

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08493

研究課題名(和文) プロテオミクスに基づく新規の抗肝炎ウイルス戦略

研究課題名(英文) Development of anti-hepatitis virus strategy based on proteomics

研究代表者

森石 恆司 (MORIISHI, Kohji)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90260273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、C型肝炎ウイルス(HCV)蛋白質およびB型肝炎ウイルス(HBV)に対して相互作用する宿主因子を同定し、抗ウイルス活性および抗肝がん化活性をもつ化合物を同定し、新規抗肝炎ウイルス療法開発を目指すことである。HCV複製および感染粒子形成に必須である宿主因子としてFKBP6、HM13を同定し、DM-CHX、桂皮酸誘導体などを抗ウイルス化合物および抗肝がん化化合物として同定した。また、HBV複製に重要な因子p-TEFbに対する阻害剤も同定し、抗ウイルス活性があることを示し、ウイルスゲノム排除の可能性も示した。この研究成果、今後の新規抗肝炎ウイルス化合物開発に貢献するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was identification of antiviral compounds that targeted host agents interacting proteins of hepatitis B and C viruses (HBV and HCV) based on proteomics information. FKBP6 and HM13 were identified as essential host proteins for HCV replication and the viral particle production and its pathogenicity. DM-CHX and cinnamic acid derivatives, which target them, prevented HCV replication and production. Furthermore, pTEFb inhibitor could suppress HBV replication and production. These results will contribute to development of novel antiviral agents targeting production and pathogenicity of HBV and HCV

研究分野：ウイルス学

キーワード：HCV C型肝炎 HBV B型肝炎 抗ウイルス剤 宿主蛋白質

1. 研究開始当初の背景

日本の肝がん患者年間3万人の7割程度はHCV感染に、2割程度がHBV感染に起因していると考えられている。抗ウイルス剤開発は進行し、高率なウイルス排除が可能になってきた。しかしながら、高齢者などへの投与の禁忌、耐性ウイルス出現、ウイルス排除後の肝発がんなどの問題が残されている。単に、ウイルスを排除するだけでCおよびB型肝炎の治療が達成されるのではなく、感染によって感作されるがん化要因の排除が必要であり、がん化および感染に関わる分子機序を標的にした抗肝炎ウイルス化合物の探索は肝炎ウイルス研究の新たな切り口と考えられる。

申請者らはHCV蛋白質Core, NS4B, NS5Aと相互作用する宿主蛋白質を網羅的に探索するために、プロテオミクス解析(プロテオーム、酵母2ハイブリット)を行ったデータに加え、蛋白質間相互作用(PPI)分子機能、誌上情報などのデータベースをもとにバイオインフォマティクス解析し、HCV感染と病原性発現機構との関連について解析してきた。これらの成果を、以下にまとめる。

HCV Coreと相互作用する宿主蛋白質を同定し、さらに関連因子Eno1, SLC25A5, PXNなどを統合データハウスによるネットワーク解析(Target Mine)で明らかにしている(Tripathi, Mol Biosyst., 2010)。更にHCVによる病原性発現およびウイルス粒子産生機構にPA28が必要であることを明らかにし(Moriishi, PNAS, 2007; Moriishi, Hepatology, 2010) ネットワーク解析によって関連宿主因子(VTI1Aなど)を同定している(Tripathi, J Proteome Res, 2012)。ウイルス複製に必須なウイルス因子NS4Bに相互作用する宿主因子を膜蛋白酵母2ハイブリットによって絞り込み、ネットワーク解析によって関連因子を同定している(Tripathi, Mol Biosyst., 2010)。NS5A蛋白質と相互作用する宿主因子を同様に解析し、それに関連する

重要分子(FKBP8, FKBP6, RTN1, RTN3など)をネットワーク解析により絞り込んでいる(Tripathi, J Proteome Res, 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、Mammalian two hybrid system、yeast two hybrid法などを用いて、宿主因子とHCV蛋白質の相互作用を指標にした培養細胞スクリーニング系を構築し、化合物スクリーニングにより抗HCV化合物を選択し、それら化合物の作用機序解析を通じて病原性発現機構・感染機構の解明および新規抗HCV療法確立を目指す。また、HBV培養系を用いて、B型肝炎との共通性機構を探索する。最終的に抗ウイルス剤候補を絞り、病原性発現機構およびウイルス増殖機序を標的にした化合物同定を目指す。

