

以反意核酸策略克服 C 型肝炎病毒
干擾素抗藥性的可行性研究

1

一、中文摘要

慢性 C 型肝炎病毒 (HCV) 感染會造成慢性肝炎、肝硬化與肝細胞癌，是全世界重要的疾病之一。干擾素 α 治療僅能治癒約 10-20% 的病人，Ribavirin 與干擾素的合併治療雖可提高治癒率，但仍祇之 50-60%。C 型肝炎病毒對干擾素的抗藥性是目前 C 型肝炎治療的瓶頸，必須予以克服。

C 型肝炎病毒的抗干擾素機轉並未完全清楚，但部分可能是經由其非結構蛋白 NS5A 與干擾素誘發之蛋白激酶 PKR 結合，而抑制了干擾素抗病毒的作用。NS5A 與 PKR 結合的位置認為是在 ISDR (喔 interferon sensitivity-determining region)，HCV 胺基酸序列 2209-2248 處，但世界各地的研究對是否有 ISDR 的存在頗有爭議，對 NS5A 的抑制干擾素作用是否與臨床反應相符也有人存疑。HCV E2 蛋白也有人發現可抑制 PKR。若吾人能設法抑制 HCV NS5A 與 HCV E2 蛋白，可能減少或去除干擾素抗藥性的難題。反意核酸 (antisense nucleotides) 可封鎖相對應之 mRNA，而抑制細胞或病毒基因體的基因表現。反意核酸可有兩種形式：寡核酸 (oligonucleotides，通常 15 到 20 個核酸長) 或表現性核酸 (expressed nucleotides)。最近反意核酸被應用到許多疾病治療的研究上，包括病毒感染，並已被批准用來治療人類巨細胞病毒 (CMV) 視網膜炎。

本研究的目的是在探討：(1) 可表現 HCV NS5A 及 E2 的肝細胞株是否會減少 PKR 蛋白的功能，是否 HCV NS5A 與 E2 確與 PKR 有交互作用？(2) 利用 HCV NS5A 及 HCV E2 的反意核酸，探討其對減輕或清除 HCV 的干擾素抗藥性的效果。

我們已完成建構反轉錄病毒重組 (MMLV) 載體，表現對干擾素具抗藥性或對干擾素敏感的慢性 C 型肝炎病人的 HCV NS5A，並將此重組的反轉錄病毒感染肝癌細胞株穩定表現 HCV NS5A，並以 immunoprecipitation 方法分析此 HCV 5A 蛋白與 PKR 在肝細胞中是否有結合，結果並不能證實。以干擾素 α 刺激表現 HCV NS5A 之肝細胞株，其 PKR 之表現及 eIF 2 α 之 phosphorylation 並未降低。我們並在 Huh-7 細胞建立 HCV E2 inducible gene expression 系統，來以 Pgene Switch System，mifepristone 調控之研究 HCV E2 與 PKR 之 interaction，並以 HCV E2 之反意核酸來克服抑制以 interaction。目前此項實驗仍在進行中。

二、英文摘要

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major public health problem worldwide. It can lead to chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Interferon- α can cure 10-20% of patients with chronic hepatitis C. Ribavirin plus interferon combination therapy can only increase the cure rate up to 40-50%. The interferon resistance of HCV needs to be overcome.

The mechanisms of interferon resistance of HCV is not completely clear, but may be explained partly by the binding of HCV nonstructural protein NS5A with interferon-inducible protein kinase PKR. The NS5A-PKR interaction inactivate the antiviral and apoptotic activities of PKR. Nevertheless, some studies question the importance of ISDR. Recently, HCV E2 protein has also been reported to bind inactivate PKR function. Current studies on NS5A-PKR interaction are not done in hepatocytes.

Antisense nucleotides can block corresponding mRNA and thus inhibit further protein synthesis. Therapeutic antisense nucleotides can be made in two forms :

四、結果與討論

1. 我們已完成建構反轉錄病毒重組(MMLV)載體，表現對干擾素具抗藥性或對干擾素敏感的慢性 C 型肝炎病人的 HCV NS5A，並將此重組的反轉錄病毒感染肝癌細胞株穩定表現 HCV NS5A，並以 immunoprecipitation 方法分析此 HCV 5A 蛋白與 PKR 在肝細胞中是否有結合，結果並不能證實。以干擾素 α 刺激表現 HCV NS5A 之肝細胞株，其 PKR 之表現及 eIF 2 α 之 phosphorylation 並未降低。我們並在 Huh-7 細胞建立 HCV E2 inducible gene expression 系統，來以 Pgene Switch *srelem*，mifepristone 調控之研究 HCV E2 與 PKR 之 interaction，並以 HCV E2 之反意核酸來克服抑制以 interaction。目前此項實驗仍在進行中。
2. 我們的發現未能證實 HCV NS5A 與 PKR 有結合，與我們在臨床病人之觀察符合，顯示 HCV 之干擾素抗藥性機轉不能以 NS5A 與 PKR 之 interaction 來解釋，尚有其他機轉，值得繼續研究。

