

令和 7 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K07980

研究課題名（和文）HBV HBxを標的とした創薬の多角的アプローチ：cccDNA排除を目指して

研究課題名（英文）A Multifaceted Drug Discovery Approach Targeting HBV HBx: Toward the Elimination of cccDNA

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、HBV HBxがHBVの増殖において関与する1）転写制御過程、2）タンパク分解過程、3）cccDNA制御過程の3つの過程を標的とし、HBV cccDNA排除可能なリード化合物創製を目標に研究を行ってきた。その結果、転写制御過程を抑制する4種の化合物を見出し、*in vitro*の系において抗HBV活性が確認出来た。更に、このうち1種の化合物は、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて抗HBV活性が確認出来た。また、止瀉薬成分のBerberineが、HBVの転写制御に関与しているHNF4 のK48ポリユビキチン化を促進し、プロテアソーム依存的タンパク分解を促進し、HBV増殖を抑制する事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、HBV cccDNAを排除する化合物創製を目標に研究を行ってきた。その結果、HBV転写制御を抑制する4種の化合物を見出した。これらの化合物は、*in vitro*の系で抗HBV活性が確認出来た。更に、このうちの1種は、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて抗HBV活性が確認出来た。また、止瀉薬成分のBerberineが、HBVの転写制御に関与しているHNF4 のK48ポリユビキチン化を促進し、プロテアソーム依存的なタンパク分解を促進し、HBVの増殖を抑制する事を見出した。このような研究成果から、新たな作用機序の抗HBV薬開発に繋がる事が期待出来ると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we targeted three HBx-mediated processes involved in HBV replication 1) transcriptional regulation, 2) protein degradation, 3) cccDNA regulation with the aim of developing lead compounds capable of eliminating HBV cccDNA. We identified four compounds that suppress HBV transcription and confirmed their anti-HBV activity *in vitro*. Furthermore, one compound showed antiviral efficacy in a humanized liver chimeric mouse model. We also identified that berberine, a component of antidiarrheal agents, enhances K48-linked polyubiquitination of HNF4, a key regulator of HBV transcription, promoting its proteasome-dependent degradation and thereby suppressing HBV replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV HBx 新規抗HBV薬開発

1. 研究開始当初の背景

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 B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: 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) 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、成人の感染でも約 10% はキャリア化する遺伝子型 A の HBV 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大きな問題となっている。

(2) 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 HBc 抗体または HBs 抗体陽性例) に対して抗癌剤や分子標的薬を用いた場合、HBV の再活性化が起こる。これを de novo B 型肝炎と言い、我が国では約 1000 万人以上とされる HBV 既往感染者が存在するため、その対策や治療が課題となっている。

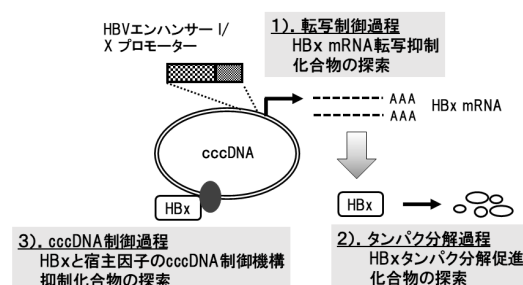
(3) B 型肝炎の治療薬として使われているペグインターフェロンや核酸アナログ製剤は、HBV の増殖を抑制し、肝炎の進行を抑えることが出来る。しかし、これらの治療薬の最大の問題点は、HBV が肝細胞の核内で形成する cccDNA (covalently closed circular DNA) を排除出来ない為、HBV を体内から完全に排除することが困難だということである。

2. 研究の目的

本研究では、HBx タンパクの以下の 3 つの過程を標的とし、HBV cccDNA 排除可能な新規抗 HBV 薬のリード化合物の創製を目指す。

- 1) 転写制御過程、
- 2) タンパク分解過程、
- 3) cccDNA 制御過程

具体的には、1) ~ 3) の各過程のスクリーニング系を構築する。また、スクリーニングソースは、既存の。更に、cccDNA 排除可能な抗 HBV 薬の開発の為のリード化合物の創製を目指し、スクリーニングのヒット化合物の構造最適化を行う。



3. 研究の方法

1) 転写制御過程

HBx タンパクを転写制御している 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、HBV エンハンサー I / X プロモーター活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。

2) タンパク分解課程

11 アミノ酸のペプチドタグ (HiBiT) が付いた HBx 発現プラスミドを作製し、細胞に導入して、基質により HBx 発現を定量出来るシステムを構築し、HBx を分解する化合物のスクリーニングを行った。

