E<sub>2</sub>G、CCK-8、E<sub>3</sub>S、cGMPおよびAdoの取り込み時間は、それぞれ予備検討において基質取り込み活性に線形性が認められた3、5、3、1.5および1分とした。その後、細胞を氷冷したNa<sup>+</sup>-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 加え細胞溶解液とした。細胞溶液中の放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-6100) にて測定した。また、タンパク質濃度は細胞溶解液10 μLを用いて、Pierce® BCA™ Protein Assay Kitを用いて測定した。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は式[1]を用いて算出した。

トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞を用いたTFVおよびETV取り込み活性解析

トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞におけるTFVおよびETVの取り込み活性は以下の方法により解析した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293、OAT2/HEK293、Mock-Zeo/HEK293またはMock-Neo/HEK293をそれぞれ $4.0 \times 10^5$  cells/mLで、またHepG2細胞を $3.0 \times 10^5$  cells/mLでcollagen type-Iでコートした24-well plateに播種した。その後、上記10で述べた方法でtransport assayをおこなった。

Transport assayでは、播種した細胞を37°CのNa<sup>+</sup>-plus KHBで洗浄した後、TFVもしくはETVを含んだNa<sup>+</sup>-plus KHB 200 μL加えることにより反応を開始した。阻害実験では、TFVおよびETVの最終基質濃度および最終放射線濃度はともに1 μMおよび0.25 μCi/mLとし、取り込み時間は1.5分とした。阻害剤として基質溶液にRIF (10 μM)、BSP (100または200 μM)、IDM (100 μM)、NBMPR (100 μM) およびコントロールとして溶媒であるDMSO (0.1%) を加えた。インキュベーション後、細胞を氷冷したNa<sup>+</sup>-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% SDSを加え細胞溶解液とした。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は上記で述べた方法で算出した。

OAT1一過性発現HEK293細胞を用いたTFV取り込み活性解析

Lipofectamine™LTX (Invitrogen) 1.2 μL/well、OPTI-MEM® (Invitrogen) 125 μL/well およびOAT1/pcDNA3.1もしくは空のpcDNA3.1 500 ng/well を混合して30分間インキュベーションした。その

後、トランスフェクション溶液とHEK293細胞 ( $4.0 \times 10^5$  cells/mL) をよく混合して、collagen type-I でコートした24-well plateに播種した。この24時間後にsodium butyrateを最終濃度10 mMで曝露し、さらにその24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayでは、播種した細胞を37°CのNa<sup>+</sup>-plus KHBで洗浄した後、TFVを含んだNa<sup>+</sup>-plus KHB 200  $\mu$ L加えることにより反応を開始した。最終基質濃度および最終放射線濃度はともに1  $\mu$ M および0.25  $\mu$ Ci/mLとし、取り込み時間を1.5分とした。その後、細胞を氷冷したNa<sup>+</sup>-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% SDSを加え細胞溶解液とした。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は上記に述べた方法で算出した。

#### TFV曝露によるヒト肝細胞mRNA発現変動解析

##### ヒト肝細胞の調製および播種

単一ドナー由来の白人種凍結肝細胞の融解はプロトコール通りにおこなった。その後、37°Cに加温し2% FBSを加えたHepatocyte Culture Medium (HCM, Lonza, Walkersville, MD, USA) に懸濁した肝細胞を遠沈管に移し、50  $\times$  g、室温で3分間遠心分離した。上清を取り除き、沈殿した細胞を2% FBSを加えたHCMで懸濁した。Trypan blue染色で生存率が80%以上あること確認し、これをヒト肝細胞とした。作製したヒト肝細胞をcollagen type-Iでコートした12-well plateに $3.0 \times 10^5$  cells/mLの細胞濃度で播種した。播種から3時間後、培地を除去し、HCMを用いて培地交換をおこなった。

##### 薬剤曝露時のtotal RNA回収およびcDNAの作製

細胞播種から24時間後に培地を除去し、TFV (10  $\mu$ M) または溶媒であるDMSO (0.1%) を含むHCMを添加した。各薬剤曝露後、24時間後に上記で述べた方法でtotal RNAを回収し、回収したtotal RNA (10~100 ng) をテンプレートとしてcDNA合成をおこなった。

##### 定量的real-time PCR

ヒト肝細胞における各遺伝子の発現量は、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS, Boston, MA, USA) およびEco<sup>TM</sup> Illumina real-time PCR system (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いたreal-time PCR法により解析した。ここではCC chemokine ligand (CCL) 3、CCL5、interleukin-8 (IL-8)、interferon stimulated gene 15 (ISG15)、

myxovirus resistance protein 1 (MxA) および toll-like receptor 3 (TLR3) を解析対象とし、プライマーは各遺伝子特異的に設計した。PCR条件は95°C 20秒の後、95°C 3秒、60°C 20秒、72°C1秒を40サイクル繰り返した。 $\Delta \Delta$ Ct法を用いた相対定量法では、各遺伝子と同様の条件で、特異的に設計したプライマーを用いて定量したGAPDHおよび $\beta$ -actin (ACTB) mRNA発現量を用いて解析した。

##### 統計解析

二群間における平均値の差の検定はStudent' s t-testによりおこなった。統計計算にはExcel統計ソフトStatcel第3版 (東京) を使用した。

##### 倫理面への配慮

本研究におけるヒト肝由来試料の使用については事前に千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果

##### ヒト肝細胞におけるETVおよびTFV取り込みの解析

白人種5検体混合凍結肝細胞を用いて、ETVの肝細胞内取り込みを解析した。その結果、ETV (1  $\mu$ M) の取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は37°Cにおいて $6.3 \pm 0.7$ と、4°Cにおける値 ( $2.8 \pm 0.5$ ) と比較して有意に高く、トランスポーターを介すると考えられるETVの肝細胞内取り込みが認められた。また、100  $\mu$ M NBMPRおよび200  $\mu$ M BSP存在下でETV取り込み活性を解析した結果、ETV肝細胞内取り込み活性は37°Cの値と比較して、NBMPR添加により有意に低下し ( $4.0 \pm 1.1$ )、またBSP添加により4°Cと同等の値 ( $2.7 \pm 0.7$ ) まで有意に低下した。

一方、同様にTFVの肝細胞内取り込みを解析した結果、TFV (1  $\mu$ M) の取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は37°Cにおいて $3.5 \pm 0.4$ であり4°Cにおける値 ( $2.3 \pm 0.3$ ) より有意であるが、わずかに高い程度であった。また、100  $\mu$ M NBMPRおよび200  $\mu$ M BSP存在下でTFV取り込み活性を解析した結果、TFV肝細胞内取り込み活性はそれぞれ4°Cに近い値 ( $2.7 \pm 0.2$ および $2.7 \pm 0.4$ ) にまで低下した。

肝細胞内取り込みトランスポーター安定発現HEK293細胞における各トランスポーターの発現および機能解析



ヒト肝細胞を用いた検討において、BSPの存在下ETVの肝細胞内取り込みが消失したことから、BSP感受性の肝取り込みトランスポーターがETVの肝取り込みに関わっていると考えられる。BSP感受性の代表的な肝取り込みトランスポーターとしてこれまでにOATP1B1、OATP1B3、OATP2B1およびOAT2が同定されている。そこでこれらトランスポーターに着目した。

