

令和元年6月20日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09348

研究課題名(和文) HBV転写制御領域を標的とする抗HBV薬開発の為に海洋生物由来シード化合物の探索

研究課題名(英文) Search for a novel seed compound of anti HBV agent targeting transcriptional control of HBV from Marine Organisms

研究代表者

山下 篤哉 (YAMASHITA, Atsuya)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：00334871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、海洋生物抽出物や海洋生物由来の化合物をスクリーニングソースとして、HBV コアプロモーター及びエンハンサー-1を標的部位とした抗HBV化合物の探索を行った。その結果、カイメン由来の化合物metachromin AがHBV コアプロモーター活性及びエンハンサー-1を抑制し、HBVの増殖を抑制することを見出した。更に、構造活性相関の検討の結果、hydroquinone基および5位、9位の2重結合が抗HBV活性に重要な部位であることがわかった。また、metachromin Aの抗HBV活性の機序は、HBVの主要な転写制御因子HNF4 のタンパク量を減少されるによるものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルス(HBV)感染症の治療薬はインターフェロンや核酸アナログ製剤であるが、薬剤耐性ウイルス出現や副作用と言った問題があり、新規治療薬の開発が急務である。そこで、本研究はHBV独自の遺伝子制御機構に着目し、その機構を抑制する治療薬候補化合物をユニークな化合物の宝庫とされている海洋生物由来の化合物から探索した。その結果、沖縄近海に生息するカイメン由来の化合物metachromin AがHBV独自の遺伝子制御機構を抑制し、ウイルス産生を抑制することを見出した。更に、その抑制メカニズムについても解明することが出来た。この研究結果を新規HBV感染症治療薬の開発に繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：To identify an antiviral compound targeting HBV core promoter and enhancer 1, extracts of marine organisms and compounds from marine organisms were screened using cell lines expressing firefly luciferase under the control of the HBV core promoter and enhancer 1. As a result, metachromin A, which isolated from the marine sponge, inhibited HBV core promoter and enhancer 1 activity, and suppressed HBV production. The analysis on the structure-activity relationship revealed that the hydroquinone moiety, and the double bonds at carbon numbers-5 and -9 in metachromin A are crucial for anti-HBV activity. Furthermore, metachromin A reduced the protein level HNF4, which mainly regulates HBV transcription.

研究分野：抗ウイルス薬

キーワード：HBV 海洋生物 ケミカルバイオロジー 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) 持続感染者は、世界で約 4 億人、日本国内で約 130~150 万人存在すると推定されている。近年、我が国では母子感染や輸血による HBV 感染は極めて稀になったが、それに代わり慢性化率の高い遺伝子型 A の HBV の性感染症としての感染拡大、また、HBs 抗原陰性で臨床的には治癒したと思われる HBV 既往感染者患者において、免疫抑制・化学療法により HBV 再活性化が起こる de novo B 型肝炎が新たな問題となっている。B型肝炎ウイルス (HBV) 感染症の治療薬はインターフェロンや数種の核酸アナログ剤であるが、これらの薬剤は薬剤耐性ウイルスの出現や副作用と言った問題や covalently closed circular DNA (cccDNA) の排除が困難であることから、新規抗 HBV 薬の開発が急務である。

研究代表者らは、これまでに、海洋生物抽出物を創薬ソースとした新規 C 型慢性肝炎治療薬の開発を目指し研究を行ってきた。海洋生物抽出物を創薬ソースとして選択したのは、次のような理由からである。(1) 海洋生物は、地上の生物とは全く異なる生活環を有していることから、海洋生物由来の化合物は、地上の生物から得ることが出来ないユニークな構造を持つとされている。(2) 近年、海洋生物から創薬開発研究も盛んに行われており、Halaven などの海洋生物由来の抗癌剤も臨床の場で使われている。

