

完全治癒を果たした抗 HCV 剤の開発

岡山大学名誉教授 加藤 宣之 (20 期 1977 年卒)

はじめに

2020 年 10 月、ノーベル生理学・医学賞に「C 型肝炎ウイルス(HCV)の発見」の功績で米研究所の Harvey Alter 博士(85)、カナダの大学の Michael Houghton 博士 (71)、米大学の Charles Rice 博士 (68)の3人が選ばれた。1970 年代に Alter 博士がウイルスの存在を提唱し、1989 年 Houghton 博士がその感染検体からウイルス遺伝子を分離し、最後に 1997 年 Rice 博士がそのウイルスの病原性を証明した功績による受賞であった。

学術上 HCV の発見は 1989 年になっている。それまでは、A 型や B 型肝炎ウイルスの予防法や診断法が確立された後にも頻発していた輸血後肝炎の原因ウイルスとして非 A 非 B 型肝炎ウイルスと呼ばれていた。この肝炎の 70-80%は慢性化し、十数年後には、その半数程度が肝硬変そして年率 7%程度で肝がんを発症する。HCV 発見当時、約 2 億人が感染していると推定されたことから、この肝炎の制圧を目指した研究が急速に展開された。そして、発見から約 30 年の時を経た 2017 年、8 週間経口摂取するだけで副作用もほとんどなく HCV をほぼ 100%体内から排除できる薬剤がついに実用化された¹⁾。

このような画期的な医療上の進歩があったことから、研究の源がノーベル賞の対象となった。しかし、ここに行き着くまでには決して平坦な道のりではなく、五里霧中で一進一退を極めた時期もあった。そんな中、一気に問題が解決するようなブレイクスルーもあった。

本稿では、画期的な抗 HCV 剤を誕生させるために奮闘した研究者達の研究の軌跡をたどりながら何が成功に導くための重要なポイントであったのかを振り返ってみることにする。

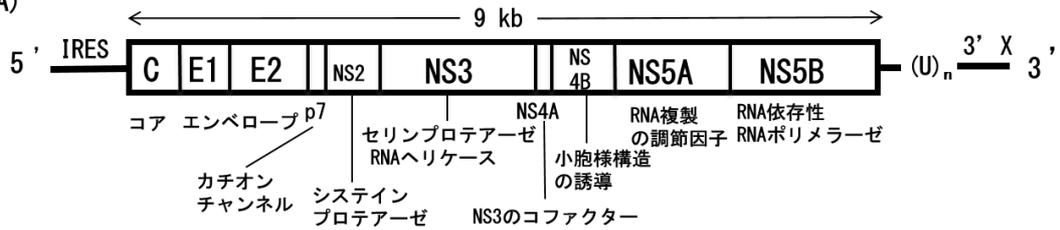
1. HCV 発見後の 10 年間に展開された研究 (1989-1998)

1989 年 4 月、Science 誌に HCV ゲノム(約 9,600 スクレオチドからなるプラス鎖の一本鎖 RNA)の一部

(約 350 スクレオチド)の情報とその遺伝子断片を酵母で発現させたタンパク質を用いて開発した HCV 抗体検査法が報告された^{2,3)}。その衝撃的な内容に多くの研究者は、HCV がついに発見されたと思った。しかし、Nature などの一部の科学雑誌は、ウイルス全体が発見された訳ではないのでウイルスとは認めない対応をとった。このような混乱があった状況下でも、日欧米を中心に HCV ゲノムの全容解明を目指した先陣争いがあった。当時、筆者は東京築地にある国立がんセンター(現・国立がん研究センター)研究所ウイルス部に厚生技官としてレトロウイルスの研究に携わっていた。しかし、厚生省(現・厚生労働省)からの強い要請によりある日を境に筆者はこの先陣争いに身を置く立場となった。当初、筆者らよりも先行する国内の研究グループもあったが、チームワークの良かった筆者らは、幸運にも 1990 年 12 月先陣を切って HCV ゲノムの全容を報告することができ注目を浴びた⁴⁾。しかし、筆者らはそれが完全ではないのではないかと気にかかり密かに研究を進めた。そして、3 年後、ゲノムの 3'末端部にユニークな 98 スクレオチド(3'X と呼ばれ、後に HCV の複製に必須であることが判明) がさらに存在していることを突き止め、1995 年に発表した⁵⁾。これにより HCV ゲノムの全容の解明に至った(図 1)。

