

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15420

研究課題名(和文) 生体高分子シミュレーションによる抗ウイルス薬耐性化仮想アッセイシステムの構築

研究課題名(英文) Application of molecular dynamics simulation to construct of virtual assay system of antiviral drug resistance

研究代表者

坂本 直哉 (Sakamoto, Naoya)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10334418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、分子動力学解析法により、DAAの標的蛋白との結合モデルを構築し、ウイルス薬耐性変異が標的結合性、複合体安定性に与える影響を解析し、HCV replicon細胞を用いたデータとの関連解析をおこなった。シミュレーションにより、NS5A2量体が安定して小胞体膜上に局在するための最適構造を確定した。分子動力学シミュレーションで得られた仮説(モデル)を検証するためにNS5A阻害薬に対する耐性変異を有するHCV repliconおよびHCV genotype 1b培養系を構築し、増殖能および薬剤感受性を解析し、シミュレーションでの結合安定性と薬剤感受性が逆相関することが確認した。

研究成果の概要(英文)：We conducted molecular dynamics simulation assay to construct docking models of direct acting antivirals and the target viral protein and studied effects of resistance-associated mutations of the viral protein on the drug-protein binding affinity and the drug resistance. We further conducted in-vitro HCV replicon cell culture system and confirmed significant association of the calculated binding affinity and the phenotypic drug resistance. We confirmed that NS5A-P32del resistance mutation acquires strong resistance to all clinically available NS5A inhibitors in vitro.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ウイルス肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

近年 C 型肝炎ウイルス感染に対し、ウイルス蛋白を直接標的とした DAA(Direct Acting Antivirals)が開発され、ウイルス駆除率は約 90%まで向上した。しかしウイルス駆除不成功例での薬剤耐性ウイルスの出現が新たな治療抵抗因子となり、個々の症例における DAA の効果、耐性ウイルス出現を精緻に予測することが至急の課題である。NS5A 阻害薬 Daclatasvir とプロテアーゼ阻害薬 Asunaprevir の併用療法では、85%でウイルス駆除が得られる一方、治療前 NS5A 蛋白に L31V または Y93H のどちらかの耐性変異が存在するとウイルス駆除率が 50%以下に低下する(Karino, J Hepatol 2013)。しかし NS5A 阻害薬と NS5A 分子との正確な結合構造および耐性変異の影響が十分に解析されていないことから、耐性出現を予測することはきわめて困難である。

近年スーパーコンピュータなど計算能の飛躍的な進歩に伴い、蛋白・核酸など高分子の挙動と小分子薬剤との結合動態を精緻に解析する分子動力学シミュレーションが可能となった。申請者らは同手法を用いて NS5A 蛋白、小胞体膜、Daclatasvir をモデル化したシミュレーションを施行し、NS5A が予測された立体構造を保ちつつ安定な二量体を形成し小胞体膜状に局在することを確認した。

## 2. 研究の目的

申請者らは本研究において、高速コンピュータを用いた分子動力学シミュレーションにより(1)NS5A 阻害薬、NS3 プロテアーゼ阻害薬とそれぞれの標的蛋白との高精度の動的結合モデルを構築し、(2)薬剤耐性変異が標的結合性、複合体安定性に与える影響を解析、さらに(3)得られた結果を、標的蛋白(NS3, NS5A)に変異を導入した HCV replicon 細胞を用いた増殖・薬剤耐性レベルの解析で確認する。以上の研究で得られた知見より、個々の DAA 治療症例における治療効果、耐性変異出現を精緻に予測できる仮想アッセイシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) NS5A, NS3 蛋白、核酸、DAA 分子のモデリングと分子動力学シミュレーション

HCV-NS5A 蛋白は小胞体局在蛋白であり細胞内では二量体として存在する。NS5A 阻害薬(Daclatasvir)は、複数の HCV ゲノタイプに対し強い抑制効果を有する。NS5A 蛋白二量体および NS5A 蛋白-NS5A 阻害薬複合体の細胞内における動態、相互の分子間相互作用、およびアミノ酸変異存在時の変化を予測するた

