

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08507

研究課題名(和文) 化学生物学に基づくB型肝炎ウイルスゲノム複製機構における新規創薬標的分子の探索

研究課題名(英文) Search for new potential drug targets for Hepatitis B virus genome replication based on chemical biology

研究代表者

山崎 学 (YAMASAKI, Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：50442570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus: HBV)による肝炎の治療戦略拡充のために、新たな創薬標的分子の選定が求められている。本研究では、ゲノム複製に特化した独自の培養細胞評価系を用いて、HBVゲノム複製を阻害する化合物を見出し、これを用いた化学生物学的研究により創薬標的分子の同定を目指した。その結果、本研究にて3つの阻害剤を同定するとともに、そのうちの1つに、直接作用のみならず間接的にも抗HBV効果を発揮するポテンシャルを見出した。

研究成果の概要(英文)：There is a need for novel drug targets for treatment of chronic Hepatitis B virus (HBV) infection to expand our therapeutic repertoire. In this study, we screened in-house compound library and microbial fermentation broths using adenovirus-mediated efficient virus genome replication system, and performed mode-of-action studies using hit compounds for identification of new potential drug targets. In the course of our screening program, we identified three selective inhibitors, and found that the compound among them has a potential activity to exert host anti-HBV responses in addition to direct antiviral activity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：B型肝炎ウイルス 抗ウイルス薬 ゲノム複製 創薬標的分子 ケミカルバイオロジー

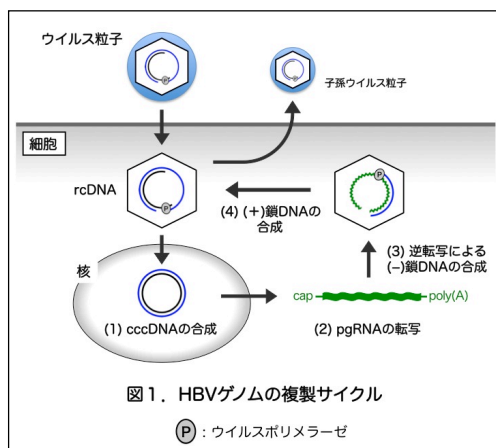
1. 研究開始当初の背景

HBV の持続感染による慢性肝炎は、肝硬変・肝がんの発症リスクを高めることから、抗ウイルス剤による治療が必要となる。現在、治療にはインターフェロンと核酸アナログ製剤が用いられている。しかし、インターフェロンによる治療効果は投与患者の 20~40% に留まり、高頻度に副作用が認められる。また、核酸アナログ製剤は高率に肝炎を沈静化するものの、長期投与による薬剤耐性が懸念される。このことから、新たな治療薬、とくに既存薬とは異なる作用機序を有する新薬の開発により、治療戦略を拡充することが求められている。

新規の標的分子に対する創薬では、ヒトでの臨床的有効性の確証がない。このために、薬剤を開発しても「治療効果が得られない」というリスクが存在する。そこで、先行の核酸アナログが作用する HBV ゲノム複製機構に着目し、「この過程の阻害は治療効果と相関する」という作業仮説を考えた。そして、HBV ゲノム複製に特化して高効率化した培養細胞評価系を用いることは、ゲノム複製の分子基盤の基礎研究のみならず、創薬標的分子の探索研究を加速させるという考えに至った。

2. 研究の目的

HBV のゲノムは一部が一本鎖構造をとる環状不完全二重鎖 DNA (relaxed circular DNA : rcDNA) であり、その複製は 4 つの過程に分かれる (図 1)。すなわち、(1) 核内での完全二重鎖 DNA (covalently closed circular DNA : cccDNA) の合成、(2) cccDNA からのプレゲノム RNA (pgRNA) の転写、(3) スクレオカプシド内での逆転写、(4) これを鋳型とした (+) 鎖 DNA の合成である。複製されたゲノムの一部は cccDNA の新たな供給源となる。申請者らは、これまでの研究から、独自のアデノウイルスベクター (AdV) を用いて、この過程を高効率化した評価系 (従来のプラスミドを用いる場合と比較して約 10 倍の複製効率) を構築した。



本研究では、この HBV ゲノム複製評価系を用いて、ウイルスゲノム複製を阻害する化合物を探索・同定するとともに、見出した化合物

物の作用機序解析を展開し、新たな創薬標的分子候補を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングソース