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293およびOATP2B1/HEK293、および本研究で樹立したOAT2/HEK293を用い、まずこれらにおける各トランスポーターの発現を確認した。それぞれの細胞より調製したcDNAを用いて、各トランスポーターおよびGAPDH mRNA発現をRT-PCR法により解析した。その結果、OATP1B1/HEK293においてOATP1B1 mRNA発現が、OATP1B3/HEK293においてOATP1B3 mRNA発現が、OATP2B1/HEK293においてOATP2B1 mRNA発現が、そしてOAT2/HEK293においてOAT2 mRNA発現が認められた。一方、Mock- (ZeoまたはNeo) /HEK293においてはいずれのトランスポーターのmRNA発現も認められず、また全ての細胞においてGAPDH mRNA発現が認められた。

次に、OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293およびOAT2/HEK293における各トランスポーターの取り込み活性を、それぞれの典型的基質であるE<sub>2</sub>G (0.1 μM)、CCK-8 (0.01 μM)、E3S (50 μM) およびcGMP (2 μM) を用いて解析した。その結果、いずれの細胞においても基質取り込み活性はMock- (ZeoまたはNeo) /HEK293よりも高く、それらトランスポーターを介した活性は各トランスポーターの典型的阻害剤の存在下、完全に消失した。

#### トランスポーター安定発現HEK293細胞におけるETV取り込み輸送の解析

上述の肝取り込みトランスポーター安定発現HEK293細胞を用いて、各トランスポーターによるETVの取り込み活性を解析した。その結果、OAT2/HEK293におけるETV取り込み活性値 (pmol/mg protein/min) は、14.6 ± 1.5と、Mock-Neo/HEK293の4.3 ± 1.2よりも有意に高く、このOAT2を介したETV取り込み活性は200 μM BSPの存在下で完全に消失した (4.7 ± 2.3)。一方、OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293およびOATP2B1/HEK293における解析では、これらトランスポーターを介したETV取り込みは認められなかった。

#### NBMPR感受性ETV取り込み機序の探索

ヒト肝細胞を用いた検討では、NBMPRにより部分

的なETV肝細胞内取り込み阻害が認められた。これまでに代表的なNBMPR感受性のトランスポーターとして核酸トランスポーターであるENT1およびENT2が知られているが、NBMPRのOAT2に対する阻害作用は不明である。そこでまずENT1およびENT2を発現するHepG2細胞を用いてETVの取り込みにおけるこれらトランスポーターの関与を解析した。その結果、HepG2細胞においてNBMPR感受性のAdoの取り込み活性は認められたのに対し、NBMPR感受性のETV取り込み活性は認められなかった。そこで次にOAT2/HEK293を用いて、OAT2を介したETV取り込みにはNBMPRが及ぼす影響を解析した。その結果、NBMPR添加によりOAT2を介したETVの取り込み活性は完全に消失した。このことからETVはENT1およびENT2の基質ではなく、ヒト肝細胞において認められたNBMPR感受性ETV取り込みはOAT2によるものであることが明らかとなった。

#### 肝取り込みトランスポーターによるTFV取り込み輸送の解析

ヒト肝細胞を用いた検討では、TFVにおいても小さいながらNBMPRおよびBSP感受性の取り込みが認められたことから、ETVと同様に、BSP感受性トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞を用いて、各トランスポーターによるTFVの取り込み活性を解析した。その結果、いずれのトランスポーターによる取り込みも認められず、またENTによりTFV取り込みも認められなかった。一方、取り込み実験のコントロールとしてTFVを基質とすることが報告されているOAT1を用いて一過性取り込み実験をおこなったところ、そのTFV取り込み活性値 (pmol/mg protein/min) は、10.1 ± 2.2と、空ベクター導入HEK293細胞の2.0 ± 1.6よりも高くOAT1を介したTFV取り込みが認められた。

#### ヒト肝細胞における各遺伝子発現量に及ぼすTFV暴露の影響

TFVは直接的な抗ウイルス作用に加え、肝細胞において抗ウイルス活性に関わる遺伝子の発現を変動させる作用を有する可能性も考えられる。そこで、TFV (10 μM) をヒト肝細胞に曝露し、CCL3、CCL5、IL-8、ISG15、MxAおよびTLR3 mRNAの発現量を解析した。その結果、ヒト肝細胞におけるCCL3 mRNA発現量はコントロールと比較して、8.7倍 (n=2) まで上昇した。一方、他の遺伝子 (CCL5、IL-8、ISG15、MxAおよびTLR3) については顕著なmRNA発現変動は認められなかった。

#### D. 考察

本研究の結果、OAT2はETVのヒト肝細胞内取り込みトランスポーターであることが明らかとなった。OAT2はSLC22A7遺伝子にコードされる12回膜貫通型のトランスポーターであり、幅広い基質認識性を示し、cGMP、p-アミノ馬尿酸およびプロスタグランジンE2などの内因性物質を基質とすることが知られている。またOAT2はアシクロビルやガンシクロビルといった抗ウイルス薬を基質とすることも報告されている。これら抗ウイルス薬とETVの構造的特徴を比べてみると、グアニン骨格を有している点で類似しており、ETVはこれら薬剤と同様の基質結合部位を介してOAT2により輸送されると考えられる。

これまで、OAT2は種々の臓器の中でも肝臓に特に高く発現していることが報告されている。また、肝臓においてはOAT2は類洞膜側に局在することが知られている。したがってETVはOAT2の基質となることで肝臓に効率的に取り込まれると考えられ、このことはETVがB型肝炎治療薬として高い薬効を示す理由の一端を説明する可能性があると考えられる。

さらに、ETV取り込み量の変動すると、それに伴いETVの肝細胞内濃度も変動することが考えられることから、OAT2の機能や発現量の変動はETV薬効発現にも影響を及ぼす可能性がある。これまでにこのような肝取り込みトランスポーターの発現や機能が薬効に影響を及ぼす例として、C型肝炎治療薬リバビリンがある。リバビリンはENT1を介して細胞内に取り込まれることが知られており、ENT1による細胞内取り込み活性が変動すると、それに伴って細胞内リバビリン濃度が変動し、さらにその薬効も変動することが、C型肝炎ウイルス複製モデル細胞を用いた検討から明らかとなっている。したがってENT1によるリバビリン取り込みの様、OAT2によるETV取り込み活性がその薬効発現を規定しうる役割を担う可能性が考えられる。

しかしながら、本研究の結果のみでは肝細胞においてOAT2以外にもETV肝取り込みに関与し、その薬効発現を規定しうるトランスポーターが存在する可能性は否定できない。これまでにBSP感受性の肝取り込みトランスポーターとして、本検討で着目したトランスポーターの他に、OATP1A2、OAT7およびsodium/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が報告されており、これらトランスポーターはいずれも肝臓に高く発現し、広い基質認識性を有すると考えられている。しかしながら、これまでにこれらトランスポーターが核酸アナログやグアニン骨格を有する化合物を基質としたとする報告はなく、現時点においてこれらがETVを基質とする可能性については不明である。

