

# 1. C型肝炎治療法の進歩

鈴木 哲朗, 中島 謙治, 千田 剛士, 伊藤 昌彦

浜松医科大学感染症学講座ウイルス学・寄生虫学分野

C型肝炎ウイルス (HCV) は肝疾患の主要な原因因子で持続感染しやすく, そのキャリアは我が国だけで約 200 万人とされている。C型慢性肝炎は進行して肝細胞がん発症に至ることから, 早期に診断し HCV を除去するための抗ウイルス治療が求められる。1992 年より基軸であったインターフェロン (IFN) 療法には不耐容例, 難治例などの問題があり治療上制約があった。90 年代, 培養細胞での強制発現系また精製タンパク質を用いて個々の HCV タンパク質の性状, 機能解析が行われ, プロテアーゼ, ポリメラーゼといった創薬標的も見出された。2000 年以降, レプリコンシステム及び JFH-1 株による複製, 感染増殖細胞系の確立に伴い HCV 阻害剤スクリーニングが容易になり創薬研究は加速した。2011 年, HCV に対する初めての direct-acting antivirals (DAA) である NS3/4A プロテアーゼ阻害剤が IFN/ リバビリンとの三剤併用療法として認可された。その後, 第二世代のプロテアーゼ阻害剤また NS5A 阻害剤が登場し IFN フリー, DAA のみによる治療法も開始された。さらに NS5B ポリメラーゼ阻害剤が承認され, IFN フリー療法の選択肢も増えた。C型肝炎は「免疫応答での排除は難しいにもかかわらず, 効果的な抗ウイルス薬によって排除・治癒が期待できるようになった歴史的に初めての感染症」の局面に入ったと言える。

## 1. はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) が発見され四半世紀が経過し, 遂に (早くも, と言うべきか) 「C型肝炎は治る病気です」と言える時代に入った。HCV は持続感染性が高く, 慢性肝炎から肝硬変, 肝細胞癌へと進行する数十年に亘る慢性肝疾患の主要な原因因子である。本稿では, C型慢性肝炎の治療法の変遷, 最新の治療薬の特徴を紹介するとともに, 治療薬開発の基盤となった基礎研究の成果について簡略に述べる。

## 2. インターフェロン療法の時代

1986 年, 非 A 非 B 型肝炎患者に対してインターフェロ

ン (IFN) を投与することにより肝逸脱酵素レベルが正常化しうることが米国で示され, HCV 発見後, IFN による血中 HCV レベルの低減効果も明らかとなった。これらを踏まえ, 1992 年, C型慢性肝炎に対する IFN 単独療法が我が国で保険適応となった。IFN の抗 HCV 効果は, HCV の遺伝子型やウイルス量に依存しており, 日本人の 7 割以上, 世界的にも主要な遺伝子型である 1b の患者に対する IFN 単独投与の治療効果は 10% 以下であった。

2001 年, 核酸アナログで抗 RNA ウイルス薬として知られていたリバビリン (RBV) と IFN の併用療法が認可され, さらに 2003 年には IFN にポリエチレングリコールを付加し安定性を高め効果の持続性を高めたペグ-インターフェロン (PEG-IFN) の単独療法が, 2004 年には PEG-IFN と RBV の併用療法が開始され「遺伝子型 1b かつ高ウイルス量」の患者への著効率は約 50% にまで上昇した。

このように IFN 投与を主体とした化学療法の治療効果は向上したが, 副作用による投与中断の場合を除いても患者間での治療効果の違いは歴然と認められた。そこで, IFN 療法に対する感受性を規定する因子, 要因の解析が進められた。HCV 遺伝子配列と治療効果との関連解析から, 非構造タンパク質 NS5A 内特定領域のアミノ酸変異と IFN 感受性の相関が示され, この領域は IFN sensitivity

