

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08458
研究課題名（和文）レポーターアッセイによる新規・大規模抗HBV薬スクリーニング系を用いた薬剤開発

研究課題名（英文）High through anti-HBV drug screening by using reporter assay

研究代表者
須田 剛生（Suda, Goki）
北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：20447460
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、HBVのウイルス蛋白の一つであるHBx蛋白が、自然免疫によるウイルス排除機構のkey playerであるIFNシグナルを阻害する事を明らかにした。更に、他グループより他HBV蛋白も同様にIFNシグナル阻害を行う事が明らかになった。我々はこのHBV蛋白のIFNシグナル阻害作用に着目した新規の抗HBVのレポーターアッセイを構築した。このスクリーニング系と北海道大学薬学部にて独自に合成された化合物ライブラリーを用いて、新規の抗HBV候補の大規模スクリーニングを行い、複数の抗HBV活性を細胞毒性のないレンジで発揮する化合物を複数同定した。

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)は全世界で4億人の感染者が存在し、世界的な公衆衛生上の問題となる感染症である。一方で、現時点までに使用可能な抗HBV薬は核酸アナログとIFNのみであり、加えてこれらの薬剤ではHBVの排除は困難で、更なる抗HBV薬の開発は急務である。我々は、独自に開発したスクリーニング系と北海道大学が独自に有する薬剤、化合物を用いて複数の抗HBV薬候補を同定した。これらの薬剤は、既存薬と比してHBs抗原の低下効果が強く、臨床的治癒となるHBs抗原の消失が期待される薬剤候補であった。これらの、新規薬剤候補の臨床応用を目指す事によりHBV撲滅に向けた創薬基盤の萌芽となりうる。

研究成果の概要（英文）：We revealed that hepatitis B virus X protein inhibit IFN signaling pathway. We focused on these mechanisms, we established novel high-throughput screening system to find novel anti-HBV drug by using reporter assay system. In addition, we utilized "Hokdai library" which consisted of chemical library and existing drugs e.g. By using this novel system and drug library, we found several potential compounds which could suppress HBV replications.

研究分野：消化器内科学

キーワード：HBV スクリーニング drug screening

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は全世界で4億人の感染者が存在する。世界的に年間100万人がHBVと関連した肝疾患により死亡し、世界的な公衆衛生上の問題となり適切な治療介入が必須である。

HBVはヘパドナウイルス科に属する部分的2本鎖の環状DNAを有するDNAウイルスである。この遺伝子上に4つのオープンリーディングフレームが存在する。オープンリーディングフレームは、S遺伝子、C遺伝子、P遺伝子、X遺伝子からなる。S遺伝子からは、HBs抗原及びその他の外膜を構成する蛋白が産生される。C遺伝子からはウイルス核の構成要素であるHBc抗原や、分泌型のHBe抗原が産生される。P遺伝子からはDNAポリメラーゼが産生され、これが逆転写酵素活性をもつ。X遺伝子からは多機能を有するX蛋白が産生され、近年、癌化に関与が示されるなど多彩な機能が解明されつつある。

慢性B型肝炎に対し、現在使用可能な治療法としてはIFN療法と核酸アナログ療法の二種に限定されている。核酸アナログ製剤は、HBVポリメラーゼを特異的に阻害することによりマイナス鎖及びプラス鎖DNAの合成を強力に抑制する。しかしながら、cccDNA抑制効果は限定的である事、長期の投与が必要、適切な中止基準がない、耐性ウイルスの出現、腎障害などといった問題を有する。一方、IFN療法は、cccDNA抑制効果・長期でのHBs抗原低下作用が報告される事、治療期間が一定である一方で、その著効率は限定的であり、更なる治療効果の向上が求められる。

2. 研究の目的

我々は、HBVのIFN不応性の原因について検討を行いHBx蛋白がER stressを介したPP2Ac, SOCS3の上昇によりIFN不応性に関与する事を報告した(Tsunemats S, Suda G, et al JMV 2017)。

