

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05734

研究課題名（和文）構造予測及び活性測定系による双方向アプローチを基盤とした革新的HBV阻害薬の探索

研究課題名（英文）Exploration of innovative HBV inhibitors based on a bidirectional approach using structure prediction and in vitro assay systems

研究代表者

大崎 恵理子 (Ohsaki, Eriko)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50447801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではB型肝炎ウイルス（HBV）のポリメラーゼの逆転写酵素（RT）ドメインの予測分子モデルを作製し、構造に基づくin silicoスクリーニングにより、RTとの結合親和性の高い化合物の探索を試みた。得られたヒット化合物について、高純度精製RTを用いたin vitroアッセイ系により阻害効果を評価したところ、実際に阻害効果を示す化合物の同定に成功した。さらにドッキングシミュレーションにより結合部位を予測し、化合物の組み合わせを検討したところ、併用による相加的・相乗的阻害効果が得られたことから、期待以上の予測精度で候補薬剤の絞り込みに成功した。

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）の持続感染者は、2019年の推計では世界で約3億人の持続感染者が存在し年間約89万人が死亡しており、治療薬開発は重要な課題である。薬剤開発において標的分子の立体構造データは必須であるが、HBVポリメラーゼの立体構造はウイルス発見から約60年近く経過した今なお解かれていない。本研究により予測分子モデルおよびシミュレーションの精度が期待以上に高いことが示唆され、薬剤探索の有用なツールとなることが示唆された。また、逆転写酵素（RT）ドメインの結晶化に世界で初めて成功し、立体構造の完全解明の日も近く、本研究の成果が薬剤開発の情報基盤の構築に貢献するものと確信する。

研究成果の概要（英文）： In this study, we proposed a molecular model of the reverse transcriptase (RT) domain of hepatitis B virus (HBV) polymerase and attempted to find compounds with high binding affinity to RT by structure-based in silico screening. The obtained hit compounds were evaluated for their inhibitory effects by an in vitro assay system using highly purified RT, and we succeeded in identifying compounds that showed inhibitory effects. Furthermore, we predicted the binding site by docking simulation, examined the compound combination, and found that additive and synergistic inhibitory effects were obtained by combining the compounds.

研究分野：分子生物学

キーワード：B型肝炎ウイルス ポリメラーゼ 逆転写酵素 立体構造解析 スクリーニング 非核酸系RT阻害剤

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) の一過性感染者は世界で20億人、そのうちウイルスが排除できず持続感染者となる人は世界に3億人存在し、日本には約130万人いると推測される。ウイルス感染症克服において、ウイルスゲノムの複製に不可欠なポリメラーゼを標的とした阻害剤は強力な治療薬となる。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の世界的な感染拡大による危機に際して、治療薬候補としていち早く効果が注目されたレムデシビルなどは、いずれもポリメラーゼを標的とした核酸アナログ製剤である。また、C型肝炎ウイルス (HCV) や HIV 感染症においては、核酸アナログを含む複数の阻害剤の併用療法により、高い治療効果が得られるようになった。これらのことから示唆されるように、B型肝炎ウイルス (HBV) 感染者からのウイルス排除という目的においてポリメラーゼを標的とした阻害剤は、併用療法を前提とした上で強力な治療薬となりうる。

ポリメラーゼを標的とした承認治療薬は、現在のところエンテカビルやラミブジンなどの核酸系逆転写酵素阻害剤 (Nucleos(t)ide analogue Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI) のみであり、多剤併用療法の柱となる重要な薬剤であるが、以前は単剤で用いられてきたために NRTI 耐性獲得例が多く認められる。このような耐性変異を克服するために、交差耐性のない新薬、特に NRTI とは作用機序の異なる画期的な非核酸系逆転写酵素阻害剤 (Non-Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI) の開発が求められている。作用機序の異なる薬剤の併用効果について、例えば実際に同じ NRTI であるものの、他の NRTI とは作用機序が異なる Tenofovir (TDF) を一例としてあげる。TDF は、すでにリン酸基が1つ付与された構造を持つことから、他の NRTI とは異なり最初のリン酸化反応をスキップし二リン酸の付与のみで阻害活性を呈するため、作用機序の違いから他の NRTI とは一線を画す治療効果を示す。

