

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07531

研究課題名(和文) マイクロRNA阻害剤によるB型肝炎ウイルスの複製抑制機構の解明

研究課題名(英文) Suppression of hepatitis B virus replication by a microRNA inhibitor

研究代表者

棟方 翼 (MUNAKATA, Tsubasa)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主席研究員

研究者番号：50420237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)のプレゲノムRNAの5'側イプシロンシグナル配列に結合するマイクロRNA(miRNA)として、我々はmiR-4453を発見した。miR-4453はHBVの複製を促進する宿主因子であり、このmiRNAに対する阻害剤はHBVの複製を逆に阻害することを、培養細胞実験だけでなく感染動物モデルで証明した。B型肝炎の治療法としては、発癌リスクが低下して予後が改善する「機能的治癒」、即ち既存の核酸アナログでは不可能な「HBs抗原陰性化」を達成可能な薬物が求められている。miR-4453阻害剤はHBs抗原量を低下させる為、HBV感染の新たな治療薬候補となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBV感染は慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へ進行する。現在の治療薬はインターフェロン又は核酸アナログである。しかし前者は重篤な副作用があり、後者はHBV排除は出来ない為、新しい作用機序の薬物が望まれている。特に発癌リスクが低下する「HBs抗原陰性化」を達成可能な薬物が求められている。我々はHBVの感染依存に発現が変動するマイクロRNAとしてmiR-4453を同定した。またmiR-4453の阻害剤がHBV複製をin vitro及びin vivoで抑制することも見出した(特許第7441174号)。そして、miR-4453阻害剤はHBs抗原量を低下させるため、新規抗ウイルス薬になり得る。

研究成果の概要(英文)：During the research of hepatitis B virus (HBV) life cycle, we have found that miR-4453, binding to the 5' epsilon signal of HBV pregenomic RNA (pgRNA), enhanced HBV replication. miR-4453 is a pro-viral host factor, and inhibitors of miR-4453 were found to suppress HBV persistent infection in vitro and in vivo. As a novel therapy for HBV chronic infection and subsequent liver diseases, miR-4453 inhibitor is an appropriate candidate, because the amount of HBsAg, which causes the risk of developing cancer, can be down-regulated by the inhibitor compounds.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス マイクロRNA 治療薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は膜構造を持ち、rcDNA (relaxed circular: 不完全な二本鎖DNA) をゲノムとするウイルスであり、ヒト肝細胞へ感染すると核内で cccDNA (covalently closed circular: 完全閉環二本鎖DNA) を形成する。この cccDNA より発現するウイルス RNA の一つが pgRNA (pregenomic: プレゲノミック RNA) で、pgRNA を鋳型としてウイルスの逆転写酵素(RT) により HBV のゲノム DNA が合成される。また、cccDNA からは HBV の膜蛋白質である HBs 抗原を発現する RNA も転写される。

HBV の持続感染者は世界で推定 4 億人存在し、日本でも国民の約 1% が感染している。HBV に感染すると慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌、肝不全へ進行する為、生命予後に直接関与する HBV 感染の治療は必須である。現在の治療薬はインターフェロン又は核酸アナログである。しかし、前者は感染者の自然免疫を高める上で重篤な副作用が常に問題であり、後者は HBV の RT を阻害するものの HBV 排除は出来ず一生服薬を継続する必要があり、服薬をしていても HBV 関連の発癌を誘発することがある為、新しい作用機序の薬物の開発が望まれている。特に、発癌リスクが低下して予後が改善することが判明している「機能的治癒」、即ち核酸アナログでは不可能な「HBs 抗原陰性化」を達成可能な薬物が求められている。

マイクロ RNA (miRNA) は 20-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり遺伝子の転写後発現調節を行う。ヒト・ゲノムには 1000 以上の miRNA がコードされている。miRNA はその標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の 3'UTR を認識して、標的 mRNA を不安定化するとともに翻訳抑制を行う。miRNA による制御は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは感染といった広範な生理学的及び病理学的な過程で重要な役割を担う。HBV 感染でも既に複数の miRNA がウイルス蛋白質の発現を抑制することが報告されていたが、ウイルス複製を促進する miRNA は知られていなかった。

HBV はヒトやチンパンジーには感染するが通常のマウスには感染しない為、我々は、マウス肝臓の大部分をヒト肝臓に置換したヒト肝臓キメラマウスを用いて HBV 動物感染実験を行った。その結果、HBV の持続感染依存に発現が有意に変動する miRNA として、miR-210、miR-663a、miR-3648、miR-4453 の 4 種類を同定した。我々は更にその中で miR-4453 が HBV 複製を促進することを発見した。

