

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08460

研究課題名(和文) HBV感染に伴う細胞老化の評価と抗HBV核酸アナログがもたらす効果

研究課題名(英文) Evaluation of cellular senescence associated with HBV infection and the effect of anti-HBV nucleic acid analog

研究代表者

鎌田 伸好(東伸好)(Higashi-Kuwata, Nobuyo)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究所 難治性ウイルス感染症研究部 主任研究員

研究者番号：60361218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：核酸アナログ製剤はHBV感染症の治療に有効であるが、治療では長期の服薬期間が必須である為、安全性の高い薬剤開発が望まれている。我々はこれ迄に新規核酸アナログを複数デザイン・合成・同定している。しかしながらこれら核酸アナログの長期投与及びHBV感染そのものが細胞の老化現象に及ぼす影響について詳細な評価はされていない。

本研究ではHBV感染により感染細胞では非感染細胞に比してSA-gal活性低下、細胞老化関連タンパクp21の核内局在低下等がもたらされること、更にその様な細胞老化逆行現象は我々が開発中の新規核酸アナログ、E-CFCP投与によって正常細胞レベルに正される傾向があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではHBV感染細胞では非感染細胞に比して老化関連タンパクp21の核内局在低下が惹起される事、更にその感染細胞での核内局在は添加する抗HBV核酸アナログ種により異なって変動する事を見出した。加えて感染細胞でのp21核内局在低下(細胞老化逆行)現象は新規核酸アナログ、E-CFCPの添加/投与により正常細胞レベルに戻る傾向がある事を明らかにした。この是正効果が核酸アナログの直接的抗ウイルス活性のみに因るものか今後検討が必要ではあるが、その様な検討を通じHBV複製を強力に抑制し、細胞機能を病態改善に有利に修飾(HBV感染症では肝癌化阻止)も可能な、より有望な薬剤創出に有用なデータを供する。

研究成果の概要(英文)：While certain nucleoside/nucleotide analogs are effective in the treatment of HBV infections, their efficacy and safety are yet to be optimized due to life-long medication period. We have designed, synthesized, and identified multiple novel nucleoside/nucleotide analogs. However, the effects of long-term administration of these nucleic acid analogs and HBV infection itself on HBV-infected hepatocytes have not yet been well evaluated. In this study, we revealed that HBV infection causes a decrease in nuclear localization of senescence-related protein p21 in HBV infected cells compared to non-infected cells, and its cellular senescence retrograde phenomenon tends to be corrected to normal levels by administration of a novel nucleoside analog, E-CFCP.

