

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08852

研究課題名（和文）化合物および遺伝子ノックアウトライブラリーを用いたA型肝炎ウイルス宿主因子の探索

研究課題名（英文）Research for hepatitis A virus host factors using compound and gene knockout libraries

研究代表者

鈴木 亮介（Suzuki, Ryosuke）

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：50342902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：A型肝炎ウイルス（HAV）の感染、増殖に重要な宿主因子を同定する目的で、標的タンパク質が明らかになっている既知の薬理活性化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。その結果、統合失調症の治療薬としてFDAに承認されているロキサピンを同定した。ロキサピンはドーパミンD2受容体（DRD2）の阻害剤であるが、HAVが増殖複製する肝細胞ではその発現が認められないため、DRD2を介さずに作用している可能性が考えられた。ロキサピン耐性ウイルス変異の解析からHAV 2Cタンパク質に直接作用する事が示唆された。またロキサピンの抗HAV効果は培養細胞のみならず感染マウスモデルでも認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A型肝炎は、高齢者では症状や肝障害が重い傾向があり、劇症化し死亡する事もある。先進国でも数百人から数万人規模のアウトブレイクが生じ、死亡例も報告されており、感染や発症を制御する必要性が高まっているが、ワクチンはあるものの、特異的治療薬がない。本研究成果は2Cタンパク質が治療薬のターゲットとなる事が明らかとなり、A型肝炎治療薬開発において有用な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To identify the host factors important for hepatitis A virus (HAV) infection and proliferation, we screened a library of known pharmacologically active compounds with known target proteins. As a result, we identified loxapine, which is approved by the FDA for the treatment of schizophrenia. Loxapine is an inhibitor of the dopamine D2 receptor (DRD2), but because its expression was not observed in hepatocytes where HAV proliferates and replicates, we considered that it may act without mediated DRD2. Analysis of loxapine-resistant virus mutations suggested that it acts directly on the HAV 2C protein. Furthermore, the anti-HAV effect of loxapine was observed not only in cultured cells but also in infected mouse models.

研究分野：ウイルス学 肝炎ウイルス フラビウイルス

キーワード：A型肝炎 A型肝炎ウイルス 治療薬

1. 研究開始当初の背景

A型肝炎はピコルナウイルス科A型肝炎ウイルス(HAV)感染による急性肝炎である。小児の感染は不顕性感染や軽症が多いものの、成人では症状や肝障害が重い傾向があり、劇症化し死亡する事もある。世界で毎年1億人が感染し、1.5万人以上が死亡している。アメリカやヨーロッパなどの衛生環境の整った先進国でも数百人から数万人の集団発生が生じ、死亡例も報告されている。2018年には国内においても900人を超えるA型肝炎の流行が発生している事からも、A型肝炎の医学・公衆衛生学的重要性が再認識され、感染や発症を制御する必要性が高まっている一方で、このウイルスに関する基礎的研究の進展は遅れている。1990年代には安全かつ効果の高いワクチンが承認されているが、治療薬はない。またHAVが増殖する際に必須の宿主因子の解明などの基礎研究もあまり進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、HAV感染/増殖をハイスループットに評価可能なアッセイ系を用いて、標的タンパク質が明らかになっている既知の薬理活性化化合物ライブラリーやFDA承認済み化合物ライブラリー等の低分子化合物のスクリーニングを行い、HAVが肝細胞で感染/増殖する為に重要な宿主因子を探索/同定し、さらにそのメカニズムを明らかにする事により、HAV感染メカニズムを分子レベルで解明する事である。また同時に、CRISPRライブラリーを利用したゲノムワイドな遺伝子ノックアウトライブラリーを用い、HAVが肝細胞で感染/増殖する為に重要な宿主因子を探索、同定し、HAVの感染における宿主との相互作用を明らかにする事である。これらの研究成果により、HAV感染による重症化の予防や治療法開発のための研究基盤の確立が期待できる。

3. 研究の方法

HAVの増殖を抑制する低分子化合物のスクリーニング

HAVの感染増殖をハイスループットに解析する事が可能な、ルシフェラーゼ遺伝子挿入組換えHAVおよびヒト肝細胞由来培養細胞を用いて、薬理活性化化合物ライブラリー等のスクリーニングを行う。HAVの感染を制御する低分子化合物の候補を得る。