さらに、上記以外にも肝細胞においてBSPに感受性を有する肝取り込みトランスポーターが存在する可能性もある。したがって、上記可能性を全て考慮して、OAT2以外のETV肝取り込みトランスポーターの有無を明らかとし、これにより、ETV肝細胞取り込みという観点からその薬効発現に最も寄与するトランスポーターを明らかとする必要がある。

今後、上記のような検討により、OAT2（およびその他ETV肝取り込みトランスポーター）がETV薬効発現規定因子として確立すれば、その機能や発現量を変動させる宿主因子を同定することにつながり、さらにそれらから薬効発現の個人差の一端を説明しうる因子の同定へとつながるかもしれない。

一方、TFVに関しては、その肝細胞内取り込みには寄与が小さいながらもトランスポーターが関与している可能性があるが、本研究ではそのトランスポーターを明らかとすることはできなかった。しかし、TFVはOAT2の基質とならなかったことから、少なくともTFVはETVとは異なる機序で肝細胞内へ取り込まれると考えられる。ヒト肝細胞を用いた検討では、トランスポーターを介したTFV取り込みはETVと同様にBSP添加により低下したことから、BSP感受性の肝取り込みトランスポーターがTFVの肝取り込みに関わっている可能性がある。今後、この特徴を手がかりとしてTFVの肝細胞内取り込み機構に関してさらなる研究を進めていく必要があると考えられる。

また、本研究では上述のような肝取り込み機構とは異なる遺伝子発現変動の視点からTFVの薬効関連因子の探索をおこない、ヒト肝細胞においてTFVによりCCL3 mRNAの発現量が上昇することを初めて見出した。これまで、ヒト末梢血単核細胞においてTFV曝露によりCCL3分泌量が増加すること、およびマウスマクロファージにおいてTFV曝露によりCCL3分泌量が濃度依存的増加することが報告されている。CCL3に関して、これまでCCL3が様々なウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが複数報告されている。例えば、詳細な作用機序は不明だが、CD8<sup>+</sup> T細胞から分泌されたCCL3がHIV複製を阻害する作用を有することが明らかとなっている。また、機序は明らかとなっていないが、CCL3ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、パラミクソウイルス感染5日後におけるウイルス増殖量が高いことが明らかとなっている。さらに、単純ヘルペスウイルスを用いた検討において、CCL3がウイルス粒子のglycoprotein Bに結合することで、エンベロープにポアを作り、抗ウイルス活性を示すことも明らかとなっている。このように、CCL3が様々なウイルスの増殖および複製を抑制する作用を有することが明らかとなっている。

したがってHBVに関してもCCL3は何らかの作用機序により、抗HBV活性を示す可能性が考えられる。今後CCL3のHBV複製に対する作用を明らかとしていくことにより、TFVの新たな抗ウイルス作用発現機序解明の糸口が見出されるかもしれない。

## E. 結論

本研究よりETVはOAT2を介して肝細胞内に取り込まれることが明らかとなった。今後、OAT2のETV肝細胞内取り込みにおける寄与を明らかとしつつ、その薬効発現における役割を詳細に明らかとしていく必要があると考えられる。一方、TFVの肝細胞内取り込みに関して、本検討ではTFVの肝取り込みトランスポーターを同定することができなかったが、TFVはヒト肝細胞においてCCL3 mRNA発現量を上昇させることを明らかとした。したがって、今後TFV取り込み機構のさらなる検討を進めるとともに、TFV薬効発現におけるCCL3遺伝子の役割を明らかとしていく必要があると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Furihata T, Fu Z, Suzuki Y, Matsumoto S, Morio H, Tsubota A, Matsumoto S, Chiba K. Differential inhibition features of direct acting anti-hepatitis C virus agents against human organic anion transporting polypeptide 2B1. *Int J Antimicrob Agents*. 2015, in press.

Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4555-64.

Panigrahi R, Chandra PK, Ferraris P, Kurt R, Song K, Garry RF, Reiss K, Coe IR, Furihata T, Balart LA, Wu T, Dash S. Persistent hepatitis C virus infection impairs ribavirin antiviral

activity through clathrin-mediated trafficking of equilibrative nucleoside transporter 1. *J Virol*. 2015;89:626-42.

### 2. 学会発表

森尾花恵, 降幡知巳, 付中国, 鈴木雄基, 松本涉吾, 坪田昭人, 千葉寛. 新規直接型C型肝炎治療薬の小腸organic anion transporting polypeptide 2B1阻害プロファイル (神戸、2015年3月)

Suzuki Y, Furihata T, Fu Z, Matsumoto S, Tsubota A, Sun Y, Morio H, Chiba K. Identification of simeprevir and asunaprevir as unique OATP inhibitors with long-lasting properties. 19th North American regional ISSX meeting/29th JSSX annual meeting (San Francisco, USA Oct. 2014)

付中国, 降幡知巳, 松本涉吾, 坪田昭人, 孫雨晨, 鈴木雄基, 森尾花恵, 千葉寛. 新規直接作用型C型肝炎治療薬のOrganic anion transporting polypeptide 1B1/1B3阻害プロファイル 第9回トランスポーター研究会 (名古屋、2014年6月)

Panigrahi R, Chandra PK, Ferraris P, Kurt R, Garry RF, Balart LA, Coe I, Furihata T, Wu T, Dash S. Persistently infected HCV cell culture impairs RBV antiviral activity through clathrin mediated trafficking of ENT1. 2014 AASLD Annual Meeting (Boston)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## II. 分担研究報告 (1)

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))  
分担研究報告書

薬物間相互作用回避に向けた直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランスポーター阻害機序の解析

研究分担者 千葉 寛

### 研究要旨

Organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) は肝臓・小腸に発現する薬物取り込みトランスポーターである。そのため、OATP2B1機能を阻害する薬剤は薬物間相互作用 (drug-drug interaction, DDI) を引き起こす可能性がある。一方、C型肝炎治療においては、第二世代直接作用型C型肝炎治療薬が標準療法として用いられ始めている。これら薬剤は临床上他の薬剤と併用される機会が多いが、OATP2B1機能に対する阻害プロファイルは明らかとなっていない。そこで本研究では、シメプレビル (SMV) およびアスナプレビル (ASV) のOATP2B1機能に対する影響を明らかとすることを目的とした。OATP2B1安定発現HEK293細胞およびコントロールHEK293細胞を作製した。Estrone-3-sulfate (5 nM)を基質としたトランスポートアッセイをおこない、これら薬剤の共存下および持続的OATP2B1機能阻害効果を解析した。共存下OATP2B1機能阻害効果を解析したところ、SMVおよびASVのOATP2B1に対する $IC_{50}$ 値 ( $\mu M$ ) はそれぞれ $0.49 \pm 0.12$ および $0.16 \pm 0.06$ であった。さらにいずれの薬剤においても、曝露中止後にもその阻害効果が持続する持続的OATP2B1機能阻害効果が認められた。そこで、SMVおよびASVの持続的阻害効果と共存下阻害効果の協調作用を解析したところ、持続的阻害存在時の $IC_{50}$ 値 ( $\mu M$ ) はそれぞれ $0.19 \pm 0.05$ および $0.08 \pm 0.01$ に低下した。本研究の結果、SMVおよびASVは強い共存下OATP2B1機能阻害剤であること、さらにこれら薬剤は共存下阻害効果を増強させる持続的阻害効果も有することが明らかとなった。従って、SMVおよびASVとOATP2B1基質薬物との併用時には、DDIに注意を要すると考えられる。

