

委員発言要旨資料

下 遠 野 委 員

HCVゲノム複製を模擬する細胞を用いた複製機構の解析

医薬基盤研究所（旧医薬品機構）
研究推進部基礎研究推進課による研究助成
および
厚生科学研究費による研究助成

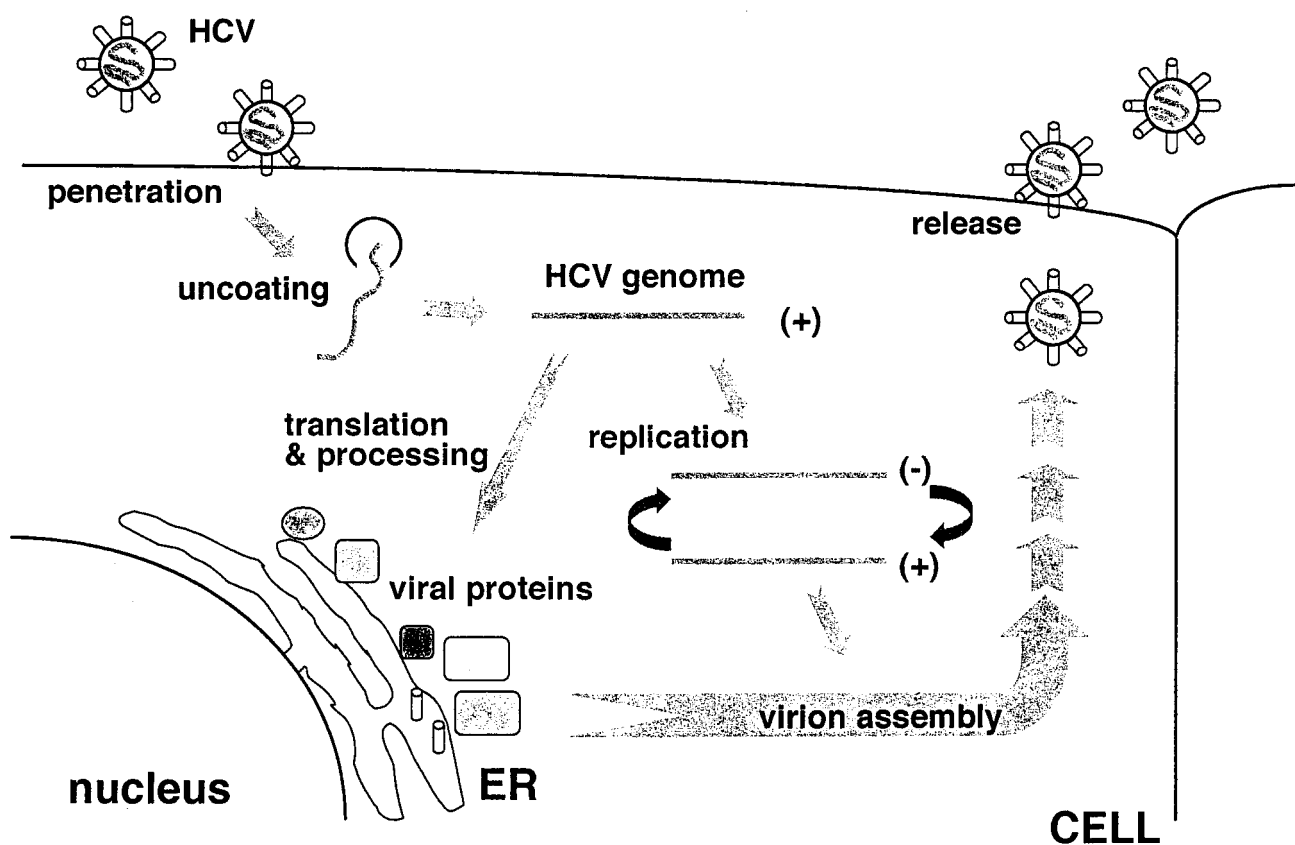
発表内容

- (1) シクロスポリンA、および免疫抑制作用のないシクロスポリン誘導体によるHCVゲノムの効率よい複製阻害
- (2) インターフェロンとミゾリビン併用処理によるHCVゲノム複製阻害
- (3) HCV粒子を産生する細胞の樹立