3. 研究の方法

宿主因子およびHCV蛋白質との相互作用を標的にした化合物スクリーニングを可能とする培養細胞系を構築する。遺伝子改変動物および酵母Two-Hybrid法の結果からネットワーク解析し、今まで感染および病原性発現に関わる宿主因子を複数同定してきている(上述)。それら関連宿主因子どうし、あるいは宿主因子-HCV蛋白質との相互作用を標的にした培養細胞スクリーニング系を構築し、化合物スクリーニングを行う。HCVスクリーニング系は培養細胞ルシフェラーゼ遺伝子とHCV非構造遺伝子をECMVIREsで連結し、ルシフェラーゼ活性がウイルス複製と関連する培養細胞系を用いた。また、HBVスクリーニング系としてウイルスプロモーター下にルシフェラーゼ遺伝子を連結させて、ウイルスプロモーターを標的にした化合物スクリーニング培養細胞系を構築した。

培養細胞スクリーニング系によって既存化合物ライブラリーおよび天然化合物ライブラリーに対してスクリーニングを行い、化合物を

選択する。さらに、感染培養感染系でその生物活性を解析する。また、HCV 感染培養系、シュードウイルス感染系によって多角的にウイルス感染への影響を解析し、抗ウイルス効果を評価した。その化合物の効果や既存の情報から、ウイルス感染による病原性発現機構の解明を目指す。HBV に対する抗ウイルス活性についても当研究室で確立されている NTCP-HepG2 細胞培養系で解析し、C 型肝炎との共通性を考察した。

4. 研究成果

蛋白質間相互作用スクリーニング系の構築として、HCV コア蛋白質を標的にした宿主因子 PSME3 のホモダイマーに形成による mammalian membrane two hybrid screening 系の構築し、化合物ライブラリーLOPAC によって数種の候補化合物を同定した。さらに HCV コア蛋白質あるいは NS5A と相互作用する宿主蛋白質探索を目的とした membrane two hybrid 系によって、必須宿主蛋白質を同定した。さらに HBV プロモーターを標的にしたスクリーニング系も構築し、抗 HBV 化合物を同定した。

NS5A と相互作用する宿主蛋白質として FKBP6 を同定した。FKBP6 は FKBP8 とホモ・ヘテロダイマーを形成し、NS5A のドメイン I と FKBP6 の TPR ドメインが結合に重要であり、NS5A の Val121 が必須アミノ酸残基であった。FKBP6 ノックアウト Huh7 細胞では、HCV 複製は完全に阻害され、FKBP6 の発現によって複製が可能となったことから、FKBP6 は HCV ゲノム複製に寄与するものと思われた。更に、FKBP6 は FKBP8 を相互作用することでホモ・ヘテロダイマー形成をすることが分かった。さらに化合物スクリーニングで、DM-CHX が FKBP6/8 のダイマー形成を阻害すると同時に、HCV ゲノム複製も阻害したことから、FKBP6/8 のダイマー形成は HCV 複製に重要であることが示唆された。DM-CHX の化学構造から、誘導

体を作製し、抗 HCV 活性を解析したが、解析した化合物中で DM-CHX は一番毒性が低く、抗 HCV 活性が高かった。

HCV コア蛋白質と相互作用する宿主因子として HM13 を同定し、その阻害剤候補として既存のプレセニリン阻害剤をスクリーニングした結果、LY411575 が一番高い抗 HCV 活性を示した。LY411575 は HCV ゲノム複製を阻害せず、ウイルス粒子産生を阻害した。HM13 によるコア蛋白質の切断はコア蛋白質の安定性に寄与しており、ヌクレオキャプシド形成を阻害しているものと思われた。さらに、抗 HCV 活性は既存抗 HCV 複製阻害剤 Daclatasvir のウイルスゲノム複製阻害効果に対して増強作用は見られず、ウイルス粒子産生に対して相乗作用を示した。また、LY411575 は感染による酸化ストレスを軽減し、がん化に關与する因子の発現を低下させたことから、HCV 感染による肝発がん化に対する阻害効果も示唆された。