研究分野：感染症内科学

キーワード：HBV感染 HBV感染と細胞老化 抗HBV核酸アナログと細胞老化

1. 研究開始当初の背景

我々のグループは近年、抗 HBV 候補薬の開発 [Kumamoto & Higashi-Kuwata *et al.* *J Org Chem* 2016, 81:2827-36] に携わり、有望な化合物についての *in vitro* ならびに *in vivo* 実験を中心的に担い、得られた効果を確認・報告している [Takamatsu & Higashi-Kuwata *et al.* *Hepatology* 2015, 62:1024-36]。加えて、これまでに複数の最適化要素を組み合わせることにより、標的タンパク質である HBV 逆転写酵素と核酸アナログの分子および原子間相互作用を有意に高め、野生型および薬剤耐性 HBV の複製・感染を強力にブロックする新規核酸アナログを複数デザイン・合成・同定している。このような核酸アナログによる治療では長期の服薬期間が必須であることからより一層安全性の高い薬剤開発が望まれている。しかしながらこれら核酸アナログの長期投与が細胞老化に与える影響および HBV 感染そのものが HBV 感染細胞に及ぼす細胞老化については未だ仔細に評価されていない。殊に肝細胞の老化についてのデータは殆んどみられない。これらの点を明らかにする事は候補薬の臨床応用へ向けた開発を確実に著しく加速させ、さらに新たな薬剤デザインに有用なデータを集積しうる為にも、また、HBV 感染症の治療を効果的に進める新たな治療法を開発するためにも極めて有用と考えられる。研究代表者は獣医師の免許を保持し、医学博士号をも取得していることから、実験動物に関連する知識や実験手技のみならず医学の研究分野にも精通している。これまで本研究費 (若手 B) の助成を受けラットの部分肝切除術を用い、肝再生時において肝実質細胞のみならず肝非実質細胞である星細胞(ビタミン A 貯蔵細胞)がダイナミックに形態を変え、そのビタミン A 貯蔵機能をも変化させることを主に形態学的手法を用いて明らかにしてきた [Higashi *et al.* *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 285(2):899-907, 2005]。また、Systemic sclerosis の患者の皮膚組織および PBMC 中の monocyte/macrophage サブセットの特性を組織免疫染色と FACS の手法を用いて詳細に明らかにしている [Higashi-Kuwata *et al.* *Arthritis Res Ther* 12(4):R128, 2010]。加えて、モルフォメトリーの手法を用い Systemic sclerosis の患者の皮膚におけるリンパ管循環障害と末梢血管障害の病理像も明らかにしてきた [Higashi-Kuwata *et al.* *Eur J Dermatol* 21(4):490-4, 2011]。本研究代表者の以上のような研究経験を生かし、我々の研究グループは平成 24 年度にかけて本研究費 (挑戦的萌芽) の助成を受け AIDS マウスモデルを作成し、*in vivo* imaging 法、免疫染色法、血中 p24 抗原量測定法で HIV 初期感染のプロセス、ならびに所属リンパ節から全身のリンパ臓器への HIV の伝播と分布のプロフィールやダイナミクスを明らかにした [Higashi-Kuwata & Ogata-Aoki *et al.* *Antiviral Res.* 2017, 144:83-92]。さらに、この感染の広がりには抗 HIV 薬投与によって抑制される事も示した [Ogata-Aoki & Higashi-Kuwata *et al.* *Antiviral Res.* 2017, 144: Sep 8. pii: S0166-3542(17)30265-6.]。近年も HBV 感染ヒト肝キメラマウスを用い新規抗 HBV 核酸アナログの投与を行い本研究テーマの為の多くの予備データを取得している

2. 研究の目的

ETV 等既存の核酸アナログは、HBV 感染症の治療に有効であるが近年はそれらの薬剤耐性変異株が出現し新たな薬剤開発が急務となっている。加えてこのような核酸アナログによる治療では長期の服薬期間が必須であることからより一層安全性の高い薬剤開発が望まれている。我々はこれまでに複数の最適化要素を組み合わせることにより、標的タンパク質である HBV 逆転写酵素と核酸アナログの分子および原子間相互作用を有意に高め、野生型および薬剤耐性 HBV の複製・感染を強力にブロックする新規核酸アナログを複数、デザイン・合成・同定している。しかしながらこれら核酸アナログの長期投与が細胞老化に与える影響および HBV 感染そのものが HBV 感染細胞に及ぼす肝細胞老化については未だ仔細に評価されていない。そこで本研究では HBV 感染に伴う肝細胞老化の評価を行い、さらに抗 HBV 核酸アナログがそうした肝細胞老化にもたらす効果、肝細胞老化の是正に働くのかあるいは悪化をもたらすのか、について検討し、もって我々が臨床応用に進めようとしている化合物の適性を決するに資することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究期間内では HBV 感染肝細胞の細胞老化状態を 老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性, CDKis (cyclin-dependent kinase inhibitor) p21 発現, SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotyp) IL6, IL8 発現, Phospho-Histone H2A, X, などの細胞老化マーカーを指標に *in vitro* および *in vivo* にて定量的および定性的評価を行い、その細胞老化の状態が既知および新規抗 HBV 核酸アナログの存在によってどのように変化するのか、同様の *in vitro* および *in vivo* 評価系で検討する。さらに新規抗 HBV 核酸アナログのみの存在によって細胞が細胞老化に関わる因子に変化をきたすのかについても検討し明らかにする。

(1) *In vitro* および *in vivo* HBV 感染系での細胞老化状態の評価

In vitro HBV 感染系にはヒト肝キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞である PXB 細胞に HBV を感染させ感染成立を上清中の HBV-DNA コピー数で確認した細胞を使用し、*in vivo* HBV 感染系には HBV の接種後感染成立を血清中の HBV-DNA コピー数で確認したヒト肝キメラマウスを用いる。そ