これまでの研究でまだ克服されていない点

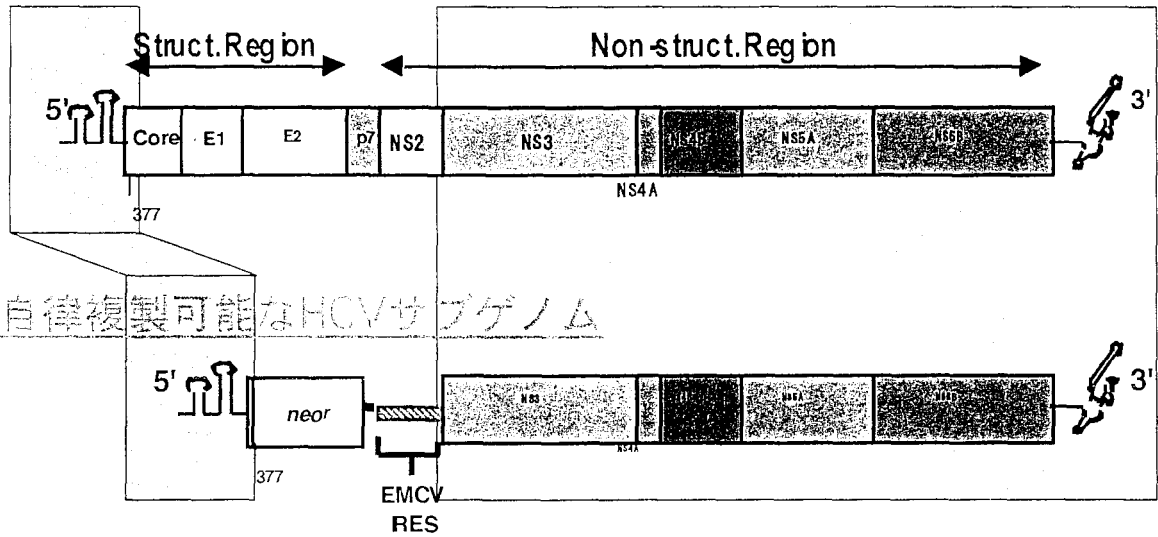
培養細胞を用いた効率よいHCV感染・複製系がない。

C型肝炎ウイルスの生活環



培養細胞で効率よく複製するHCVサブゲノムの構造

HCV全ゲノム

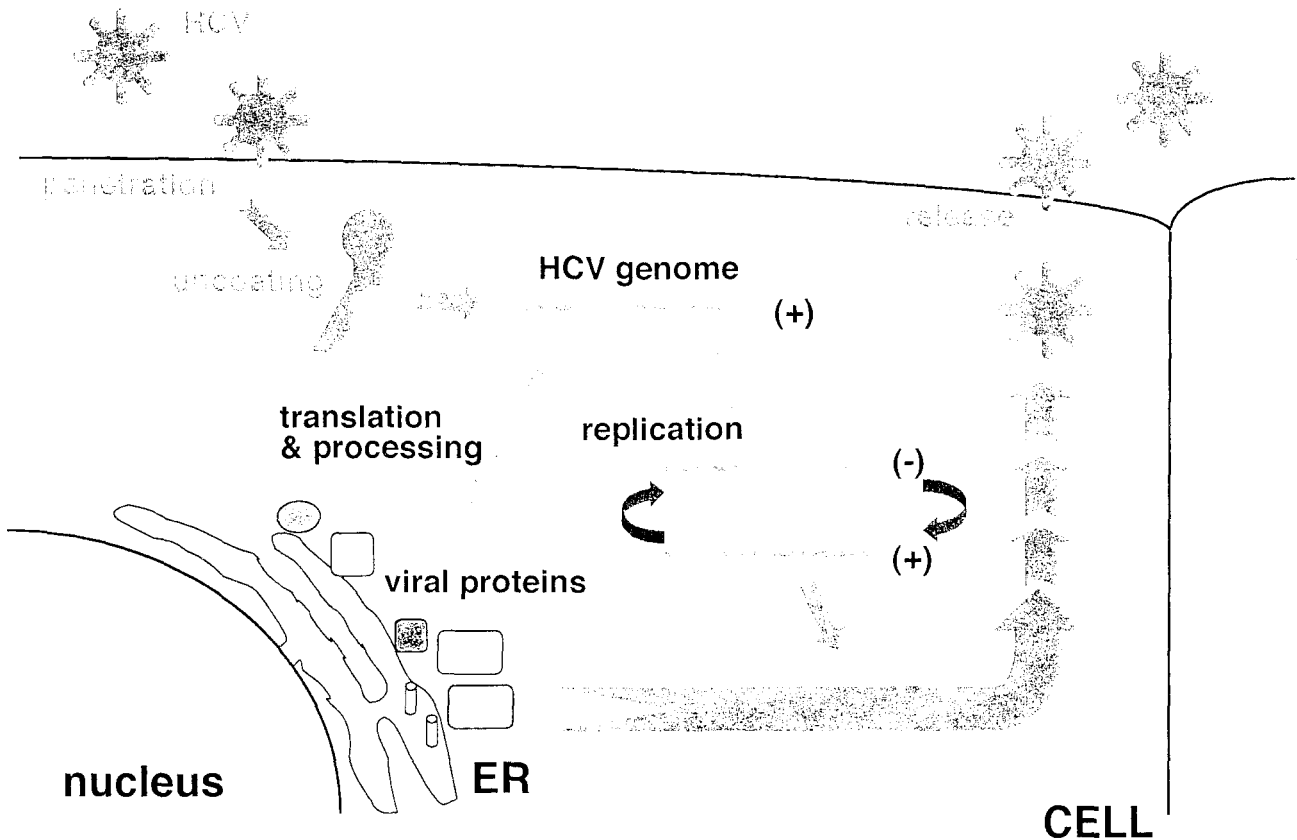


自律複製可能なHCVサブゲノム

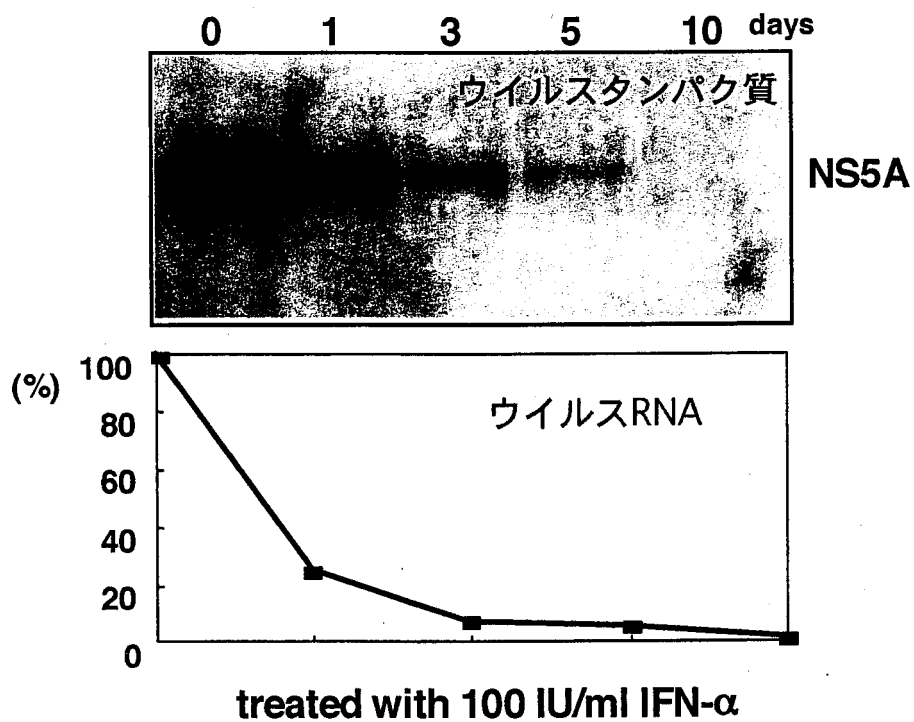
Lohman et al., 1999

Kishine H. Shimotohno K., 2002

サブゲノムレプリコンを用いて解析出来るHCVの生活環



インターフェロン処理によりHCVゲノム複製が強く阻害される



(1) シクロスポリンA、および免疫抑制作用のないシクロスポリン誘導体によるHCVゲノムの複製阻害

(京都大学 下遠野等)