CDK 阻害剤を HBV 感染培養系でスクリーニングし、p-TEFb 阻害剤に抗 HBV 活性があることを見いだした。HBV 感染培養系においてウイルス RNA、粒子内 DNA、ウイルス粒子産生を有意に阻害した。さらに cccDNA 量も有意に阻害したことから、この結果が新たな抗 HBV 剤開発に貢献すると思われる。

HCV コア蛋白質に対して結合する宿主蛋白質探索を目的に膜 2 ハイブリット法にて同定した膜内蛋白質酵素 HM13 に対する阻害剤 LY411575 に続き、HCV コア蛋白質に結合する宿主因子 STAT3 を標的にした化合物同定を目的に桂皮酸誘導体をスクリーニングし、二つの誘導体に有意な抗 HCV 活性を認めた。そのうち selectivity index が高い誘導体の生物活性を解析した。Genotype 1 から 4 のレプリコン細胞に対する抗 HCV 活性 (EC50) は 1.5 から 7.1 μ M を示し、インターフェロン活性を介さずにウイルス蛋白質量ならびにウイルス粒子産生量も有意に低下

した。その化学構造は AG490 (JAK2 阻害剤) と似ていることから STAT3 の Tyr705 のリン酸化への関与が示唆されたが、抗 HCV 活性を示す濃度では STAT3Tyr705 のリン酸化に変化はなかった。NAC によってその抗 HCV 活性は阻害されたことから、宿主細胞の活性酸素誘導能を介していることが示唆された。さらなる化学構造の展開によって、抗がん化作用をもつ抗 HCV 剤開発が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Tanaka T, Otoguro T, Yamashita A, Kasai H, Fukuhara T, Matsuura Y, Moriishi K: Roles of the 5' Untranslated Region of Nonprimate Hepacivirus in Translation Initiation and Viral Replication.

Journal of Virology, 92: e01997-17, 2018, doi: 10.1128/JVI.01997-17, 査読有

Yasumoto J, Kasai H, Yoshimura K, Otoguro T, Watashi K, Wakita T, Yamashita A, Tanaka T, Takeda S, Moriishi K: Hepatitis B virus prevents excessive viral production via reduction of cell death-inducing DFF45-like effectors. *Journal of General Virology*, 98: 1762-1773, 2017, 査読有

Yamashita A, Tamaki M, Kasai H, Tanaka T, Otoguro T, Ryo A, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Tanaka J, Moriishi K: Inhibitory effects of metachromin A on hepatitis B virus production via impairment of the viral promoter activity. *Antiviral Research*, 145: 136-145, 2017, 査読有

Moriishi K: The potential of signal peptide peptidase as a therapeutic

target for hepatitis C. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21: 827-836, 2017, 査読有

10.1080/14728222.2017.1369959

Amano R, Yamashita A, Kasai H, Hori T, Miyasato S, Saito S, Yokoe H, Takahashi K, Tanaka T, Otoguro T, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K: Cinnamic acid derivatives inhibit hepatitis C virus replication via the induction of oxidative stress.

Antiviral Research, 145: 123-130, 2017, 査読有

10.1016/j.antiviral.2017.07.018

Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Murakami S, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosoya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M, Moriishi K: Inhibitory effect of CDK9 inhibitor FIT-039 on hepatitis B virus propagation. *Antiviral Research*, 133: 156-164, 2016, 査読有

10.1016/j.antiviral.2016.08.008

Otoguro T, Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K: Inhibitory effect of presenilin inhibitor LY411575 on maturation of hepatitis C virus core protein, production of the viral particle and expression of host proteins involved in pathogenicity.

Microbiology & Immunology, 60: 740-753, 2016, 査読有 10.1111/1348-0421.12448

Moriishi K, Matsuura Y: Structural Proteins of HCV and Biological Functions. In: Hepatitis C virus I: Cellular and Molecular Virology. Eds: T. Miyamura, S. M. Lemon, C. M. Walker&T. Wakita. Springer, (2016), doi: ISBN-10: 978-4431560982

ISBN-13: 978-4431560968, 査読有

Yamashita A, Fujimoto Y, Tamaki M,

Setiawan A, [Tanaka T](#), Okuyama-Dobashi K, [Kasai H](#), Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, de Voogd NJ, Maekawa S, Enomoto N, Tanaka J, [Moriishi K](#): Identification of Antiviral Agents Targeting Hepatitis B Virus Promoter from Extracts of Indonesian Marine Organisms by a Novel Cell-Based Screening Assay. *Marine Drugs*, 13: 6759-6773, 2015, doi:

