

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15996

研究課題名（和文）In vivoでの、B型肝炎ウイルス治療薬の開発及び排除機構の解明

研究課題名（英文）Development of hepatitis B virus therapeutic drug and elucidation of elimination mechanism in vivo.

研究代表者

竹内 文彦（TAKEUCHI, Fumihiko）

京都大学・医生物学研究所・特定助教

研究者番号：20852437

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）：B型肝炎ウイルスに対するジクマロールの効果は、複数の細胞実験系で確認できた。しかし、B型肝炎ウイルス感染した遺伝子改変マウスにジクマロールを投与したが、抗B型肝炎ウイルス効果は確認することができなかった。これは薬の効果よりも、B型肝炎ウイルスの増えるスピードが速かった可能性が考えられた。これらの知見は今後のB型肝炎ウイルス完治のための治療薬研究に貢献できると期待できる。ジクマロールを発見した実験系によって、強い化合物が複数、示唆された。しかし、候補化合物の一つは安定性が低いことが分かった。現在は残りの化合物候補を評価しており、ジクマロールよりも強力な治療薬を発見することが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルスの根治に向けた治療薬の開発において、既存の治療薬とは全く異なる種類の治療薬開発を行なった。結果、複数の候補治療薬が発見された。現在は、より少ない量で効果が出るように、治療薬の改良などを目指している。

研究成果の概要（英文）：The effect of dicumarol on hepatitis B virus was confirmed in several cellular experimental systems. However, dicumarol was administered to genetically modified mice infected with hepatitis B virus, but its anti-hepatitis B virus effect could not be confirmed. This suggested that the speed at which the hepatitis B virus increased may have been faster than the drug's effectiveness. These findings are expected to contribute to future research on therapeutic drugs for the complete cure of hepatitis B virus.

The experimental system in which dicumarol was found suggested several strong compounds. However, one of the candidate compounds was found to have low stability. We are currently evaluating the remaining candidate compounds and expect to discover a more potent therapeutic agent than dicumarol.

研究分野：ウイルス

キーワード：B型肝炎ウイルス HBV cccDNA

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus; HBV) の高い感染性は HBV ゲノムの特徴的な生活環に由来する。血液や体液を介して体内に侵入した後、HBV のゲノムは不安定な開環 DNA (relaxed circular DNA; rcDNA) から非常に安定な閉環 2 重鎖 DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) を形成する。形成された cccDNA は全ての HBV 複製の起点となるので、HBV タンパク質や rcDNA を減少させても、cccDNA が 1 copy でも残れば、そこからウイルスの再合成、再活性化が起こる。一方で、cccDNA を減少させれば、HBV RNA, DNA, タンパク質の全てが減少する。よって、cccDNA の除去が根本的な HBV 完治のために必須である。現在まで報告されているワクチン、インターフェロンや核酸アナログ製剤では、HBV の複製、侵入を阻害できるが、cccDNA の減少を誘導することはできない。cccDNA を減少させることができる化合物の探索は、HBV 完治のために急務となっている。

2. 研究の目的

我々は、変異型レンチウイルスを用いたスクリーニングを行い、約 4000 種の化合物の中から cccDNA 阻害剤としてジクマロールを発見した。ジクマロールは臨床使用されている抗凝固剤のワルファリンの前駆体である。ジクマロールは HBV の受容体である Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を安定発現した HepG2 細胞を用いた感染実験での HBV RNA および、HBV 安定発現細胞 (Hep38.7) での cccDNA また、ヒト化キメラマウスから摘出されたヒト初代継代肝細胞での感染実験において HBV タンパク質を減少させた。本研究は、HBV 感染したヒト化キメラマウスにジクマロールを長期投与することによって、組織内 cccDNA 排除確認を目的とした。そして、有効性が確認できた変異型レンチウイルスを用いたスクリーニングによって、新たな化合物の探索を目的とした。

3. 研究の方法

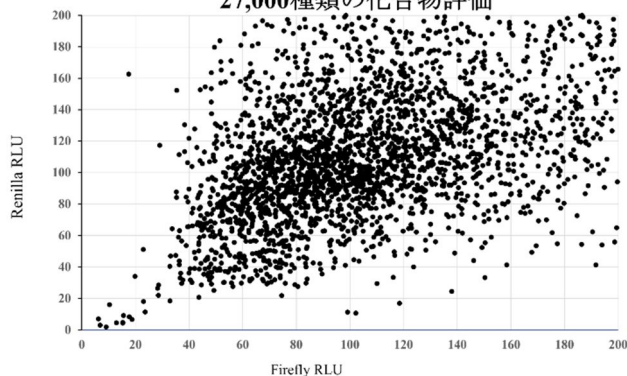
HBV 感染したヒト化キメラマウスにジクマロールを投与し、抗 HBV 効果を確認する。
変異型レンチウイルススクリーニング系を用いて、より強力な化合物を探索する。