連絡先

〒 431-3192

静岡県浜松市東区半田山 1-20-1

浜松医科大学感染症学講座ウイルス学・寄生虫学分野

TEL: 053-435-2336

FAX: 053-435-2338

E-mail: tesuzuki@hama-med.ac.jp

region (ISDR) と名付けられた<sup>1)</sup>。さらに、NS5A の別領域に IFN/RBV 治療効果に関連する IFN/RBV resistance-determining region (IRRDR) が示され<sup>2)</sup>、Core タンパク質の特定のアミノ酸変異が IFN 治療効果に影響すると報告された<sup>3)</sup>。このようなウイルス要因とは別に、IFN の治療効果を左右する宿主ゲノム変異、一塩基多型 (SNPs) の解析が勢力的に行われ、2009 年、3 グループ (我が国、欧米) が 19 番染色体の IL28B 遺伝子近傍の SNPs と治療成績との関連を明らかにした<sup>4-6)</sup>。

### 3. HCV 阻害剤の開発に寄与した基盤的研究

IFN 製剤の安定性向上、単独使用から RBV との併用療法へと IFN を基軸とした化学療法が徐々に改良された時代、一方では、「培養できないウイルス」であった HCV の研究、特に治療薬の開発に繋がる基盤的研究が大きく進展した。90 年代初頭より、翻訳から前駆体プロセッシング、ゲノム RNA 複製といった HCV ライフサイクルの主要ステップに働くウイルス因子の同定、ウイルスタンパク質の生化学的解析が進んだ。1993 年、HCV は前駆体ポリタンパク質のプロセッシングに重要なプロテアーゼを二種類有すること、NS3 の N 末端側はセリンプロテアーゼ活性を有し NS4A と会合すること、NS3/4A プロテアーゼは NS3/4A、4A/4B、4B/5A、5A/5B 間の切断に働くことなどが明らかとなった<sup>7-11)</sup>。1996 年、HCV タンパク質として初めて NS3 プロテアーゼ領域の立体構造が解かれ<sup>12, 13)</sup>、結晶構造に基づいて、プロテアーゼの構造、活性部位における基質との会合様式などの情報が集積された。同年、NS5B が RNA 依存的 RNA 合成酵素活性を有することが *in vitro* 解析から証明された<sup>14)</sup>。これらの研究成果は NS3/4A、NS5B が抗 HCV 薬開発の標的となりうることを示しており、ウイルス酵素活性阻害を指標とした薬剤探索など抗 HCV 薬の創薬研究が開始された。

このようにウイルス因子の機能解析が進んだとは言え、HCV の培養細胞系が確立されていない当時、個別 HCV タンパク質の機能を阻害することによってウイルスの複製・産生が本当に抑制されるのか明らかにされていた訳ではない。RNA レプリコンを駆使した HCV 複製細胞系の樹立 (1999 年)<sup>15)</sup>、リバースジェネティクスによる感染性ウイルスの産生、ウイルスライフサイクル全体を再現した培養系の確立 (2005 年)<sup>16-18)</sup> は各 HCV 因子の機能が確かにウイルス複製増殖に重要であることを示し、同時に、これらの実験系は、薬剤の抗 HCV 活性を評価する上で極めて大きな役割を果たした (果たしている)。NS3/4A プロテアーゼまたは NS5B ポリメラーゼに対する阻害剤が、HCV 複製、感染性粒子産生を期待通り阻害することが示され、レプリコンシステムなどで化合物ライブラリーをランダムに評価するスクリーニングも可能となった。これにより、C 型肝炎治療薬の開発研究は加速した。

