

医研第331号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication
by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α .
(ネルフィナビルによる細胞内 HCV ウイルス増殖抑制効果
及び、インターフェロン- α との相乗効果)

氏名 常間 智



論文要旨

目的： Human immunodeficiency virus (HIV) 感染者の予後

が, highly active anti-retroviral therapy (HAART) 療法により改善し,

HIV, Hepatitis C virus (HCV) 重複感染が多い欧米において,

死亡原因として HCV 感染による肝疾患が増加

している. 重複感染者の肝炎は HCV 単独感染

者と比較し重症化しやすく, 肝硬変への移行

が速いため予後不良である. Protease inhibitor (PI) 剤を

含む HAART 療法と含まない HAART 療法では, 前者

で肝組織内 HCV-RNA 量が有意に低下したとの報

告がある. 今回 HCV replicon system を用い, HCV の

複製に対する HIV-PI 剤の作用について検討した.

方法： HCV 非構造蛋白遺伝子上流に luciferase 遺

伝子を挿入した replicon が持続複製する HCV replicon

細胞を用い, maximum plasma concentration (Cmax) を上限とし

た HIV-PI 剤希釈液を作製, 負荷 24 時間後の

luciferase 活性を測定することにより HCV-replicon 複

製の評価を行った. また PI 剤による細胞障害

性を細胞より遊離する lactate dehydrogenase (LDH) を用い

評	価	し	た	.																	
PI	剤	原	末	は	入	手	困	難	で	あ	る	た	め	,	市	販	薬				
(Atazanavir	(ATV)	,	Fosamprenavir	(FPV)	,	Indinavir	(IDV)	,	Nelfinavir	(NFV)		
Ritonavir	(RTV)	,	Saquinavir	(SQV))	を	無	菌	的	に	扱	い	,	実	験	に	
使	用	し	た	.																	
結	果	:	細	胞	障	害	性	を	認	め	な	い	濃	度	で	,	HCV-replicon				
複	製	に	対	し	,	NFV	,	RTV	,	SQV	は	抑	制	的	に	,	AZT	は	促	進	的
に	作	用	し	た	.	IDV	,	FPV	は	影	響	を	及	ぼ	さ	な	か	っ	た	.	
上	記	結	果	よ	り	,	NFV	の	原	末	を	入	手	,	経	時	的	作	用		
及	び	IFN	と	の	相	互	作	用	に	つ	い	て	検	討	し	た	.				
NFV	,	IFN	を	HCV-replicon	に	投	与	し	,	72	時	間	後	の	luciferase						
活	性	値	か	ら	,																
50%	inhibitory	concentration	(IC50)	を	算	出	し	た	.	NFV	(原	末)					
は	HCV-Replicon	複	製	に	対	し	て	濃	度	依	存	性	に	抑	制	効					
果	を	示	し	た	(IC50	=	9.88mM)	.	IC50	の	濃	度	に	お	い	て			
LDH	試	験	,	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-																	
sulfo	phenyl)-2H-tetrazolium,inner salt (MTS)	法	,	TUNNEL	染	色	法	に	て												
細	胞	傷	害	性	,	細	胞	ア	ポ	ト	ー	シ	ス	の	誘	導	を	認	め		
な	か	っ	た	.																	
IFN	は	濃	度	依	存	性	に	HCV-Replicon	細	胞	の	複	製	抑	制	効					

平成21年3月9日

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	* <u>課程博</u> 論文博	第32/号	氏名	當間 智
論文審査委員	審査日	平成 21 年 3 月 4 日		
	主査教授	森 直樹		森
	副査教授	田中 勇 俊		田中
	副査教授	宇野 司		宇野

(論文題目)

Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by nelfinavir and synergistic effect with interferon- α .

(論文審査結果の要旨)

上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

Human immunodeficiency virus (HIV) 感染者の予後が,highly active anti-retroviral therapy (HAART) 療法により改善し, HIV, hepatitis C virus (HCV) 重複感染が多い欧米において,死亡原因として HCV 感染による肝疾患が増加している. 重複感染者の肝炎は HCV 単独感染者と比較し重症化しやすく, 肝硬変への移行が速いため予後不良である. Protease inhibitor (PI) 剤を含む HAART 療法と含まない HAART 療法では, 前者で肝組織内 HCV-RNA 量が有意に低下したとの報告がある.

また, nelfinavir (NFV) は, 濃度依存性に NF- κ B の活性化を抑制し, その抑制効果は HIV-PI 剤の中で最も強かったとの報告があり, NFV は細胞内のシグナル伝達に影響を与え, 抗ウイルス効果を発揮する可能性がある. また, NFV は HIV-PI 剤の中で肝毒性が最も少ないという報告がある.

この結果より, NFV は何らかの機序で, HCV に対しても抗ウイルス効果を示す可能性があり, かつ肝毒性の少なさなどから臨床的にも有用な薬剤である可能性がある.

今回 HCV replicon system を用い, HCV の複製に対する NFV の作用について検討し, interferon(IFN) との相互作用についても検討した.

2. 研究内容

HCV 非構造蛋白遺伝子上流に luciferase 遺伝子を挿入した replicon が持続複製する HCV replicon 細胞を用い、NFV 希釈液を作製、負荷後の luciferase 活性を測定することにより HCV-replicon 複製への影響の評価を行った。また、NFV の細胞傷害性、細胞増殖抑制性及びアポトーシス誘導性の評価は、lactate dehydrogenase (LDH) 測定試験、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) 法、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine (TUNEL) 染色法にて行った。また、NFV の投与濃度ごとに、HCV-replicon の非構造蛋白領域 (non-structural region: NS5A) の発現を評価した。NFV (原末) は HCV-replicon 複製に対して濃度依存性に抑制効果を示し、有効濃度内において細胞傷害性、細胞増殖抑制性及び細胞アポトーシスの誘導を認めなかった。また、濃度依存性に NS5A の発現を抑制した。さらに NFV と IFN に関して classical isobologram を用い、その相乗効果の有無を調べたところ、相乗指数 (the combination index) は 0.9 以下となり、相乗効果を認めた。NFV は HCV の複製を抑制し、かつ IFN との相乗効果も有する可能性が示唆された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、HIV-PI 剤である NEV が HCV の複製にも抑制的に働くことを示した興味深い報告である。HIV, HCV の混合感染は今後さらに重要な問題になると考えられ、その研究は重要な研究である。かつ、その研究結果は国際的にも認められた Journal of viral hepatitis に受理された高水準のものであると評価された。よって、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。