め、分子動力学シミュレーションを施行する。(2) HCV replicon 細胞を用いた変異 NS5A, NS3 蛋白の増殖、抗ウイルス効果に与える影響の解析

分子動力学シミュレーションで得られた仮説(モデル)を検証するために HCV replicon 系で確認実験を行う。i. HCV プラスミド(JFH1, TPF1)への耐性変異の導入、ii. 変異 HCV クローンの細胞内増殖、ウイルス分泌レベルの比較解析、iii. 変異 HCV クローンのインターフェロン感受性の解析、iv. インターフェロンシグナル抑制分子(SOCS1, SOCS2, UPF1, IL-6, TNF )の定量解析

## 4. 研究成果

分子動力学解析法により、HCV を標的とした Direct acting antivirals とそれぞれの標的蛋白との動的結合モデルを構築し、ウイルス薬剤耐性変異が標的結合性、複合体安定性に与える影響を解析、さらに得られた結果を、標的蛋白に変異を導入した HCV replicon 細胞を用いた増殖・薬剤耐性レベルの解析で確認することを目的として研究を遂行し以下の結果を得た。

(1) HCV-NS5A 蛋白は小胞体局在蛋白であり細胞内では二量体として存在する。NS5A 蛋白と NS5A 阻害薬分子、小胞体核酸、DAA 分子のモデリングと分子動力学シミュレーションを実施し、NS5A2 量体が安定して小胞体膜上に局在するための最適構造を確定した。(2) 未だ正確な結合構造があきらかにされていない NS5A 阻害薬 Daclatasvir と NS5A2 量体の結合構造をシミュレーションしたところ、薬剤耐性変異 L31, Y93 アミノ酸残基の近傍に結合が安定化することを確認した。(3) 分子動力学シミュレーションで得られた仮説(モデル)を検証するために NS5A 阻害薬に対する耐性変異を有する HCV replicon および HCV genotype 1b 培養系を構築し、増殖能および薬剤感受性を解析し、シミュレーションでの結合安定性と薬剤感受性が逆相関することが確認された。(4) NS5A 阻害薬に高度耐性となる P32 欠損変異を導入した HCV replicon および HCV 培養系を用いて、現在臨床使用可能な薬剤全てが強度耐性となることを確認した。

本研究の成果により、今後数多く導入される DAA プロトコルの症例に応じた適切な選択と適用決定のためのエビデンスを構築できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 22 件)

