

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K08439

研究課題名(和文) HBV HBxタンパクのユニークな転写制御機構を標的とした抗HBV化合物の探索

研究課題名(英文) The search for anti-HBV compounds targeting the unique transcriptional regulatory mechanism of the HBV HBx protein.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、B型肝炎ウイルス(HBV)のXタンパクの発現を制御しているエンハンサー I/Xプロモーターを標的部位とし、FDA承認済み薬剤ライブラリーの中からその活性を抑制する化合物の探索を行った。その結果、22種の1次ヒット化合物(活性を抑制する化合物)を得た。次に、1次ヒット化合物がHBVの増殖を抑えるかについて検討したところ、4種の2次ヒット化合物を得た。更に、4種の2次ヒット化合物はHBVの感染の阻止及び細胞内のHBV cccDNAも減少させた。この結果より、エンハンサー I/Xプロモーターを標的部位とした新たなB型肝炎の治療薬の開発に繋がる可能性があることが示唆された。

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、これらの治療薬は薬剤耐性ウイルスの出現や副作用などの問題あり、継続的な治療が困難なケースがある。また、これらの治療薬では感染者の肝臓に存在するHBVのウイルス遺伝子のHBV cccDNAの完全排除が困難な為、治療後、B型肝炎の症状が収まった後にも、再活性が起こるケースがある。その為、HBV cccDNAが完全排除出来る治療薬の開発が望まれている。従って、本研究の成果からHBV cccDNAの完全排除の治療薬の開発に繋がれば、その社会的な意義は大きなものになると思われる。

研究成果の概要(英文)：We established a screening system in order to identify compounds inhibiting the enhancer I/X promoter, which regulates the expression of the hepatitis B virus (HBV) X protein. To identify an antiviral compound targeting the enhancer I/X promoter of HBV, we screened FDA-approved drug library by using this screening system. As a result, 22 primary hit compounds (compounds that inhibit the activity) were obtained. Next, we examined whether the primary hit compounds inhibited the growth of HBV, and obtained four secondary hit compounds. Furthermore, the four secondary hit compounds also inhibited HBV infection and reduced intracellular HBV cccDNA. The results suggest that the enhancer I/X promoter is a potential target site for the development of new therapeutic agents for hepatitis B.

研究分野：抗ウイルス薬

キーワード：HBV 転写機構 抗HBV化合物

## 1. 研究開始当初の背景

### 我が国の B 型肝炎の現状とその問題点

B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) のキャリアと呼ばれるウイルス持続感染者は、我が国では人口の約 1% に当たる約 130 ~ 150 万人存在すると推定されている。近年、我が国では、輸血用血液スクリーニング検査や母子感染予防対策によって輸血や母子感染による HBV の新規感染者は極めて稀になった。しかし、それに代わり、昨今、以下のような問題点が浮上している。

#### 1). 我が国における HBV の遺伝子型の変遷とその問題点

HBV はその遺伝子配列により A から J までの遺伝子型に分類されており、我が国における主たる HBV の遺伝子型は B および C である。近年の我が国の傾向としては、上述のような理由から、B および C の遺伝子型の HBV の新規感染者は減少している。ところが、我が国ではあまり見られなかった、慢性化しやすい遺伝子型 A の B 型肝炎患者が若年者に急増している。更に、その主な感染ルートが性行為によるものであるため、新たな問題となっている。

#### 2). HBV の再活性化

悪性腫瘍や関節リウマチに罹患している HBV 既往感染者 (臨床的には治癒状態と考えられる HBs 抗原陰性で HBe 抗体または HBs 抗体陽性例) に対して抗体製剤などの分子標的薬を用いた場合、HBV の再活性化が起こるケースがある。このような HBV 再活性化に起因する肝炎を de novo B 型肝炎と呼び、重症化するケースが多い。更に、de novo B 型肝炎発症場合、悪性腫瘍や関節リウマチ等の原疾患の治療を困難にさせる。我が国では、40 歳以上の年齢層の 20 ~ 25% に当たる約 1000 万人以上の HBV 既往感染者が存在すると推定され、また、40 歳以上の年齢になると悪性腫瘍や関節リウマチの発症する割合が上昇するため、新たな問題となっている。

#### 3). B 型肝炎の治療の現状

現在、B 型肝炎の治療薬として使われているペグインターフェロンや核酸アナログ製剤は、HBV の増殖を抑制し、肝炎の進行を抑制することが出来る。しかし、これらの治療薬の最大の問題点は、HBV が肝細胞の核内で形成する cccDNA (covalently closed circular DNA) を排除出来ない為、HBV を体内から完全に排除することが困難ということである。

