

# HCV 治療薬併剤時における薬剤間相互作用の推定

伊藤 悠介<sup>1</sup>, 小泉 吉輝<sup>2</sup>, 渡土 幸一<sup>3</sup>, 岩見 真吾<sup>4</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院システム生命科学府数理生物学研究室

<sup>2</sup>国立国際医療研究センター

<sup>3</sup>国立感染研究所ウイルス第二部

<sup>4</sup>九州大学理学研究院生物科学部門数理生物学教室

Yusuke Ito<sup>1</sup>, Yoshiki Koizumi<sup>2</sup>, Koichi Watashi<sup>3</sup>, Shingo Iwami<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University

<sup>2</sup>National Center for Global Health and Medicine

<sup>3</sup>Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

<sup>4</sup>Department 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. しかしながら, 治療薬を併用 (2 剤, 3 剤) 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, 2 剤もしくは 3 剤併用した時の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.

これまで, 筆者らは HCV 治療で代表的な直接標的薬の薬剤間相互作用について解析を進めてきた. ただ, HCV 治療当初はインターフェロンなどの宿主因子活性型抗ウイルス薬 (HTA) が主に使用されていた. そのため本発表での研究目的は, 直接標的薬だけでなく HTA も含む薬剤間相互作用を理解すること, そして HTA も含む HCV 治療薬併用時における薬効を評価することにある. 以上より本研究では, 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, 全 12 種類計 52 通りの薬剤間相互作用の解析を実施したのでここに報告する.

## 2 HCV 感染実験と相互作用を記述する薬剤濃度モデル

### 2.1 HCV 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 8 種類, HTA 4 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。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、計 12 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。よって、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、HCV 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、実効薬剤濃度が増加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  $\Delta k_2$  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：

$$\frac{D_{1,in}^*(\Delta k_2)}{D_{1,in}^*(0)} = \frac{D_{1,eff}}{D1} = \frac{1}{1 + \frac{\Delta k_2}{k_1 + k_2}} = \frac{1}{1 + g(D2)}. \quad (2)$$

$D1$  は薬剤 1 の投与濃度を意味する。さらに式 (2) の  $g(D2)$  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]：

$$D_{1,eff} = D1 \frac{1}{1 + a_{12} \frac{D_{2,eff}}{IC_{50,2} + D_{2,eff}}}, \quad (3)$$

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

$D_{1,eff}$ ,  $D_{2,eff}$  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。

次に、上記の実効薬剤濃度を用いて HCV 治療薬 2 剤併用時における薬効を評価する。ここで薬剤 1, 2 の抗ウイルス効果は、次式で定義できる：

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

各薬剤の抗ウイルス効果は広く用いられるヒル関数を適用した。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。

### 2.3 推定された $a_{ij}$ を用いて 3 剤併用時の薬効を予測する

上記で推定された  $a_{ij}$  を用いて, 3 剤併用時の薬効を予測する。本モデルを用いることで, 3 剤併用時における薬剤  $i$  の実行薬剤濃度 ( $D_{i,eff}$ ) と薬効 ( $F^{triple}$ ) は次のように定義できる [4] :

$$D_{i,eff} = D_i \prod_{j \neq i} \frac{1}{1 + a_{ij} \frac{D_{j,eff}}{IC_{50,j} + D_{j,eff}}}, \quad (6)$$

$$F^{triple} = \prod_{i=1} \frac{IC_{50,i}^{m_i}}{IC_{50,i}^{m_i} + D_{i,eff}^{m_i}} \quad (7)$$

本モデルでは薬効は積で記述できると仮定している。本モデルの利点は, 2 剤併用時のデータから推定された  $a_{ij}$  を用いることで, 3 剤併用時の薬効の予測できるということにある。よって, 2 剤併用の抗ウイルス効果の実験データさえ取得できれば, パラメータ推定することなく, 3 剤併用時の薬効を計算することが可能となる。

## 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 HCV 治療薬の薬効を評価する事が可能となる。本研究では, 実効薬剤濃度モデルと実験結果を比較した。さらに, 薬剤間相互作用を記述する時にこれまで頻繁に用いられる薬剤間相互作用を考慮していない Bliss モデル, そして Loewe モデルとも比較した。この比較により, 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 推定された HCV 治療薬における薬剤間相互作用

得られた  $a_{ij}$  を用いて, HCV 治療薬全 12 種類の薬剤間相互作用を推定した (図 1). ここでピンクの矢印が拮抗関係, 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. 例えば, SMV が LDV への拮抗関係よりも LDV が SMV への拮抗関係の方が強い (図 1 左上). また, オレンジ色が RNA 複製阻害薬, 緑色がタンパク質翻訳阻害薬, グレーが宿主因子活性型抗ウイルス薬 (HTA) を意味する. 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 1). 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 1). 加えて, インターフェロンなどの HTA を併用した場合は相乗関係を示すことが示唆された.