### A. 研究目的

最近、C型肝炎治療においては次世代の直接作用型治療薬 (direct acting antivirals, DAAs) が次々と開発され、これら新薬による治療が主流となりつつある。DAAsは高い治療効果を有する一方、薬物間相互作用を生じるリスクも臨床にもたらしめている。薬物間相互作用は従来薬のインターフェロン $\alpha$ やリバビリンでは大きな問題ではなかったため、これまでC型肝炎治療の臨床において重要視されてこなかったが、DAAs時代の到来に伴い、薬物間相互作用への対策は急務の臨床課題であると考えられる。

我々は前年度までに、肝細胞薬物取り込みトランスポーター organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) および OATP1B3 に対する種々の DAAs (テラプレビル [TLV]、シメプレビル [SMV]、アスナプレビル [ASV]、ダクラタスビル [DCV]、ソフォスブビル [SOF]) の阻害作用を明らかとしてきた。しかし、OATP1B1 や OATP1B3 と同様に肝薬物取り込みを担う OATP2B1 について上

記 DAAs の阻害作用は明らかとなっていない。

そこで本分担研究では、ヒト肝薬物取り込みトランスポーターOATP2B1 に対する TLV、SMV、ASV、DCV、SOF の阻害プロファイルを明らかとすることを目的として検討をおこなった。

### 研究方法

#### 試薬

TLV、SMV、ASV、DCVおよびSFVはそれぞれShanghai Biochempartner (Shanghai, China)、ChemScene LLC (Monmouth Junction, NJ, USA)、AdooQ BioScience LLC (Irvine, CA, USA)、ChemScene LLCおよびMedchemexpress LLC (Princeton, NJ, USA) より購入した。OATP2B1機能阻害剤であるtaurocholic acid (TCA)、bromosulphophthalein (BSP)およびtestosterone (TST)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) または東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。上記薬剤はdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

OATP2B1 complimentary DNA (cDNA) クローニング  
およびOATP2B1発現用プラスミドベクターの作製

ヒト肝cDNAをテンプレートとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (TAKARA, 東京, 日本) を用いて、polymerase chain reaction (PCR) をおこなった。得られたPCR産物をテンプレートとしてPrimeSTAR HS DNA polymerase を用いてPCRをおこない、OATP2B1に制限酵素配列を付加した後、XhoIおよびBamHI処理をおこなった。得られたDNA断片を同様に制限酵素処理したpcDNA3.1/Neo(-) vector (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) とライゲーションさせ、OATP2B1/pcDNA3.1を作製した。DNAの塩基配列の解析は、オペロンバイオテクノロジー株式会社(東京)に委託した。

OATP2B1安定発現HEK293細胞の樹立および細胞培養

ヒト胎児腎臓由来Human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞はHUMAN SCIENCE (東京) より入手し、Dulbecco's modified Eagle's medium (Life technologies) に、10% (v/v) 非働化fetal bovine serumおよび50 units/mL penicillin - 50  $\mu$ g/mL streptomycinを加えた培地で培養した。

OATP2B1安定発現HEK293細胞 (OATP2B1/HEK293) および空ベクター導入HEK293細胞 (Mock/HEK293) は、OATP2B1/pcDNA3.1またはpcDNA3.1 Neo(-) vectorをreverse-transfection法によりHEK293細胞に導入し、G418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) で薬剤選択をおこなうことにより樹立した。また、細胞単一化はコロニーフォーメーション法によりおこなった。樹立した細胞(それぞれOATP2B1/HEK293およびMock/HEK293とする)はG418 disulfate salt を400  $\mu$ g/mLの濃度で添加して培養した。上記細胞は全て5% CO<sub>2</sub> / 95% airを気相とした37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

Total RNA抽出およびcDNA合成

OATP2B1/HEK293およびMock/HEK293からのtotal RNA抽出はISOGEN with spin column (Nippon Gene, 東京) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。Total RNA中のゲノムDNAの混入の有無は、human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプロモーター領域を検出するプライマーを用いたPCR反応により確認した。ゲノムDNAの混入が認められた場合にはDNaseI処理により除去した。cDNA合成はtotal RNA (1.0  $\mu$ g) をテンプレートとし、High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kits with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

上記で調製したcDNAをテンプレートとし、PCR反応によりOATP2B1/HEK293におけるOATP2B1 mRNAおよび細胞におけるGAPDH mRNAの発現を解析した。

Western blotting

細胞膜可溶化画分調製

Mock/HEK293 および OATP2B1/HEK293 細胞を150-mmディッシュに播種した。コンフルエントに達した後に、培地を除去し、PBS (-) で細胞層をリンスし、セルスクレーパーで剥離した。これをPBS (-) で懸濁し、800 $\times$ g、4°Cで3分間遠心分離して細胞ペレットを調製した。これら細胞ペレットをSET buffer (0.25 sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, Protease inhibitors cocktail, pH 7.4) で懸濁し、ソニケーションで破碎した。これを1,000 $\times$ g、4°Cで10分間遠心分離し、得られた上清をさらに100,000 $\times$ g、4°Cで40分間超遠心した。これにより得られた沈殿を0.8% NP-40, 0.4% deoxycholic acidおよび0.08% sodium dodecyl sulfate (SDS) 添加SET bufferに懸濁し、ソニケーションにより破碎した。これを再度100,000 $\times$ g、4°Cで40分間超遠心し、得られた上清を膜可溶化画分とした。蛋白質濃度は、Pierce<sup>®</sup> BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc, Rockford, USA) を用いて測定した。

Western blotting

上記により得られた膜可溶化画分 (10  $\mu$ g) にSET bufferを加えて、10  $\mu$ Lとした後、同量のlaemmili bufferを加え、37°Cで30分間インキュベートし、10%のポSDS-polyacrylamide gelにより分離した後、ポリフッ化ビニルデン膜 (PVDF) に転写した。転写後のPVDF膜は、5% Skim milk (wako) 含有Tris Buffered Saline with Tween 20を用いて室温で2時間のブロッキングをおこなった。一次抗体はrabbit anti-OATP-B (H-189) IgG (400-倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, CA) および mouse anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase IgG (1,000-倍希釈; Sigma) をCan Get Signal solution 1 (TOYOBO, 大阪) で希釈したものを用い、室温で1時間振とうした。二次抗体は horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG

(5,000倍希釈で使用; Sigma) およびhorseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (5,000倍希釈で使用; Abcam, Cambridge, UK) を Can Get Signal solution 2 (TOYOBO, 大阪) で希釈したものを用い、室温で1時間処理した。蛍光検出はAmersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE Healthcare, Giles, UK) およびLAS-4000 (FUJIFILM, 東京) によりおこなった。