## 2. 研究の目的

### 1). 研究の目的及び研究当初の研究の方向性

本研究課題の申請時は、HBV HBx タンパクが HBV cccDNA のような染色体外の環状 DNA の転写のみを優先的に促進するというユニークな転写制御機構に着目し (図 1) その転写制御機構を抑制することにより HBV cccDNA を抑制する化合物を探索することを目的とした。

ところが、図 2 に示すような HBx の HBV cccDNA の制御を抑制する化合物探索の為にスクリーニング系の構築し、化合物のスクリーニングを計画していた。ところが、HBx によるルシフェラーゼの活性の上昇が期待していたほどに上がらず、当初計画していたスクリーニング系の構築を断念せざるを得なかった。

### 2). 研究の方向性の変更

そこで当初の計画を変更し、HBV HBx の mRNA の転写制御するエンハンサー I/X プロモーターに着目し、エンハンサー I/X プロモーターの転写活性を抑制することにより HBV HBx タンパクを減少させ、HBV cccDNA を抑制する抗 HBV 化合物の探索を行うこととした (図 3)。

## 3. 研究の方法

### 1). HBV エンハンサー I/X プロモーターレポーター細胞の樹立

HBV エンハンサー I/X 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プラスミドを作製。次にこのプラスミドを Huh7 細胞に導入し、レポーター細胞を作製した (図 3)。

### 2). HBV エンハンサー I/X プロモーター活性抑制化合物のスクリーニング

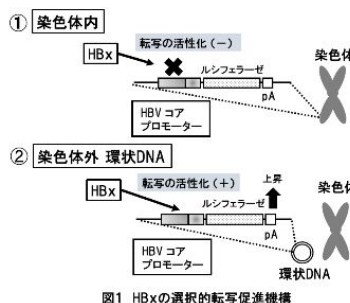


図1 HBxの選択的転写促進機構

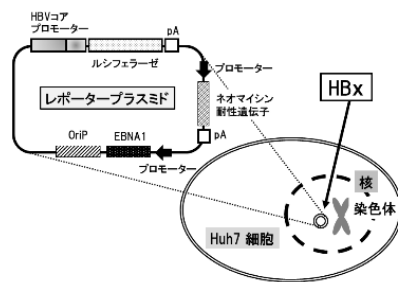


図2 エピゾーム型HBVコアプロモーターレポータープラスミドを用いたHBx転写促進作用をモニターする評価系

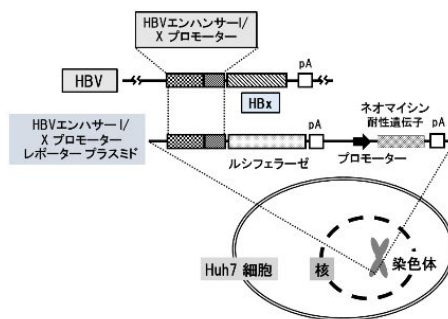


図3 HBVエンハンサー I/Xプロモーターレポーター細胞

FDA-approved drug library (1470 化合物) をスクリーニングソースとし、樹立した HBV エンハンサー I/X プロモーターレポーター細胞を用いて、エンハンサー I/X プロモーターの転写活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。

### 3). 抗 HBV 活性

HBV エンハンサー I/X プロモーターの転写活性を抑制したヒット化合物については、HBV のウイルスゲノムを導入した HepG2.2.15.7 細胞を用いて抗 HBV 活性及び細胞毒性について確認を行った。また、HBV の誘導系細胞である Hep38.7 細胞を用いて HBV cccDNA に対する抑制効果を調べた。更に、HBV の感染抑制については、HepG2-NTCP 細胞を用いて検討を行った