それぞれ上述の細胞老化マーカー等で評価を行い、HBV 感染肝細胞老化のプロフィールを明らかにする。

(2) 既知および新規抗 HBV 核酸アナログが HBV 感染細胞の細胞老化状態に及ぼす効果の評価

In vitro HBV 感染系にはヒト肝キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞である PXB 細胞に HBV を感染させ感染成立を上清中の HBV-DNA コピー数で確認した後、既知および新規抗 HBV 核酸アナログを添加状態で一定期間培養を続けた細胞を使用し、*in vivo* HBV 感染系にはヒト肝キメラマウスに HBV の接種後感染成立を血清中の HBV-DNA コピー数で確認した後、既知および新規抗 HBV 核酸アナログを一定期間経口投与したヒト肝キメラマウスを用いる。それぞれの実験系から得られたサンプルに対して上述の細胞老化マーカー等で評価を行い、既知および新規抗 HBV 核酸アナログが HBV 感染肝細胞に及ぼす効果を明らかにする。

(3) 既知および新規核酸アナログのみの存在が細胞老化状態に及ぼす影響の評価

評価には、ヒト肝キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞である PXB 細胞やヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、既知および新規抗 HBV 核酸アナログを添加状態で一定期間培養を続ける。上述の細胞老化マーカー等で評価を行い、既知および新規抗 HBV 核酸アナログ自体の存在が細胞老化に及ぼす影響を明らかにする

4. 研究成果

(1) *In vitro* および *in vivo* HBV 感染系での細胞老化状態の評価

HBV 感染 PXB 細胞群では、HBV 非感染 PXB 細胞群に比べ SA-βgal 活性の低下が SA-βgal 染色法、SA-βgal 活性蛍光測定法で確認された (図 1)。p21 タンパクの発現量については核内では発現量の減少が確認される一方で細胞質内においてはタンパク発現量が上昇する傾向

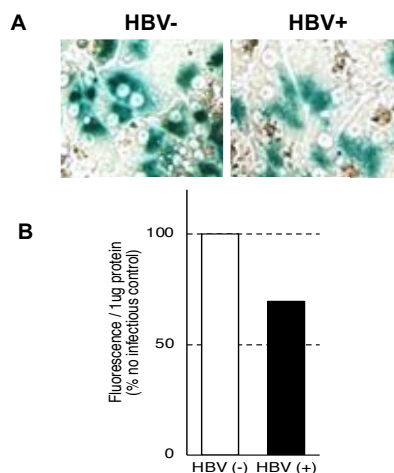


図1. HBV感染に伴いSA-βGal活性は低下する (A) HBV暴露PXB細胞群のSA-βgal活性はSA-βgal染色性 (緑色) によって非暴露群に比して低減する傾向即ち老化傾向が観察された。(B) この活性低下はSA-βgal活性蛍光測定法で定量的にも確認された。

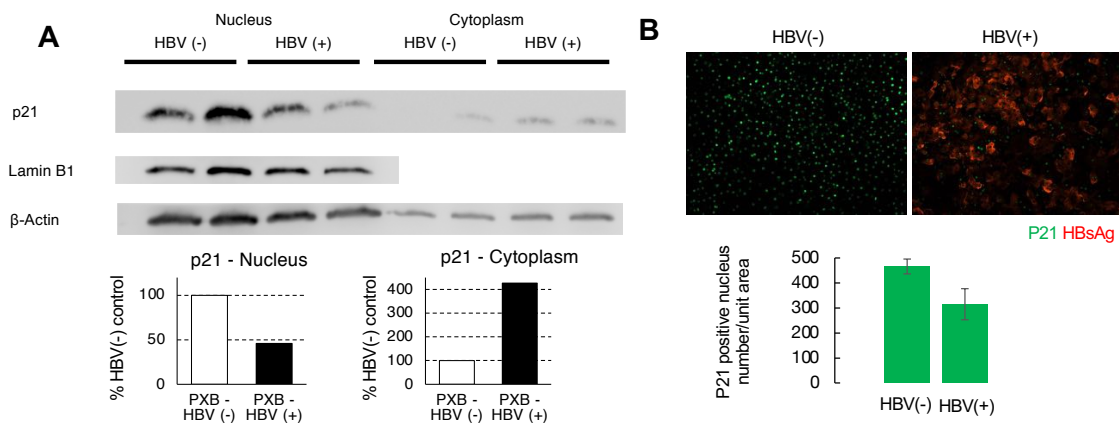


図2. HBV感染に伴うp21タンパク発現局在の変化 (A) HBVに感染したPXB/ヒト肝細胞では細胞老化マーカーの1つであるp21タンパク質の核内発現量の低下、一方で細胞質内での発現量の上昇がWestern blot 法で確認された。(B) 細胞免疫染色法でもHBVに感染したPXB/ヒト肝細胞 (HBsAgタンパク:赤) ではp21タンパク (緑) の核内発現量の低下が観察された。