研究代表者は HBV RT の高純度精製に成功し、その特異的活性を検出する活性測定系の確立に成功し、これまでに 74,288 化合物のスクリーニングを完了した。研究代表者は HBV RT の高純度精製に成功し、その特異的活性を検出する活性測定系の確立に成功し、これまでに 74,288 化合物のスクリーニングを完了した。興味深いことにスクリーニングで見出した RT 阻害候補薬の中には、過去に報告のある異種ウイルス (DNA および RNA ウイルス) のポリメラーゼ阻害剤なども含まれていた。実際に研究代表者自身によっても HBV だけでなく異種ウイルスのポリメラーゼにも同様の阻害効果を示すものが多数確認されている。ポリメラーゼが機能的に高度に保存された因子であることから、本アッセイ系が阻害剤のスクリーニングに有効であることを裏付けている。HBV RT は RNA および DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、すなわち DNA ポリメラーゼに分類されるが、スクリーニングで同定した阻害化合物は、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性に対してのみ阻害効果を示した。これはスクリーニング時に RNA をテンプレートとして用いたために妥当な結果であるが、ヒトの DNA ポリメラーゼと同ファミリーである T4 polymerase, Klenow, Taq polymerase などに対しては阻害効果を示さなかったことから、ヒトの DNA ポリメラーゼには影響を及ぼさず、ウイルスゲノムに対して選択的に阻害効果を示す薬剤であることが示唆されている。HBV RT の阻害剤が異種ウイルスにも効果を示すことは特別不思議なことではない。例えば TDF は、2'-deoxyribose が acyclic nucleoside phosphonate (ANP) に置換された構造を持っているが、ANP 構造を持った抗ウイルス剤としては 1980 年代にすでに Epstein-Barr virus (EBV) に対する阻害効果が報告されている [1987, Lin et al, Antimicrob Agents Chemother]。以後、ANP 構造を持つ類縁化合物が多くヘルペスウイルスやレトロウイルスに対しても効果を示すことが報告されている [EBV; 9 編, retrovirus など 80 編]。幸いなことに現在 HBV に対する有効なワクチンがすでに存在しているため、母子感染などによる HBV 陽性率は低下し、十分な効果をあげている。しかしながら既感染者からいかにしてウイルスを“排除”するかが今後の重要な課題であり、強力な治療薬の開発が急務である。

2. 研究の目的

HBV ポリメラーゼはウイルス増殖にとって必須因子であり、ポリメラーゼを標的とした治療薬の開発は、B型肝炎ウイルスによる感染症の克服にとって重要な課題の一つである。また、その機能解明には構造解析が重要な役割を果たすことは HIV RT の立体構造解明によってもたらされた恩恵からも明らかである。本研究ではドッキングシミュレーションにより、結合ポケットの異なる阻害化合物の組み合わせを検討し、複数の候補薬剤の同時投与による阻害効果を *in vitro* 活性測定系にて評価する。この解析により既報告の薬剤耐性変異に対して強い阻害活性をもつ化合物が得られる可能性も期待される。

スクリーニングによって得られたヒット化合物は、ポリメラーゼ全長ではなく、RT ドメインの活性を阻害するものであるが、セルベースアッセイにより HBV DNA のレベルを減少

させるものが現時点で2つ同定されている。すなわちウイルス本来のポリメラーゼ活性を阻害する化合物が同定されているものの、その数はかなり絞り込まれる。しかしながら、単独では阻害効果が低い場合でも、複数の薬剤を併用することで活性に關与する複数の部位を同時にブロックすることができれば、原理的にはより強力にポリメラーゼの機能を停止させることができ、且つ変異のすきを与えない迅速なウイルス増殖抑制が可能になるはずである。そこで、2次スクリーニングで除外した化合物についても、シミュレーションにより再評価し、できるだけ多くのヒット化合物を候補薬として同定する。これらの有望な阻害化合物を最大限活かして構造学的見地から再評価し、コンビネーションによる複合的阻害作用化合物を発掘する。本研究課題により得られた知見を基盤として、ゲノム複製に必須因子である“ポリメラーゼ”を標的とする一撃必殺の強力な治療薬開発につなげる。