4. 研究成果

HBV に対するジクマロールの阻害効果は、低感染下のみならず高感染下においても確認することができた。そして、HBV の DNA 配列がゲノムに挿入された HBV 安定発現株においても阻害効果を確認することができた。しかし、HBV 感染したヒト化キメラマウスにジクマロールを低濃度の DMSO と非イオン性界面活性剤を併用した溶媒で投与したが、血清中の HBV タンパク質の減少は確認することができなかった。これは核内で修飾タンパク質によって高度に保護された cccDNA を阻害するには薬剤の濃度だけでなく期間も重要であると考えられた。また、HBV の増幅が強く、化合物の阻害効果よりも増幅が上回っている時はその効果を確認することが難しいことが考えられた。これらの知見は今後の HBV 完治のための阻害薬研究に貢献できると期待できる。

ジクマロールを発見した実験系によって 27,000 種類の化合物を評価した。HBV の cccDNA と同じく、細胞内の環状 DNA を評価するために Firefly のルシフェラーゼの値を使い、タンパク質合成や細胞増殖、転写活性などの細胞毒性を評価する内在性コントロールとして Renilla ルシフェラーゼの値を使った。細胞としては、NTCP を安定発現する HepG2 を使用した。27,000 種類の化合物を細胞に投与した。細胞を回収後、Firefly と Renilla ルシフェラーゼの値を計り、コントロールよりも Renilla の値が変化しておらず、その一方で Firefly の値が減少している薬剤を更に詳しく解析した。結果、27,000 種類の化合物の中から、29 個の化合物候補を選択した。

変異型レンチスクリーニングによる
27,000種類の化合物評価



この 29 個の化合物候補は内在性コントロールである Renilla の値が 80%以上、120%以下で推移する化合物を選択した。そして、環状 DNA の指標である Firefly の値が 50%以下になる化合物である。

4. 研究成果 (続き)

この29個の化合物を使って、次は初代ヒト肝臓細胞を使ったHBV感染実験によって、抗HBV効果を評価した。

これまでのスクリーニング系ではHepG2でのレンチウイルスでの評価であり、実際に抗HBV効果があるのかを評価する必要性があったからだ。

NTCPを安定発現させたHepG2でもHBV感染実験を行なうことは可能であるが、感染値が低く、感染に用いたウイルス量よりも、感染して合成されるウイルス量が極端に少ないことから、今回は感染値が高い初代ヒト肝臓細胞を使ったHBV感染実験を行なった

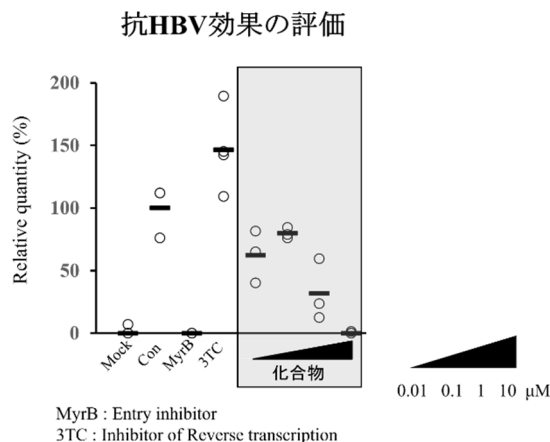
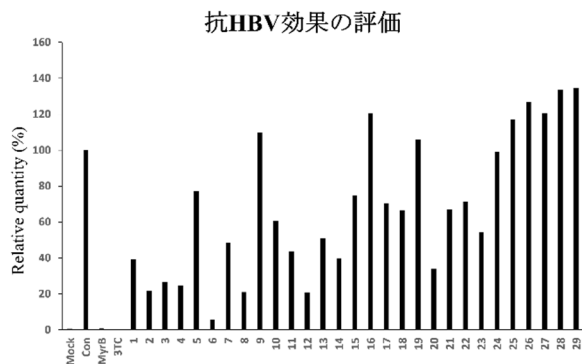
感染後に化合物を培養液中に付加し、抗HBV効果をHBVタンパク質やRNA、DNAの減少によって評価した。結果、29個の化合物候補から9つの化合物候補を見出した。

この9つの化合物候補は抗HBV効果がコントロールよりも50%以上の阻害効果を示す。一方で、細胞毒性がない化合物を候補として選んだ。

9つの化合物をさらに初代ヒト肝臓細胞でのHBV感染実験によって評価した。評価対象として前回と同様に、侵入阻害剤としてMyrBを使い、逆転写酵素阻害剤として3TCを用いた。感染後に化合物を培養液中に付加し(MyrBだけは感染期間の24時間のみ)抗HBV効果をHBVタンパク質やRNA、DNAの減少によって評価した。結果、2つの化合物が再現性高く、抗HBV効果を示した。しかし、2つの候補の1つは培養液中での安定性が低いことが分かり、候補としては除外された。

この化合物はジクマロールよりも10倍以上低い濃度でも、HBVのcccDNAのみならず、タンパク質の阻害効果が示唆された。

現在は化合物候補をその構造類似体も含めて評価しており、ジクマロールよりも強力な阻害剤を発見することが期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究期間中に新型コロナウイルスの感染拡大があり、主要な学会が延期になった。
また、評価中の化合物は特許出願を目指している。
特許出願前の学会、論文での発表は慎重に対応した。

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