2000 年以降、抗 HCV 薬開発の標的として新たに脚光を浴びるようになったウイルスタンパク質に NS5A が挙げられる。NS5A は膜に結合するリン酸化蛋白であり、複数のセリン/スレオニン残基がリン酸化されている。HCV 複製複合体を構成しゲノム RNA の複製に必須であるとともに粒子形成にも重要な役割を果たしている<sup>19-21)</sup>。このような NS5A の機能にはリン酸化様式が深く関与することが示されている<sup>22, 23)</sup>。NS5A の N 末端側ドメイン (domain I) は小胞体等の細胞質内膜との会合部位を含みまた自身の二量体形成に重要である。この二量体化によって形成されるポケットに HCV RNA が結合するとされている。HCV のゲノム複製には NS5A と NS5B、NS4B など HCV 因子との会合また種々の宿主因子との相互作用による複合体形成が重要である。他方、我々また欧米のグループは、NS5A が、脂肪滴近傍で HCV 粒子形成の初期段階に重要な働きをすることを報告した (ref)。複製複合体で生成されたゲノム RNA を捕捉した NS5A が C 末端領域 (domain III) を介して HCV Core タンパク質と会合することが、ヌクレオキャプシド形成に貢献していると推定されている。

HCV レプリコン細胞を用いたランダムスクリーニングから見出された BMS-790052 は、培養系で pico-molar range という驚くべき抗 HCV 活性 (EC50) を示し、臨床試験でも有効性が示された<sup>24)</sup>。この化合物は、NS3/4A プロテアーゼ、NS5B ポリメラーゼを阻害しないこと、薬剤耐性に関わる HCV 変異が NS5A 領域に集中していること、実際に NS5A に結合しうることなどが示され、NS5A を標的とした新しいタイプの抗 HCV 薬であることがわかった。

### 4. DAA の登場：IFN との併用療法

HCV の基礎研究の進歩を背景に HCV 阻害剤、特に直接的抗ウイルス薬 (direct-acting antivirals ; DAA) の開発研究、C 型肝炎患者への臨床試験は大きく進展した。臨床試験過程で DAA 単剤では耐性変異の出現頻度が高いことが示されたため、IFN または IFN/RBV との併用投与による治験プロトコールが進んだ。そして 2011 年 5 月、米国 FDA は HCV に対する初めての DAA 製剤として NS3/4A プロテアーゼ阻害剤テラプレビル (Telaprevir) を PEG-IFN/RBV との併用投与として認可、我が国でも同年 11 月、同様に承認された。この治療では重篤な皮膚病変や貧血などの副作用が認められるケースはあるものの、初回治療例だけでなく、前治療 (PEG-IFN/RBV) 無効例または再燃例においても良好な治療成績が認められた。その後、2013 年、シメプレビル (Simeprevir)、2014 年にはバニプレビル (Vaniprevir) がやはり PEG-IFN/RBV との三剤併用として承認され実臨床で使用されている。テラプレビルのように直鎖型構造のプロテアーゼ阻害