所属機関が所有する低分子化合物ライブラリー (合成化合物、天然化合物とその誘導体) と、微生物培養液サンプル (放線菌およびカビ由来) を用いた。

(2) スクリーニング法

CMV プロモーター下流に HBV ゲノム (PreS 領域を欠失) を挿入した AdV (HBV103-AdV 系) を肝がん由来細胞株 Huh-7 に感染させ、化合物を処理した。数日間培養した後、細胞内の rcDNA および cccDNA を qPCR 法により定量した。アッセイは最適化 (signal/background 比は 200 以上、Z' 値は 0.5 以上) して行い、阻害活性を判定した。

2 次スクリーニングでは、HBV ゲノムの代わりに GFP を挿入した AdV (同じ発現単位) を共感染させ、選択性を判定した。3 次スクリーニングでは、野生型ウイルスを産生する HepG2. 2. 15 細胞を用い、AdV 非依存的な複製系にて阻害活性を判定した。

(3) RT-PCR によるインターフェロン誘導性遺伝子の発現解析

化合物処理した HepG2. 2. 15 細胞から RNA を抽出し、オリゴ dT を用いた逆転写反応により cDNA を調製した。インターフェロン誘導性遺伝子 (ISG15, IRF7, OASL) および APOBEC3 ファミリータンパク質 (A3B, A3F, A3G, A3H) を qPCR により検出し、内部標準の GAPDH に対して相対定量した。

(4) カプシド内のウイルス DNA の解析

Hep38. 7-Tet 細胞をテトラサイクリンを除いた培地で培養し、十分にウイルス複製した後、テトラサイクリンと化合物を添加した。培養後、細胞内の HBV カプシドをスクロース密度勾配遠心により回収し、pgRNA やウイルス DNA を qPCR により定量した。

ウイルス DNA は 3D-PCR (温度勾配をつけた変性条件で PCR 反応) を行い、より低い変性温度で増幅した PCR 産物 (変異による Tm 値の低下) を pGEM-T ベクターにクローニングした。塩基配列決定後、G→A 変異した塩基の頻度を計数した。

(5) in vitro RNaseH アッセイ

HBV ポリメラーゼの RNaseH ドメインの C 末端に His タグを付加し、これを pCold II ベクターに挿入した。大腸菌 BL21 にて発現させた後、組換え RNaseH をアフィニティ精製した。³²P 放射標識した RNA とオリゴ DNA をハイブリダイズした基質を用いて酵素反応を行い、検出は urea-PAGE 後にオートラジオグラフィで行った。

4. 研究成果

(1) HBV ゲノム複製を阻害する化合物の同定
化合物ライブラリーから約 30,000 化合物を 1 次スクリーニングした。ヒット化合物の選択性を 2 次スクリーニングにより判定した後、HepG2.2.15 細胞を用いて 3 次スクリーニングした。その結果、HBV ゲノム複製を阻害する 2 種の化合物 (核酸アナログと天然物誘導体) を見出した。

一方、微生物培養液から約 10,000 サンプルをスクリーニングした結果、カビ由来の培養液の 1 つに阻害活性を見出した。単離精製・構造解析した結果、培養液中の活性成分は puberulonic acid と同定された。

(2) 核酸アナログの直接的な抗 HBV 作用

ヒットした核酸アナログ (NA) は、デオキシヌクレオシド型の化合物であり、抗腫瘍活性をもつ医薬品として承認されている。HBV103-AdV 系にて、ウイルスゲノム複製を選択的かつ濃度依存的に阻害し、EC₅₀ 値は 1.14 μM であった (図 2 A 上グラフ)。NA によるゲノム複製の阻害はサザンブロット法でも確認した。一方、リボヌクレオシド型の NA では、このような阻害活性は認められなかった (図 2 A 下グラフ)。このことは、ヒットした NA は、HBV の逆転写反応に直接作用してゲノム複製を阻害することを示唆する。

次に、薬剤耐性ウイルスに対する効果を明らかにするために、第一選択薬のエンテカビルに耐性を付与するアミノ酸変異を導入した HBV 発現プラスミドによるトランスフェクション実験を行った。サザンブロットの結果、ヒットした NA はエンテカビル耐性ウイルスのゲノム複製 (RC と dsL) にも、野生型と同等の阻害活性を示すことが確認された (図 2 B)。