があることが Western blot 法、細胞免疫染色法で見出された (図 2)。HBV 感染 PXB マウスにおいては肝組織の p21 タンパク染色で HBV 感染により p21 の核内発現量の減少傾向が確認された (図 3)、一方で肝臓組織片を用いた Western blot 法では核内タンパクと細胞質内タンパクの分離が困難であった為 p21 タンパクの核内発現量の減少の証明は困難であった。

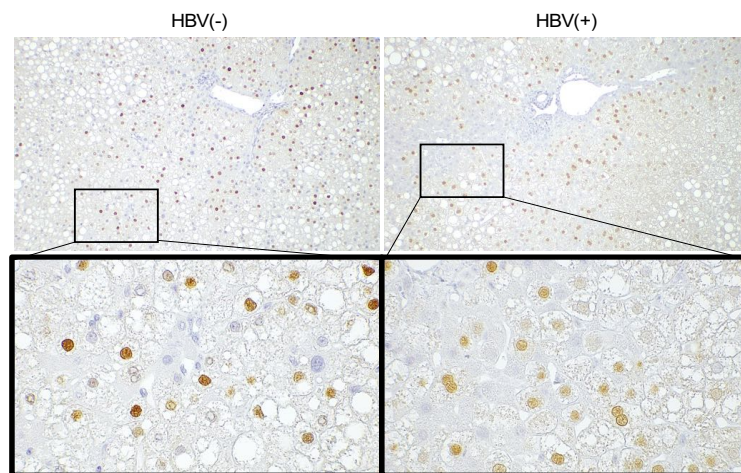


図3. ヒト肝キメラマウス (PXBマウス) のHBV感染に伴う肝組織内p21タンパク発現局在の変化 HBVに感染したPXBマウスの肝組織ではp21タンパク質の核内発現量が低下していることが免疫組織染色で確認された。反応陽性部位はDAB基質による発色で茶色に観察される。

(2) 既知および新規抗 HBV 核酸アナログが HBV 感染細胞に及ぼす効果の評価

上述の(1)の結果から HBV 感染によって肝細胞では SA-β gal 活性が低下、核内 p21 タンパク発現量が減少し、細胞老化とは逆の方向、いわば細胞の若返りが生じた。抗 HBV 核酸アナログのこの細胞老化逆行への影響について既存薬である TDF, ETV と我々が開発途中の新規核酸アナログ E-CFCP を用い、細胞毒性を生じない薬液濃度とインキュベーション条件下で検討を行なったところ、その効果は核酸アナログ種により異なることが明らかになった。既存の核酸アナログ (ETV・TDF) 添加では HBV 感染による核内 p21 タンパク発現低下は維持された一方で、E-CFCP 添加では核内 p21 タンパク量の発現低下が是正され非感染細胞レベルに up-regulate されること、即ち新規核酸アナログ E-CFCP は既存の核酸アナログに比して p21 pathway を介した premature な細胞老化を惹起し HBV 感染によって若返った細胞を HBV 非感染時の正常な状態に引き止める効果を発揮する可能性が示された (図 4)。この現象は E-CFCP 投与により HBV 血症を HBV-DNA