(2) インターフェロンとミゾリビン併用処理によるHCVゲノム複製阻害

(3) HCV粒子を産生する細胞の樹立

HCVゲノム複製の制御に関わる細胞側要因の探索

薬理機構の明らかな薬剤の中から抗HCVゲノム複製作用を持つ薬剤の選択

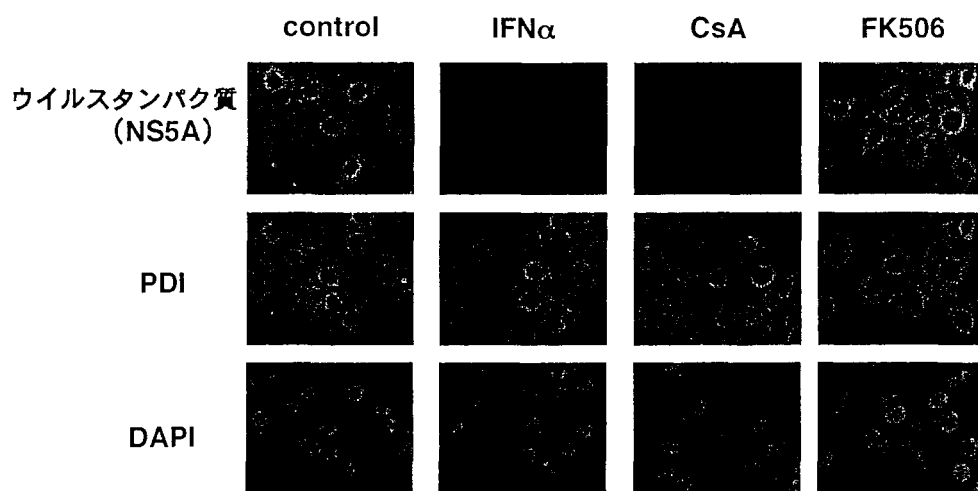


細胞側の複製制御機構の解明



新しい抗HCV剤開発に向けた研究

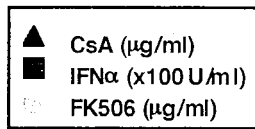
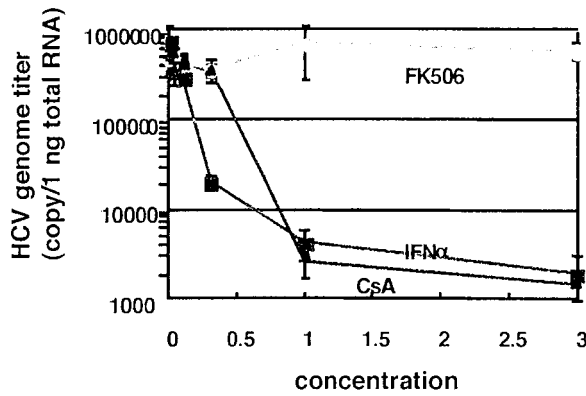
シクロスポリンAはHCVゲノム複製を強く抑制する



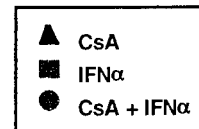
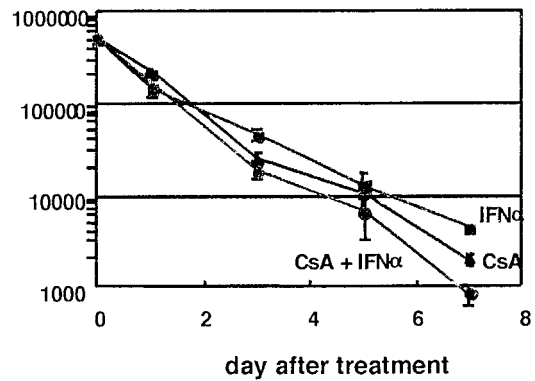
Control: no treatment
IFN α : 100 U/ml, 7 days
CsA: 1 μ g/ml, 7 days
FK506: 1 μ g/ml, 7 days