低分子化合物の標的タンパク質、作用点の解析

HAVの感染を制御する低分子化合物の候補についてTime of addition assayを行い、ウイルスの侵入、ゲノム複製、粒子形成、粒子の放出等の作用点について解析する。また候補化合物の標的となるタンパク質をノックダウンさせて、ウイルス増殖に及ぼす影響を調べ、標的タンパク質の関与を明らかにする。さらに各種ウイルスタンパク質との分子間相互作用を免疫沈降法等を用いて解析する。レセプター候補分子が得られた場合には、膜を有するウイルス粒子と、膜を持たない粒子それぞれについて感染初期過程への関与を解析する。

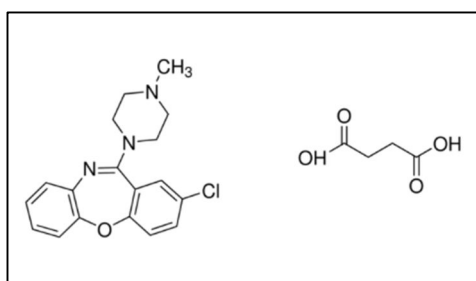
モデル動物を用いた低分子化合物の検証

上記によって得られた低分子化合物のウイルス感染への影響について、in vivoでの効果を検証する為に、HAV感染感受性のI型IFN応答欠損マウスやヒト肝臓キメラマウス等を用い、低分子化合物のin vivoにおける抗ウイルス効果を明らかにする。

4. 研究成果

既知の薬理活性化化合物ライブラリーについて、A型肝炎ウイルス(HAV)の感染、増殖を抑制する化合物のスクリーニングを行なった。その結果、統合失調症の治療薬としてFDAに承認されているロキサピンを同定した。

ロキサピンの構造

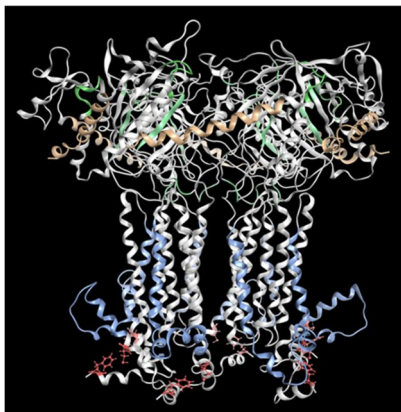


一方で計画していた CRISPR ライブラリーを利用したゲノムワイドな遺伝子ノックアウトライブラリーを利用した宿主因子の同定は、複数の先行研究が発表された事から、以後はロキサピンの作用機序の解明を進めた。

ロキサピンは HAV のゲノム複製過程を抑制し、ウイルスの侵入、タンパク質の翻訳、粒子形成や放出の過程には関与しなかった。また同じピコルなウイルスの EV-D68 に対する阻害効果は認められなかった。

ロキサピンはドーパミン D2 受容体 (DRD2) の阻害剤であるが、HAV が増殖複製する肝細胞ではその発現が認められないため、DRD2 を介さずに作用している可能性が考えられた。そこでロキサピン存在下で HAV の培養を繰り返し、薬剤耐性の HAV を得た。ロキサピン耐性ウイルス変異の解析から HAV 2C タンパク質に直接作用する事が示唆された。また分子シミュレーションからも、ロキサピンの結合部位は、アミノ酸の変異が認められた 2C の N 末端領域である事が示唆された。

HAC 2C の 6 量体構造とロキサピン耐性変異部位 (赤)



2C の N 末端領域は膜への結合に関与する事、また 2C の発現により ER 膜の構造変化が認められる事が知られているが、ロキサピン処理やロキサピン耐性変異の挿入は、この特徴について変化は認められなかった。

さらにロキサピンの抗 HAV 効果は培養細胞のみならず感染マウスモデル (*Ifnar1^{-/-}* マウス) でも認められ、非投与群に比べ、ウイルス感染後 3 ~ 7 日で便中の HAV RNA 量が有意に低下していた。