## 4 . 研究成果

HBV エンハンサー I/X プロモーターの転写活性を抑制し、抗 HBV 活性を示す化合物を見出すため、HBV エンハンサー I/X プロモーターを樹立した。この細胞を使って、FDA-approved drug library (1470 化合物) から HBV エンハンサー I/X プロモーターの転写活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。その結果、22 種の 1 次ヒット化合物を得た。次に、1 次ヒット化合物について、HepG2.2.15.7 細胞を用いて抗 HBV 活性の確認を行った。その結果、4 種の化合物が抗 HBV 活性を有し、これらを 2 次ヒット化合物とした。更に、HepG2-NTCP 細胞を用いた HBV の感染抑制試験を行ったところ、いずれの化合物も HBV の感染抑制を抑制した。また、Hep38.7 細胞を用いて HBV cccDNA に対する抑制効果を調べたところ、いずれの化合物も細胞内の cccDNA の量を減少させた。これらの結果より、4 種の 2 次ヒット化合物は HBV エンハンサー I/X プロモーターの転写活性を抑制することで HBx のタンパクが低下することにより( 図 4 )、HBV cccDNA に結合する HBx タンパクが低下し( 図 4 )、その結果、HBV cccDNA が減少することが示唆される( 図 4 )。現在、4 種の 2 次ヒット化合物の HBV cccDNA が減少する機序についてより詳細な解析を進めている。

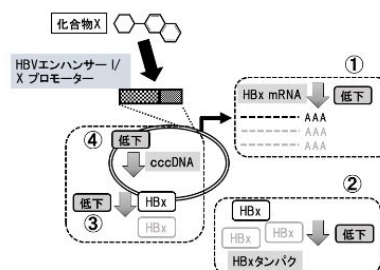


図4 HBVエンハンサー I/Xプロモーター 転写活性抑制化合物のcccDNA低下作用のメカニズム

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masaru Muraoka, Shinya Maekawa, Yuichiro Suzuki, Mitsuaki Sato, Tatsuya Yamaguchi, Taisuke Inoue, Tadashi Sato, Atsuya Yamashita, Kohji Moriishi, Masanori Matsuda, Nobuyuki Enomoto	4. 巻 50
2. 論文標題 Cancer-related genetic changes in multistep hepatocarcinogenesis and their correlation with imaging and histological findings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1071-1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13529	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 Teruhime Otoguro, Tomohisa Tanaka, Hirotake Kasai, Nobuhiro Kobayashi, Atsuya Yamashita, Takasuke Fukuhara, Akihideo Ryo, Moto Fukai, Akinobu Taketomi, Yoshiharu Matsuura, Kohji Moriishi	4. 巻 5
2. 論文標題 Establishment of a Cell Culture Model Permissive for Infection by Hepatitis B and C Viruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 634-649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1653	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 Tomohisa Tanaka, Kaori Okuyama-Dobashi, Ryoji Motohashi, Hiromasa Yokoe, Kazunori Takahashi, Pattama Wiriyasermkul, Hirotake Kasai, Atsuya Yamashita, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Akihideo Ryo, Shushi Nagamori, Masayoshi Tsubuki, Kohji Moriishi	4. 巻 194
2. 論文標題 Inhibitory effect of a novel thiazolidinedione derivative on hepatitis B virus entry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2021.105165	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 Masaaki Toyama, Koichi Watashi, Masanori Ikeda, Atsuya Yamashita, Mika Okamoto, Kohji Moriishi, Masamichi Muramatsu, Takaji Wakita, Ashoke Sharon, Masanori Baba	4. 巻 66
2. 論文標題 Novel Neplanocin A Derivatives as Selective Inhibitors of Hepatitis B Virus with a Unique Mechanism of Action	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e0207321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aac.02073-21.	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 -

〔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 山下 篤哉, 田中 智久, 乙黒 光姫, 葛西 宏威, 森石 恆司
2. 発表標題 HBV core promoter をターゲットとした新規抗HBV化合物4,4'-bis(cyclohexylmethyl)biphenyl-2,2',5,5'-tetraol
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 乙黒 光姫, 田中 智久, 葛西 宏威, 山下 篤哉, 福原 崇介, 松浦 善治, 森石 恆司
2. 発表標題 B型およびC型肝炎ウイルス感染を許容する培養細胞の樹立
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 田中 智久, 乙黒 光姫, 葛西 宏威, 山下 篤哉, 福原 崇介, 松浦 善治, 森石 恆司
2. 発表標題 HBV感染に関するcyclin-dependent kinaseの解析
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 山下篤哉, 葛西宏威, 田中智久, 大津直樹, 赤池康範, 森石恆司
2. 発表標題 HBV Enhancer I-X promoterをターゲットとした抗HBV化合物の同定
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学 医学部 微生物  
[https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/microbio/Microbiology\\_Yamanashi\\_Uni\\_Japanese/Home.html](https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/microbio/Microbiology_Yamanashi_Uni_Japanese/Home.html)  
山梨大学 研究者総覧  
<http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/319/0031900/profile.html>

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
---------	---------