HCVゲノム複製はシクロスポリンの用量依存的、 また時間依存的に減少する

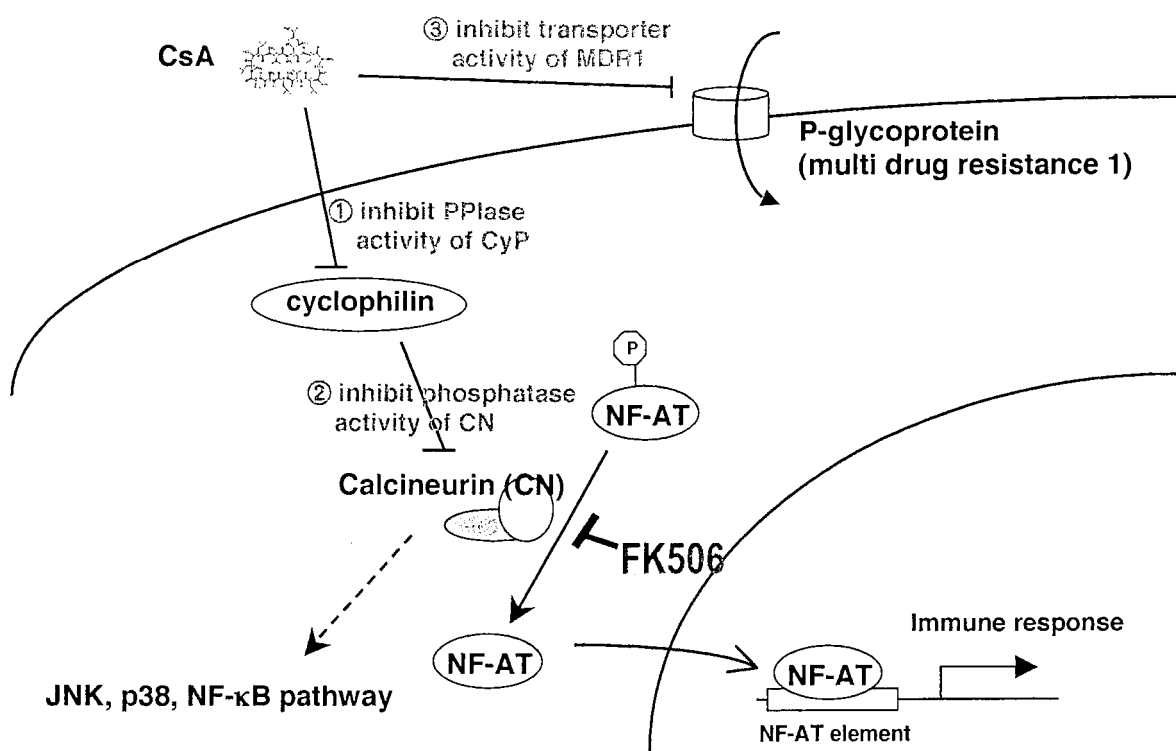
A <用量依存曲線>



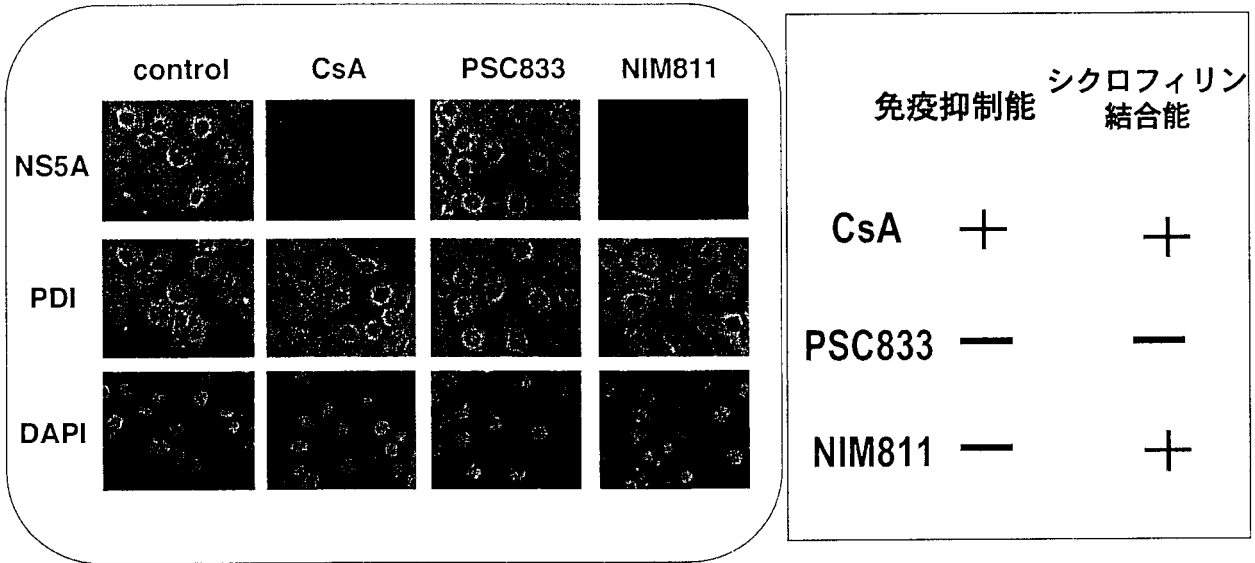
B <タイムコース>



シクロスポリンA (CsA) の細胞に与える影響



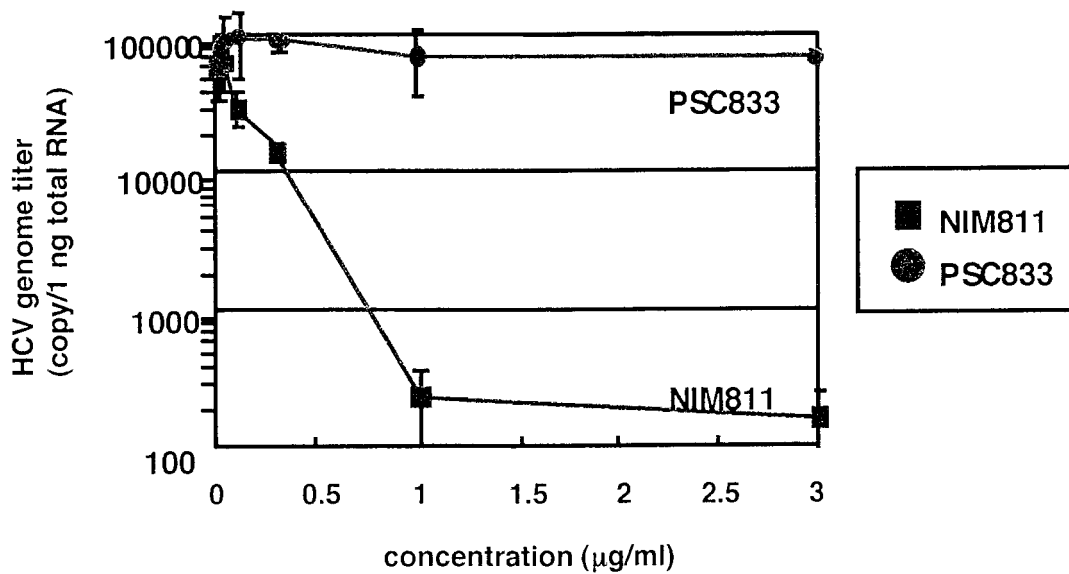
シクロスポリンAおよびその誘導体によるHCVゲノム複製の抑制



Control: no treatment, CsA: 1 μ g/ml, 7 days
 NIM811: 1 μ g/ml, 7 days, PSC833: 1 μ g/ml, 7 days

Watashi K., Shimotohno, K., *Hepatology*, 2003

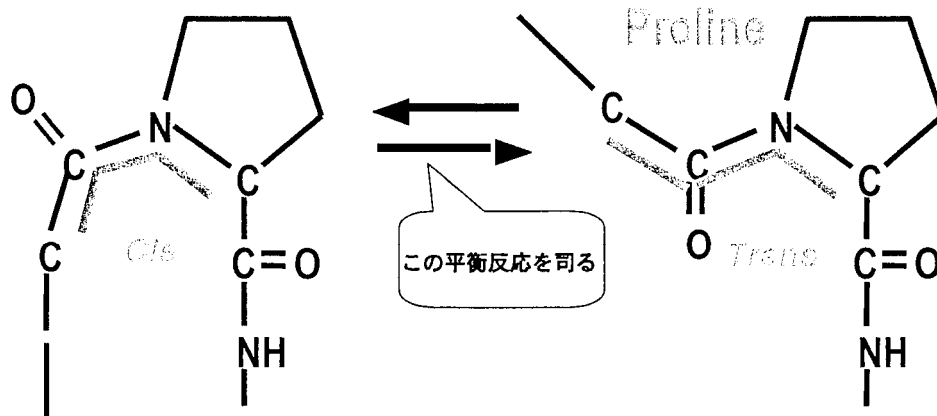
免疫抑制作用のないシクロスポリン誘導体、NIM811、によるHCVゲノム複製抑制



Watashi K., Shimotohno, K., *Hepatology*, 2003

シクロフィリンとは？

(Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase活性 (PPIase) を持ち、シクロスポリンと結合する性質を持つタンパク質)