本研究成果は 2C タンパク質が治療薬のターゲットとなる事が明らかとなり、A 型肝炎治療薬開発において有用な知見となる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiota T, Matsuda M, Zheng X, Nagata N, Ishii K, Suzuki R, Muramatsu M, Takimoto K, Hanaki K, Lemon SM, McGivern D, Hirai-Yuki A	4. 巻 96
2. 論文標題 Macrophage depletion reactivates fecal virus shedding following resolution of acute hepatitis A in Ifnar1-/- mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0149622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01496-22. Epub 2022 Nov 10.	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 該当する
1. 著者名 Kiyohara T, Ishii K, Satake M, Matsubayashi K, Suzuki R, Sugiyama R, Sunagawa T and Masamichi Muramatsu.	4. 巻 67
2. 論文標題 Seroepidemiology of hepatitis A virus infection in Japan, an area of very low endemicity. Microbiology and Immunology, 2023.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 14-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13035. Epub 2022 Nov 27.	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 Shi S, Zheng X, Suzuki R, Li Z, Shiota T, Wang J, Hirai-Yuki A, Liu Q, Muramatsu M, Song SJ	4. 巻 238
2. 論文標題 Novel flavonoid hybrids as potent antiviral agents against hepatitis A: Design, synthesis and biological evaluation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Med Chem.	6. 最初と最後の頁 114452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejmech.2022.114452. Epub 2022 May 14.	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 該当する
1. 著者名 斉藤淳哉、山島美緒、林田稔也、池田智成、石田智士、浦川立貴、岡村卓真、栗林泰隆、山道忍、矢島弘之、宮崎修、本田徹郎、杉山隆一、清原知子、鈴木亮介、森内浩幸、市川辰樹	4. 巻 63
2. 論文標題 妻の感染を契機に同居家族全員がA型肝炎ウイルスに感染した症例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肝臓	6. 最初と最後の頁 13-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2957/kanzo.63.500	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 鈴木亮介	4. 巻 2023
2. 論文標題 ウイルス性肝炎を見直す A型肝炎・E型肝炎	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 小児科	6. 最初と最後の頁 7-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Sun Lu, Li You, Misumi Ichiro, Gonzalez-Lopez Olga, Hensley Lucinda, Cullen John M., McGivern David R., Matsuda Mami, Suzuki Ryosuke, Sen Ganes C., Hirai-Yuki Asuka, Whitmire Jason K., Lemon Stanley M.	4. 巻 17
2. 論文標題 IRF3-mediated pathogenicity in a murine model of human hepatitis A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009960	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 該当する

1. 著者名 Matsuda M, Hirai-Yuki A, Kotani O, Kataoka M, Zheng X, Yamane D, Yokoyama M, Ishii K, Muramatsu M, Suzuki R.	4. 巻 20
2. 論文標題 Loxapine inhibits replication of hepatitis A virus in vitro and in vivo by targeting viral protein 2C.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1012091.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1012091.	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 Kanda T, Sasaki-Tanaka R, Ishi K, Suzuki R, Inoue J, Tsuchiya A, Nakamoto S, Abe R, Fujiwara K, Yokosuka O, Li TC, Kunita S, Yotsuyanagi H, Okamoto H; AMED HAV and HEV Study Group.	4. 巻 54
2. 論文標題 Recent advances in hepatitis A virus research and clinical practice guidelines for hepatitis A virus infection in Japan.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 4-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13983	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Xin Zheng, Shaochun Shi, Ryosuke Suzuki, Ziyue Li, Jiayin Wang, Qingbo Liu, Shao-Jiang Song, Masamichi Muramatsu.
2. 発表標題 Identification of New flavonoid hybrids as potent anti-hepatitis A virus agents.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xin Zheng, Shaochun Shi, Ryosuke Suzuki, Ziyue Li, Jiayin Wang, Asuka Hirai-Yuki, Qingbo Liu, Shao-Jiang Song, Masamichi Muramatsu.
2. 発表標題 Development of novel flavonoid hybrids against hepatitis A.
3. 学会等名 第63回臨床ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鄭シン、張寒、史紹春、鈴木亮介、塩田智之、結城明香、劉慶博、宋少江、村松正道
2. 発表標題 新規フラボノイド系化合物を用いた抗HAVおよびHCV作用の検討
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

1. 発表者名 鈴木亮介、松田麻未、西山直子、小林さくら、鈴木祐成、結城（平井）明香、山根大典、村松正道
2. 発表標題 レポーター遺伝子を持つ組換えA型肝炎ウイルスを用いた抗ウイルス低分子化合物の探索
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鄭シン, 史紹春, 鈴木亮介, 結城(平井)明香, 若江亨祥, 劉慶博, 宋少江, 村松正道
2. 発表標題 A型肝炎ウイルスにおける新規抑制剤の開発
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Ryosuke Suzuki, Mami Matsuda, Asuka Hirai-Yuki, Osamu Kotani, Michiyo Kataoka, Xin Zheng, Daisuke Yamane, Masaru Yokoyama, Koji Ishii, Masamichi Muramatsu
2. 発表標題 Loxapine inhibits replication of hepatitis A virus by targeting the N-terminal region of 2C
3. 学会等名 Europic2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 山下信子、鈴木亮介	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 小児科 ウイルス性食中毒	

1. 著者名 鈴木亮介	4. 発行年 2023年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 A型肝炎・E型肝炎	

1. 著者名 鈴木亮介	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 5
3. 書名 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴	

〔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
---------	---------