3) 抗 HBV 活性の評価

1) 2) のスクリーニング系のヒット化合物については、HBV 遺伝子が挿入されている HepG2.2.15.7 細胞や HBV の感染系である HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて、抗 HBV 活性の確認を行った。これらの系で抗 HBV 活性が確認出来た化合物については、ヒト肝細胞キメラマウス由来の PXB 細胞を用いて、培養上清中の HBV のウイルス遺伝子やウイルスタンパク、更に、細胞内の cccDNA に測定して、化合物の抗 HBV 活性の評価を行った。

4. 研究成果

1) 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し、HBV のウイルスゲノムを挿入し、HBV を恒常的に産生している Hepg2.2.15.7 細胞において抗 HBV 活性を示した 4 種の化合物を見出した。更に、これら 4 種の化合物は、HBV に高

い感染性を示す HepG2-NTCP-C4 細胞による HBV 感染抑制実験においても、50% 細胞増殖阻止濃度 (CC50) と、50% ウイルス増殖阻止濃度 (IC50)の比 Selectivity index が 100 以上と高い数値を示した。更に、4 種のヒット化合物のうちの 1 つの化合物ではヒト肝細胞キメラマウスにおいて、ヒトの血中濃度と同程度の化合物の濃度で抗 HBV 活性を示した。

また、新たな FDA-approved drug library (850 化合物) について、HBV エンハンサー I/X プロモーター抑制活性の確認をしたが、抑制活性を有する化合物は見出すことが出来なかった。

更に、ヒット化合物の誘導体を作製し、より効果のある化合物の創製を目指したが、ヒット化合物の抗 HBV 活性を超える誘導体を得る事が出来なかった。

2) HBV エンハンサー I/X プロモーターの転写抑制活性は低かったが、HBV core プロモーターの転写活性を強く抑制する化合物 Berberine を見出した。Hepg2.2.15.7 細胞、HepG2-NTCP-C4 細胞及び PXB 細胞においても抗 HBV 活性を示し、cccDNA の減少も確認出来た。更に、Berberine が HBV core プロモーター活性を抑制する機序を調べた結果、Berberine は HBV core プロモーターを制御する主要な転写因子 HNF4 を E3 ubiquitin ligase TRIM21 を介して、K48 ポリユビキチン化し、プロテアソームによって分解することにより、HBV core プロモーターが低下する事を見出した (Antiviral research 2024 106027)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

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 -

1. 著者名 Atsuya Yamashita, Hirotake Kasai, Shinya Maekawa, Tomohisa Tanaka, Yasunori Akaike, Akihide Ryo, Nobuyuki Enomoto, Kohji Moriishi	4. 巻 232
2. 論文標題 Berberine promotes K48-linked polyubiquitination of HNF4 α , leading to the inhibition of HBV replication.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Antiviral research	6. 最初と最後の頁 106027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.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 Nobuhiro Kobayashi, Saori Suzuki, Yuki Sakamoto, Rigel Suzuki, Yuan Ma, Lihan Liang, Takuma Izumi, Kisho Noda, Daisuke Okuzaki, Yumi Kanegae, Sanae Hayashi, Yasuhito Tanaka, Atsuya Yamashita, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura, Osamu Takeuchi, Tomokazu Tamura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara	4. 巻 106
2. 論文標題 NEDD4-binding protein 1 suppresses hepatitis B virus replication by regulating viral RNAs.	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Journal of general virology	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） 10.1099/jgv.0.00208	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下篤哉, 葛西宏威, 田中智久, 赤池康範, 森石恆司
2. 発表標題 ジスピロ -ラクタム構造を持つ新規抗HBV化合物の創製
3. 学会等名 第71回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2024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, 前川伸哉, 榎本信幸, 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31回 日本抗ウイルス療法学会 学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsuya Yamashita, Hirotake Kasai, Shinya Maekawa, Tomohisa Tanaka, Yasunori Akaike, Nobuyuki Enomoto, and Kohji Moriishi
2. 発表標題 Berberine, a plant-derived isoquinoline alkaloid, is the anti-HBV compound targeting the viral core promoter.
3. 学会等名 2023 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下篤哉, 葛西宏威, 田中智久, 赤池康範, 森石恆司
2. 発表標題 精神病薬Aripiprazole およびCariprazineの抗HBV活性機序の解析
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023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, 前川伸哉, 榎本信幸, 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化合物の探索
3. 学会等名 第30回 日本抗ウイルス療法学会 学術集会・総会
4. 発表年 2022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化合物の同定とその抑制機序
3. 学会等名 第69回 日本ウイルス学会学術集会
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
---------	---------