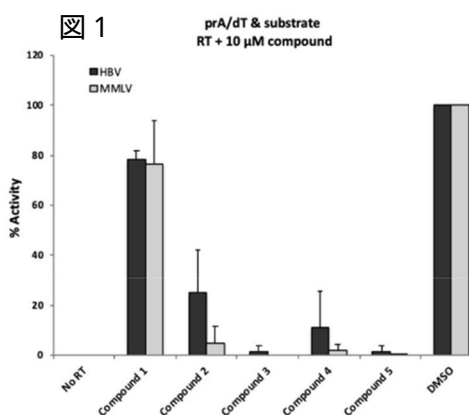
3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに 74,288 化合物のスクリーニング (cell-free assay) を遂行し、79 化合物の候補阻害剤を同定した。さらには、HBV 産生細胞である HB611 を用いたセルベースアッセイにより細胞毒性のない濃度範囲内において HBV DNA 量を減少させる化合物が現時点で少なくとも2つ同定されている。そこで本研究課題では、ヒット化合物の中から異なる結合ポケットに結合する化合物の組み合わせをドッキングシミュレーションにより予測し、実際の阻害効果を *in vitro* アッセイ (cell-free/cell-based) により検証する。具体的には RT タンパク質の高精度モデリング、ドッキングシミュレーションによる化合物と RT とのアミノ酸相互作用部位の同定、2次スクリーニングで除外した60%以上の阻害活性を示した化合物のシミュレーションによる再検証、複数の化合物の組み合わせのドッキングシミュレーションによる検討、*in vitro* 活性測定系による予測値と実験値の整合性検証、セルベースアッセイによる阻害活性の評価、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた感染実験による薬剤阻害効果の評価を行う。モデリングやシミュレーションの検証は、既報告の NRTI 耐性変異型 RT と NRTI との相互作用解析と *in vitro* 活性測定系、セルベースアッセイによるシミュレーションの評価により確認する。活性測定、セルベースアッセイなどの各作業は研究室に所属する大学院生の分担・協力により効率的に進める。立体構造解析、モデリング、ドッキングシミュレーション、分子可視化などの解析には「Waals」「ArgusLab」「DOCK」「AutoDock」「Flare」などのアカデミックフリーあるいは有償のソフトを使用し、実験値との比較によるパラメータの最適化を行い、必要に応じた最適な解析ソフトの選択など柔軟に対応する。

4. 研究成果

我々が用いている精製 RT は、特異的なポリメラーゼのテンプレート・プライマー・基質結合活性を示す。このアッセイ系で同定した RT 結合活性阻害剤のいくつかは、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)の RT の活性を阻害することが明らかとなった(図1)。MMLV RT は市販されている RT であり伸長活性を保持しているが、本アッセイ系で同定した HBV RT の候補阻害剤によりその活性が阻害される。したがって、本アッセイ系は、HBV RT の結合活性を阻害する化合物を同定することができ、伸長活性を阻害する核酸系 RT 阻害剤ではなく、非核酸系 RT 阻害剤の探索に有効であることが示唆された。一方で HBV ポリメラーゼはその発現・精製が非常に困難であるため、これまで結晶構造が得られていない。そこで、MMLV RT の PDB データを元に、MMLV RT の活性を阻害した化合物についてドッキングシミュレーションを試みた。興味深いことに、いくつかの阻害化合物の結合部位は非常によく似ており、結合に關与するアミノ酸に類似性が見られた。一方、コントロールとして阻害活性を持たない低分子化合物でシミュレーションしたところ、自由結合エネルギーの値は親和性が低いものであったことから、シミュレーションの結果は妥当なものであると考えられた。また、HIV RT のアミノ酸置換によりエンテカビル結合能を持つ、HBV RT の性質により近い変異体(HBV RT mimic)の結晶構造が明らかになっている。この HBV RT mimic の PDB データを用いてドッキングシミュレーションを行ったところ、候補化合物のいくつかは非常によく似た領域に結合することが推測された。