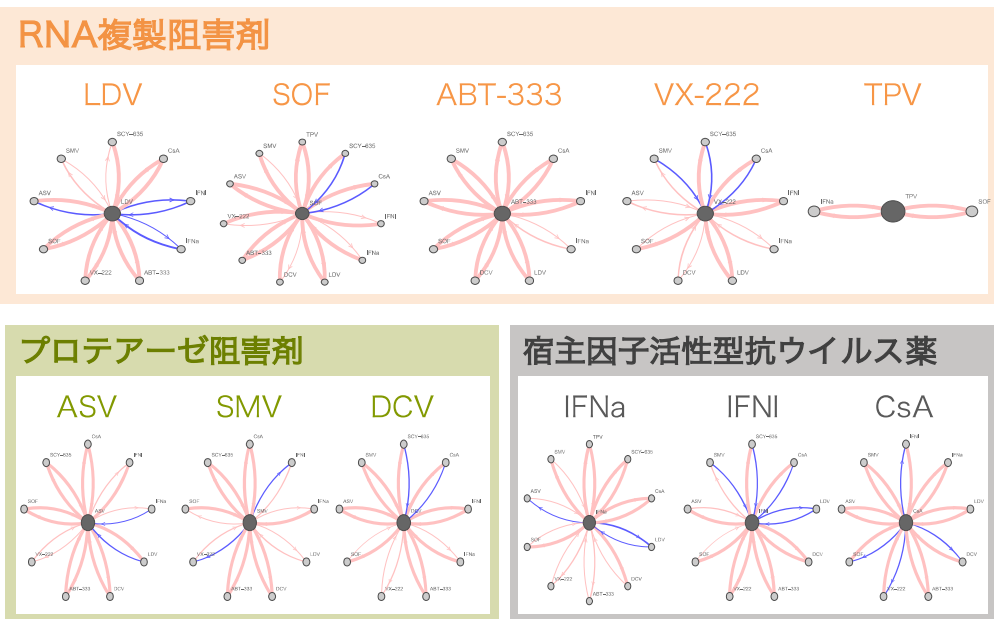


図 1: 本研究で推定された, HCV 治療薬における薬剤間相互作用

### 3.3 3 剤併用時の薬効を予測する

さらに, 得られた  $a_{ij}$  を用いて, HCV 治療薬 3 剤併用時の薬効を予測した. 具体的には, 3 剤併用実験の結果と予測結果を決定係数を用いて比較した. 同時に, 2 つの古典的な薬効評価モデルの Bliss モデルと Loewe モデルも比較した. 実効薬剤濃度モデルによる予測は  $R^2 = 0.94$  であった. 一方で, Bliss モデルと Loewe モデルによる予測は  $R^2 = 0.64$ ,  $R^2 = 0.73$  であった. つまり, 実効薬剤濃度モデルは従来の薬効評価モデルよりも高精度に 3 剤併用時の薬効を予測できることが示唆された.

## 4 まとめ

本研究では、併用時の薬剤間相互作用によって変動する実効薬剤濃度を記述した数理モデルを用いて、HCV 治療薬の全 12 種類計 52 通りの抗ウイルス効果を解析を実施した。実効薬剤濃度モデルでは、代表的な治療薬の DAA だけでなくインターフェロンなどの抗ウイルス治療薬の抗ウイルス効果も詳細に評価できることを明らかにした。また、それぞれの HCV 治療薬が併用時に他剤に与える薬剤間相互作用を推定した。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り、インターフェロンなどの治療薬は相乗関係を示すことが示唆された。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]。さらに興味深いことに、本モデルでは 3 剤併用時の薬効を予測が可能になることである。従来薬剤間相互作用を記述する 2 つの古典的な数理モデルよりも予測精度が高いことが示され、HCV 治療薬 3 剤併用時の薬効を詳細に予測できることが期待される。展望としては、本研究で推定された薬剤間相互作用 (相乗関係や拮抗関係) が、実際のどの分子メカニズムに対応するかについて共同研究者らと検討していく。

謝辞 本研究は日本学術振興会 DC2 の研究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):837-849.
- [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