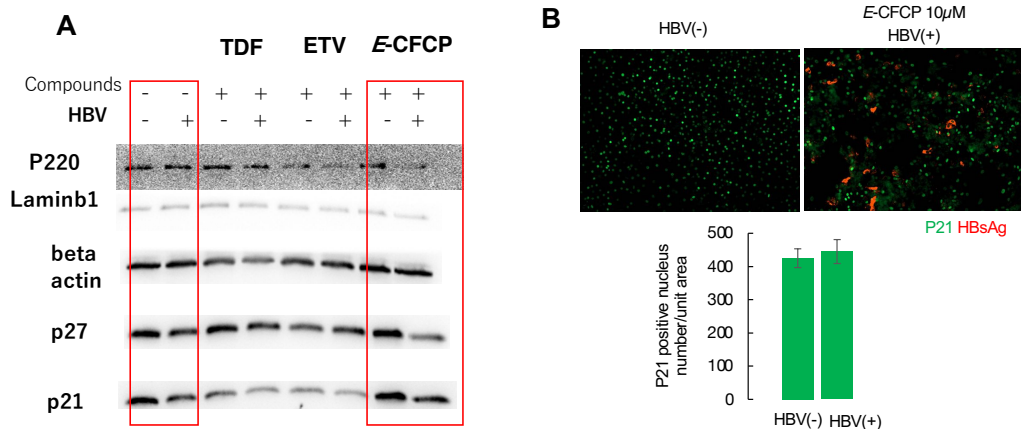


図4. HBV感染に伴う細胞老化と核酸アナログの細胞老化修飾 (A) HBVに感染したPXB/ヒト肝細胞ではp21タンパク質の核内発現低下、即ち細胞老化と逆の現象(抗細胞老化現象)が生じる。既存の核酸アナログ(TDF ETV 各10μM)はこの現象を是正しない一方で新規ハロゲン化核酸アナログ E-CFCP 10μM はp21の発現上昇を惹起しHBV感染による抗細胞老化現象を是正することがWestern blot法で示された。(B) HBVに感染したPXB/ヒト肝細胞(HBsAgタンパク:赤)にE-CFCP(10μM)を添加することでp21タンパク(緑)の核内発現量の上昇/回復が細胞免疫染色法で観察された。

~6x10⁸copies/mL から~3x10⁴copies/mL に低減させた HBV 感染 PXB マウス由来の肝臓組織切片の p21 免疫染色法でもその傾向が観察された (図 5A)。更にこれらの肝組織を Anti-Phospho-Histone H2A. X 抗体、Anti-Histon H2A. X 抗体、Anti-Acetyl-Histon H3 で免疫染色することにより、HBV 感染および、核酸アナログ CFCP による p21 の核内発現量変動は HistonH2A. X 発現量に関連しており、Phospho-Histone H2A. X 陽性細胞の出現に差異が認められなかったことから DNA ダメージに関連する細胞老化でない事、おそらく premature な細胞老化が明らかになった (図 5B-D)。

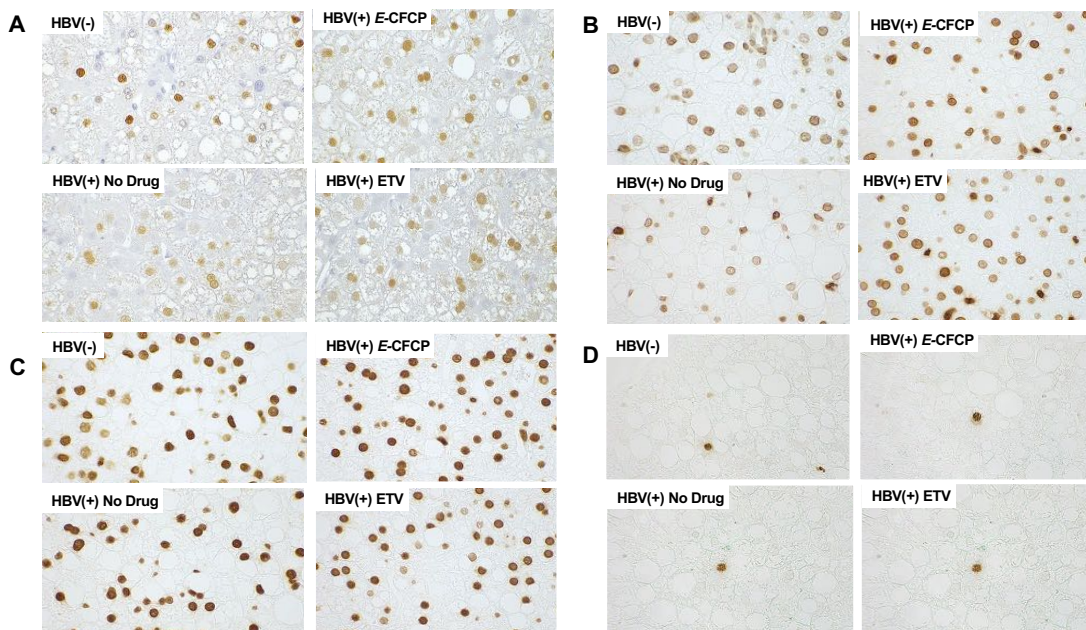


図5. ヒト肝キメラマウス (PXBマウス) のHBV感染と核酸アナログ投与による肝組織内p21タンパク発現局在の変化ならびにヒストン関連タンパク(Histon H2A.X, Acetyl-Histon H3, Phospho-Histon H2A.X)の発現と分布 (A) HBV感染によりPXBマウスの組織内肝細胞で低下したp21タンパク質の核内発現量はE-CFCP投与によりやや改善する傾向が免疫組織染色法で観察された。(B) Histon H2A.Xの核内発現量もHBV感染により減弱し、核酸アナログ添加で回復する傾向が観察された。(C) Acetyl-Histon H3, (D) Phospho-Histon H2A.XについてはHBV感染の有無、核酸アナログ添加の有無において差異は観察されなかった。