### 2. 研究の目的

我々は更に、miR-4453 の阻害剤が HBV の複製を *in vitro* 及び *in vivo* で抑制することも見出した。現在の HBV 治療法では血中の HBV DNA は低下する一方で、cccDNA の排除は出来ず、HBs 抗原陰性化も不可能である。我々が発見した miRNA 阻害剤は cccDNA の排除については未解明だが、それ以外の HBV DNA、HBV RNA、HBs 抗原の全ての発現量を低下させる為、新しい HBV 治療薬の重要な候補である。そこで我々は「**マイクロ RNA 阻害剤で HBV 感染を治癒できるか?**」という疑問を解決する為に本課題で研究を進めることを考えた。

miR-4453 の標的配列は、HBV の pgRNA に存在するイプシロン・シグナル中にある。我々の解析により、miR-4453 はイプシロン・シグナルに結合することで pgRNA の安定性を上げて、HBV 複製を促進していることが判明している。このシグナルは pgRNA の粒子形成と逆転写に必須であり、特に標的配列部分は、A から H まで 8 種類存在する HBV の遺伝子型で完全に保存されている。即ち、miR-4453 は HBV の RNA の中でも機能的に極めて重要な部分を認識する為、治療薬の標的として適している。

miRNA 阻害剤による抗ウイルス薬としては、C 型肝炎ウイルス (HCV) の miravirsen が Phase II まで治験が進んでいる。HCV での成功例を参考にしつつ開発出来るのも、本研究課題の利点と言える。

miRNA と対比される遺伝子発現制御方法としては siRNA が挙げられる。siRNA の標的配列は 1 塩基でも変化すると効率が格段に低下するが、miRNA の標的は元々が不完全な対合である為、標的の変化には siRNA より対応出来る。HBV の既知の治療薬である RT 阻害薬には既に耐性ウイルスが出現していることを考えると、この点では miRNA の方が siRNA より優位性がある。その上で我々は更に、miRNA の阻害剤を利用している。宿主ゲノムから発現する miRNA に対する変異は極めて起り難い為、耐性ウイルスの出現は極めて考え難い。ただ、miR-4453 の遺伝子配列中にはポリモルフィズムが報告されており、その HBV に対する効果も解析する。

### 3. 研究の方法

「miR-4453 阻害剤が HBV 治療薬となり得るか？」を検討していく上で、次の四点の解析が重要な研究テーマとなる。

- (1) miR-4453 が HBV pgRNA を安定化するメカニズムの解析
- (2) miR-4453 阻害剤が in vivo で HBV 複製を抑制するメカニズムの解析
- (3) miR-4453 阻害剤の安全性の解析
- (4) miR-4453 の HBV 以外の標的探索とその機能解析

具体的には、以下の実験を主に行うことで結果を吟味して、上記命題を検討する。

- (1) ノザン・プロット解析を用いて、pgRNA の量的変化及び安定性が miR-4453 やその阻害剤により、どのように制御されるのか観察する。pgRNA の安定性の解析では、アクチノマイシン D を用いて RNA の新規合成を抑制してからノザン・プロットを行う。
- (2) ヒト肝臓キメラマウスを用いた HBV 感染実験系において、持続感染が成立した後に、miR-4453 阻害剤を投与する。血中の HBV DNA と HBs 抗原に加えて、HBe 抗原の定量も行う。血清中の HBs 抗原と HBe 抗原は肝臓中の cccDNA のサロゲート・マーカーでもあるので、詳細に観察する。
- (3) ヒト肝臓キメラマウスの実験において、マウスの体重とアルブミンの量を経時的に測定することで、miR-4453 阻害剤の安全性について検討を行う。
- (4) miR-4453 の肝細胞中の標的遺伝子を探索する目的で、CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) -seq 解析を行う。培養肝細胞 HepG2 において、miR-4453 とその阻害剤の両方の効果を包括的に解析することで、より確度の高い標的遺伝子群を同定する。

### 4. 研究成果

我々は、HBV の pgRNA 量が miR-4453 により制御されていること、更に pgRNA の安定性が実際に miR-4453 に依存していることを突き止めた(図 1)。pgRNA の分解に寄与する、宿主の RNA 分解酵素の候補は既に同定している。pgRNA がイプシロンのステム・ループ構造に結合することで、その RNA 分解酵素が物理的及び機能的に作用できなくなると予想している。