2. 研究の目的

上記のような研究背景および申請者のこれまでの研究成果をもとに、HBV のコアプロモーター及びエンハンサー I を標的部位とし、それらの活性を抑制することにより抗 HBV 活性を示す化合物を海洋生物抽出物より分離・同定する。

3. 研究の方法

(1) 海洋生物の抽出物および海洋生物由来の精製化合物

海洋生物の抽出物および海洋生物由来の精製化合物は、琉球大学 理学部田中淳一先生より供与された。

(2) レポーター細胞の樹立

HBV のコアプロモーター及びエンハンサー I の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを作製。これらプラスミドを Huh7 細胞に導入し、レポーター細胞を作製した。更に、HBV の Pre S1 及び Pre S2 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを作製し、これらのレポーター細胞についても樹立した。

(3) 抗 HBV 抑制活性の検討

抗 HBV 抑制活性については、樹立した HBV のコアプロモーター及びエンハンサー I のレポーター細胞を用いて、ルシフェラーゼ活性測定および MTS 法による細胞毒性の測定により 1 次スクリーニングを行った。ヒットしたものについては、HBV のウイルスゲノムを導入した HepG2.2.15.7 細胞および HBV の誘導系細胞である Hep38.7 細胞を用いて抗 HBV 活性を検討した。

4. 研究成果

(1) 海洋生物の抽出物および海洋生物由来化合物のスクリーニングの結果

まず、HBV のコアプロモーター及びエンハンサー I のレポーター細胞を用いて、沖縄近海に生息する海洋生物の抽出物 100 種について検討した。その結果、1 つの海洋生物抽出物に HBV エンハンサー I を抑制する活性があることを見出した。また、この海洋生物抽出物は HBV エンハンサー I のみならず、HBV コアプロモーターの活性も抑制した。しかし、ヒットしたこの海洋生物抽出物より抗 HBV 活性を有する化合物の同定には至らなかった。

海洋生物由来の化合物については、平成 28 年度は 20 種の海洋生物由来の化合物について HBV のコアプロモーター及びエンハンサー I の抑制活性の検討を行ったが、抑制活性があるものを見出すことは出来なかった。平成 29 年度は海洋生物由来テルペン系化合物 15 種類について HBV コアプロモーターの転写抑制活性を検討した。その結果、沖縄県近海に生息するカイメン *Dactylospongia metachromia* 由来化合物の metachromin A および沖縄県近海に生息する未同定のカイメン由来化合物の Kalihinol E がヒット化合物として得られた。

(2) ヒット化合物の抗 HBV 活性の検討とその機序の解明

metachromin A 及び Kalihinol E の HBV 増殖抑制活性について検討したところ、metachromin A は HBV の増殖を強く抑制したが、Kalihinol E は細胞毒性が強く HBV の増殖抑制活性は弱かった。そこで、以後、metachromin A について解析を進めた。5 種類の類縁化合物を使って構造活性相関を検討したところ hydroquinone 基および 5 位、9 位の 2 重結合が抗 HBV 活性に重要な部位であることがわかった。また、metachromin A の HBV コアプロモーターの転写抑制活性の作用機序を検討したところ、metachromin A は HNF4 の転写レベルを抑制するのではなく、HNF4

のタンパクの分解を促進し HBV コアプロモーターの転写活性を抑制することを見出した。更に、metachromin A は HBV コアプロモーターのみならず HBV エンハンサー I の抑制活性もあることを見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

Suzuki Y, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N, HBV preS deletion mapping using deep

sequencing demonstrates a unique association with viral markers. PLoS One 査読有 14
2019 e0212559

DOI:10.1371/journal.pone.0212559

Suzuki Y, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N, HBV patients with low HBsAg and high
HBcrAg titers have a high risk of HBV-related HCC. Hepatology Research 査読有 49 2019
51-63

DOI:10.1111/hepr.13277

Tanaka T, Yamashita A, Moriishi K, Roles of the 5' untranslated region of nonprimate
hepacivirus in translation initiation and viral replication. Journal of Virology
査読有 92 2018 e01997-e019917