更に近年、HBVウイルス蛋白のHBVポリメラーゼ蛋白(Chen J. et al Hepatology. 2013)、HBVコア蛋白(Rosmorduc et al. J Gen Virol 1999)がIFNシグナルを阻害する事が報告されている。

新規薬剤の開発の律速段階となっているのがレポーターアッセイ等の簡便な抗HBV薬スクリーニング系開発が十分でない事があげられる。

今研究では、我々により明らかとされたHBVウイルス蛋白発現に伴うIFN抵抗性に着目し、レポーターアッセイを用いた簡便な新規の抗HBV薬スクリーニング系を構築、ハイスループットスクリーニングを行い新規抗HBV薬候補を同定、臨床応用する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) HBVウイルス蛋白発現に伴うIFN抵抗性に着目し、レポーターアッセイを用いた簡便な新規の抗HBV薬スクリーニング系を構築

(2) 既存薬ライブラリーの残り1200薬剤を用いてスクリーニングを行う事により国内承認薬の大部分のスクリーニングを行う。

(3) 北海道大学薬学部により独自に合成された2000化合物について同様の検討を行い新規の抗HBV作用を有する化合物を同定する

(4) 同定された、薬剤・化合物は、HepAD38細胞、Huh7.5.1細胞にHBV発現プラスドを導入し

た細胞において抗 HBV 作用の validation を行う。

(5) 同定された薬剤が HBV ライフサイクルのどの部位に作用するかを検討する為に、ccc-DNA からの転写への影響、HBV ウイルスのアセンブリー、放出への影響を検討する

(6) ヒト肝細胞キメラマウスより分離された初代肝細胞培養：PXB 細胞に HBV を感染させ、候補薬剤を添加する事により自然の肝細胞に近い状態での抗 HBV 作用を検討する