#### Transport assay

#### OATP2B1を介した基質取り込み活性解析

作製したOATP2B1/HEK293における基質取り込み活性は以下の方法で解析した。OATP2B1/HEK293、またはMock/HEK293をcollagen type-I (Sigma-Aldrich) でコートした24-well plateにそれぞれ $4.0 \times 10^5$  cells/mLで播種し、24時間後にsodium butyrate (Sigma-Aldrich) を最終濃度10 mMで曝露し、その24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayにおけるOATP2B1の基質溶液は、 $\text{Na}^+$ -plus Krebs-Henselei buffer ( $\text{Na}^+$ -KHB) (pH 6.5) に $[^3\text{H}]$ E3S (2120.1 GBq/mmol) (PerkinElmer Life Science, Inc. Boston, MA, USA) および非標識E3S (Sigma-Aldrich) を溶解し、最終基質濃度5 nM (高親和性部位を介した取り込み) または50  $\mu\text{M}$  (低親和性部位を介した取り込み) および最終放射線濃度0.25  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ とした。阻害実験では、OATP2B1に対する典型的阻害剤として、TCA (高親和性部位阻害剤)、TST (低親和性部位阻害剤) またはBSP (両親和性部位阻害剤) をそれぞれ最終阻害剤濃度1 mM, 1 mMまたは100  $\mu\text{M}$ の濃度で基質溶液に加えた。

Transport assayでは、細胞を37°Cの $\text{Na}^+$ -plus KHBで1回リンスした後、上記の基質溶液200  $\mu\text{L}$ を加えて37°Cで取り込み反応を開始した。E3S取り込み時間は、予備検討において基質取り込み活性に線形性が認められた3分間とした。その後、細胞を氷冷した $\text{Na}^+$ -plus KHBで速やかにリンスし、0.2% SDS加え細胞溶解液とした。細胞溶液中の放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-6100, Aloka, 東京) にて測定した。また、タンパク質濃度はPierce<sup>®</sup> BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kitを用いて測定した。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は式 [1] を用いて算出した。

式[1]

$$[\text{取り込み活性 (pmol/ mg protein/ min)}] \\ = [\text{放射能 (dpm)}] / [\text{基質溶液放射能}$$

$$(\text{dpm/nmol})] / [\text{採取量 (mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] \\ \times [1000 (\text{pmol/nmol})] / [\text{タンパク濃度 (mg protein/mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] / [\text{取り込み時間 (min)}]$$

#### DAAの共存下OATP2B1機能阻害活性解析

Transport assayは上記と同様の方法でおこなった。高親和性部位の阻害にはTLV (0.1, 1.0, 10, 40 および100  $\mu\text{M}$ )、SMV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.0, 4.0 および10  $\mu\text{M}$ )、ASV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 0.6, 1.0, 4.0 および10  $\mu\text{M}$ )、DCV (0.1, 0.4, 1.0, 4.0, 10, 40 および100  $\mu\text{M}$ ) およびSFV (1.0, 4.0, 10, 40 または100  $\mu\text{M}$ ) を用いた。低親和性部位の阻害にはTLV (0.1, 0.4, 1.0, 4.0, 10, 40 および100  $\mu\text{M}$ )、SMV (0.01, 0.1, 1.0, 10 および100  $\mu\text{M}$ )、ASV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.0, 4.0 および10  $\mu\text{M}$ )、DCV (0.1, 1.0, 10, 40 および100  $\mu\text{M}$ ) およびSFV (1.0, 4.0, 10, 40 または100  $\mu\text{M}$ ) を用いた。コントロールとしてDMSOを最終濃度0.1 %で細胞に曝露した。DAAのOATP2B1に対する50%阻害濃度  $[\text{IC}_{50}]_{\infty}$  ( $\mu\text{M}$ ) は式[2]を用いて算出した。

式[2]

$$[\text{取り込み活性 (\%)}] = [100 / (1 + I / [\text{IC}_{50}]_{\infty})]$$

ここで、それぞれの取り込み活性値はOATP2B1を介した基質取り込み活性値からMock/HEK293における基質取り込み活性値を減じた後、コントロールの基質取り込み活性値に対する相対値 (%) を算出することにより得た。また、I はDAAの濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示す。

#### DAAの濃度依存性な持続的OATP2B1機能阻害活性解析

DAAの持続的OATP2B1機能阻害活性の濃度依存性は既報の方法をもとに解析した。TLV、SMV、DCV、SFV (0.1, 1.0 および10  $\mu\text{M}$ )、ASV (0.01, 0.1 および1  $\mu\text{M}$ ) またはコントロールとして0.1% DMSOを含む $\text{Na}^+$ -KHBで細胞を1時間、37°Cで培養した後、 $\text{Na}^+$ -KHBで二回リンスし、DAA非存在下にてtransport assayをおこなった。取り込み活性値はコントロールの取り込み活性値の相対値 (%) として算出した。

#### DAAの時間依存性な持続的OATP2B1機能阻害活性解析

DAAの持続的OATP1B機能阻害活性の時間依存性は既報の方法をもとに解析した。DAA (1.0  $\mu\text{M}$ ) ま

たはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa<sup>+</sup>-KHB (pH 6.5)で細胞を1時間、37°Cで培養し、その後培養培地(抗生剤不含)で一回リンスした後、再び同培養培地にて37°Cで培養した。一定時間(0、1または3時間)培養後、37°CのNa<sup>+</sup>-KHBで2回リンスし、DAA非存在下にて上記と同様の方法でtransport assayをおこなった。取り込み活性値は上記と同様に各時間におけるコントロールの取り込み活性値の相対値(%)として算出した。

#### DAAの持続的機能阻害効果の共存下OATP2B1機能阻害効果への影響解析

DAAの持続的機能阻害効果が共存下OATP2B1機能阻害作用に及ぼす影響は既報の方法をもとに解析した。SMV(0.001, 0.01, 0.1, 0.4, 1.0および10 μM)、ASV(0.001, 0.01, 0.04, 0.1, 0.4および1.0 μM)またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa<sup>+</sup>-KHBで細胞を1時間、37°Cで培養した後、Na<sup>+</sup>-KHBで二回リンスし、SMV(0.001, 0.01, 0.1, 0.4, 1.0および10 μM)、ASV(0.001, 0.01, 0.04, 0.1, 0.4および1.0 μM)の存在下にてtransport assayをおこなった。DAAのOATP2B1に対する持続的かつ共存下50%阻害濃度[IC<sub>50</sub>]<sub>co+pre</sub>(μM)は式[2]を用いて算出した。

#### 統計解析

二群間における平均値の差の検定はStudent's t-testによりおこなった。統計計算にはExcel統計ソフトStatcel第3版(東京)を使用した。

#### 倫理面への配慮

ヒト肝由来試料の使用については事前に千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

#### OATP2B1安定発現系HEK293の作製

OATP2B1/HEK293またはMock/HEK293より調製したcDNAを用いて、OATP2B1 mRNAの発現をRT-PCR法により解析した。その結果、OATP2B1/HEK293のみにおいてOATP2B1 mRNA発現が認められた。

