

薬剤間の相互作用を考慮した C型肝炎治療薬の拮抗/相乗関係の推定

伊藤 悠介¹, 小泉 吉輝², 渡土 幸一³, 岩見 真吾⁴

¹九州大学大学院システム生命科学府数理生物学研究室

²国立国際医療研究センター

³国立感染症研究所ウイルス第二部

⁴九州大学理学研究院生物科学部門数理生物学教室

Yusuke Ito¹, Yoshiki Koizumi², Koichi Watashi³, Shingo Iwami⁴

¹Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University

²National Center for Global Health and Medicine

³Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

⁴Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University

1 はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は、肝細胞癌を誘発する主要な原因ウイルスである [1]. この HCV に慢性感染している患者数は日本国内で 150 万人・世界で 1.7 億人であり [1,2], 現在 HCV 感染機構の理解と治療が希求されている. ここで HCV が肝細胞内で増殖するためには、タンパク質翻訳過程と自身の遺伝情報である RNA 複製過程が重要である [3]. この重要な過程を阻害する治療薬が直接標的薬であり [1], 劇的な治療成果を挙げている [2]. 例えば, 2015 年に承認されたソホスブビルとレジパスビルによる多剤療法では, 国内第 3 相試験で血中 HCV RNA 持続陰性化 100%であった [2]. このように近年, 直接標的薬を併用する多剤療法は非常に注目され, 臨床現場でも応用されている.

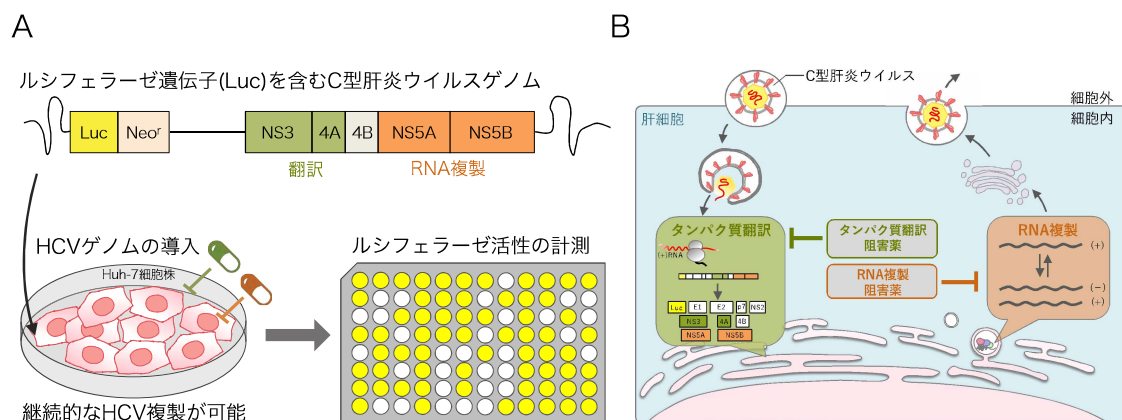


図 1: (A) C型肝炎ウイルス感染実験の概要 (B) 直接標的薬の作用機序

しかしながら直接標的薬を併用すると、薬剤同士で相互作用することがこれまでに報告されている [2]. これにより投与した薬剤濃度と実際に作用する細胞内の薬剤濃度 (実効薬剤濃度) が異なる可能性がある. 従って、抗ウイルス効果を正確に評価するためには、実効薬剤濃度を考慮することが必要になる. そこで本研究では、近年提唱された薬剤間の相互作用を考慮した実効薬剤濃度モデル [4] を用いて、C 型肝炎ウイルス治療薬の直接標的薬 2 剤の相互作用を推定した.

2 C 型肝炎ウイルス感染実験と相互作用を記述する薬剤濃度モデル

2.1 C 型肝炎ウイルス感染実験

本実験では、HCV レプリコンシステムと直接標的薬 6 種類を用いて HCV 感染実験を行い、抗ウイルス効果に関する実験データを取得した [5]. HCV レプリコンシステムでは、用いた HCV がウイルス増殖に必須のタンパク質翻訳領域と RNA 複製領域を含むよう作製された (図 1A). これにより、培養細胞中で持続的な HCV 複製が可能となる. また使用した直接標的薬はウイルス複製に重要なタンパク質翻訳と RNA 複製を直接阻害し (図 1B), 6 種類の濃度 ($IC_{50} \times 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4$) を使用した. そのため、本実験では薬剤濃度依存的に HCV 複製を抑制することができる.