動物モデルでの miR-4453 阻害剤の抗 HBV 作用については、図 2 にまとめている。血清中の HBV DNA、HBe 抗原、HBs 抗原の全てが阻害剤により低下することから、この阻害剤が HBV 治療薬の有効な候補であることは明らかである。重要なことは、肝細胞中の cccDNA 量のサロゲート・マーカーとなる HBe 抗原と HBs 抗原の双方が阻害剤依存に優位に定価したことである。これらの結果から、miR-4453 阻害剤は「機能的治癒」に留まらず、HBV の完全な排除にも寄与する可能性が期待される。

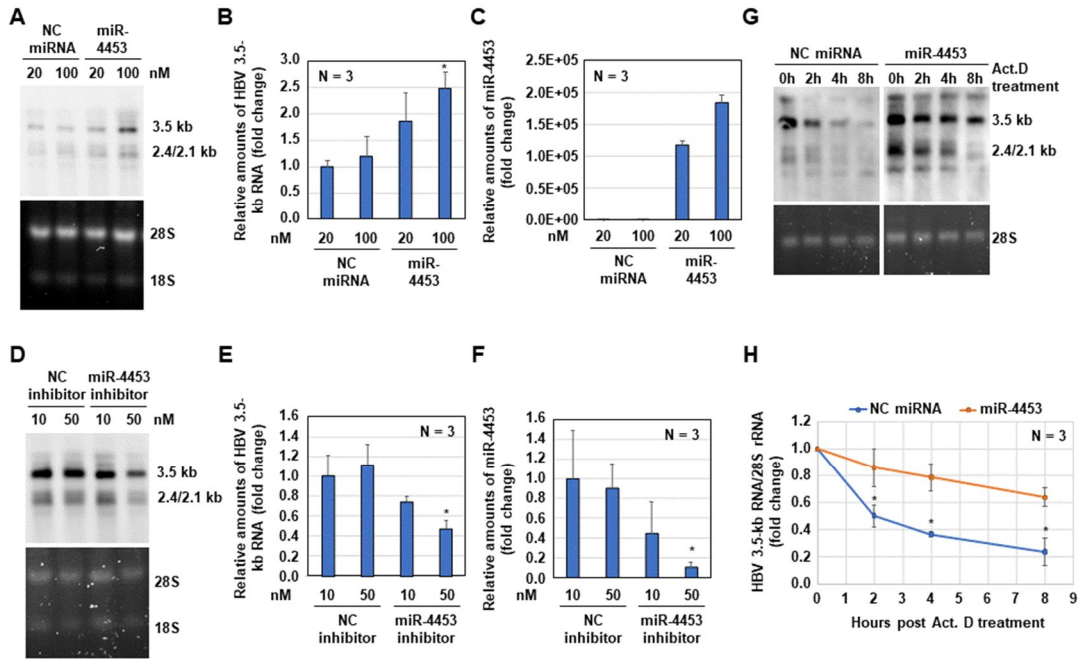


図1. miR-4453 はHBV pgRNA の安定性を促進する

- A, B) HBV の 3.5-kb RNA (pgRNA) は miR-4453 依存に量が増加する。  
 C) miR-4453 の量は RNA トランスフェクションにより増加する。  
 D, E) HBV の 3.5-kb RNA (pgRNA) は miR-4453 阻害剤依存に量が減少する。  
 F) miR-4453 の量は阻害剤のトランスフェクションに減少する。  
 G, H) HBV の 3.5-kb RNA (pgRNA) の半減期は miR-4453 により増加する。