続いて、OATP2B1蛋白質の発現を明らかとするため、OATP2B1/HEK293またはMock/HEK293より膜可溶化画分を調製し、Western blottingをおこなった。その結果、Mock/HEK293ではOATP2B1蛋白質の発現が認められず、OATP2B1/HEK293でOATP2B1蛋白質の発現が認められた。

#### OATP2B1高親和性部位または低親和性部位を介したE3S取り込み活性解析

OATP2B1/HEK293またはMock /HEK293におけるOATP2B1高または低親和性部位を介したE3S取り込み活性を、各活性部位により優先的に輸送される濃度(それぞれ0.005 μMまたは50 μM)を用いて解析した。その結果、OATP2B1/HEK293(高親和性部位)およびMock/HEK293におけるE3S取り込み活性値はそれぞれ0.18 ± 0.03、0.006 ± 0.001 (pmol/mg protein/min)であり、OATP2B1/HEK293においてMock /HEK293よりも高い活性が認められた。この取り込み活性は、高親和性部位選択的阻害剤TCA(1 mM)および両親和性部位に対する阻害剤BSP(100 μM)の存在下で完全に消失したのに対し、低親和性部位に優先的な阻害剤TST(1 mM)存在下では、阻害ではなく、活性の増強が認められた。このTSTのOATP2B1高親和性部位を介した取り込みに対する増強効果は、これまでも報告があるがその理由は不明である。一方、OATP2B1低親和性部位を介した取り込み活性値は、OATP2B1/HEK293で316.2 ± 37.4 (pmol/mg protein/min)とMock /HEK293の42.9 ± 7.3 (pmol/mg protein/min)よりも高かった。これら取り込み活性は、TST(1 mM)およびBSP(100 μM)の存在下で完全に消失したのに対し、TCA(1 mM)では十分に阻害されなかった。以上の結果より、作製したOATP2B1/HEK293では、既報と同様、異なる活性部位を介した二種類のE3S取り込み機構が認められた。

#### DAAの共存下OATP2B1機能阻害プロファイル

OATP2B1高または低親和性部位を介したE3S取り込み活性におよぼすTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV(いずれも0.01-100 μM)の影響を解析した。その結果、TLVは高親和性部位に対する阻害効果は認められなかったが、低親和性部位に対する[IC<sub>50</sub>]<sub>co</sub>値(μM)は16.22 ± 2.73であった。SMV、ASVおよびDCVは高親和性部位に対する阻害効果を有しており、その[IC<sub>50</sub>]<sub>co</sub>値(μM)はそれぞれ0.49 ± 0.12、0.16 ± 0.06および35.5 ± 4.10であった。また、これら薬剤はいずれも低親和性部位も阻害し、それら[IC<sub>50</sub>]<sub>co</sub>値はそれぞれ10.15 ± 2.80、0.92 ± 0.08および50.10 ± 18.02 (μM)であった。一方、SFVはいずれの親和性部位に対しても機能阻害効果を示さなかった。したがって、SMVおよびASVは*in vitro*において各親和性部位に対して強い共存下機能阻害効果を有する一方で、TLVは低親和性部位のみに対する阻害効果を有することが明らかとなった。また、DCVおよびSFVによるOATP2B1阻害効

果は他剤と比較し顕著に小さい、あるいは認められないことも明らかとなった。

#### DAAの濃度依存性な持続的OATP2B1機能阻害効果

DAAの持続的OATP2B1機能阻害プロファイルを明らかとするため、OATP2B1の高親和性または低親和性部位を介したE3S取り込み活性に対するTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV前処理の影響を解析した。その結果、SMV (1.0および10  $\mu\text{M}$ ) 前処理後の高親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $40.2 \pm 5.9$ 、 $29.2 \pm 5.4$  (%)、低親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $36.1 \pm 12.0$ 、 $8.6 \pm 6.4$  (%)であり、両活性部位に対するSMVの強い持続的機能阻害効果が認められた。同様に、ASVも両親和性部位に対して強い持続的機能阻害効果を有しており、ASV (0.1および1  $\mu\text{M}$ ) 前処理後の高親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $48.1 \pm 3.1$ 、 $14.8 \pm 5.6$  (%)、低親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $68.0 \pm 24.3$ 、 $18.4 \pm 0.5$  (%)であった。したがって、SMVおよびASVは共に強い持続的OATP2B1機能阻害効果を有することが明らかになった。一方、TLV、DCVおよびSFVでは、いずれの親和性部位に対しても顕著な持続的機能阻害効果は認められなかった。

#### DAAによる持続的OATP2B1機能阻害効果の時間依存性

上記において顕著な持続的OATP2B1機能阻害効果が認められたSMVおよびASVについて、その時間依存性を解析した。その結果、SMVの前処理から1または3時間後における高親和性部位の取り込み活性値はそれぞれコントロールの $34.3 \pm 14.9$ 、 $58.1 \pm 3.3$  (%)と、前処理後3時間以上継続するのに対し、低親和性部位ではそれぞれコントロールの $83.1 \pm 8.8$ 、 $109.1 \pm 7.0$  (%)と前処理後1時間程度しか続かなかつた。また、ASVの前処理から1または3時間後における高親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $57.1 \pm 5.6$ 、 $77.5 \pm 24.5$  (%)、低親和性部位に対しては、それぞれコントロールの $100.6 \pm 1.4$ 、 $111.9 \pm 17.0$  (%)であり、SMVの持続的阻害プロファイルと類似したプロファイルが認められた。したがって、両薬剤の持続的OATP2B1機能阻害効果の継続時間は、基質取り込みに係る活性部位毎に異なることが明らかとなった。

#### DAAの持続的OATP2B1機能阻害効果の共存下機能阻害効果に対する影響

SMVおよびASVの持続的OATP2B1機能阻害効果による共存下機能阻害効果への増強作用を明らかとするため、各薬剤前処理かつ共存下におけるE3S取り込み活性を解析した。その結果、SMVおよびASVの高親和性部位に対する $[\text{IC}_{50}]_{\text{co+pre}}$ 値は、それぞれ共存下阻害条件のみから得られた値と比較して2.6または2.0倍低下し、 $0.19 \pm 0.05$ 、 $0.08 \pm 0.01$  ( $\mu\text{M}$ )となった。一方、低親和性部位においてもそれぞれの $[\text{IC}_{50}]_{\text{co+pre}}$ 値は共存下阻害条件のみから得られた値より低下し $0.39 \pm 0.05$ 、 $0.37 \pm 0.12$  ( $\mu\text{M}$ )となったが、その低下度はSMVにおいてASVよりもより顕著であった(それぞれ26.0または2.5倍低下)。以上より、SMVおよびASVの持続的OATP2B1機能阻害効果は共に共存下機能阻害効果を増強させることが明らかとなったが、その上乘せ効果は活性部位により異なることも明らかとなった。