さらに、HBV ポリメラーゼの 3D モデルを構築し、*in vitro* スクリーニングに用いたライ

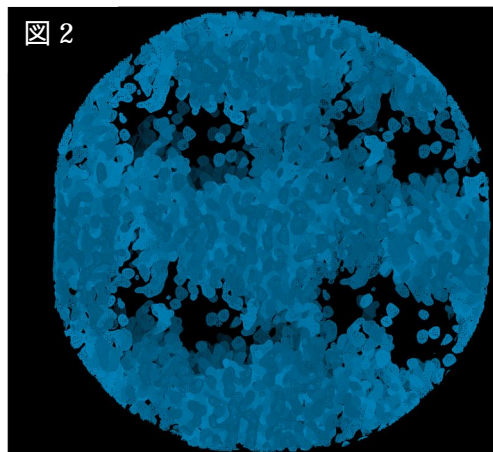


ブラリーを用いてバーチャルスクリーニングを行い、有効性を評価した。興味深いことに、*in vitro* スクリーニングで同定済みの 32 個のヒット化合物はいずれもドッキングスコアが -8.0kcal/mol 以下と非常に高い結合親和性を示し、バーチャルスクリーニングの有効性が示唆された。

In vitro cell-free assay および cell-based assay による薬剤評価で阻害効果が良好な化合物について、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた感染実験による毒性評価および阻害効果の評価を行った。その結果、毒性が認められない濃度範囲においてウイルス感染後十分なウイルス増加が認められたタイミングにて候補阻害剤を投与したところ、血中のウイルス DNA 量の低下が認められた。ただし、キメラ率があまり良好ではなかったことも原因の一つと考えられるが、顕著な減少効果までは確認されておらず、投与条件の再検討や高いキメラ率のマウスを使用するなどの改良が必要と考えられた。さらにはより低毒性、高阻害効果を目指した阻害剤の合成展開を視野に入れて検討する必要があると考える。

スクリーニングで得られたヒット化合物の結合部位をドッキングシミュレーションにより分析したところ、32 化合物は大きく 5 つの結合部位に分類することができた。そこで、結合ポケットの異なる 2 種の化合物を併用して *in vitro* アッセイにより阻害効果を検討したところ、単剤使用に比べて 2 剤併用により、相加的あるいは相乗的な阻害効果を示す組み合わせが複数見出され、併用療法の有効性が示唆された。このことから、これまで阻害効果が弱く選択肢から外れた化合物についても、併用効果を再評価することで、新規治療薬開発につながると考えられる。

また、RT の結晶化に世界で初めて成功し、現在結晶構造解析を試みている。結晶化条件の最適化により、現時点で 1.99 の解像度の電子密度マップを得ることに成功した（図 2）。結晶構造が明らかになることで、構造活性相関や阻害剤の作用機序が明らかになり、治療薬開発の重要な知見が得られるものと期待される。



Resolution: 1.99

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 大崎恵理子, 上田啓次	4. 巻 47
2. 論文標題 立体構造を基盤としたHBVポリメラーゼ阻害剤の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 752-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohsaki Eriko, Suwanmanee Yadarat, Ueda Keiji	4. 巻 13
2. 論文標題 Chronic Hepatitis B Treatment Strategies Using Polymerase Inhibitor-Based Combination Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13091691	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 -
1. 著者名 水野信哉, 大崎恵理子	4. 巻 1
2. 論文標題 新型コロナウイルスに対する畜産動物の感受性に関する文献考察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 94-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eriko Ohsaki, Keiji Ueda	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular and Cellular Interactions Between the Host and Herpesviruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers	6. 最初と最後の頁 21-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/978-2-88971-614-2	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 -