薬剤による抗ウイルス効果を測定するために、本実験ではルシフェラーゼアッセイを用いた [5]. ルシフェラーゼ遺伝子は HCV ゲノムに含まれるため、HCV が複製すればするほどルシフェラーゼ活性が上昇する (図 1A). 従って、本実験ではルシフェラーゼ活性の大小で直接標的薬の抗ウイルス効果を定量することができる. なお本実験では、6 つの薬剤濃度を用いた時のルシフェラーゼ活性をそれぞれ取得した.

2.2 実効薬剤濃度モデル：薬剤間の相互作用を考慮する

本研究では、実際に細胞内で機能する薬剤濃度 (実効薬剤濃度) を考慮した数理モデルを用いて解析を行う [4]. これは、C 型肝炎治療薬同士の相互作用は複雑に制御されていて、その全てを数理モデル化することが困難であるためである. 例えば、RNA 複製阻害薬であるソホスブビルとレジパスビルは、細胞膜上にある共通の輸送体を競合する [2]. そのため本モデルでは、薬剤同士が相互作用することによって、実効薬剤濃度が変化することを考慮している. ここで、薬剤 2 存在下で薬剤 1 の細胞内のダイナミクスは次のように記述される：

$$\frac{d}{dt}D_{1,in} = k_1(D_{1,ex} - D_{1,in}) - (\Delta k_2 + k_2)D_{1,in}. \quad (1)$$

$D_{1,in}$, $D_{1,ex}$ はそれぞれ細胞内、細胞外の薬剤 1 の薬剤濃度である. また、 k_1 , k_2 は濃度勾配に従う細胞内への流入、細胞外への流出・薬剤物質の分解をそれぞれ表す. ここで Δk_2 は、薬剤 2 が薬剤 1 に相互作用することで与える影響である. 薬剤 2 による相互作用がある場合とない場合における薬剤 1 の細胞内の定常状態は次式で得られる：

$$\frac{D_{1,in}^*(\Delta k_2)}{D_{1,in}^*(0)} = \frac{D_{1,eff}}{D_1} = \frac{1}{1 + \frac{\Delta k_2}{k_1 + k_2}} = \frac{1}{1 + g(D_2)}. \quad (2)$$

D_1 は薬剤 1 の投与濃度を意味する. さらに式 (2) の $g(D_2)$ にミカエリスメンテンの式を適用することで、実効薬剤濃度モデルが得られる [4]：

$$D_{1,eff} = D_1 \frac{1}{1 + a_{12} \frac{D_{2,eff}}{IC_{50,2} + D_{2,eff}}}, \quad (3)$$

$$D_{2,eff} = D2 \frac{1}{1 + a_{21} \frac{D_{1,eff}}{IC_{50,1} + D_{1,eff}}}. \quad (4)$$

$D_{1,eff}$, $D_{2,eff}$ は薬剤 1, 2 の実効薬剤濃度であり, a_{12} , a_{21} はそれぞれ薬剤 2 による薬剤 1 への相互作用, 薬剤 1 による薬剤 2 への相互作用を示している. また a_{ij} は相互作用の種類を表す. 例えば $a_{ij} > 0$ の時, 式 (3), (4) より $D_{1,eff} < D1$, $D_{2,eff} < D2$ が成り立つ. これは, 投与濃度 ($D1$, $D2$) よりも実効薬剤濃度 ($D_{1,eff}$, $D_{2,eff}$) が小さいため, 薬剤 1, 2 は拮抗関係であることを示す. 従って, $a_{ij} > 0$, $a_{ij} < 0$ は拮抗関係と相乗関係をそれぞれ表す.

実効薬剤濃度を用いて直接標的薬 2 剤の抗ウイルス効果を評価する. ここで薬剤 1, 2 の抗ウイルス効果は, 次式で定義できる:

$$F = \frac{IC_{50,1}^{m_1}}{IC_{50,1}^{m_1} + D_{1,eff}^{m_1}} \frac{IC_{50,2}^{m_2}}{IC_{50,2}^{m_2} + D_{2,eff}^{m_2}} \quad (5)$$

各薬剤の抗ウイルス効果は広く用いられるヒル関数が適用され, 2 剤の時の抗ウイルス効果はその積で表される [4, 5]. なお $IC_{50,1}$, $IC_{50,2}$ は薬剤 1, 2 の 50% 阻害濃度であり, m_1 , m_2 は薬剤 1, 2 のヒル係数をそれぞれ表す. $IC_{50,1}$, $IC_{50,2}$, m_1 , m_2 は Koizumi Y et al[5] で推定されたパラメータを用いた. 推定された a_{ij} から, 薬剤間の拮抗/相乗効果を議論する.