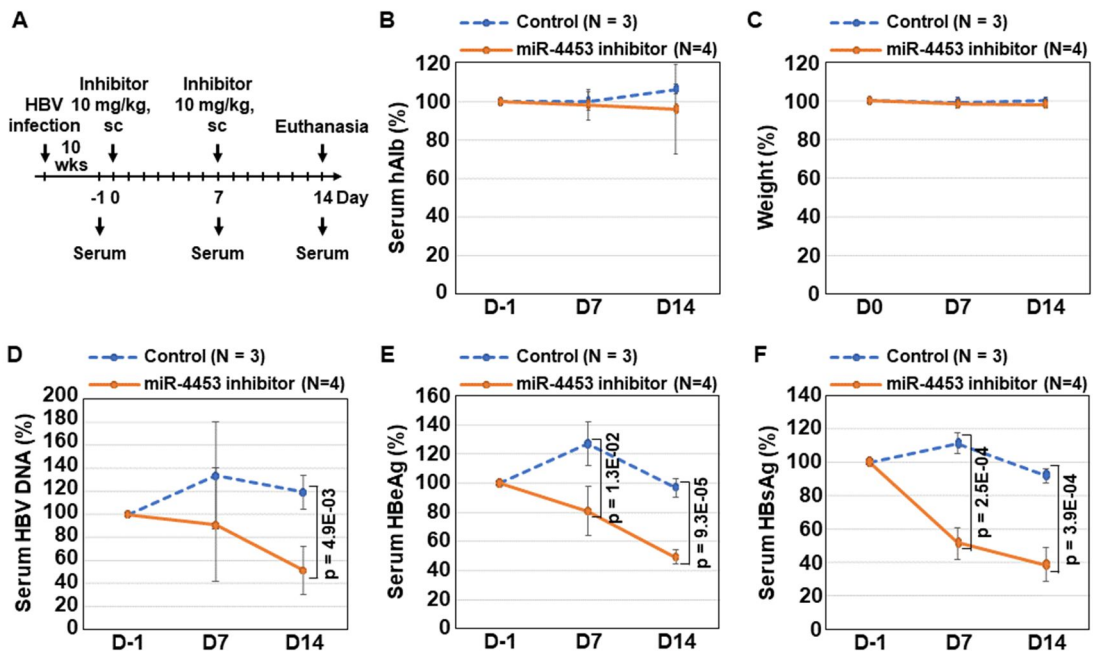


図2. miR-4453 阻害剤はHBV の持続感染を動物モデルで抑制する

- A) ヒト肝臓キメラマウス感染実験のスケジュール。

- B) キメラマウス中のヒト・アルブミンの量の経時的変化。
- C) キメラマウスの体重の経時的変化。
- D) キメラマウス血清中の HBV DNA の経時的変化。
- E) キメラマウス血清中の HBe 抗原量の経時的変化。
- F) キメラマウス血清中の HBs 抗原量の経時的変化。

また、動物実験において、ヒト・アルブミンの減少やマウスの体重減少が観察されなかった為、この阻害剤の実験濃度での安全性も担保された。今後は更に高い抗 HBV 効果を示すために、投与量もしくは投与回数を増やして実験することを考えている。

包括的な CAGE-seq 解析により、miR-4453 の細胞内での標的遺伝子群が明らかとなった。これらの HBV 感染に対する効果は不明であるが、今後の研究計画で明らかにしていきたい。HBV とは無関係の生理的機能を有する場合も考えられるので、miR-4453 標的遺伝子群の解析は、より慎重に行う必要がある。

miR-4453 阻害剤による HBV 複製阻害について、我々は日本と世界で特許を出願しており、既に日本では特許が成立している（特許第 7441174 号）。この特許を有効活用する為にも、HBV 治療薬としての具体化を今後も進める予定である。

## 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 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasui F, Matsumoto Y, Yamamoto N, Sanada T, Honda T, Munakata T, Itoh Y, Kohara M.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Infection with the SARS-CoV-2 B.1.351 variant is lethal in aged BALB/c mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4150 (1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08104-4.	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

1. 著者名 Ishigaki H, Yasui F, Nakayama M, Endo A, Yamamoto N, Yamaji K, Nguyen CT, Kitagawa Y, Sanada T, Honda T, Munakata T, Higa M, Toyama S, Kono R, Takagi A, Matsumoto Y, Koseki A, Hayashi K, Shiohara M, Ishii K, Saeki Y, Itoh Y, Kohara M.	4. 巻 13
2. 論文標題 An attenuated vaccinia vaccine encoding the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 spike protein elicits broad and durable immune responses, and protects cynomolgus macaques and human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice from severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 and its variants.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 967019 (1-18)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.967019.	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

1. 著者名 Honda T, Gomi S, Yamane D, Yasui F, Yamamoto T, Munakata T, Itoh Y, Ogasawara K, Sanada T, Yamaji K, Yasutomi Y, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M.	4. 巻 6 (3)
2. 論文標題 Development and Characterization of a Highly Sensitive NanoLuciferase-Based Immunoprecipitation System for the Detection of Anti-Influenza Virus HA Antibodies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e01342-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.01342-20.	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 該当する

1. 著者名 Makoto Saito, Yasushi Itoh, Fumihiko Yasui, Tsubasa Munakata, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeted macrocycles hamper hemagglutinin adsorption and fusion, and have antiviral effects in murine and macaque models of influenza.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications, in press	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22964-w	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tsubasa Munakata and Michinori Kohara
2. 発表標題 CLEC1B is a novel host factor that facilitates hepatitis B virus infection.
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------