哺乳動物細胞内にはPPIase活性を持つタンパク質が沢山存在し、シクロフィリンはその中のひとつのグループを形成している。

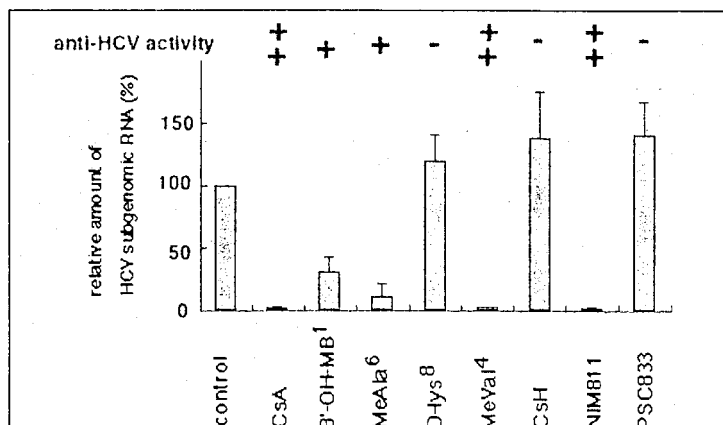
Cyclophilin : ~15 species

FKBP : ~14 species

Parvulins : 2 species

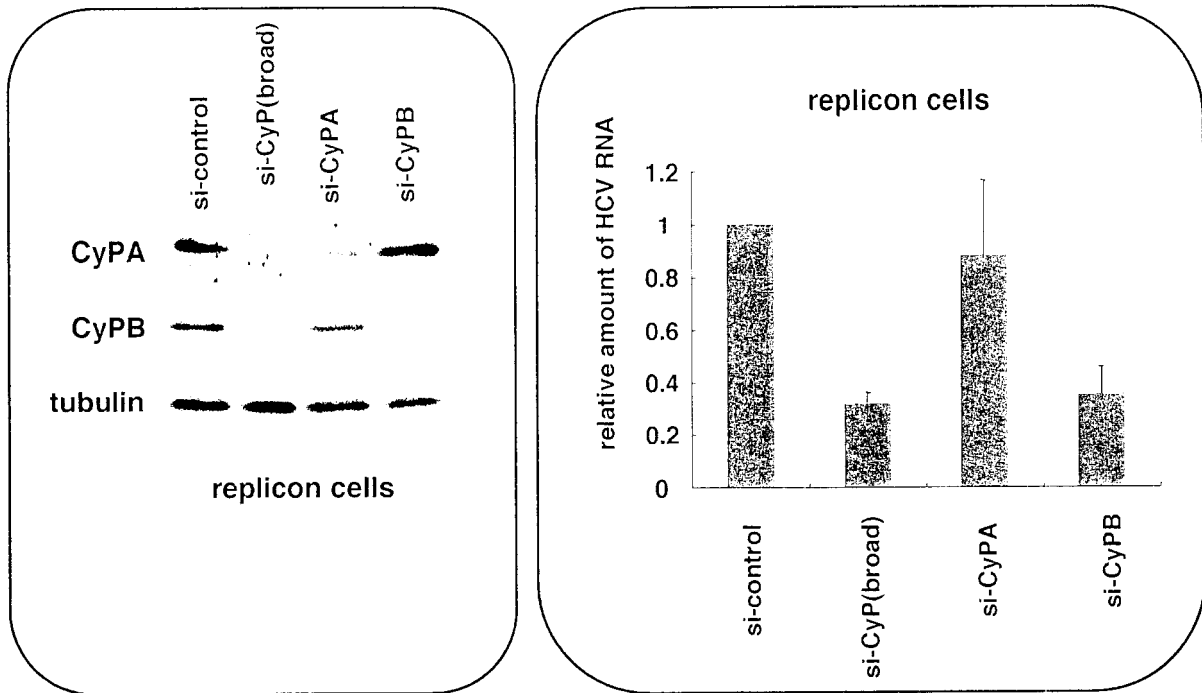
PPIase活性を持つシクロスポリン誘導体は全てHCV ゲノム複製を抑制する

CyP inhibition	+	+	+	-	+	-	+	-	
CN Inhibition	+	+	-	-	-	-	+	-	
P-gp Inhibition	+	-	+	-	+	+	+	+	
FPR Inhibition	+	-	-	+	+	+	+	NN**	
	control	CsA	8'-OH+MB1	MeAla ⁶	D-Hys ⁸	MeVal ⁴	CsH	NIMB11	PSC833