DOI:10.1128/JVI.01997-17

Amano R, Yamashita A, Moriishi K, Catechol group of cinnamic acid derivative is
essential for its anti-hepatitis C virus activity. Yamanashi Medical Journal
査読有 32 2018 95-103

Yamashita A, Enomoto N, Moriishi K, Inhibitory effects of metachromin A on hepatitis
B virus production via impairment of the viral promoter activity. Antiviral Research
査読有 145 2017 136-145

DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.08.00

Amano R, Yamashita A, Enomoto N, Moriishi K, Cinnamic acid derivatives inhibit
hepatitis C virus replication via the induction of oxidative stress. Antiviral
Research 査読有 145 2017 123-130

DOI:10.1016/j.antiviral.2017.07.018

Yasumoto J, Yamashita A, Moriishi K, Hepatitis B virus prevents excessive viral
production via reduction of cell death-inducing DFF45-like effectors. Journal of
General Virology 査読有 98 2017 1762-1773

DOI:10.1099/jgv.0.000813

Hermawan I, Yamashita A, Moriishi K, Four Aromatic Sulfates with an Inhibitory Effect
against HCV NS3 Helicase from the Crinoid *Alloeocomatella polycladia*, Marine Drugs
査読有 15 2017 E117

DOI:10.3390/md15040117

Otoguro T, Yamashita A, Moriishi K, Inhibitory effect of presenilin inhibitor LY411575
on maturation of hepatitis C virus core protein, production of the viral particle and
expression of host proteins involved in pathogenicity. Microbiology and Immunology
査読有 60 2016 740-753

DOI:10.1111/1348-0421.12448

Kouwaki T, Yamashita A, Moriishi K, Hepatocyte factor JMJD5 regulates HBV replication
through interaction with HBx. Journal of Virology 査読有 90 2016 3530-3542

DOI:10.1128/JVI.02776-15

[学会発表](計5件)

山下 篤哉、田中 智久、乙黒 光姫、葛西 宏威、森石 恆司

Berberine suppresses hepatitis B virus production via impairment of HBV core promoter
activity. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年10月28日

山下 篤哉、田中 智久、葛西 宏威、乙黒 光姫、梁 明秀、前川 伸哉、榎本 信幸、
森石 恆司

Beberine の HBV 増殖抑制活性とその抑制機序の解明 第28回抗ウイルス療法学会学術集
会 2018年6月8日

山下 篤哉、田中 智久、乙黒 光姫、葛西 宏威、森石 恆司

Inhibitory effects of metachromin A on hepatitis B virus production via impairment
of the viral promoter activity. 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017年10月24日

山下 篤哉、玉城 麻友美、田中 智久、葛西 宏威、乙黒 光姫、梁 明秀、前川 伸哉、
榎本 信幸、田中 淳一、森石 恆司

海洋生物由来テルペン系化合物 metachromin A の HNF4 発現抑制作用による HBV 増殖抑制
第27回抗ウイルス療法学会学術集会・総会 2017年5月18日

山下 篤哉、田中 智久、土橋 香織、葛西 宏威、森石 恆司

Anti-HBV activity of *Coptidis rhizoma* alkaloids via targeting the viral core promoter.
第64回日本ウイルス学会学術集会 2016年10月24日

[その他]

ホームページ等

research map

<https://researchmap.jp/read0146104/>

山梨大学研究者総覧

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisplInfo.Scholar/0/E88A6696C4043E75.html

山梨大学大学院・医学工学総合研究部・医学学域・微生物学講座

http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/microbio/Microbiology_Yamanashi_Uni_Japanese/Home.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：榎本 信幸

ローマ字氏名：(ENOMOTO, Nobuyuki)

研究協力者氏名：森石 恆司

ローマ字氏名：(MORIISHI, Koji)