3 結果

3.1 IIP を用いた実効薬剤濃度モデルの有用性の検証

定量的な抗ウイルス評価指標である IIP を用いて, 実効薬剤濃度モデルの有用性を示す. ここで IIP とは抗ウイルス効果を評価する指標であり, 次の式で記述される [5, 6]:

$$IIP = \text{Log}\left(\frac{1}{F}\right).$$

例えば $IIP = 1$ は $F = 0.1$ であり, HCV 複製を 10 倍抑制したことを意味する. このように IIP を用いる事で, 定量的に直接標的薬 2 剤の抗ウイルス効果を評価する事が可能となる.

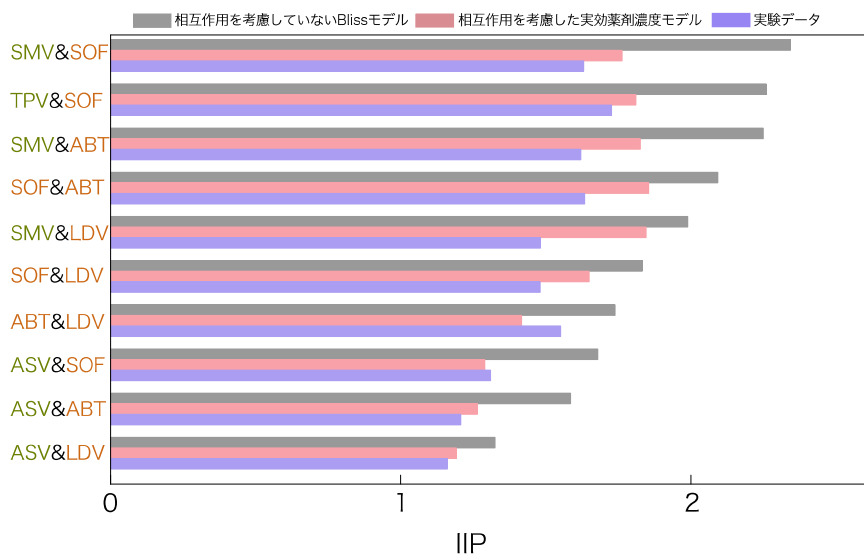


図 2: IIP を用いた抗ウイルス効果の比較

図 2 は、薬剤間相互作用を考慮していない Bliss モデル (黒) と実効薬剤濃度モデル (赤), 実験結果 (青) のそれぞれの IIP を示している. これより, 実効薬剤濃度モデルが実験結果を詳細に再現できることを確認した. つまり, これは実効薬剤濃度モデルが直接標的薬 2 剤の抗ウイルス効果を予測するのに有用であることを示唆している. また興味深いことに従来の薬剤間の相互作用を考慮しない Bliss モデルは, 抗ウイルス効果を常に過大評価することが明らかとなった. 例えば, シメプレビル (SMV) とソホスブビル (SOF) 2 剤の Bliss モデルの予測は 2.34 である一方, 実験値は 1.63 であった. これは 5 倍 ($= 10^{(2.34-1.63)}$) 抗ウイルス効果を過大評価していることを示唆している. さらに, 他の全 9 種類の場合も同様に Bliss モデルが抗ウイルス効果を過大評価していることが明らかとなった.

3.2 直接標的薬の相互作用ネットワークの推定

得られた a_{ij} を用いて, 直接標的薬の拮抗/相乗関係ネットワークを推定した (図 3). ここで赤矢印が拮抗関係, 青矢印が相乗関係を表す. 矢印の向きと太さは, それぞれ相互作用の向きと強さを意味している. また, 橙色が RNA 複製阻害薬, 緑色がタンパク質翻訳阻害薬を指す. 興味深いことに, 直接標的薬が同じ複製過程を阻害する薬剤同士は拮抗関係にあることが示唆された (図 3). 例えば, 互いに RNA 複製を阻害する治療薬であるソホスブビル (SOF) とレジパスビル (LDV) は, 拮抗関係であることが明らかとなった. この結果は臨床的知見とも合致していることを確認した [2]. さらに, タンパク質翻訳阻害薬と RNA 複製阻害薬を用いた場合は相乗関係になる傾向も示唆された (図 3).

