

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07160

研究課題名（和文）閉環状DNAとして染色体外に存在するB型肝炎ウイルスゲノムの維持と分解機序の解明

研究課題名（英文）Maintenance mechanisms of the hepatitis B virus cccDNA

研究代表者

山本 直樹（YAMAMOTO, Naoki）

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主任研究員

研究者番号：10547780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：蛋白質-蛋白質相互作用を特異的に阻害する、ヘリックス模倣型低分子化合物ライブラリーを探索し、HBV持続感染初代ヒト肝細胞においてHBV cccDNAを減少に導く新規化合物を取得することに成功した。そして、cccDNA減少活性に重要な化合物の構造を同定した。ウイルスライフサイクルにおける化合物の作用点を解析した結果、HBx蛋白質の発現に関わるウイルスのプロモーター活性を抑制していることが明らかになった。HBxは、cccDNAと蛋白質の複合体の構成因子であり、ウイルスゲノムからの転写を制御していることから、HBxがcccDNAの維持に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVは、持続感染化するとウイルスゲノムの排除を伴った根治が不可能な難治性疾患の原因ウイルスである。持続感染の要であるcccDNAは、ウイルスおよび宿主蛋白質と複合体を形成して安定的に維持されているが、その維持機序は不明である。従って、cccDNAの維持機序の解明は、HBVのライフサイクルの理解と新しい根治療法の開発に資すると考えられる。本研究により、HBV持続感染初代ヒト肝細胞においてcccDNAを効率的に減少させる新規化合物の取得に成功した。また、化合物の作用機序解析から、HBxがcccDNAの維持に関わっていることが示唆された。これらの知見は、新しい根治療法の開発に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We screened a library of alpha-helix-mimetic small-molecule compounds that specifically inhibit protein-protein interactions and we succeeded in obtaining novel compounds that lead to HBV cccDNA reduction in primary human hepatocytes persistently infected with HBV. We then identified the structures of the compounds that were important for cccDNA reduction. Analysis of the point of action in the viral life cycle revealed that it suppresses the viral promoter activity involved in HBx protein expression. As the HBx protein is a component of the cccDNA-protein complex and regulates the transcription of the viral genome, it can be suggested that the HBx protein is involved in the maintenance of cccDNA.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV cccDNA HBx 持続感染 低分子化合物

## 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、乳幼児期に感染すると高い確率で持続感染化する。現在、HBV持続感染患者に対する治療法は、IFN製剤または逆転写酵素阻害薬が用いられている。しかし、前者は強い副作用を伴う為に投与対象が限られているだけでなく、治療効果が低い。後者は、HBV rcDNAの新規合成を強力に抑制するが、生涯投薬を続ける必要がある。そして、持続感染の要であるcccDNAを排除する治療法は未だ確立されていない。HBVゲノムは、ウイルス粒子内では不完全二本鎖環状DNA(relaxed circular DNA: rcDNA)であるが、感染後の核内において完全な二本鎖閉環状DNA(covalently closed circular DNA: cccDNA)として染色体とは独立して一定量維持されることで持続感染化すると考えられている。また、cccDNAの維持は、プレゲノムRNAがウイルス逆転写酵素により新規rcDNAに変換され、再び核に移行することで新規cccDNAとなる「リサイクル経路」が関わっていると考えられているが、その詳細は不明である。研究代表者は共同研究により、ヒト肝臓キメラマウスから採取した非凍結の初代正常ヒト肝細胞が肝臓に匹敵するHBV複製効率と持続感染性を保持した培養系になることを見出した。また、この培養系を用いた逆転写酵素阻害薬やsiRNAによる逆転写酵素発現抑制実験から、cccDNAの前駆体であるrcDNAの新規合成抑制だけではcccDNAを減少させるには不十分であるとの知見を得た。cccDNAを効率的に減少させる手法の確立と機序の解明は、HBVのライフサイクルを明らかにすると共に、持続感染からの離脱を目指した治療法開発に資すると考える。

### 2. 研究の目的

本研究は、以下の3項目を通じてHBVのcccDNAの安定的な維持機序を解析することを目的とした。

(1)HBV cccDNAを減少に導く新しい低分子化合物を探索する。(2)同定した化合物の作用機序の解析を通じてcccDNAの維持機序を解析する。(3)HBV持続感染モデル動物における化合物のHBV抑制効果を評価する。

### 3. 研究の方法

(1) HBV cccDNAは感染細胞の核内においてウイルス蛋白質と共に宿主蛋白質と複合体(HBV-DNA/蛋白質複合体)を形成して安定的に維持されている。近年、HBV-DNA/蛋白質複合体を構成する因子が報告されつつあるが、肝臓内でのcccDNA維持機構における分子機序の詳細は不明である。そこで、蛋白質-蛋白質相互作用を特異的に阻害するヘリックス模倣型低分子化合物ライブラリーにおいて、HBV抑制効果を示す化合物をスクリーニングした。感染源としては、HBV Cora遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換したリポーターウイルス、または野生株のウイルスを用いた。細胞には、HBV感染受容体を安定過剰発現させたHepG2-hNTCP細胞、または初代ヒト肝臓キメラマウス肝細胞を用いた。同定した化合物について、HBV持続感染初代ヒト肝細胞を用いて50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を測定した。