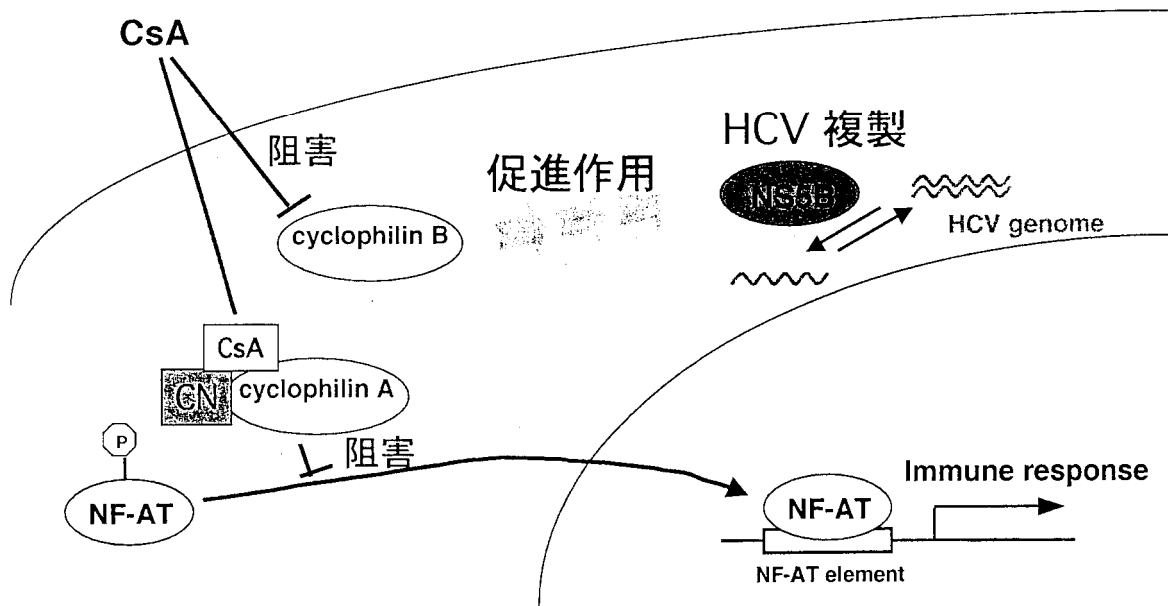


CyP Inhibition Coincided with anti-HCV Activity

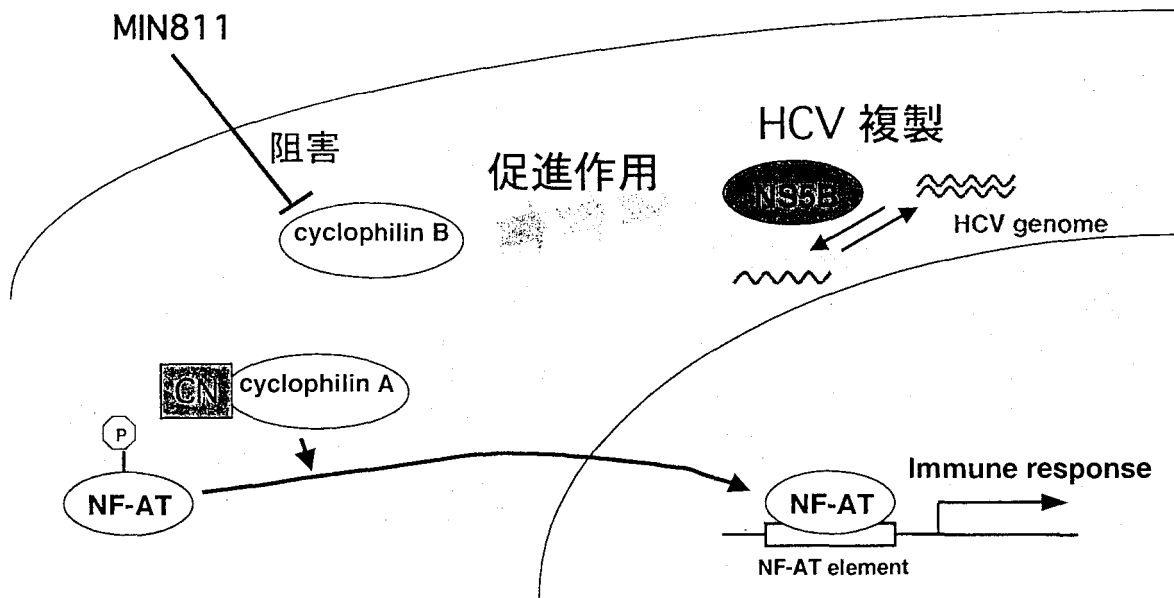
細胞内のシクロフィリンB量を低下させるとHCV ゲノム複製能も低下する



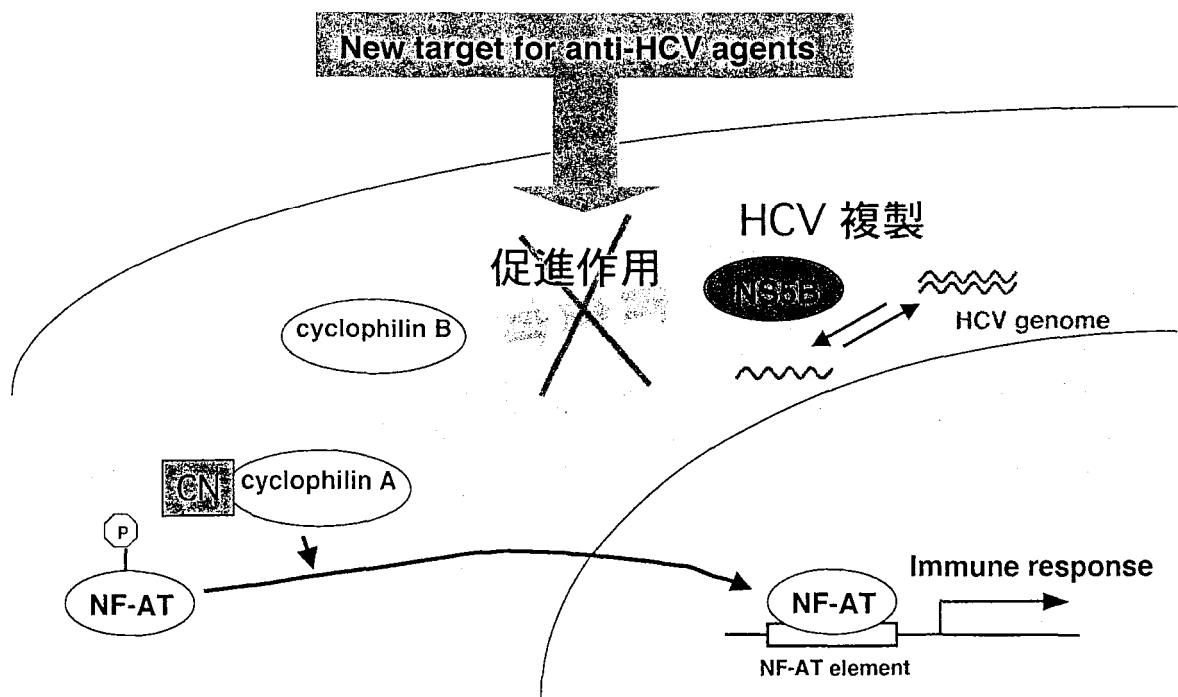
シクロスポリンAの抗HCV作用メカニズム



シクロスポリンA誘導体の抗HCV作用メカニズム



抗HCV開発の新しい標的



シクロスポリンAとインターフェロンの併用療法は血液中のHCV RNA量を下げる効果がインターフェロン単独療法の場合よりも高い

治療終了後6ヶ月後のウイルス陰性率

	CsA/IFN	IFN
HCV-1	51.7%	21.9%
HCV-2	66.7%	58.3%

Inoue K., Yoshida M., J. Gastroenterol., 2003

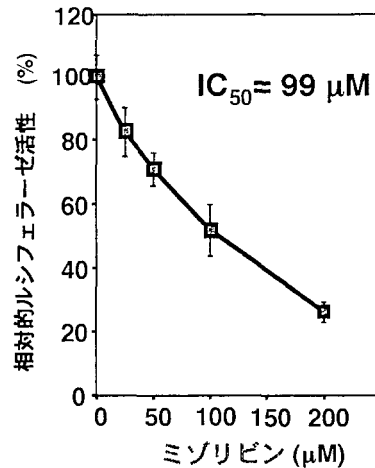
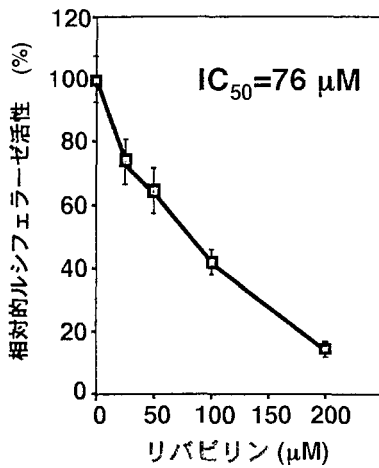
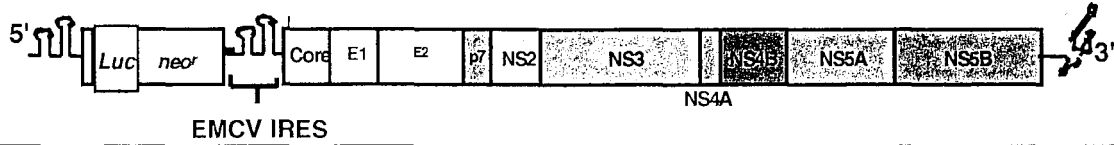
(1) シクロスポリンA および免疫抑制作用のないシクロスポリン誘導体によるHCVゲノムの効率よい複製阻害

(2) インターフェロンとミゾリビン併用処理によるHCVゲノム複製阻害 (岡山大学 加藤等)

(3) HCV粒子を産生する細胞の樹立

リバビリンおよびミゾリピンの抗HCV効果

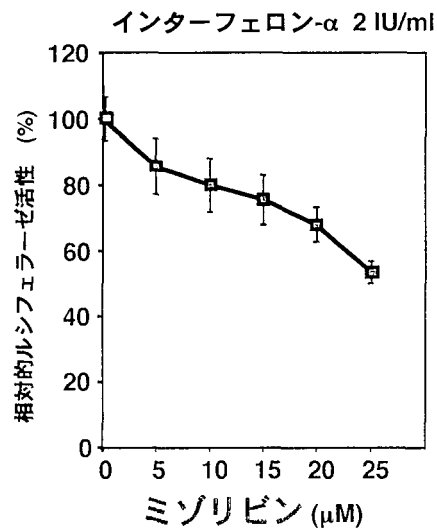
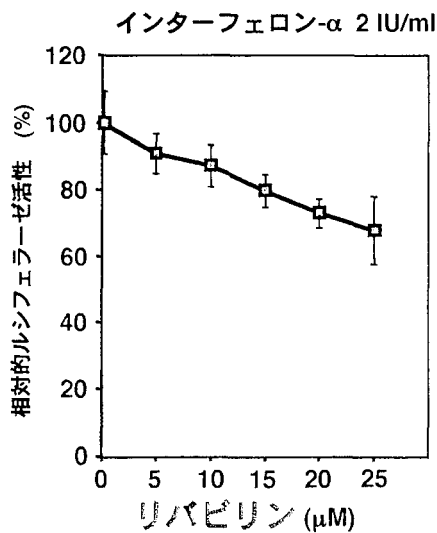
評価に用いたHCVレプリコンの構造