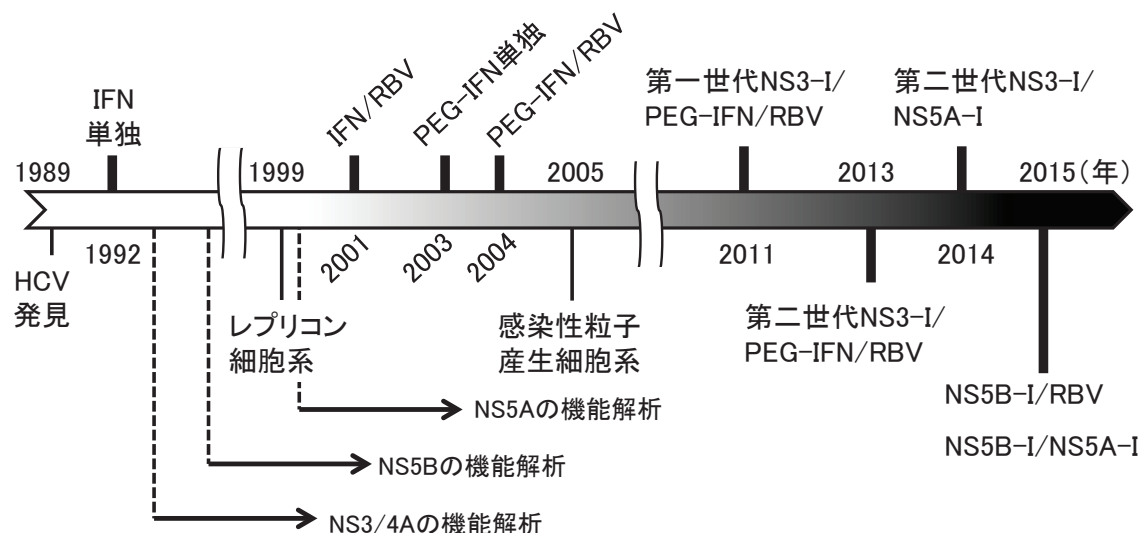


図1 C型肝炎治療法の進歩と関連する基盤的研究

C型肝炎に対する主な治療法と本邦において承認された年。

NS3-I: NS3/4A プロテアーゼ阻害剤, NS5A-I: NS5A 阻害剤, NS5B-I: NS5B ポリメラーゼ阻害剤。

剤が第一世代と呼ばれるのに対し、シメプレビル、バニプレビルなど大環状型 (macrocyclic) のプロテアーゼ阻害剤は第二世代と呼ばれている。第一世代に比べ第二世代では副作用が低減され、また少ない投与回数で効果が期待できるといった利点がある。治療効果が得られなかった際の耐性変異出現が両世代で大きな差はないとされているが、耐性 HCV 変異のプロファイリングが異なることが知られている。第一世代または第二世代のみで見られる耐性 NS3 変異が存在する反面、両世代で報告される変異も存在する。

### 5. IFN フリー治療

プロテアーゼ阻害剤 + PEG-IFN/RBV 治療は特に第二世代薬の使用で良好な成績を挙げているが、高齢者または血小板数が低値の患者では IFN の投与が困難であること、IL28B 遺伝子多型などにより IFN 治療抵抗性の症例も存在する。そのため、IFN を用いない DAA のみによる C 型肝炎治療法の開発が求められ検討されてきた。我が国では、第二世代プロテアーゼ阻害剤アスナプレビル (Asunaprevir) と NS5A 阻害剤ダクラタスビル (Daclatasvir; 開発コード BMS-790052 (上述)) が 2014 年、初の IFN フリー DAA 療法として承認された。我が国の C 型肝炎患者の多くは IFN 治療効果の低い HCV 遺伝子型 1b 感染者であり、その多くは 65 歳以上で様々な合併症を有することなど IFN 療法の選択が難しいケースが多々見られた。IFN フリー治療はこのような患者に対しても著効率 80% 以上といった高い治療成績を示しており C 型肝炎治療の重要な選択肢となりうることが示された。2015 年には NS5B ポリメラー

ゼ阻害剤が初めて認可された。使用可能となったのは核酸型 NS5B ポリメラーゼ阻害剤ソホスブビル (Sofosbuvir) であるが、これは合成、伸長反応中の HCV RNA に取り込まれて chain terminator として働きゲノム複製を阻害する。HCV の遺伝子型に関係なく阻害活性を示すことが特徴である。2015 年内に、ソホスブビルと RBV、ソホスブビルと NS5A 阻害剤レジパスビル (Ledipasvir) の各併用療法が、またプロテアーゼ阻害剤パリタプレビル (Paritaprevir) と NS5A 阻害剤オムビタスビル (Ombitasvir) にリトナビル (Ritonavir; プロテアーゼ阻害剤のブースターとして HIV 感染症治療に使われている) を組み合わせた治療法が相次いで認可された。いずれも非常に高い治療成績を示しており、慢性肝炎だけでなく代償性肝硬変 (肝機能がある程度以上保持されている肝硬変) にまで適応範囲が広がった。一方、DAA 治療においては、各阻害剤に対する耐性変異のプロファイルに注意を要することも指摘されている。ダクラタスビルに対する耐性変異として知られる NS5A 変異が DAA 未治療例の十数% で検出されることから、該当する NS5A 変異の有無を治療開始前に検査することが求められている。また、シメプレビル治療失敗例へのアスナプレビル治療が非奏功に終わる場合が多いことが知られるようになったが、これは耐性変異 (NS3 D168) を共有する薬剤での再治療が容易でないことを示唆している。