(2) 化合物の活性に寄与する骨格構造と側鎖の官能基を同定する為、(1)で同定した化合物の基本骨格をもとに類縁体を合成し、ウイルス抑制効果を評価した。ウイルスライフサイクルにおける化合物の作用点を解析する為、ウイルスRNA、DNAおよび蛋白質の発現抑制効果を評価した。更に、ウイルスDNAのプロモーター領域をリポーター遺伝子の5'上流に連結したプラスミドを構築し、プロモーター活性解析を実施した。

(3) 化合物の生体におけるHBV抑制効果を評価する為、HBV持続感染ヒト肝臓キメラマウスに150mg/kg/dayで2週間連日静脈内投与し、体重と血清中ウイルスDNAを経時的に測定した。

### 4. 研究成果

(1) 効率的にスクリーニングを実施する為、HBV Cora遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換した感染性組換えリポーターHBVを作成した。リポーターHBVを感染させたHepG2-hNTCP細胞において、約1万7千化合物に対して1次スクリーニングを実施し、細胞傷害性を示さず、ルシフェラーゼ活性値が50%以下まで低下する64化合物を選択した。次に、HBV持続感染初代ヒト肝細胞を用いて2次スクリーニングを実施し、培養上清中のウイルス蛋白質(HBsAg、HBeAg、HBcAg)、rcDNA、及びcccDNA減少効果を示す6化合物(A、B、C、D、E、およびF)を取得することに成功した(図1)。更に、6化合物のHBV持続感染初代ヒ

ト肝細胞における培養上清中 rcDNA とウイルス蛋白質、及び細胞内 cccDNA と rcDNA の IC<sub>50</sub> を測定した(表 1)。HBV 抑制活性の比較において化合物 2 が最も効果が高かったが、立体構造の比較結果をもとに側鎖の官能基を置換した類縁体の合成展開を考慮して、以後の実験は化合物 A を基に進めることにした。

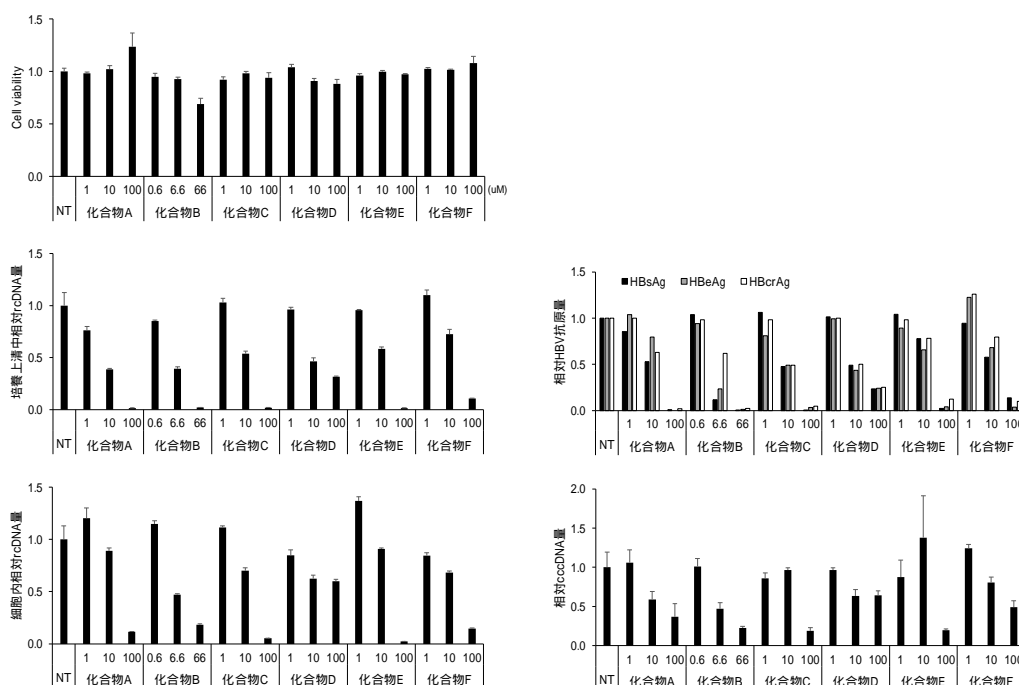


図 1. 化合物のウイルス抑制効果

HBV 持続感染初代ヒト肝細胞に各濃度の化合物をそれぞれ 15 日間投与した。WST-8 assay にて細胞毒性を評価した。培養上清中のウイルス rcDNA と共に、ウイルス蛋白質 (HBsAg、HBeAg、HBcrAg) を測定した。更に、細胞内の rcDNA と cccDNA をそれぞれ測定した。