1991 年からの数年間で HCV のゲノム解析は急速に進展し、ゲノムにコードされるタンパク質の機能やゲノムの変異性や多様性に関する多くの情報が得られた。HCV ゲノムから翻訳された前駆体タンパク質は、正確にプロセッシングされウイルスの複製に必要な C から NS5B までの 10 種類のタンパク質が出来上がる。コア(C)とエンベロープ(E1 と E2)でウイルス粒子が形成される(図1)。感度や精度の高い診断法も開発され、世界における感染状況の把握も可能になった。さらに、免疫応答や持続感染機構の解析も進み、この感染症の制圧も時間の問題かとさえ思われた。ところが、ワクチンや抗 HCV 薬の開発を阻む

HCVゲノム
(9.6 kb RNA)



HCVレプリコン
(8 kb RNA)

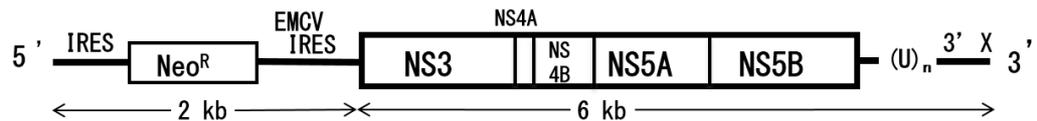


図1. HCVゲノムとHCVレプリコンの構造

二つの大きな壁に遭遇した。その一つは、HCV がヒトと稀少動物のチンパンジーでしか増殖しないことだった。筆者も含め多くの研究者が 90 年代後半から動物での肝炎モデルの開発を試みたが、すべて不成功に終わり壁を突破することはできなかった。欧米の一部の研究者は少数のチンパンジーを使うことができていたが、感染後の肝炎の状態を調べる程度の限定的なものであった。

もう一つの壁は、HCV が増殖する培養細胞がないことだった。そのため 90 年代後半から培養細胞株探しが精力的に行われた。筆者らを含め幾つかの研究グループが、HCV が若干増える培養細胞株を見つけたもののその増殖レベルは PCR 法でようやく検出できる程度の低レベルで、抗 HCV 薬の探索などに使うには程遠いものだった。そのため、研究者間ではあきらめムードが漂い、筆者らもこのような状態がいつまで続くのだろうかという不安を感じていた。

一方、この時期における C 型慢性肝炎の治療の方はどうなっていたのかというと、国内では 1991 年まで C 型慢性肝炎に対する原因療法は行われず対症療法のみであった。つまり治癒率はほぼ 0% だった。1992 年からは非特異的抗ウイルス効果を示すインターフェロン (IFN) の大量投与が行われるようになった。IFN 治療には発熱、血球減少、躁鬱病、肺炎などの副作用が認められ、決して容易な治療法ではなかった。それでも 1998 年までの 6 年間に 25 万人に投与

された。しかし、治癒率は低く 30% 程度であった。

以上述べたように、HCV 発見後の数年間は希望に満ちていたもののその後は基礎研究、臨床治療ともに大きな壁に阻まれ停滞感が漂う時期を過ごしていた。

2. HCVレプリコンの登場 (1999-2010)

1999 年 7 月、基礎研究の方で大きなブレイクスルーがあった。ドイツハイデルベルグ大の Bartenschlager 博士らのグループが培養細胞を用いた HCV レプリコンシステムの開発に成功し Science 誌に論文を発表した⁶⁾。前年の暮れに筆者は、この投稿論文を査読する機会に恵まれ計り知れない衝撃とともにこれで立ちはだかっていた壁を突破できると先を越された悔しさもありながらも思った。レプリコンシステムそれ自体は既に提唱されていた概念ではあったが、HCV で開発に成功し初めて実用的な実験ツールとして汎用されることとなった。