レプリコン細胞にリバビリン或はミゾリピンを添加し、72時間後にウイルス複製能を測定した

Naka K, Kato N., B. B. R. C. 2005

インターフェロン-αとの併用による抗HCV効果

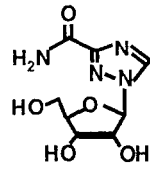


レプリコン細胞にインターフェロン-αおよびリバビリン或はミゾリピンを添加し、72時間後にHCV RNA量を測定

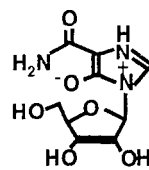
Naka K, Kato N., B.B.R.C. 2005

インターフェロンとの併用において ミソリビンがリバビリンと同等以上の抗HCV効果を示した

リバビリン



ミソリビン



	イノシン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤(IC ₅₀)	投与量/日	血中到達濃度 (腎排泄)	副作用	抗HCV効果		
					単独(IC ₅₀)	インターフェロン (2 IU/ml)併用時	
リバビリン	抗HCV薬	400-650 nM	600-1000 mg	10-14 μM (悪い)	貧血等	76 μM	15% ↓ at 10 μM 30% ↓ at 25 μM
ミソリビン	抗リウマチ薬 (免疫抑制効果)	4-8 nM (強力)	150-300 mg	10 μM (良い)	少ない	99 μM	20% ↓ at 10 μM 50% ↓ at 25 μM

Naka K, Kato N., B.B.R.C. 2005

(1) シクロアミン系へ、および免疫抑制作用のないシクロアミン誘導体によるHCVゲノムの効果よい複製抑制

(2) インターフェロンとミソリビン併用効果によるHCVゲノム複製抑制

(3) HCV粒子を産生する細胞の樹立

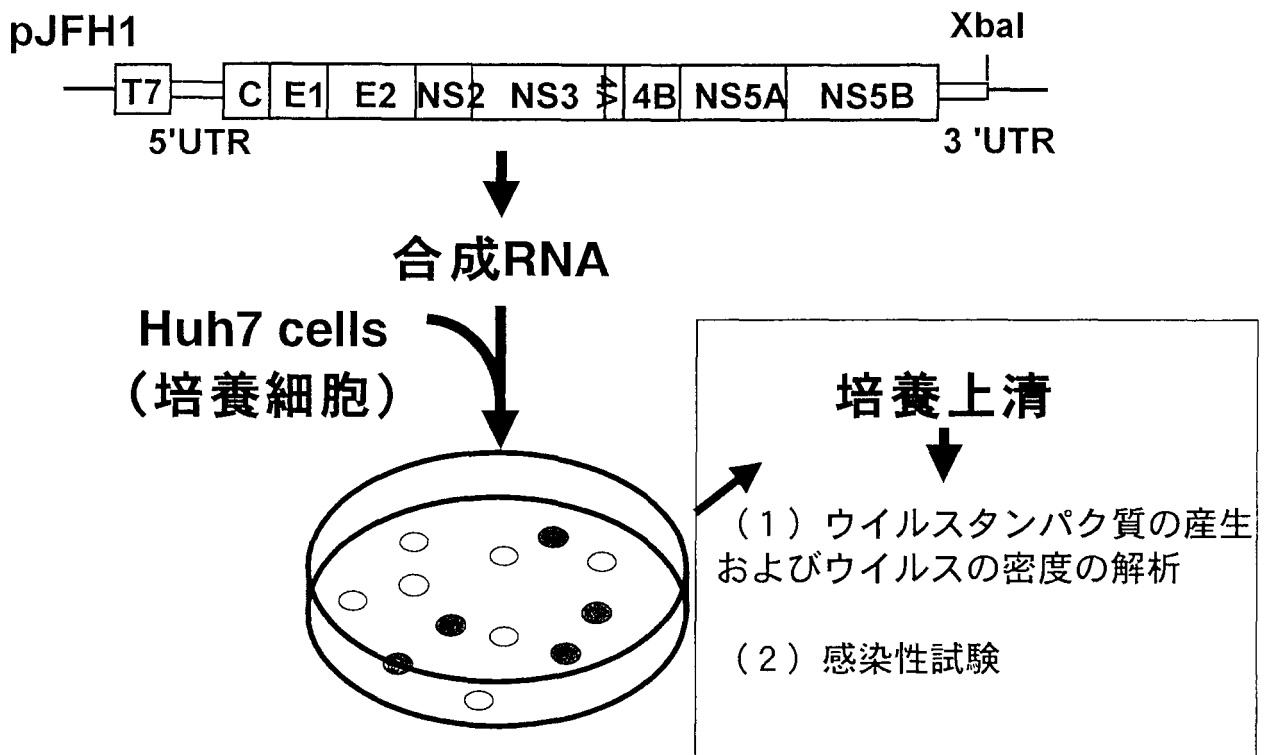
((都) 神経研 脇田等)

ウイルス粒子を産生するHCVゲノムの単離

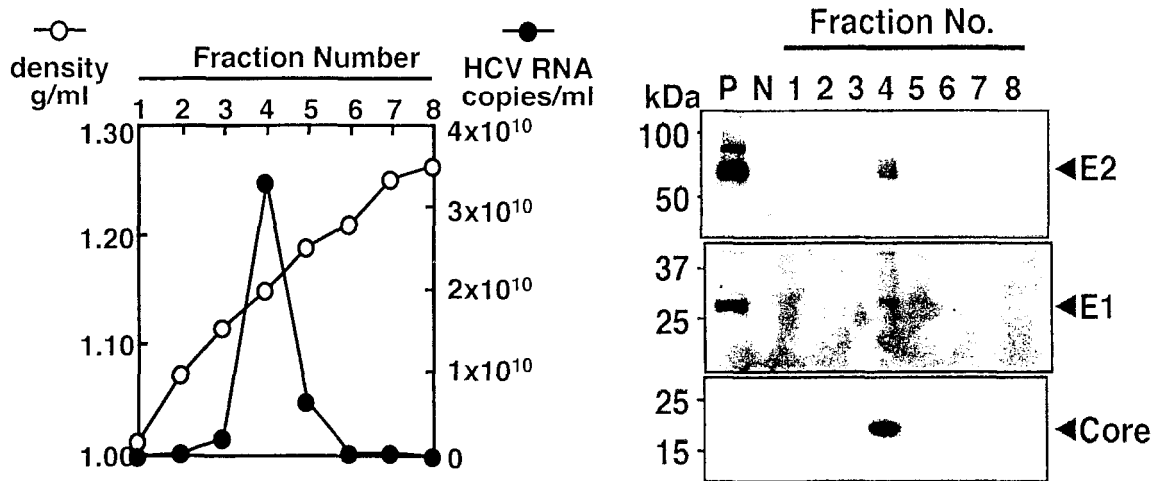
劇症肝炎患者から遺伝子型2aのHCVゲノムを単離し、そのRNAが自律複製する細胞からウイルス粒子の産生が観察された。