4. 研究成果

申請者が明らかにした HBV 蛋白発現により惹起される IFN 不応性を解除する化合物のスクリーニングを行う為に watashi らにより報告された恒常 HBV 高発現細胞の HepG2.2.15.7 細胞 (Sci Rep 2017) と親細胞の HepG2 にレンチウイルスを用いて IFN 応答配列の ISRE の下流にレポーター-配列を有する遺伝子導入し、恒常発現細胞作成した (HepG2.2.15.7-luc、HepG2-luc 細胞)。HepG2-luc 細胞に比して、HepG2.2.15.7-luc 細胞は IFN に対する反応性が低下する事、すなわち HBV 感染は感染細胞内 IFN シグナルを阻害する事を再確認した。更に、HepG2.2.15.7-luc 細胞の HBx 蛋白を siRNA で knock-down する事により IFN 感受性が改善する事も確認された。すなわち、同細胞に化合物を添加し、IFN 応答性が改善 (=レポーター活性の上昇) する薬剤は HBV 感染細胞内 HBV 蛋白の低下、HBV 蛋白発現により惹起される IFN 不応性関連因子の低下 (SOCS3, PP2A など) 作用を有する事が想定され新規薬剤候補となる。同新規スクリーニング系を用いてハイスループットスクリーニングを行った。HepG2.2.15.7 ISRE-luc を候補化合物・IFN と共培養を行い、レポーター活性の有意な上昇を認めたものを hit 化合物とした。まず、北海道大学が独自に有する化合物・薬物ライブラリーの中から既存薬ライブラリー1600 化合物を用いたハイスループットスクリーニングを施行。1600 化合物を 4 回のスクリーニングにより validation を行い 32 化合物を Hit 化合物として同定した。Hit した 32 化合物の一部は、薬剤単独で HepG2.2.15.7 細胞に加える事により培養上清中の HBV ウイルス量を減少させ、直接的な抗 HBV 作用を有する事が分かった。代表的な候補薬剤 A、B、C は、HepG2.2.25.7 細胞に添加する事により細胞内 HBV 蛋白の減少・培養上清中の HBs 抗原、HBV-DNA の減少を認めた (検査濃度での細胞毒性はみとめなかった) 候補薬剤 C は HBV 感染 PXB 細胞にても、細胞毒性のない濃度において抗 HBV 活性を有する事が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki K, Suda G, Yamamoto Y, Furuya K, Baba M, Nakamura A, Miyoshi H, Kimura M, Maehara O, Yamada R, Kitagataya T, Yamamoto K, Shigesawa T, Nakamura A, Ohara M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Ohnishi S, Sakamoto N	4. 巻 56
2. 論文標題 Tenofovir-disoproxil-fumarate modulates lipid metabolism via hepatic CD36/PPAR-alpha activation in hepatitis B virus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 168-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01750-3	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 Suda G, Ogawa K, Kimura M, Maehara O, Kitagataya T, Ohara M, Tokuchi Y, Kubo A, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Sakamoto N.	4. 巻 5-
2. 論文標題 Time-dependent changes in the seroprevalence of COVID-19 in asymptomatic liver disease outpatients in an area in Japan undergoing a second wave of COVID-19	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 1196-1200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13551	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 Suda G, Sakamoto N	4. 巻 36
2. 論文標題 Recent advances in the treatment of hepatitis C virus infection for special populations and remaining problems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1152-1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15189.	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 Kawagishi N, Suda G, Kimura M, Maehara O, Shimazaki T, Yamada R, Kitagataya T, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Uemura M, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kudo Y, Nishida M, Sakamoto N	4. 巻 50
2. 論文標題 High serum angiopoietin-2 level predicts non-regression of liver stiffness measurement-based liver fibrosis stage after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 671-681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13490	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 Nakai M, Suda G, Kubo A, Tokuchi Y, Kitagataya T, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N.	4. 巻 55
2. 論文標題 Durable response without recurrence to Tolvaptan improves long-term survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 1150-1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01721-8	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 Ohara M, Suda G, Kimura M, Maehara O, Shimazaki T, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kobayashi T, Uebayashi M, Takagi R, Yokota I, Shimamura T, Sakamoto N.	4. 巻 50
2. 論文標題 Analysis of the optimal psoas muscle mass index cut-off values, as measured by computed tomography, for the diagnosis of loss of skeletal muscle mass in Japanese people.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 715-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13499	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 Kitagataya T, Suda G, Nagashima K, Katsurada T, Yamamoto K, Kimura M, Maehara O, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Umemura M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Ohnishi S, Komatsu Y, Hata H, Takeuchi S, Abe T, Sakakibara-Konishi J, Teshima T, Homma A, Sakamoto N.	4. 巻 35
2. 論文標題 Prevalence, clinical course, and predictive factors of immune checkpoint inhibitor monotherapy-associated hepatitis in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 1782-1788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15041	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 Kawagishi N, Suda G, Kimura M, Maehara O, Shimazaki T, Yamada R, Kitagataya T, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Umemura M, Nakai M, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kudo Y, Nishida M, Sakamoto N.	4. 巻 50
2. 論文標題 High serum angiotensin-2 level predicts non-regression of liver stiffness measurement-based liver fibrosis stage after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 671-681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13490	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 Hanamatsu H, Nishikaze T, Tsumoto H, Ogawa K, Kobayashi T, Yokota I, Morikawa K, Suda G, Sho T, Nakai M, Miura N, Higashino K, Sekiya S, Iwamoto S, Miura Y, Furukawa JI, Tanaka K, Sakamoto N.	4. 巻 91
2. 論文標題 Comparative Glycomic Analysis of Sialyl Linkage Isomers by Sialic Acid Linkage-Specific Alkylamidation in Combination with Stable Isotope Labeling of 2,3-Linked Sialic Acid Residues.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal Chem.	6. 最初と最後の頁 13343-13348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b03617	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 Suda G, Kimura M, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Maehara O, Shimazaki T, Morikawa K, Natsuizaka M, Ogawa K, Sakamoto N.	4. 巻 49
2. 論文標題 Effects of resistance-associated variants in genotype 2 hepatitis C virus on viral replication and susceptibility to antihepatitis C virus drugs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 1275-1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13401	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	坂本 直哉 (Sakamoto Naoya) (10334418)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	森川 賢一 (Morikawa Kenichi) (60384377)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

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