HCV レプリコンは、HCV ゲノムの前半部の C から NS2 領域をネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) とマウス由来の脳心筋炎ウイルス (EMCV) 由来の IRES (リボソームの内部開始機構によるエンター部位) に置換したサブゲノム構造になっている (図 1)。HCV レプリコン RNA をヒト肝がん細胞株である HuH-7 細胞内に人為的に導入しネオマイシン (G418) 存在下で培養する。2~3 週間培養すると、レプリコン RNA が自律的に複製している細胞のみが増殖してコロニーを

形成するようになる。このコロニーをさらに増やしてレプリコン細胞株として樹立すると実験ツールとして使えるようになる。ウイルス粒子が産生されないので、感染のリスクなく扱える点でも優れている。ただ、誰でもすぐにできるわけではなく、レプリコン細胞株を樹立するには様々な条件下での試行錯誤を繰り返しながらの職人的技量も必要であった。また、HuH-7は1982年岡山大学医学部で樹立された細胞株であったが、このHuH-7以外の細胞株を使うとうまくいかないという制約もあった。さらに不思議なことに国内のHuH-7細胞ではうまくいかず欧米の限られた研究室で使われていたHuH-7細胞でなければうまくいかなかった。培養細胞が世界を1周すると、その姿や性質も変わってしまうことを実感した出来事でもあった。

レプリコンが恒常的に複製している細胞内では、1細胞あたり $1\sim 5 \times 10^3$ 個ほどのレプリコンの増殖が観察され、RNAゲノムの複製増殖が再現されていた。さらに、Neo^R遺伝子のところにルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入したレプリコンも作成され、PCRではなく簡便なレポーターアッセイを行うだけで、HCVレプリコンの定量が可能になった。このようなレポーターアッセイシステムの開発により、薬剤ライブラリーの大規模探索が可能になった。HCVレプリコンシステムは、HCVの複製増殖機構の解明をもたらしたことは言うまでもなく、抗HCV剤の開発においてそれまで立ちこめていた暗雲を吹き飛ばすこととなった。ちなみに、筆者らも3年遅れではあったが、独自にレプリコンシステムやレポーターアッセイシステムを開発し、その後の研究が捗ることとなった。

HCVレプリコンが登場する前後にHCVのセリンプロテアーゼ(NS3/4A)、RNA複製の調節因子(NS5A)およびRNA依存性RNAポリメラーゼ(NS5B)の3次構造が解明され、直接作用型抗HCV剤(DAA)の開発に向けたドラッグデザインも進展していた。2000年以降は、HCVレプリコンをベースにしたアッセイシステムが稼働し抗HCV化合物の大規模な探索が活発に行われた。

そして、2003年には早くも有望なDAA候補薬が登場して来た。BILM2061というNS3/4Aセリンプロテアーゼ阻害剤は、nMレベルで切れ味のよい抗HCV活性を示し、投与された肝炎患者の血中HCV

量を劇的に減少させた。しかし、同時期に投与された健常人の一部に重篤な不整脈の副作用が生じたため、臨床試験は早々に中止となった。多額の開発費用を考えるとDAAとしての実用化の困難さを予感させる出来事でもあった。

動物を用いた肝炎モデルの方でも進展があった。2001年、ヒト肝臓キメラマウス(ヒトの肝細胞を移植した免疫不全マウス)が開発された⁷⁾。このマウスの肝臓では確かにHCVが効率良く増殖し実験に使えるレベルであった。しかし、このマウスは1匹50万円と高価で、実験の途中で死んでしまうことも多く、論文の図を1個作るだけでも数百万円を要した。そのため、ワクチンの評価や抗HCV薬の探索などには不向きで研究者間で普及することはなかった。

一方、この時期におけるC型慢性肝炎の治療成績にも多少の向上がみられた。国内では認可されていなかった非特異的抗ウイルス薬で核酸アナログであるリバビリン(RBV)が使われるようになった。1998年米国でIFNとRBVの併用療法が承認され、それに押される形で国内でも2001年12月にC型慢性肝炎の治療に限りRBVのIFNとの併用が承認された。そして治癒率も35~45%に上昇した。IFNについても改良がなされ、従来8時間程度の血中半減期が90時間以上と長いペグイレイテッド-IFN(Peg-IFN)が開発された。これにより患者の通院間隔が1週間と長くなり2004年12月に国内でもPeg-IFN・RBV併用療法が承認された。それ以後標準治療として2010年まで続いた。治癒率も50%程度に上昇した。しかし、IFNの副作用に上乗せする形でRBVによる貧血の副作用が頻発し、高齢患者特に女性には過酷な治療法であった。そのため、治療の限界感が漂っている時期でもあった。