Kato T., Wakita T., J Med Virol 2001.
Kato T., Wakita T. Gastroenterology 2003

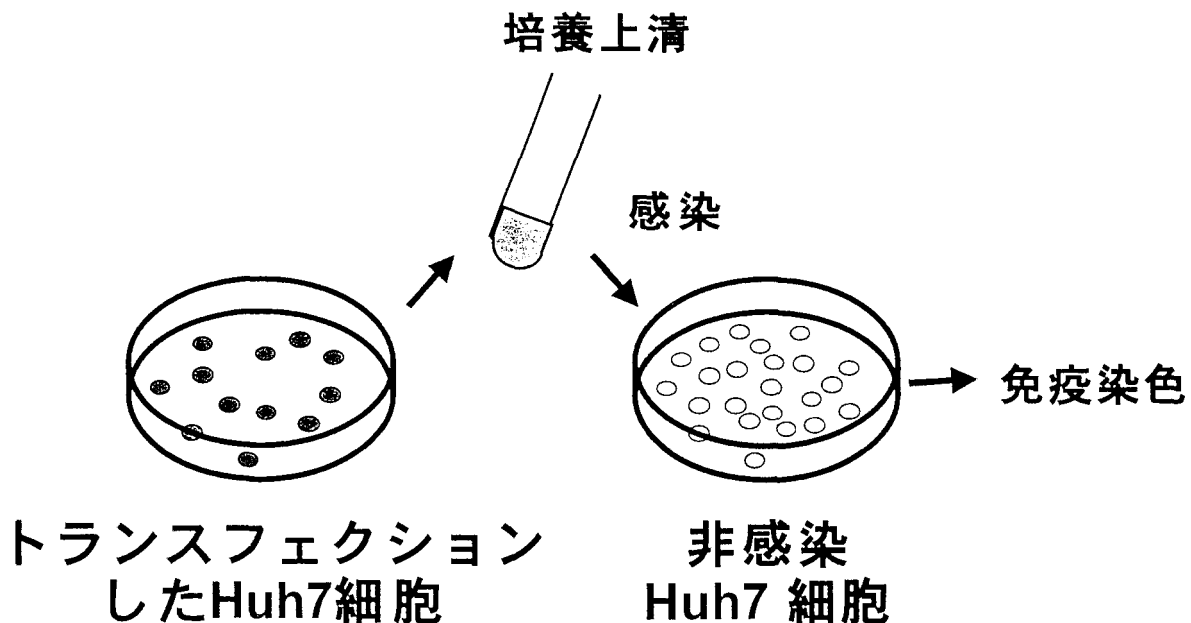
ウイルス粒子産生の検査方法



(1) しよ糖密度勾配遠心によるウイルス粒子の解析

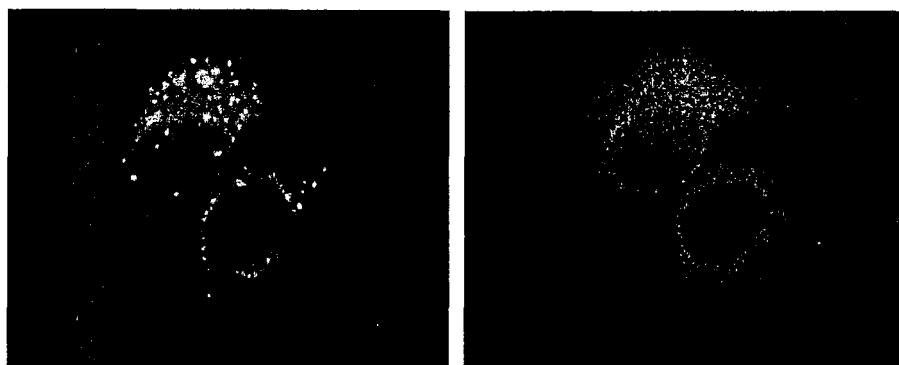


(2) 培養上清中のウイルス粒子の感染性の検討



培養上清中のウイルス粒子による感染

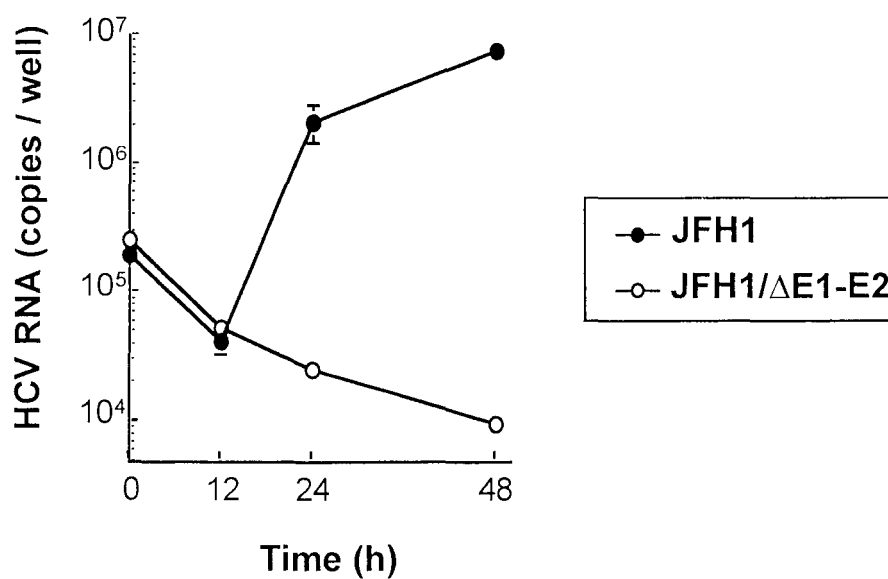
感染後48時間後の免疫染色



anti-Core

anti- NS5A

感染後の細胞内HCV RNA量の変化



発表の要旨

- (1) シクロスポリンA、および免疫抑制作用のないシクロスポリン誘導体がシクロフィリンBの機能を阻害することによりHCVゲノム複製を抑制することを示した。シクロフィリンBを標的とした抗HCV剤の開発が可能である。
- (2) インターフェロンとミゾリビン併用処理でHCVゲノム複製抑制がみられ、その効果は、インターフェロンとリバビリンの効果に匹敵するかそれよりも高い。
- (3) HCV2a遺伝子型からウイルス粒子を産生する細胞の樹立に成功した。今後、抗HCV剤の開発に重要な武器となる。