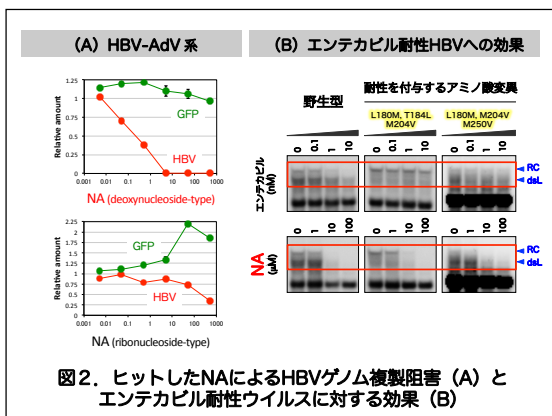


図 2. ヒットした NA による HBV ゲノム複製阻害 (A) とエンテカビル耐性ウイルスに対する効果 (B)

(3) NA による抗ウイルス応答の惹起

ヒットした NA がもつ本来の抗腫瘍活性の 1 つに、インターフェロニンシグナルを介した自然免疫の活性化が報告されている。そこで、NA が HepG2.2.15 細胞の抗ウイルス応答に及ぼす影響を調べた結果、IRF7 や OASL などのインターフェロン誘導性遺伝子や、A3B や A3H 等の APOBEC3 ファミリータンパク質の転写の活性化が認められた (図 3 A)。このことは、

本化合物は、直接作用のみならず、間接的にも HBV 感染を抑えるポテンシャルを有することを示唆する。

NA の間接的な抗 HBV 活性の存在を実証するために、Hep38.7-Tet 細胞 (HBV 複製のオンオフをテトラサイクリンの有無で制御できる細胞) を用いて解析した。本研究計画では、逆転写反応から rcDNA 合成までの過程に着目したが、カプシド内の pgRNA 量や合成される HBV DNA について、NA による阻害は認められなかった。一方、前の実験にて転写が活性化された APOBEC3 は、シチジンデアミナーゼ活性により種々のウイルスゲノムに「G→A」超変異をもたらすことが知られている。そこで、カプシド内の HBV DNA の HBx 遺伝子領域の塩基配列を決定した結果、未処理と比較して、NA により「G→A」変異の頻度が有意に高いことが示された (図 3 B)。しかし、予想に反して、比較対照とした既存薬のラミブジンにも高頻度な「G→A」変異が認められ、NA にユニークな抗 HBV 作用と結論できなかった。現在、cccDNA からの pgRNA の転写に及ぼす影響について解析を進めている。

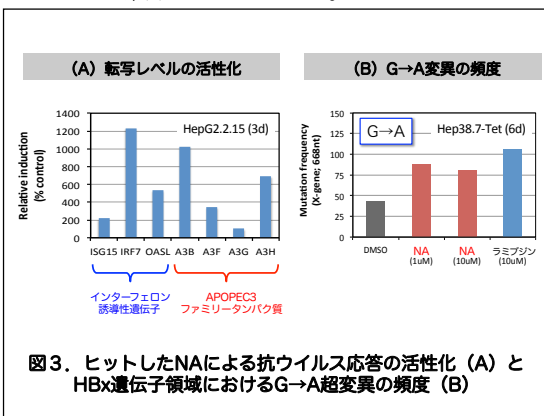


図 3. ヒットした NA による抗ウイルス応答の活性化 (A) と HBx 遺伝子領域における G→A 超変異の頻度 (B)

現在、臨床試験にある抗 HBV 薬候補の作用機序は、ウイルス因子を標的とする直接作用型か、宿主因子を介する間接作用型に分けられる。前者はウイルス複製を強力に抑えて肝炎を沈静化し、後者は自然免疫の活性化により臨床的寛解の達成率向上が期待される。一方、ヒットした NA から得られた研究成果は、双方の治療効果を、単剤で発揮できるかもしれないという作業仮説をもたらす点でインパクトがある。このような dual functional な特性をもつ薬剤の創製と、その治療への有効性の追求は、今後重要な研究課題へと発展すると考えている。