五、計畫成果自評

由於本計畫原預定兩年完成，但祇通過一年，剩餘部份仍需再繼續完成。

六、參考文獻

1. Askari FK, and McDonnell WM. Molecular medicine : antisense-oligonucleotide therapy. N Engl J Med 1996; 2:139-144.
2. Cooper SR, Taylor JK, Miraglia LJ, et al. Pharmacology of antisense oligonucleotide inhibitors of protein expression. Pharmacol Ther 1999;82:427-435.
3. Enomoto N, SuKuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. N Engl J Med 1996;334:77-81.
4. Gale M Jr, Korth MJ, Tang NM, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. Virology 1997;230:217-227.
5. Lai MY, Kao JH, Yang PM, et al. Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis C. Gastroenterology 1996;111:1307-1312.
6. Lin SB, Hsieh SH, Hsu HL, et al. Antisense oligonucleotides of IGF-II selectively inhibit growth of human hepatoma cells overproducing IGF-II. J Biochem 1997;122:712-722.
7. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, et al. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. Science 1999;285:107-110.

oligonucleotides or expressed nucleotides. Recently, FDA issue approval for the antisense compound VitraveneTM as an inhibitor of CMV retinitis.

The aims of this study are : (1) Whether hepatocyte cell lines expressing HCV NS5A and E2 can actually bind to PKR in hepatocytes ? (2) Do antisense nucleotides of HCV NS5A and E2 can block the interaction between HCV NS5A and HCV E2 and PKR ?

We have constructed recombinant retroviral vectors which can stably express HCV NS5A in hepatoma cell lines. By immunoprecipitation and western blotting, we could not confirm the interaction between HCV NS5A-expressing hepatoma cell line (Huh-7). We have established the construction of an inducible gene expression system of HCV E2 in Huh-7 cell line by using Pgene Switch System and mifepristone. The experiment of expressed antisense nucleotides of HCV NS5A and HCV E2 are still not completed.

三、計畫緣由與目的

C 型肝炎是全世界重要的公共衛生問題之一。台灣的人口約 2-3% 為 C 型肝炎抗體陽性，C 型肝炎是台灣肝細胞癌的第二大原因。因此，成功的治療慢性 C 型肝炎來防止這些嚴重後果十分重要，但目前的治療成績仍未臻理想。

干擾素- α 是最早被用來治療慢性 C 型肝炎的病例，其抗病毒的機能主要是靠刺激細胞內 JAK-STAT 訊息傳導系統，誘發 PKR 蛋白激酶(RNA-dependent Protein Kinase) 與 2-5A synthetases。前者會進一步磷酸化 eIF2 α 而抑制蛋白質合成，後者會激化 2-5A dependent Rnase 而切割病毒 RNA。但干擾素單一治療(monotherapy) 僅能治癒約 10-20% 的病人。若 Ribavirin 與干擾素合併治療則仍祇提高治療率治 40-50%，如何克服 HCV 頑抗干擾素的作用是臨床研究上的重要課題。

C 型肝炎病毒的抗干擾素機轉並未清楚，但部分可能是經由 HCV 非結構蛋白 NS5A 與外套蛋白 E2 和干擾素訊息傳導系統或其他細胞反應成分的交互作用所致。Katze 的研究群發現 NS5A 蛋白會與 PKR 結合，結合的位置在 HCV 胺基酸 2209-2274 (包含 ISDR)，且此項結合會降低干擾素對病毒的抗病毒作用，但不一定與 ISDR 有關(Polyak SJ et al, 1999; Paterson M et al, 1999)，且 NS5A 的抑干擾素作用不一定與臨床的反應相關(Paterson M et al, 1999)。因此，NS5A 與 PKR 之交互作用及其影響目前仍有爭議，賴明詔院士研究群發現 HCV E2 蛋白也可以抑制干擾素所誘發的 PKR(Taylor DR et al, 1999)，若 HCV NS5A 與 E2 蛋白與 PKR 確有密切交互作用，是 HCV 干擾素抗藥性的主要或部份原因，則打破這些蛋白的結合，理論上可去除或減輕 HCV 干擾素抗藥性，具有臨床應用的可觀潛力。

反意核酸(antisense nucleotides)可封鎖相對應的 mRNA，因而抑制基因表現。反意核酸可有兩種形式：寡核酸(oligonucleotides)或以載體表現出的表現性核酸(expressed nucleotides)。最近反意核酸在人類疾病的動物模式上被發現有藥理活性，因此被應用到許多治療疾病的研究上。

本研究的目的是在探討：(1) 可表現 HCV NS5A 及 E2 的肝細胞株是否會減少 PKR 蛋白的功能，是否 HCV NS5A 與 E2 確與 PKR 有交互作用？(2) 利用 HCV NS5A 及 HCV E2 的反意核酸，探討其對減輕或清除 HCV 的干擾素抗藥性的效果。