表 1. 化合物の IC<sub>50</sub>

	培養上清				細胞	
	rcDNA	HBsAg	HBeAg	HBcrAg	cccDNA	rcDNA
化合物A	5.0	11.4	23.8	16.4	25.6	31.9
化合物B	3.9	2.5	2.8	10.5	14.1	6.0
化合物C	11.8	9.1	9.3	9.7	55.1	20.4
化合物D	8.5	9.6	7.6	10.1	100<	100<
化合物E	14.1	23.5	18.0	26.7	68.9	28.9
化合物F	23.2	15.1	19.1	26.5	95.2	21.9

HBV 持続感染初代ヒト肝細胞における各化合物の IC<sub>50</sub> (uM) を測定した。

(2) 化合物 A の基本骨格には 3 つの側鎖があり、それぞれ異なる官能基が結合している。そこで、3 つの側鎖それぞれに親水性の異なる官能基を置換した類縁体を新たに 9 つ合成し、HBV 抑制活性の評価と構造活性相関解析を実施した。その結果、化合物の基本骨格と 1 つ目の側鎖の官能基が rcDNA、ウイルス蛋白質および cccDNA の減少効果に重要であることが明らかになった。

研究代表者が見出したこれら化合物は、ウイルス蛋白質の発現量を減少させていた。そこで、ウイルスライフサイクルにおける転写過程に着目して解析したところ、化合物投与によりウイルス mRNA が減少することが明らかになった(図 2)。HBV mRNA の転写は HBx 蛋白質によって制御されていると考えられていることから、HBx 遺伝子の転写を制御するウイルス DNA 上のエンハンサー-1/X プロモーター領域のプロモーター活性と化合物の関係を検討した。その結果、濃度依存的なプロモーター活性の低下が認められた(図 3)。以上の結果から、化合物は HBx 蛋白質の翻訳に用いられるウイルス mRNA の発現を転写レベルで抑制していることが明らかになった。

HBx 蛋白質は、HBV に起因する肝臓に関わっていることが報告されている。また、ウイルスの転写活性を制御すると共に HBV-DNA/蛋白質複合体の構成因子であることが報告されている。本研究から、HBx 蛋白質は cccDNA の維持機構に関与していることが示唆された。これらの知見から、HBx 蛋白質の機能とその発現制御機序の解明は、HBV 持続感染症の新しい治療法の開発に資すると考えられる。

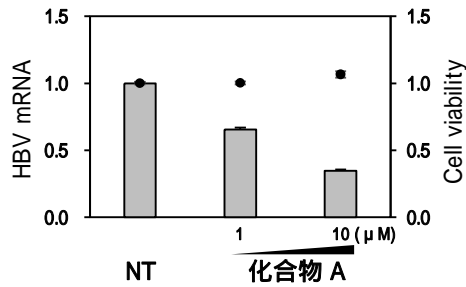


図 2. 化合物の HBV mRNA 抑制効果

HBV 安定発現細胞の HepG2.2.15 細胞に化合物を投与し、HBV mRNA を定量した。

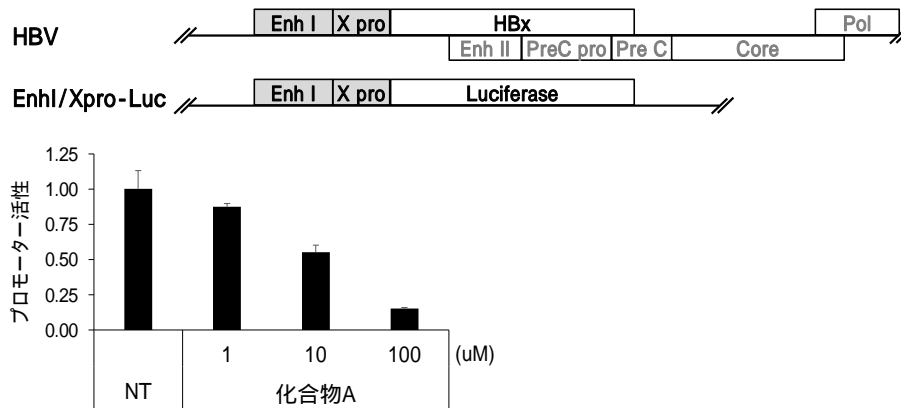


図 3. 化合物のエンハンサーI/X プロモーター活性抑制効果

HBx の発現を制御する HBV のエンハンサーI/X プロモーター領域(Enh I/X pro)の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを構築して、化合物 A のプロモーター活性に及ぼす影響を検討した。

(3) 生体における化合物の HBV 抑制効果を評価する為、HBV 持続感染モデル動物であるヒト肝臓キメラマウスに化合物 A または Vehicle(PBS)を連日投与した。化合物を投与したマウスにおいて体重減少が観察されなかったことから、本実験条件下では重篤な毒性は認められなかった。そこで、継時的に採取した血清中の rcDNA を測定したところ、HBV 抑制効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山本直樹
2. 発表標題 肝実質細胞指向性自然免疫誘導剤を用いたHBV cccDNAの制御
3. 学会等名 第68回ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト <a href="https://www.igakuken.or.jp/project/detail/infectious.html">https://www.igakuken.or.jp/project/detail/infectious.html</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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