#### D. 考察

本研究の結果、SFV以外の解析した全てのDAAはOATP2B1を阻害することが明らかとなった。まず共存下阻害作用について、TLVは低親和性部位を介したE3S取り込みのみを阻害し、高親和性部位を介したE3S取り込みには影響しなかった。これは既報のtestosteroneおよびpenicillin Gと同様の阻害特徴であるが、興味深いことに、高親和性部位の活性を増強しない点ではTLVはこれら化合物と異なる特徴を有する。一方、SMVおよびASVはOATP2B1両活性部位に対して共存下機能阻害効果を有しており、sulfasalazine, BSP, montelukastやDHEASに次ぐ、新たな両活性部位阻害剤であることが明らかとなった。しかし、SMVおよびASVは高親和性部位に対する阻害効果が同等であるにもかかわらず、両者の低親和性部位への阻害効果は大きく異なっていた。Pubchemデータベースを用いてSMVおよびASVの物性を比較したところ、それらの疎水性、極性および分子量など主だった物理化学的性質は極めて類似していた。そのため、低親和性部位に対する阻害効果の差を生じる原因は不明であるが、SMVにはASVと異なるマクロサイクリック環構造が存在することから、このような構造的差異がOATP2B1各親和性部位に対する阻害効果に関与する可能性が考えられる。

一方、これまでにアップルジュース(AJ)において持続的OATP2B1機能阻害効果が報告されているが、本研究では、臨床で用いられる薬剤として初めてSMVおよびASVが持続的OATP2B1機能効果を有することを明らかとした。これら薬剤の各活性部位に対する持続的機能阻害効果は共存下阻害時の阻害強度と一致しておらず、これはAJの阻害プ



ロファイル（両活性部位に対して、共存下機能阻害効果有するのに対し、持続的阻害効果は高親和性部位のみに認められる）と類似している。これらのことから、DAAの各親和性部位に対する持続的OATP2B1機能阻害効果の強度は共存下OATP2B1機能阻害効果の強度からは判断できないといえる。

以上のことから、それぞれのDAAはOATP2B1に対して固有の阻害作用（各活性部位に対する共存下・持続的阻害効果の組み合わせ）を有することが明らかとなった。このようにDAA間にOATP2B1阻害作用の差異を生じる詳細は不明であるが、共存下および持続的で阻害機序が異なる可能性が考えられる。

これまでに持続的OATP2B1機能阻害効果の詳細な機序については明らかとなっていないが、その可能性の一つとして細胞膜上OATP2B1蛋白質量の低下が考えられる。近年、OATP2B1発現MDCK II細胞において、細胞膜上のOATP2B1蛋白質がprotein kinase C (PKC) 活性化により内在化することでE3Sの取り込み活性が低下することが報告されている。したがって、SMVおよびASVのPKC活性化作用は不明であるものの、同様の現象が起こる可能性は否定できないと考えられる。しかし、SMVおよびASVの二つの活性部位に対する持続的機能阻害効果の継続時間が異なっていたことから、持続的機能阻害の機序としてOATP2B1の内在化だけでは説明し切れないと考えられる。一方、細胞内に取り込まれたSMVおよびASVが持続的機能阻害に関与する可能性も考えられる。これまでにシクロスポリンA (CsA) はOATP1B1に対して持続的機能阻害を有することが報告されているが、CsAは前処理後約18時間にわたって、その代謝物と共に細胞内に蓄積することが明らかとなっている。この蓄積したCsA（およびその代謝物）は持続的OATP1B1機能阻害に関与する可能性が指摘されている。したがって、SMVおよびASVの細胞内蓄積解析や持続的OATP2B1阻害効果の速度論的解析をおこなうことが、今後はこれら薬剤の持続的OATP1B機能阻害の特徴や機序を明らかにするために必要であると考えられる。

本研究の結果および前年度の結果を考え合わせると、SMVおよびASVはいずれの肝OATP分子種に対しても強い阻害効果を有することが明らかとなった。したがって、臨床でDAAによるOATPs機能阻害を介したDDIが生じるリスクはあると考えられる。例えば、fexofenadineおよびpravastatinはOATP1B1/1B3/2B1により吸収されることが報告されていることから、SMVおよびASVはこれらの薬剤と併用する時に注意を要する可能性がある。また、今後開発される薬物についてもOATPsを主な肝取り込みトランスポーターとする場合には、SMVやASVとのDDIを評価すべきであると考えられる。さ

らに、OATP1B1/1B3/2B1を介したSMVおよびASVとの *in vivo* DDIリスク評価では、今後、共存下阻害効果ばかりでなく持続的阻害効果も考慮することを、その手法とともに検討していく必要があると考えられる。

## E. 結論

以上本研究の結果から、解析したDAA (SFV以外) は異なるプロファイルで共存下OATP2B1機能阻害効果を有することが明らかとなり、SMVおよびASVについては強い持続的OATP2B1機能阻害効果を有することも明らかになった。さらに、この持続的機能阻害効果により共存下機能阻害効果は大きく増強し、その効果は一定時間継続すると考えられることから、SMVおよびASVのOATP2B1を介した *in vivo* DDIリスクは、共存下機能阻害の結果のみから推定される以上に高くなる可能性が考えられる。したがって、前年度までに得られた知見とも考え合わせ、特にSMVおよびASVを用いたC型肝炎治療においては、肝OATPsの基質として取り込まれる薬物を併用する際に、DDIに注意を要すると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Furihata T, Fu Z, Suzuki Y, Matsumoto S, Morio H, Tsubota A, Matsumoto S, Chiba K. Differential inhibition features of direct acting anti-hepatitis C virus agents against human organic anion transporting polypeptide 2B1. *Int J Antimicrob Agents*. 2015, in press.

Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4555-64.

### 2. 学会発表

森尾花恵, 降幡知巳, 付中国, 鈴木雄基, 松本涉吾, 坪田昭人, 千葉寛. 新規直接型C型肝炎治療薬の小腸organic anion transporting polypeptide 2B1阻害プロファイル (神戸、2015年3月)

Suzuki Y, Furihata T, Fu Z, Matsumoto S, Tsubota A, Sun Y, Morio H, Chiba K. Identification of simeprevir and asunaprevir as unique OATP

inhibitors with long-lasting properties. 19th North American regional ISSX meeting/29th JSSX annual meeting (San Francisco, USA Oct. 2014)

付中国、降幡知巳、松本涉吾、坪田昭人、孫雨晨、鈴木雄基、森尾花恵、千葉寛. 新規直接作用型C型肝炎治療薬のOrganic anion transporting polypeptide 1B1/1B3阻害プロファイル 第9回トランスポーター研究会 (名古屋、2014年6月)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