10.3390/md13116759, 査読有

Okuyama-Dobashi K, [Kasai H](#), [Tanaka T](#), [Yamashita A](#), Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, [Moriishi K](#): Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Scientific Reports*, 5: 17047, 2015, doi: 10.1038/srep17047, 査読有

[Kasai H](#), Kawakami K, Yokoe H, Yoshimura K, Matsuda M, Yasumoto J, Maekawa S, [Yamashita A](#), [Tanaka T](#), Ikeda M, Kato N, Okamoto T, Matsuura Y, Sakamoto N, Enomoto N, Takeda S, Fujii H, Tsubuki M, Kusunoki M, [Moriishi K](#): Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication. *Scientific Reports*, 5: 16699, 2015, doi: 10.1038/srep16699, 査読有

[学会発表](計 12 件)

The bidirectional interplay of hepatitis B virus and cell-death inducing DFF45-like effectors. 口頭、[Kasai H](#), Yasumoto J, [Yamashita A](#), [Tanaka T](#), Watashi K, Wakita K, Otoguro T, [Moriishi K](#), 第 65 回日本ウイルス学会総会、2017/10/24-26、国内(大阪)

Establishment of hepatitis B and C virus co-infection cell line. ポスタ
ー Otoguro T, [Tanaka T](#), [Kasai H](#), [Yamashita A](#), [Moriishi K](#), 第 65 回日本ウイルス学会総会、2017/10/24-26、国内(大阪)

5' -terminal stem-loop of equine hepacivirus RNA permits miR-122-omde@emd replication. 口頭、[Takana T](#), Otoguro T, [Kasai H](#), [Yamashita A](#), [Moriishi K](#), 第 65 回日本ウイルス学会総会、2017/10/24-26、国内(大阪)

Cross-species compatibility of hepacivirus 5' untranslated region. 口頭 [Tanaka T](#), Otoguro T, [Kasai H](#), [Yamashita A](#), Okuyama-Dobashi K, [Moriishi K](#), 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内

CDK9 inhibitor FIT-039 suppresses HBV propagation. [Moriishi K](#), [Tanaka T](#), Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M. 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内

Anti-HBV activity of Coptidis rhizome alkaloids via targeting the viral core promoter. [Yamashita A](#), [Tanaka T](#), Okuyama-Dobashi K, [Kasai H](#), [Moriishi K](#), 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内

Hepatitis C virus infection impairs mono-ubiquitination of histone H2A and activates expression of homeobox genes. [Kasai H](#), [Tanaka T](#), [Yamashita A](#), Dobashi-Okuyama K, [Moriishi K](#). 口頭、第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内

Establishment of highly

HBV-permissible HepG2 cell line to facilitate screening of antiviral compounds. Otoguro T, Tanaka T, Chen W, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Moriishi K, ポスター 第 64 回日本ウイルス学会総会、2016/10/24、国内

Functional homology of hepacivirus 5' UTRs in IRES activity and replication. Tanaka T, Otoguro T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Moriishi K, ポスター、23rd International symposium on hepatitis C virus and related viruses. 2016/10/11-15, Kyoto, 国内

Inhibition of HBV propagation by treatment with CDK9 inhibitor FIT-039. Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Chen W, Okamoto T, Ueda K, Hosaya T, Matsuura Y, Ryo A, Tanaka Y, Hagiwara M and Moriishi K, ポスター、2016 International HBV meeting, 2016/9/21-24, Yonsei, 国外

プレセニン阻害剤のC型肝炎ウイルス増殖抑制効果の検討(口頭) 乙黒光姫、田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本ウイルス学会、福岡 2015

Inhibitory effect of tyrphostin derivative HD-31 on hepatitis C virus replication via regulation of reactive oxygen species production. (ポスター) Amano R, Yamashita A, Kasai H, Moriishi K. 日本ウイルス学会、福岡、2015

(1) 研究代表者

森石 恆司 (MORIISHI, Kohji)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：90260273

(2) 連携研究者

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

葛西 宏威 (KASAI, Hirotake)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：20324189

田中 智久 (TANAKA Tomohisa)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：30585310