(4) 天然物誘導体の抗 HBV 作用

ヒットした天然物誘導体は、所属機関にて新規同定した抗菌活性を示す化合物の誘導体である。HBV103-AdV 系にて、ウイルスゲノム複製を選択的に阻害し、EC₅₀ 値は約 1 μM であった。また、HepG2.2.15 細胞では EC₅₀ 値は約 10 μM であった。一方、一部構造情報が不十分なために、NMR 等を用いて構造解析した結果、エピマーの混合物であることが判明した。このことから、作用機序解析に先立ち、

分離・精製作業が必要になったが、保存量が僅かなために実施困難であった。本化合物は構造がユニークであり、これまでと異なる作用機序や薬剤標的分子が期待される。現在、誘導体合成を進めており、活性本体の構造を確定した上で、作用機序解析を再開する。

(5) Puberulonic acid の抗 HBV 作用

カビ培養液から精製した puberulonic acid は、2 価の金属イオンと配位するトロポロン骨格もつ化合物である (図 4 A)。ウイルスゲノム複製を選択的に阻害し、HBV103-AdV 系での EC₅₀ 値は 7.5 μM であった (図 4 B)。HBV ポリメラーゼは、逆転写反応の際、pgRNA 分解のために Mg 依存性の RNase H 活性を発揮する。そこで、組換え RNase H を作製し、in vitro 酵素阻害アッセイを構築して評価した結果、puberulonic acid は RNase H 活性を阻害することが示された (図 4 C)。RNase H の阻害は、既存薬の核酸アナログ製剤と相乗的に抗 HBV 活性を発揮することが報告されており、本研究でも創薬標的分子としての有効性を確認した。

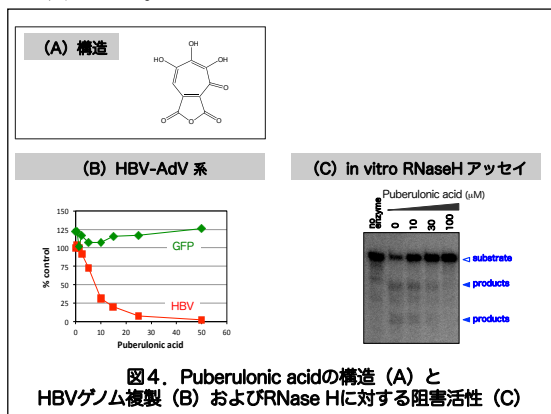


図 4. Puberulonic acid の構造 (A) と HBV ゲノム複製 (B) および RNase H に対する阻害活性 (C)

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 2 件)

- ① Takizawa N, Yamasaki M. Current landscape and future prospects of antiviral drugs derived from microbial products. J Antibiot (Tokyo). 71, 45-52 (2017) 査読有
DOI: 10.1038/ja.2017.115.
- ② Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Matsuda N, Nomoto A, Suzuki T, Saito I, Kanegae Y. Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. Sci Rep. 7; 41851. (2017) 査読有
DOI: 10.1038/srep41851

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山崎学、松田法恵、鈴木まりこ、鐘ヶ江裕美、斎藤泉、柴崎正勝：アデノウイル

スベクターを用いたウイルスゲノム複製を標的とする抗 HBV 剤の同定

第 65 回日本ウイルス学会学術集会

2017 年 10 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪市)

- ② 山崎学、松田法恵、近藤小貴、鈴木まりこ、鐘ヶ江裕美、斎藤泉、野本明男、柴崎正勝：アデノウイルスベクターを基盤としたウイルスゲノム複製評価系による抗 HBV 剤の探索

第 63 回日本ウイルス学会学術集会

2015 年 11 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡市)

- ③ 近藤小貴、鈴木まりこ、山崎学、柴崎正勝、斎藤泉、鐘ヶ江裕美：AdV を用いた効率的 HBV 複製ゲノム検出法の開発
- 第 63 回日本ウイルス学会学術集会
2015 年 11 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡市)

[その他]

ホームページ等

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所

<http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 学 (YAMASAKI Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：50442570

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

斎藤 泉 (SAITO Izumu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・チームリーダー

研究者番号：70158913

鐘ヶ江 裕美 (KANEGAE Yumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80251453

近藤 小貴 (KONDO Saki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80451871

五十嵐 雅之 (IGARASHI Masayuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長

研究者番号：40260137

澤 竜一 (SAWA Ryuichi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・上席室長

研究者番号：50235454