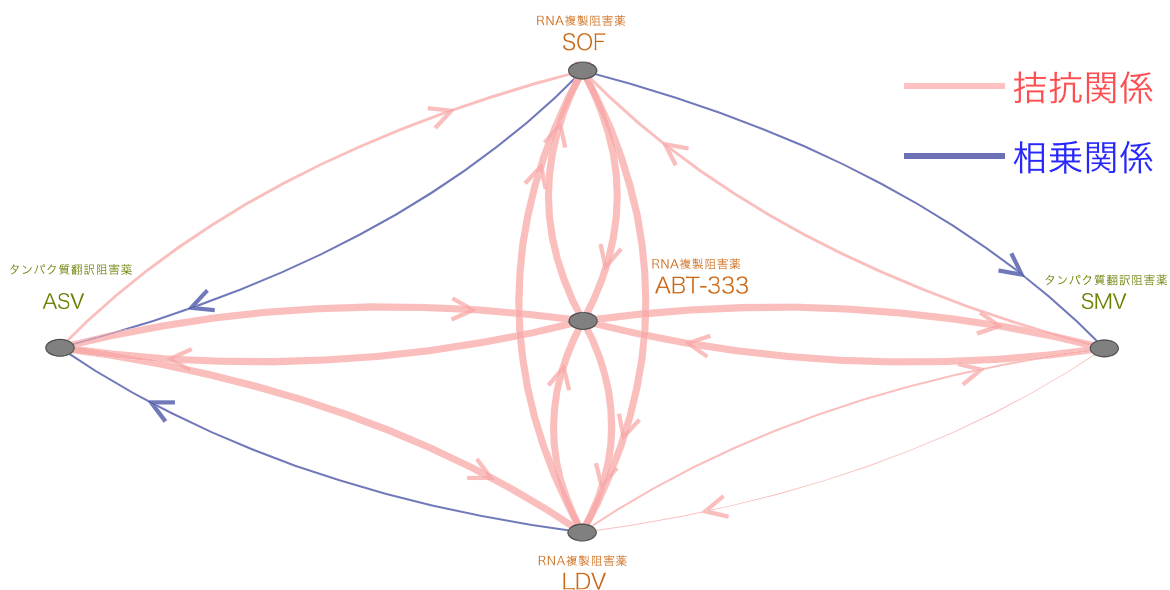


図 3: 推定された直接標的薬の相互作用ネットワーク

4 まとめ

本研究では実効薬剤濃度モデルを用いて, C 型肝炎ウイルス (HCV) 治療薬の直接標的薬 6 種計 10 通りの抗ウイルス効果を解析した. 興味深いことに, 実効薬剤濃度モデルでは HCV 直接標的薬

2 剤の抗ウイルス効果を詳細に評価できることを明らかにした。これにより細胞内で実際に作用する薬剤濃度の予測が可能となり、多剤療法における適切な薬剤投与濃度を考慮する重要な知見になりうる (引用) また、直接標的薬の拮抗/相乗作用ネットワークを推定した。特に同じ RNA 複製過程を阻害する直接標的薬同士は拮抗関係になることが示唆された。例えば、RNA 複製阻害薬であるソホスブビル (SOF) とレジパスビル (LDV) が拮抗関係にある結果は臨床的知見と合致している [2]。具体的には、肝細胞膜上にある P 糖タンパク質を競合して利用するため、細胞内濃度が減少することが既に報告されている [2]。さらに今後は、全 15 種類の HCV 治療薬 2 剤の相互作用を推定する。そして臨床現場で主流の 3 剤併用時の相互作用についても解析を行う予定である。

謝辞 本研究は九州大学による QR プログラム、博士後期課程奨学金の助成を受けています。

参考文献

- [1] Scheel TK, Rice CM (2013) Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 19(7):837849.
- [2] 肝炎診療ガイドライン作成委員会 (2018) C 型肝炎治療ガイドライン (第 6.1 版) 日本肝臓学会
- [3] Manns MP et al. (2007) The way forward in HCV treatment- finding the right path. *Nat Rev Drug Discov* 6(12):991-1000
- [4] Zimmer A et al. (2016) Prediction of multidimensional drug dose responses based on measurements of drug pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(37):10442-7
- [5] Koizumi Y et al. (2017) Quantifying antiviral activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(8):1922-1927
- [6] Shen L et al. (2008) Dose-response curve slope sets class-specific limits on inhibitory potential of anti-HIV drugs. *Nat Med* 14(7):762-6