3. DAAの登場 (2011-2015前半)

2003年に頓挫したDAA候補のBILM2061以降も研究者達は、あきらめることなくDAA候補の探索を続けていた。そして、8年後の2011年11月、ついに実用化DAAの第1号としてTelaprevir(TVR; NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤)(図2)が臨床治療に使われた。ただ、TVR単独では早期に耐性HCVが出現してしまうことから臨床においてはPeg-IFN・RBV・TVRの3剤併用療法が行われ治癒率は73%

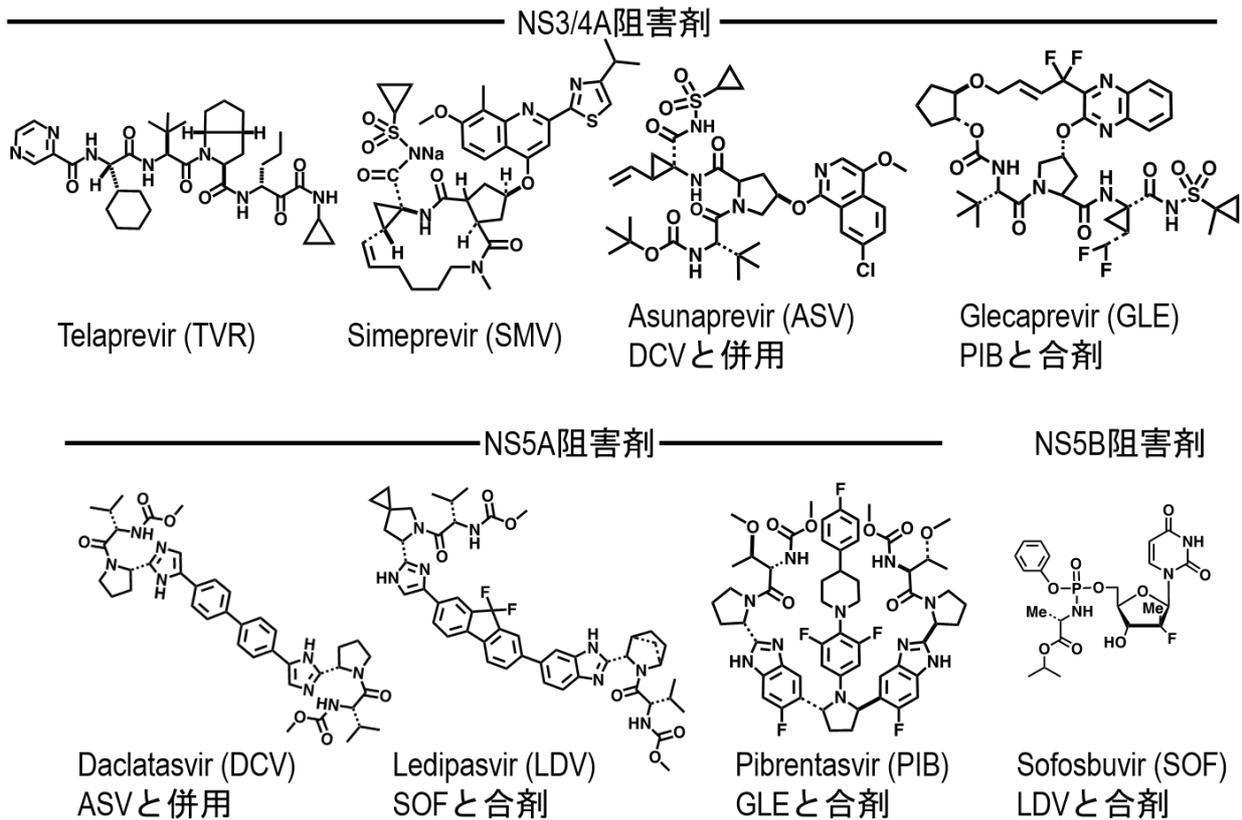


図2. DAAとして開発され汎用された抗HCV剤

に上昇した。ところが、TVR は当初、初の DAA として脚光を浴びたものの Peg-IFN・RBV 併用療法で認められる貧血や皮膚障害などの副作用がさらに強まること、特に Stevens-Johnson 症候群や薬剤性過敏性症候群などの重篤な皮疹が副作用として問題となった。そのため、皮膚科医と連携をとりながらの治療が必要とされ使い方の難しい薬剤となった。しかしその後、貧血や皮疹などの副作用が少ないプロテアーゼ阻害剤として Simeprevir (SMV) や Asunaprevir (ASV) などが開発された(図 2)。これらの DAA は直鎖構造の TVR とは異なり、分子内に環状構造あるいは分岐構造を有しているため血中薬物動態も向上していた。Peg-IFN・RBV・SMV 3 剤併用療法は 2013 年 12 月に承認され、治癒率も 85% に向上した。このように Peg-IFN・RBV に副作用の少ない DAA を加えることにより治癒率を大幅に高めることに成功した。しかし、治癒しなかった症例では DAA に対する耐性変異を持つ HCV が増殖してしまうという問題もあった。また、DAA 併用時においても Peg-IFN・RBV の副作用が軽減された訳ではないので、依然として体に負担のかかる治療法であった。さらに、高齢や

肝臓の状態などによる不適応症例や貧血などの副作用での治療中止例も少なからず認められた。そのため、副作用の強い IFN や RBV を使わずに副作用が少なく標的が異なる複数の DAA を併用すれば副作用が軽減され、そして耐性変異を持つ HCV の出現も最少化できるのではないかと考えられていた。