(3) 既知および新規核酸アナログのみの存在が細胞老化に及ぼす影響の評価

上述の(2)の結果を得る際にコントロールとして置いた核酸アナログ添加 HBV 非感染細胞での結果から PXB 細胞においては核酸アナログのみの存在が細胞老化に及ぼす影響について、ETV, TDF では p21 の核内発現レベルが 非処置非感染 PXB 細胞での発現レベルに比して低下すること、即ち細胞老化と逆の現象、をもたらすことが明らかになった。一方で E-CFCP の添加によっては非処置非感染 PXB 細胞での発現レベルと比しても顕著な差が見られなかった (図 4)。さらに異なる細胞種であり、細胞老化の研究に使用例のある HUVEC を用い、(2)と同様に薬剤それぞれ自体が細胞毒性を生じない薬液濃度とインキュベーション条件下で検討したところ、PXB 細胞での結果と異なり TDF, ETV 添加では非処置細胞と同等の p21 発現量が確認される一方で E-CFCP 添加では非処置細胞より発現量が増加することが明らかになった (図 6)。しかしながら TDF, ETV, E-CFCP いずれの発現量も MAPKAP キナーゼ 2 阻害剤共存下で変動することから HUVEC においては TDF, ETV, E-CFCP はそれ自体の存在で細胞に p21 pathway を介した premature な細胞老化を惹起することが明らかになった。

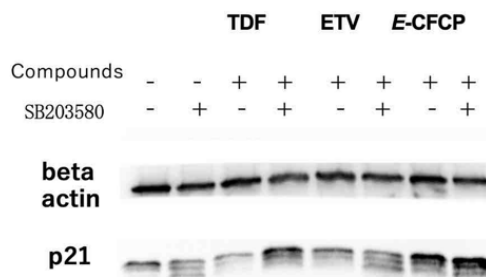


図6. 核酸アナログの存在自体が細胞老化に与える影響
HBV 非感染細胞として ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、薬剤それぞれ自体が細胞毒性を生じない薬液濃度 (各10 μ M) で培養後核内タンパク質を抽出、Western blot法で解析した。TDF, ETV添加では非処置細胞と同等のp21発現量が確認される一方で E-CFCP添加では非処置細胞に比して発現量の増加が確認された。またp21発現量はMAPKAPキナーゼ2阻害剤(SB203580)の共存下で変動した。

本研究では HBV 感染細胞では非感染細胞に比して老化関連タンパク p21 の核内局在低下がもたらされること、さらにその感染細胞での核内局在は 添加する抗 HBV 核酸アナログ種により異なって変動することを見出した。加えて HBV 感染細胞での p21 タンパクの核内局在低下 (細胞老化逆行) 現象は我々が開発中の新規核酸アナログ、E-CFCP の添加/投与によって正常細胞レベルに戻る傾向があることを明らかにした。この E-CFCP 添加による一定程度の細胞老化タンパクの発現維持、細胞機能是正効果が抗 HBV 核酸アナログである E-CFCP の抗ウイルス活性の副次的効果の産物のみであるかについては今後も検討が必要であるが、その様な検討を通じ HBV 複製を強力に抑制し、細胞機能を病態改善に有利に修飾 (HBV 感染症では肝癌化阻止) も可能な、より有望な薬剤創出に有用なデータを供する事が可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higashi-Kuwata Nobuyo, Hayashi Sanae, Kumamoto Hiroki, Ogata-Aoki Hiromi, Das Debananda, Venzon David, Hattori Shin-ichiro, Bulut Haydar, Hashimoto Mai, Otagiri Masaki, Takamune Nobutoki, Kishimoto Naoki, Davis David A., Misumi Shogo, Kakuni Masakazu, Tanaka Yasuhito, Mitsuya Hiroaki	4. 巻 74
2. 論文標題 Identification of a novel long-acting 4'-modified nucleoside reverse transcriptase inhibitor against HBV	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2020.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------