1. 著者名 Ohsaki Eriko, Ueda Keiji	4. 巻 12
2. 論文標題 Screening and Evaluation of Novel Compounds against Hepatitis B Virus Polymerase Using Highly Purified Reverse Transcriptase Domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 840(1-21)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12080840	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 -

1. 著者名 Hossain Md. Golzar, Akter Sharmin, Ohsaki Eriko, Ueda Keiji	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of the Interaction of Hepatitis B Virus with Mitochondria and Associated Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 175(1-15)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12020175	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 -

1. 著者名 Hossain Md Golzar, Mahmud Md Muket, Rahman Md Arifur, Akter Sharmin, Nazir K. H. M. Nazmul Hussain, Saha Sukumar, Wada Masami, Ohsaki Eriko, Honda Tomoyuki, Ueda Keiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Precore-Defective Hepatitis B Virus Genotype D2 Strain Isolated in Bangladesh	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00083-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00083-20	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 -

1. 著者名 Liu Xiao Quan, Ohsaki Eriko, Ueda Keiji	4. 巻 25
2. 論文標題 Establishment of a system for finding inhibitors of RNA binding with the HBV polymerase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 523 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12778	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 -

1. 著者名 Ohsaki Eriko, Ueda Keiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Interplay Between KSHV and the Host DNA Damage Response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 604351(1-8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.604351	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 -

1. 著者名 Hossain MG, Akter S, Ohsaki E, Ueda K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of the interaction of hepatitis B virus with mitochondria and associated proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12020175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Md. Golzar Hossain, Md Muket Mahmud, Md. Arifur Rahman, Sharmin Akter, K.H.M. Nazmul Nazir, Sukumar Saha, Masami Wada, Eriko Ohsaki, Tomoyuki Honda, and Keiji Ueda	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Pre-core-Defective Hepatitis B Virus Genotype D2 Strain Isolated in Bangladesh	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Society for Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00083-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-374153-0.00015-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 水野信哉, 大崎恵理子	4. 巻 78
2. 論文標題 増殖因子産生の場としての脾臓による肝再生調節機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血液内科 第78巻第6号 特集 脾臓研究の進歩と臨床	6. 最初と最後の頁 765-773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12020175	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Eriko Ohsaki, Yadarat Suwanmanee, Masami Wada, Keiji Ueda
2. 発表標題 1.Virtual screening and docking analysis of hits with the reverse transcriptase domain of HBV polymerase.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masami Wada, Eriko Ohsaki, Keiji Ueda.
2. 発表標題 2.Regulation of HBV RNAs by nonsense-mediated mRNA decay pathway controls viral replication.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eriko Ohsaki, Yadarat Suwanmanee, Keiji Ueda
2. 発表標題 Evaluation of novel candidate NNRTIs against Hepatitis B virus
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eriko Ohsaki, Yadarat Suwanmanee, Keiji Ueda
2. 発表標題 Novel non-nucleo(s)tide RT inhibitor candidates reducing HBV DNA amplification.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 水野信哉, 大崎恵理子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 新型コロナウイルスに対する畜産動物の感受性に関する文献考察 アグリバイオ2021年1月号	

1. 著者名 Mizuno S, Ohsaki E.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature Switzerland	5. 総ページ数 10
3. 書名 Liver Diseases-A Multidisciplinary Textbook	

1. 著者名 水野信哉, 大崎恵理子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 低温医学と冬眠科学をつなぐ増殖因子の役割 アグリバイオ2020年1月号	

1. 著者名 S. Mizuno, E. Ohsaki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 10
3. 書名 Molecular Basis of Fibrogenesis and Angiogenesis During Chronic Liver Disease: Impact of TGF- and VEGF on Pathogenic Pathways: Liver Diseases-A Multidisciplinary Textbook	

1. 著者名 水野信哉, 大崎恵理子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 低温医学と冬眠科学をつなぐ増殖因子の役割: アグリバイオ2020年1月号	

〔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
---------	---------