2014 年 7 月、IFN や RBV フリーの DAA 療法の第一号としてプロテアーゼ阻害剤である ASV と初の NS5A 阻害剤となった Daclatasvir (DCV)(図 2)との併用療法が承認された。そして、治癒率も 90% に向上した。DCV は、血中薬物動態が良好でピコモル程度の濃度で効力を示した。DCV・ASV 併用療法は IFN 不適格症例や IFN 無効症例に対しても有効で、副作用も鼻咽頭炎や頭痛など軽微なものも多く、この時点でようやく過酷な副作用から解放されることとなった。さらに、2015 年 3 月には代償性肝硬変症例に対しても承認された。一方、DCV・ASV 併用療法における治療不成功例では複数の耐性変異を持つ HCV が出現していることが問題になった。耐性変異の詳細はここでは述べないが、その後これらの耐性変異が、国内では 11~23% の頻度で治療前に

既に存在していたことが判明した。そのため、治療前に耐性変異の有無を調べて変異のない症例に対して DCV・ASV 併用療法を行うという変更がなされた。治療前に耐性変異を有する症例では、IFN 不適格症例や無効症例も多かったことから、この時点においては積極的治療を行わず、新たなタイプの DAA の登場を待つという方針がとられた。

4. 治癒率ほぼ 100%の DAA の登場 (2015 後半以降)

このような状況下、新たなタイプの DAA として登場して来たのが、NS5B RNA ポリメラーゼ阻害剤として開発された Sofosbuvir (SOF)である(図 2)。SOF はウラシルのアナログで最初から一リン酸を構造中に含むようにデザインされたプロドラックである。律速段階になる最初のリン酸基がすでに付与されているため、容易に三リン酸化を受け、チェーンターミネターとして強い抗 HCV 効果を示す。ほぼ同時期に NS5A 阻害剤の DCV とは異なる種類の Ledipasvir (LDV)(図 2)も開発され、SOF と LDV との合剤として使用された。慢性肝炎患者や代償性肝硬変症例の臨床試験での治癒率は 99%と非常に良好であった⁸⁾。国内では 2015 年 8 月に承認された。この DAA に対する耐性変異は稀で、咽頭炎、貧血、頭痛などの副作用も軽微であり投与期間もこれまでの半分の 12 週間となった。その後、問題となっていた耐性変異にも有効な NS5A 阻害剤として Elbasvir (EBR)、Pibrentasvir (PIB)および Velpatasvir (VEL) が開発され、NS3/4A プロテアーゼ阻害剤についても、新たに Grazoprevir (GZR)や Glecaprevir (GLE)が開発された。これらの DAA は EBR/GZR 合剤、PIB/GLE 合剤および SOF/VEL 合剤として、それぞれ 2016 年 9 月、2017 年 9 月および 2019 年 1 月に承認され治癒率も 100%に近く現在に至っている。特に PIB/GLE 合剤(図 2)は、8 週間の投与で良いことから現在主流になっている。

