

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤耐性、臓器不全等治療困難症例に対する病態解析と根治的治療法の開発に関する研究

業務主任者 茶山 一彰 広島大学大学院医歯薬保健学総合研究院 教授

研究要旨：直接作用型抗ウイルス剤により C 型慢性肝炎に対する治療は飛躍的に向上するが、一部では、完治に至らない症例も出現すると思われる。本研究では、これらの症例に対する治療法開発を目的とし、以下の検討を行い、知見を得た。

（1）薬剤耐性や種々の genotype の HCV に対する既存の薬剤による有効な治療法の開発

プロテアーゼ阻害剤/PEG-IFN/RBV 併用療法において、次世代シークエンサーを用いて、治療後超早期のウイルスゲノム多様性減変化は IFL3 SNP に有意な関連があり、治療効果を予測しうる因子となる可能性を示した。HCV 感染マウスを用いて NS3 D168 変異が約 10% 以下の場合にはダクラタスビル+アスナプレビル併用投与により HCV 排除が可能なことを見いだした。培養細胞系を用いて、HCV が異なる細胞に感染する際、新たな quasispecies を出現すること、さらに HCV 感染マウスでは、培養細胞とは異なる quasispecies が選択されることを明らかにした。

（2）現在開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発

HCV 培養細胞系を用いてビタミン A 誘導体が HCV 複製抑制効果を有しており、中でも、肝癌の chemoprevention の有用性が報告されている Peretinoin(NIK333)が最も強力であることを見いだした。

（3）宿主因子をターゲットとした治療薬の開発

培養細胞系を用いて HCV 感染を阻害する化合物をスクリーニングし、ウイルス粒子形成または分泌過程を阻害することが推測される 12 種類の化合物を見いだした。うち脂質代謝に関与する化合物 A の持つ PLD 阻害活性が感染性 HCV 産生阻害に重要であり、PLD 阻害剤が HCV 粒子の分泌を阻害し、HCV 感染の拡大を阻止することを見いだした。HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を分離培養したところ、培養上清に HCV RNA が放出されることが確認された。

（4）IFN、その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発

HCV 感染に対する IFN- λ 3 遺伝子治療法の開発を試み、HCV レプリコン細胞に IFN- λ 3 発現プラスミドを導入したところ抗 HCV 効果が確認された。また HCV レプリコン細胞を用いて薬剤ライブラリーによって HCV 複製を抑制する新たな薬剤をスクリーニングすることにより、ステアリル CoA デサチュラーゼ (SCD) 阻害薬が効果的に HCV ゲノム複製を抑制すること、SCD 阻害薬を DAA や IFN と併用することで相加的および相乗効果的に作用することを見いだした。

透析患者および肝移植患者に対するダクラタスビル+アスナプレビル併用療法の安全性および有効性を検討する臨床研究を行っていく。

【担当責任者】

立野知世 (株)フェニックスバイオ 取締役研究開発部長
島上哲朗 金沢大学附属病院恒常性制御学講座 助教
土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野 教授
前川伸哉 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 特任講師
松浦喜治 大阪大学微生物研究所分子ウイルス分野 教授
大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院消化器・移植外科学 教授
脇田隆字 国立感染研究所ウイルス第二部 部長
正木崇生 広島大学大学院医歯薬保健学研究院分子内科学 教授
川上由育 広島大学病院臨床研究部 講師
三木大樹 (独)理化学研究所統合生命医科学研究センター・消化器疾患研究チーム 研究員
平賀伸彦 広島大学大学院医歯薬保健学研究院消化器・代謝内科 特任助教

A. 研究目的

直接作用型抗ウイルス剤(DAA)によりC型慢性肝炎に対する治療は飛躍的に向上する。しかし、これらの治療が全て実用化されても多剤耐性ウイルスの存在により、現在考え得る全ての治療薬を使用しても完治に至らない難治例の存在が既に明らかになっている。また、genotype 1b型および2型以外のC型肝炎ウイルス(HCV)感染例に対する対策も十分でない。今後を講じるべき難治例としては、耐性ウイルスを有し、インターフェロン(IFN)の効果が期待出来ない症例、genotype 1b型、2型以外の症例、非代償性肝硬変、肝移植後、腎不全、透析中、腎移植後など臓器不全を合併した症例があげられる。本研究は、このような症例に対する治療法開発を目的とし、(1)薬剤耐性や種々のgenotypeのHCVに対する既存の薬剤による有効な治療法の開発(2)NS2阻害剤のような現在

開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発(3)耐性出現の可能性の少ない宿主因子をターゲットとした治療薬の開発(4)インターフェロン、その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発、の4点を中心に行う。

B. 研究方法

(1)薬剤耐性のウイルスに対する既存の薬剤による有効な治療法の開発では、申請者らがこれまでに作製したinfectious cloneであるKT-9クローンに変異を加え、現在開発されているDAAに対する各種耐性株を作製しヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、異なるDAAの組み合わせなどによる治療効果を検証する実験を行う。既存のDAAやインターフェロン α 、 β 、 λ などの組み合わせ、投与量などを検討し、どのような耐性株にはどの薬剤の併用が有効