1. Sho T, Suda G, Nagasaka A, Yamamoto Y,

- Furuya K, Kumagai K, Uebayashi M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Onodera M, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Kawagishi N, Ohara M, Ono Y, Nakai M, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Safety and efficacy of sofosbuvir and ribavirin for genotype 2 hepatitis C Japanese patients with renal dysfunction. *Hepatology* 2018; Epub ahead of print. (査読有)
2. Suda G, Ogawa K, Morikawa K, Sakamoto N: Treatment of hepatitis C in special populations. *J Gastroenterol* 2018; Epub ahead of print. (査読有)
  3. Nakai M, Ogawa K, Takeda R, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Umemura M, Ito J, Sho T, Suda G, Morikawa K, Sakamoto N: Increased serum C-reactive protein and decreased urinary aquaporin 2 levels are predictive of the efficacy of tolvaptan in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2018; 48:E311-E319. (査読有)
  4. Suda G, Ito J, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Okamoto M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Yoshida J, Meguro T, Ohara M, Kawagishi N, Kimura M, Umemura M, Izumi T, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Add-on effects of fluvastatin in simeprevir/ pegylated-interferon/ribavirin combination therapy for patients with genotype 1 hepatitis C virus infection: A randomized controlled study. *Hepatology* 2018; 48:E146-E154. (査読有)
  5. Suda G, Furusyo N, Toyoda H, Kawakami Y, Ikeda H, Suzuki M, Arataki K, Mori N, Tsuji K, Katamura Y, Takaguchi K, Ishikawa T, Tsuji K, Shimada N, Hiraoka A, Yamsaki S, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Kudo M, Nagasaka A, Furuya K, Yamamoto Y, Kato K, Ueno Y, Iio E, Tanaka Y, Kurosaki M, Kumada T, Chayama K, Sakamoto N: Daclatasvir and asunaprevir in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection: a nationwide retrospective study in Japan. *J Gastroenterol* 2018; 53:119-128. (査読有)
  6. Hontani K, Tsuchikawa T, Hiwasa T, Nakamura T, Ueno T, Kushibiki T, Takahashi M, Inoko K, Takano H, Takeuchi S, Dosaka-Akita H, Kuwatani M, Sakamoto N, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Shimada H, Shichinohe T, Hirano S: Identification of novel serum autoantibodies against EID3 in non-functional pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 2017; 8:106206-106221. (査読有)
  7. Maehara O, Suda G, Natsuizaka M, Ohnishi S, Komatsu Y, Sato F, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Shimazaki T, Kimura M, Asano A, Fujimoto Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Naganuma S, Whelan KA, Nakagawa H, Nakagawa K, Takeda H, Sakamoto N: Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2017; 38:1073-1083. (査読有)
  8. Sakurai F, Kunito T, Takayama K, Hashimoto R, Tachibana M, Sakamoto N, Wakita T, Mizuguchi H: Hepatitis C virus-induced innate immune responses in human iPS cell-derived hepatocyte-like cells. *Virus Res* 2017; 242:7-15. (査読有)
  9. Arima Y, Ohki T, Nishikawa N, Higuchi K, Ota M, Tanaka Y, Nio-Kobayashi J, Elfeky M, Sakai R, Mori Y, Kawamoto T, Stofkova A, Sakashita Y, Morimoto Y, Kuwatani M, Iwanaga T, Yoshioka Y, Sakamoto N, Yoshimura A, Takiguchi M, Sakoda S, Prinz M, Kamimura D, Murakami M: Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife* 2017; 6:e25517. (査読有)
  10. Kawagishi N, Suda G, Onozawa M, Kimura M, Maehara O, Ohara M, Izumi T, Umemura M, Ito J, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C. *J Viral Hepat* 2017; 24:1098-1106. (査読有)
  11. Sho T, Nakanishi M, Morikawa K,

- Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Umemura M, Ito J, Nakai M, Suda G, Ogawa K, Chuma M, Meguro T, Nakamura M, Nagasaka A, Horimoto H, Yamamoto Y, Sakamoto N: A Phase I Study of Combination Therapy with Sorafenib and 5-Fluorouracil in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Drugs R D* 2017; 17:381-388. (査読有)
12. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Komori A, Toyoda H, Kumada T, Namisaki T, Yoshiji H, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwara E, Itoh Y, Ide T, Tamori A, Matsubara M, Kawada N, Shirabe K, Tomita E, Honda M, Kaneko S, Nishina S, Suetsugu A, Hiasa Y, Watanabe H, Genda T, Sakaida I, Nishiguchi S, Takaguchi K, Tanaka E, Sugihara J, Shimada M, Kondo Y, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Tanaka Y: Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 2017; 152:1383-1394. (査読有)
13. Wang SC, Lai KR, Li CY, Chiang CS, Yu GY, Sakamoto N, Tu WY, Hsieh MH, Huang JF, Chuang WL, Dai CY, Yu ML: The Paradoxical Effects of Different Hepatitis C Viral Loads on Host DNA Damage and Repair Abilities. *PLoS One* 2017; 12:e0164281. (査読有)
14. Nguyen BN, Okuno Y, Ajiro M, Iida K, Denawa M, Yamamoto M, Sakamoto N, Kagechika H, Hagiwara M: Retinoid derivative Tp80 exhibits anti-hepatitis C virus activity through restoration of Gl-GPx expression. *J Med Virol* 2017; 89:1224-1234. (査読有)
15. Suda G, Ogawa K, Kimura M, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Sakamoto N: Novel Treatment of Hepatitis C Virus Infection for Patients with Renal Impairment. *J Clin Transl Hepatol* 2016; 4:320-327. (査読有)
16. Morikawa K, Shimazaki T, Takeda R, Izumi T, Umemura M, Sakamoto N: Hepatitis B: progress in understanding chronicity, the innate immune response, and cccDNA protection. *Ann Transl Med* 2016; 4:337. (査読有)
17. Mizokami M, Dvory-Sobol H, Izumi N, Nishiguchi S, Doehle B, Svarovskaia ES, De-Oertel S, Knox S, Brainard DM, Miller MD, Mo H, Sakamoto N, Takehara T, Omata M: Resistance Analyses of Japanese Hepatitis C-Infected Patients Receiving Sofosbuvir or Ledipasvir/Sofosbuvir Containing Regimens in Phase 3 Studies. *J Viral Hepat* 2016; 23:780-8. (査読有)
18. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsuhashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M: Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep* 2016; 6:24767. (査読有)
19. Ito J, Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kumagai K, Kikuchi H, Miyagishima T, Kobayashi T, Kimura M, Yamasaki K, Umemura M, Izumi T, Tsunematsu S, Sato F, Tsukuda Y, Terashita K, Nakai M, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Prevalence and characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants in patients with hepatitis C virus genotype 1b infection. *Hepatol Res* 2016; 46:1294-1303. (査読有)
20. Morikawa K, Suda G, Sakamoto N: Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatol Res* 2016; 46:871-7. (査読有)
21. Suda G, Kudo M, Nagasaka A, Furuya K, Yamamoto Y, Kobayashi T, Shinada K, Tateyama M, Konno J, Tsukuda Y, Yamasaki K, Kimura M, Umemura M, Izumi T,