副作用もほとんどなく治癒率もほぼ 100%と C 型慢性肝炎患者から容易にそして完全に HCV を排除できる時代になった。しかしながら、これですべてが解決した訳ではなく、DAA 投与により治癒した方々から年率 3%程度(未治療では年率 7%程度)で肝がんが発生することが判っている。つまり、HCV が排除さ

れる前に微小ながんがすでに存在していたことを示している。肝がんの 10 年生存率は依然として 10%(2017 年統計)と厳しいことから、肝がん発症を抑止する方策を見出す研究が今後も必要である。

また、DAA 治療には数百万円かかる。国内では助成制度があり個人の負担は月 2 万円だが、医療保険の財政を圧迫している。コストパフォーマンスは抗がん剤などよりはるかに良いが、安価で効果の高い薬剤開発の公的研究費による支援も必要である。

おわりに

本稿では、HCV の発見から画期的な抗 HCV 剤の開発までの約 30 年間においてなされた基礎研究とそれに伴いどのように抗 HCV 療法が進歩して完全治癒が達成されたのかを経時的に紹介した。

読者の皆さんも「HCV レプリコンの開発」が抗 HCV 剤の開発史上最大のブレイクスルーであったことを納得されたのではないかと思う。実際、この功績により 2016 年 C 型肝炎の創薬に対して、レプリコンの開発者である Bartenschlager 博士にラスカー賞が授与された。ノーベル賞受賞者の Rice 博士と SOF の開発者の Sofia 博士にも同時に授与されている。実は、2000 年にも HCV の発見に対して、ノーベル賞受賞者の Alter 博士と Houghton 博士にラスカー賞が授与されている。C 型肝炎という単一分野での 2 度のラスカー賞は異例なことである。

しかしながら、これですべてが解決という訳ではない。HCV は現在大流行している SARS-CoV-2 と比較しても桁違いに変異性が高く多様性に富むことから多くの努力にもかかわらず HCV に対するワクチンの実用化は現在も程遠い状況になっている。

結局のところ、HCV を体内から完全に排除できたのは、HCV ゲノムの複製に関わるウイルスタンパク質(NS3/4A、NS5A および NS5B)の機能を特異的に阻害する DAA が開発されたからだと言える。このことは、HCV と同じ一本鎖で+鎖 RNA をウイルスゲノムとする SARS-CoV-2 に対する今後の抗ウイルス戦略においても大いに参考にすべき点ではないかと思う。SARS-CoV-2 については、ワクチンが実用化されているが、免疫を回避できる変異株が次々と出現して新しいワクチンとのイタチごっこになりそうな状況になっている。SARS-CoV-2 についてもレプリコンが最近

開発されており感染のリスクなく薬剤の大規模スクリーニングが可能になっている。近い将来、SARS-CoV-2 に対する特異的 DAA の開発も成し遂げられるのではないかと期待される。

文献

- 1) S. Zeuzem. et al. *N. Engl. J. Med.* 378, 354-369 (2018)
- 2) QL. Choo. et al. *Science* 244, 359-362 (1989)
- 3) G. Kuo. et al. *Science* 244, 362-364 (1989)
- 4) N. Kato et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9524-9528 (1990)
- 5) T. Tanaka et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 744-749 (1995)
- 6) V. Lohmann et al. *Science* 285, 110-113 (1999)
- 7) DF. Mercer et al. *Nature Med.* 7, 927-933 (2001)
- 8) M. Mizokami et al. *Lancet Infect. Dis.* 15, 645-653 (2015)

同窓会 HP:2022 年 10 月 21 日公開