であるかを明らかにする。(2)新しい抗ウイルス薬の開発と評価では、現状のDAA以外の薬剤の治療効果および既存のDAAに対する薬剤耐性の抗HCV効果を検証する。(3)宿主因子を標的とする新規薬剤の開発では、これまで我々が発見してきた宿主の蛋白を標的とした治療を開発するため、Ezetimib, cox2 inhibitor, Thromboxan A2 阻害剤などの抗ウイルス効果を増強させる方法を検討し、これらの組み合わせによりどのような抗ウイルス効果が得られるかを検討する。また siRNA による screening を行い、C型肝炎ウイルスの増殖に必須である宿主因子を同定し、発見された宿主因子とウイルス蛋白の interaction について解析し、シーズの発見を行う。(4)抗ウイルス性サイトカインを利用した新規治療法の開発では、HCVの増殖に寄与する宿主因子に関して、HCV感染前後のトランスクリプトームを解析してライブラリーを作製し、HCV感染により、特異的に発現が亢進あるいは抑制される因子を同定し、IFN以外の抗ウイルス因子の研究を行う。このような因子は hydrodynamic 法によりキメラマウスに強制発現し、その抗ウイルス効果を検証する。また臓器不全合併症例に対する治療法を確立するため、肝移植、腎移植、透析中、非代償性肝硬変など、臓器不全や免疫抑制などのリスクを負う症例に対して臨床研究を計画し、最適な治療法を開発する。

C. 結果および考察

(1)薬剤耐性や種々の genotype の HCV

に対する既存の薬剤による有効な治療法の開発

NS3 D168変異を種々の割合で有するHCV感染マウスに対し、ダクラタスビルとアスナプレビルの併用投与を行ったところ、D168変異が10%以下の場合には併用投与によりHCVの排除が可能であることを見出した(平賀班員)。

プロテアーゼ阻害剤/PEG-IFN/RBV3剤併用療法において、次世代シーケンサーを用いてHCV quasispeciesの動態および薬剤耐性変異の発生と経過を解析した(前川班員)。治療後超早期のウイルスゲノム多様性減少と最終治療効果、あるいは宿主IFL3 SNPは有意な関連があり、超早期における多様性変化で治療効果を予測しうる可能性が示唆された。治療前に少数の耐性変異を認めた症例では、そのHCVは臨床的耐性HCVに進展せず、臨床的耐性は野生型のHCVに変異が生じ耐性を獲得したと考えられた。一方、治療抵抗性になるにつれ、quasispeciesの系統は大きく変化することを明らかにした。

In vitroの感染系で、Huh7細胞に馴化したHCVcc(HCVcc/Huh7)とHep3B細胞に馴化したHCVcc(HCVcc/Hep3B)を作製し、次世代シーケンスにて解析したところ、それぞれ異なったquasispeciesを保持しており、異なる細胞株に感染させた際に、さらに新たなquasispeciesが出現することを明らかにした(松浦班員)。HCVcc/Huh7はHuh7細胞に対して、HCVcc/Hep3BはHep3B/miR-122細胞に対して特異的に

高い感染性を示しており，これらの結果から，quasispecies は細胞特異的な高い感染性を得るために重要な役割を果たしていると思われた．さらに SCID マウスを用いて，Huh7 細胞や Hep3B 細胞と異なる quasispecies が *in vivo* で選択されることを明らかにした．

(2) 現在開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発

新規抗ウイルス薬としてビタミン A 誘導体に注目して HCV 培養細胞系を用いてその抗ウイルス効果を解析し，複数のビタミン A 誘導体は，genotype 1a 型，1b 型，2a 型のいずれの HCV に対しても複製抑制効果を有することを見いだした（島上班員）．またビタミン A 誘導体の中でも，肝癌の chemoprevention の有用性が報告されている Peretinoin (NIK333) による HCV 複製抑制効果が最も強力であり，Peretinoin による HCV 複製抑制効果は，時間依存性かつ用量依存性であった．さらに Peretinoin はウイルスの RNA 複製のみでなく，感染性粒子産生能も抑制することを見いだした．

(3) 宿主因子をターゲットとした治療薬の開発

約 2000 例の C 型慢性肝炎症例について高密度のゲノムワイド SNP タイピングを実施した（三木班員）．今後，HCV の慢性感染，また IFN 併用から IFN フリーのレジメンまで含めた治療症例において，臓器不全合併症例を含む難治例に絞った

治療効果，あるいは治療不応をもたらすウイルスの薬剤耐性（ウイルスゲノムと宿主ゲノムの相互作用），治療不耐をもたらす各種副作用などに関連する宿主の遺伝的要因について解析する．