Tsunematsu S, Sato F, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Efficacy and safety of daclatasvir and asunaprevir combination therapy in chronic hemodialysis patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol 2016; 51:733-40. (査読有)

22. Terashita K, Chuma M, Hatanaka Y, Hatanaka K, Mitsunashi T, Yokoo H, Ohmura T, Ishizu H, Muraoka S, Nagasaka A, Tsuji T, Yamamoto Y, Kurauchi N, Shimoyama N, Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, Maeda A, Ogawa K, Natsuzaka M, Kamachi H, Kakisaka T, Kamiyama T, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N: ZEB1 expression is associated with prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. J Clin Pathol 2016; :593-9. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

1. 中村 晃久、森川賢一、鈴木和治、川岸直樹、大原正嗣、出水孝章、梅村真知子、中井正人、荘拓也、須田剛生、小川浩司、坂本直哉: 肝移植後の抗 C 型肝炎ウイルス療法への検討 第 122 回日本消化器病学会北海道支部例会 2018.3 札幌市
2. 川岸 直樹、鈴木和治、中村晃久、大原正嗣、出水孝章、梅村真知子、中井正人、荘拓也、須田剛生、森川賢一、小川浩司、坂本直哉: C 型肝炎の DAAs 治療における脂質、糖代謝の変化の検討 第 42 回日本肝臓学会 西部会 2017.11 福岡市
3. 荘 拓也、須田剛生、鈴木和治、中村晃久、川岸直樹、出水孝章、中井正人、森川賢一、小川浩司、坂本直哉: ジェノタイプ 2 型 C 型肝炎・肝硬変に対する Sofosbuvir (SOF) + Ribavirin (RBV) 併用療法の治療効果と非著効例における薬剤耐性ウイルスの検討 第 21 回日本肝臓学会大会 (JDDW) 2017.10 福岡市
4. 川岸 直樹、鈴木和治、中村晃久、大原正嗣、出水孝章、梅村真知子、中井正人、荘拓也、須田剛生、森川賢一、小川浩司、坂本直哉: C 型肝炎に対する DAA 治療における B 型肝炎再活性化の頻度と危険因子の検討 第 53 回日本肝臓学会総会 2017.6 広島市
5. 川岸直樹、大原正嗣、出水孝章、梅村真知子、伊藤淳、中井正人、荘拓也、須田剛生、

森川賢一、小川浩司、坂本直哉: ジェノタイプ 1b 型 C 型肝炎・肝硬変に対する Ombitasvir (OBV) + Paritaprevir (PTV) + Ritonavir (r) 併用療法の治療効果・安全性の検討 第 120 回消化器病学会北海道支部例会 2017.3 札幌市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 直哉 (SAKAMOTO Naoya)  
北海道大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 10334418

### (2) 研究分担者

須田 剛生 (SUDA Goki)  
北海道大学・医学研究院・特任助教  
研究者番号: 20447460

森川 賢一 (MORIKAWA Kennichi)  
北海道大学・医学研究院・助教  
研究者番号: 60384377

### (3) 連携研究者

なし