## II. 分担研究報告 (2)

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))  
分担研究報告書

網羅的遺伝子発現解析による日本人C型肝炎患者の治療奏効にかかわる新たな宿主分子の同定

研究分担者 坪田 昭人

### 研究要旨

肝炎治療においては種々の宿主側・ウイルス側要因が治療奏効に影響を及ぼすが、それら要因は治療法ごと、患者集団ごとに異なっている。本分担研究ではC型肝炎二剤併用療法の治療奏効にかかわる因子を明らかとすることを目的とした。ペグインターフェロン $\alpha$ 2bおよびリバビリン併用療法 (全48週間または全72週間) を施行した患者をSVR/再燃(S/R)群と部分応答/不応(P/N)群に分け、各群由来試料を用いたmRNAおよびmiRNAの網羅的発現解析により治療奏効関連因子の探索をおこなった。その結果、MAP3K8 mRNAの発現量がP/N群においてS/R群よりも有意に高かった。また、miR-17-5pの発現量がP/N群においてS/R群よりも有意に低く、MAP3K8と逆相関関係にあった。これと一致して、MAP3K8の3'非翻訳領域にmiR-17-5pが結合することが明らかとなった。さらに、HCV産生モデル細胞においてMAP3K8およびmiR-17-5pの発現や機能を変動させると、それぞれについて、患者治療応答性と一致したHCV産生プロファイルの変動が認められた。以上、本研究の結果から、MAP3K8およびmiR-17-5pはペグインターフェロン $\alpha$ 2b/リバビリン併用療法の治療効果関連因子であることが明らかとなった。したがって、これら新たな経路の同定により、これまで不明であった治療奏効や不応患者の原因解明およびそれら患者集団の抽出が可能となることが期待される。しかし、これら遺伝子がどのような分子経路を介してHCV複製・産生に作用するか明らかではなく、今後MAP3K8/miR-17-5pの標的遺伝子 (HCV複製に関わる遺伝子や治療薬取り込みトランスポーター遺伝子など) の同定やその治療薬標的としての可能性を明らかとしていく必要があると考えられる。

### A. 研究目的

本研究では、難治性肝炎の奏効率を向上させるため、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体の遺伝情報と肝炎治療臨床経過との関連解析を計画している。本解析遂行のため、分担研究では肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と治療応答性の特徴解明を目的の一つとしており、本年度では、ペグインターフェロン $\alpha$ 2b/リバビリン併用療法を施行した日本人C型肝炎患者を対象とした。そこで本分担報告書では、これら患者由来試料のmRNAおよびmiRNA発現の網羅的解析から見出された新たな二つの治療応答関連因子、およびそれらのC型肝炎ウイルス (HCV) 複製における推定分子機序について報告する。

### B. 研究方法

#### 患者・治療法

ペグインターフェロン $\alpha$ 2b (週1回、1.5  $\mu$ g/kg、

MSD、東京) およびリバビリン (600-1000 mg/day、MSD) による治療を48週間 (または72週間) 受けたHCV1b型感染日本人患者 (2011年12月~2013年3月、東京慈恵会医科大学柏病院) のうち、次(1-4)の条件を満たす130名の患者を対象とした。条件は、(1)C型肝炎患者である；(2)感染HCVの遺伝子型が1bである；(3)肝がん、肝不全、他の肝疾患がない；(4)他疾患に対する薬物療法をおこなっていない；である。

患者から治療前に肝組織を採取し、病理組織学的解析に用いた。また、採取切片の一部を用いてmRNAおよびmiRNAの抽出をおこなった。

#### 治療応答の定義

Sustained virologic response (SVR) は治療完遂後24週の時点で血中HCVが検出限界以下と定義した。治療不応 (null) は治療開始後12週の時点で2 log<sub>10</sub> IU/mL以下のウイルス低下量で、そのまま治療期間中ウイルスが検出され続けた例と定義した。また、部分応答は、治療開始後12週の時点で2 log<sub>10</sub>

IU/mL以上の低下が認められたが、治療中血中HCVが検出限界以下にならなかった例とした。再燃 (relapsers) は、治療完遂時点で血中HCVが検出限界以下であったが、経過観察期間に再出現した例とした。

#### HCV RNA測定法

治療前および治療中 (4週に1回)、治療後の血中HCV RNAレベルはAmplicor HCV version (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) により定量した。

#### mRNAマイクロアレイ

患者由来肝試料 (SVR、n=5; relapsers、n=3; null、n=4) における全mRNA発現プロファイルはGeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) により解析した。データセットはR 2.12.1 statistical softwareとBioConductor packageを用いて解析した。

#### miRNAマイクロアレイ

患者由来肝試料 (SVR、n=5; relapsers、n=3; null、n=4) における全miRNA発現プロファイルはmiRCURY LNA microRNA Array series (Exiqon, Vedbaek, Denmark) により解析した。Total RNAはHy3でラベルし、miRBASE 14.0に登録されている全miRNAを対象として解析した。データセット解析にはR 2.12.1 statistical softwareを用いた。

#### 治療応答に関連する遺伝子発現変動の抽出

BioConductorを用い、SVRまたはrelapsers群とnullまたは部分応答群の間で発現量に差があるmRNAまたはmiRNAの探索をおこなった。p値はBenjamin i-Hochberg false discovery rate (FDR) 法により設定した。

#### クラスター解析法

R statistical softwareを用いて、発現変動のあった遺伝子群に対してクラスター解析をおこなった。発現変動プロファイルの類似性はピアソン関連係数を用いて判定した。ヒートマップは異なる遺伝子発現プロファイル群で作成した。

#### mRNAの定量

マイクロアレイ結果の検証のため、定量的リア

ルタイムPCRを用いてmRNAの発現定量解析をおこなった。解析にはTaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies) および TaqMan probes (<http://www.roche-appliedscience.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>) を用いた。各遺伝子の発現は、18S rRNAの発現量に対する相対量として算出した。

#### miRNAの定量

上記と同様に、マイクロアレイ結果の検証のため、定量的リアルタイムPCRを用いてmiRNAの発現定量解析をおこなった。解析にはTaqman probe systemを用いた。各遺伝子の発現は、RNU48の発現量に対する相対量として算出した。

#### miRNAの標的遺伝子予測

マイクロアレイ解析において、SVR/relapsers群とnull/部分応答群の間で発現量に差がある (1.2倍以上でp値が0.005以下) miRNAについて、MicroCosm, Targets, miRanda, PicTar, PITA, およびTargetScanによる標的mRNA予測をおこなった。標的mRNAの抽出条件は、1) マイクロアレイ解析で1.5倍以上の発現量の差異がp値0.003以下で認められる、2) マイクロアレイ解析において、miRNAと逆相関の発現プロファイルが認められる、3) リアルタイムPCRにより発現量の差異が確認できている、とした。遺伝子発現ネットワーク解析は、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathways、Agilent Literature Search 3.0.3 beta、およびCytoscape 3.0.2を用いておこなった。

#### 細胞培養

Huh7.5.1細胞は、10%牛胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle's mediumを用いて培養した。また、JFH1をHuh7.5.1細胞に導入し、この培養上清よりHCVを回収した。

#### プラスミドおよびsiRNA

Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAP3K8) に対する3種siRNA (uucgucuuuuauaucuugugtt, uguugcuagguuuauauctt, aucuugugccaguauacctt) およびスクランブルsiRNAはシグマ (St. Louis, MO) より購入した。miR-17-5p発現プラスミドおよびその阻害プラスミド、コントロールプラスミドは、GeneCopoeia (Rockville, MD) より購入した。