J6/JFH1 株の合成全長 RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし上清中のウイルスの感染性を阻害する化合物をスクリーニングした（脇田班員）．ウイルス粒子形成または分泌過程を阻害することが推測される 12 種類の化合物を見いだした．うち脂質代謝に關与する化合物 A の持つ PLD 阻害活性が感染性 HCV 産生阻害に重要であり，PLD 阻害剤が，HCV 粒子の分泌を阻害し，HCV 感染の拡大を阻止することを見いだした．

HCV 感染に対する宿主因子の影響を検討する為，HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を分離し，コラーゲンコートプレート上で平面培養を試みた（立野班員）．Genotype 1a 型 HCV 感染マウスのヒト肝細胞を PEG-IFN で処理すると明らかな HCV RNA 量の低下を認めたことから，培養 12 日目の上清中には *in vitro* で新規に合成された HCV RNA が放出されていると思われた．また genotype 3a 型 HCV 感染マウスのヒト肝細胞を培養し，上清中と細胞内の HCV RNA 量の検討を行ったところ，細胞内の HCV RNA 量の低下に伴って上清中の HCV RNA 量が低下する事が示され，生体内で HCV に感染したヒト肝細胞であれば，一定期間は培養下でも HCV を複製し上清中に放出可能である事が示された．

(4) IFN, その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発

IFN- λ 3 遺伝子治療法の抗 HCV 効果を検討した(高倉班員). 本年度は短期発現型 IFN- λ 3 発現ベクターとして pcDNA3.1 ベクター, 持続型 IFN- λ 発現ベクターとして pCpG-mcs を選択し, これにヒト IFN- λ 3 の cDNA を挿入したベクター, pCMV-IFN- λ 3 および pCpG-IFN- λ 3 を構築した. 構築したプラスミドベクターを HCV レプリコン感染細胞 LucNeo#2 細胞にトランスフェクションしたところ IFN- λ 3 の発現と HCV レプリコンの減少が確認された. また, ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入されたマウスにおいて, 血中 IFN- λ 3 が検出されることが確認された.

これまでに報告している感染性 HCV 産生阻害効果を持つトロンボキササン A2 合成酵素(TXAS)阻害薬の薬効作用機序の解析をおこなった(土方班員). 肝癌由来培養細胞を TXAS 阻害薬で処理した時に発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ法で解析し, 数十種類の候補遺伝子を見出した. また HCV レプリコン細胞を用いて薬剤ライブラリーによって HCV 複製を抑制する新たな薬剤をスクリーニングすることにより, ステアリル CoA デサチラーゼ(SCD)阻害薬が効果的に HCV ゲノム複製を抑制することを見出した. SCD 阻害薬は既存の DAA と併用することで相加的にその効果を上昇させ, またインターフェロンと併用することで相乗

効果を示した. このことから SCD 阻害薬が既存薬の効果を上昇させる併用薬の候補となると思われた.

透析患者および肝移植患者を対象にダクラタスビル+アスナプレビル併用療法に関する臨床研究を行っていく. 透析患者の C 型慢性肝疾患患者を対象として, ダクラタスビル+アスナプレビル併用した場合の薬物動態と有効性および安全性の評価を多施設共同研究として実施する(川上班員, 正木班員). また肝移植患者に対してダクラタスビル+アスナプレビル併用した際の免疫抑制薬を含めた薬物動態の解析を行うとともに, リンパ球混合試験で抗ドナー免疫応答を解析し, 有効性・安全性の評価を行うため, 対象患者の抽出を行い, 新規抗 HCV 療法に適した免疫抑制プロトコールおよび検査スケジュールを作成した(大段班員).

D. 考察

臨床検体, HCV 培養細胞系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いて新規候補となる抗ウイルス剤のスクリーニングあるいは新規治療法の開発を試みた. 有効性が示された薬剤および治療法は今後, 難治性の C 型肝炎患者に対する新規治療法となることが期待され, さらに詳細な検討を行っていく.

E. 結論

臨床検体, HCV 培養系, HCV 感染マウスを用いて(1)薬剤耐性や種々の genotype の HCV に対する既存の薬

剤による有効な治療法の開発(2) NS2 阻害剤のような現在開発が行われている以外のウイルス蛋白をターゲットとした治療薬の開発(3) 耐性出現の可能性の少ない宿主因子をターゲットとした治療薬の開発(4) IFN, その他の抗ウイルス性サイトカインを利用したウイルス排除法の開発に関する研究を行った。

F. 健康危機情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H. Quantitative Effect of Natural Killer-Cell Licensing on Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Curative Hepatectomy. Cancer Immunol Res. in press.
- 2) Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. J Viral Hepat. in press.
- 3) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Chayama K;

Hiroshima Liver Study Group. Ribavirin dose reduction during telaprevir/ribavirin/peg-interferon therapy overcomes the effect of the ITPA gene polymorphism. J Viral Hepat. in press.

4) Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Kubo M, Chayama K. IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. J Gen Virol. 95(Pt 6):1297-306. 2014.

5) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. Antimicrob Agents Chemother. 58(4):2105-12. 2014.

H . 知的財産権の出願・登録状況

- 1 . 特許取得 なし
- 2 . 実用新案登録 なし
- 3 . その他 なし