### 6. おわりに

HCV は宿主の免疫応答から逃れる仕組みを獲得し、数十年間に亘って感染し続けるウイルスである。他の多く



のウイルスは一過性感染後、宿主の免疫応答により排除され治癒される一方、HCVと同様に免疫応答によるウイルス排除の困難なHIV感染症では、現在の抗HIV療法でも潜伏感染しているウイルスの完全排除は難しく、治療を中断するとウイルスの再増殖が認められる。

では、HCVの場合はどうか？

DAAを主体とした最新の治療法では、90%以上の症例で治療後半年を経過してもウイルスRNAが検出されないと報告されているが、免疫監視機構が機能しにくいHCV感染がこのまま治癒されうるのだろうか。既感染者における免疫低下などによる再活性化の可能性は？複製効率の高い耐性ウイルスが出現する可能性は？ウイルス排除後、肝疾患の進展はストップするのか？など注視していくべき点が多い。いずれにせよ、C型肝炎は「免疫応答での排除は難しいにもかかわらず、効果的な抗ウイルス薬によって排除・治癒が期待できるようになった歴史的に初めての感染症」の局面に入ったと言える。

### 引用文献

- 1) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. 1996. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81.
- 2) El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. 2008. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47.
- 3) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. 2007. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 46:403-410.
- 4) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399-401.
- 5) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105-1109.
- 6) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798-801.
- 7) Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67:4665-4675.
- 8) Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. 1993. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 67:3835-3844.
- 9) Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10583-10587.
- 10) Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. 1993. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 67:2832-2843.
- 11) Tomei L, Failla C, Santolini E, De Francesco R, La Monica N. 1993. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 67:4017-4026.
- 12) Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA. 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87:343-55.
- 13) Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z. 1996. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 87:331-342.
- 14) Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15(1):12-22.
- 15) Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
- 16) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791-796.
- 17) Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626.
- 18) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9294-9299.

- 19) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. 2008. Interaction of hepatitis C virus non-structural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 82:7964-7976.
- 20) Appel N, Zayas M, Miller S et al.: Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. 2008. *PLoS Pathog.* 4:e1000035.
- 21) Tellinghuisen TI, Foss KI, Treadaway J. 2008. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* 4:e1000032.
- 22) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. 2014. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. *J Virol* 13:7541-7555.
- 23) Masaki T, Suzuki T. 2015. NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. *Future Virol* 10:751-762.
- 24) Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, Langley DR, Sun JH, O'Boyle DR 2nd, Lemm JA, Wang C, Knipe JO, Chien C, Colonna RJ, Grasela DM, Meanwell NA, Hamann LG. 2010. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 465:96-100.

## **Advances in drug development for hepatitis C**

**Tetsuro SUZUKI, Kenji NAKASHIMA, Takeshi CHIDA, Masahiko ITO**

Department of Infectious Diseases, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan  
tesuzuki@hama-med.ac.jp

Chronic infection with hepatitis C virus (HCV) is a global public health burden. It has been only several decades since this virus was first identified. In the meantime, a lot of progress has been made in the fight against HCV. Although the development of pegylated interferon (PEG-IFN) and its combination with ribavirin (RBV) has significantly increased effectiveness of IFN-based treatment, candidate patients must be assessed for eligibility prior to the treatment due to side effects of the regimens and the rates of sustained virological response (SVR) were only around 50%. In 2011, the protease inhibitor (PI) Telaprevir was firstly approved as a direct-acting antiviral (DAA) for hepatitis C. The second generation of PIs was subsequently introduced and, by adding PI to Peg-IFN/RBV, the SVR rates were found to be raised to up to 80%. Further, with the recent approval of the NS5A inhibitors and the NS5B polymerase inhibitors and with the SVR rates reaching 90% or greater using IFN-free, DAA combination regimens, it is now expected that the majority of patients with chronic hepatitis C can be cured of infection in the near future.

