

研究課題名【B型肝炎ウイルスの新規培養系の確立と創薬開発への応用】

(所属機関) 神戸大学大学院・医学研究科・感染制御学分野

(氏名) 阿部 隆之

E-mail: atakayu@med.kobe-u.ac.jp

【研究の背景と目的】

B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus : HBV) の感染者数は全世界で3億5千万人、本邦でも約150万人のHBV感染者数が推測されており、感染症研究の中でも早期に解決されるべき感染症の一つである。HBVは、ワクチンが一定の有効性を示すものの、一部が慢性持続感染化し、肝硬変及び肝癌の発症の原因となることが知られている。HBV感染症においてもウイルスの酵素遺伝子を標的にした創薬が試みられているが、慢性持続感染細胞からの完全なウイルスの排除には至っていない。HBV感染症の特徴として、慢性持続感染を呈することが挙げられるが、その詳細な感染機構及び病原性誘発の機序も含め、それらの概要は未だ謎に包まれたままである。その要因の一つに、HBVに対する効率の良い培養細胞系や汎用性の高い小型実験動物が存在しないことが挙げられる。本研究では、HBVの感染・複製過程における新規受容体及び細胞内宿主因子を同定し、HBVの感染環を正確に且つ効率良く再現可能な培養細胞系の樹立を試みることを目的とする。さらに、最終的には、新たな系の知見に基づいたHBV感染症に対する新規創薬開発への発展も将来構想として取り入れる予定である。

【研究方法・研究内容】

1) HBVの複製制御に関与する新規細胞内宿主因子の同定と機能解析

我々の研究グループは、これまでにC型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV) のNS5A蛋白質に相互作用する細胞内宿主因子として、インターフェロン誘導性の候補遺伝子 (ISG#1) を同定している (阿部 投稿論文準備中)。このISG蛋白質は多くのウイルス感染症に対して抗ウイルス活性応答を示し、また、タンパク質翻訳後修飾反応 (Post-Translational Modification; PTM) としての機能を有するものであった。このPTMシステムには、ユビキチンやユビキチン様の幾つかの蛋白質修飾反応経路があり、多くのウイルス感染症に対する生体防御機構としての関与が報告されている。これまでに、HBV感染に対するタンパク質翻訳後修飾反応との相互作用にはまだ不明な点が多かったことから、HBV感染とインターフェロン誘導性の候補遺伝子 (ISG#1) との関わりを、培養細胞内にて検討した。

2) HBVの感染を阻害する新規化合物の同定と抗HBV活性の評価

HBV の感染・複製を阻害する新規化合物を同定するために、ヘテロ環化合物ライブラリー (491 化合物) を用いた抗 HBV 活性の評価を検討した (化合物ライブラリーは神戸薬科大学 上田昌史 教授 研究室より分与していただいた)。具体的には、HBV の感染初期過程を解析できるレポーターHBV (HBV-NL) を用い、化合物を添加後のレポーター活性を指標にしたスクリーニング系で評価を行った。

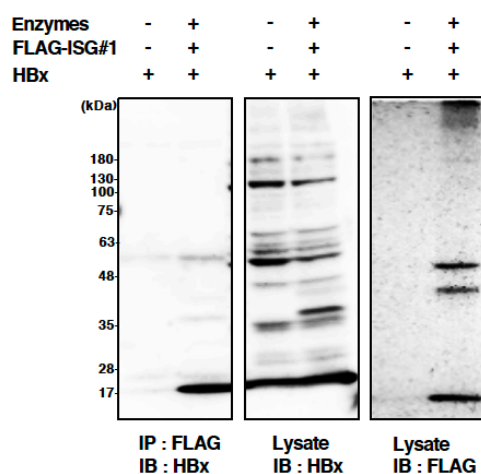
3) HCV/HBV 共培養系の樹立

近年、慢性 C 型肝炎の治療に伴う B 型肝炎の再燃・再活性化の問題が危惧されている。しかしながら、これまでに汎用性の高い HCV/HBV 共感染培養系は確立されておらず、その分子機序、並びに抗ウイルス剤の評価の知見が乏しい背景がある。そこで本研究では、HCV 持続複製細胞株に HBV の感染受容体 (NTCP) を発現させた細胞株を樹立し、その特性を評価した。

【研究成果】

1) HBV の複製制御に関与する新規細胞内宿主因子の同定と機能解析

4 種の HBV 遺伝子産物 (HBx、HBc、HBs 及び HBV ポリメラーゼ) を発現する各種プラスミドと、候補遺伝子 (ISG#1) の発現プラスミドを培養細胞内にて共発現させ、免疫沈降法によるタンパク質相互作用実験、並びに免疫ブロットによる発現様式の解析を行った。その結果、本研究にて着目したインターフェロン誘導性の候補遺伝子 (ISG#1) は、HBV のゲノムにコードされている、HBx 蛋白質に相互作用することが明らかとなった (2018 国際 HBV 学会及び第 66 回日本ウイルス学会にて発表済み) (研究成果左図を参照)。さら



に、推定分子量 15kDa のこの候補遺伝子 (ISG#1) は、HBx 蛋白質に共有結合を介して付加される細胞内蛋白質修飾反応に関与することが免疫ブロットの解析より示唆された。さらに、この細胞内蛋白質修飾反応に関与する細胞内連結酵素群 (Enzymes と明記) も同定することができた。実際に、これらの細胞内連結酵素群を欠損、あるいはその RNAi による発現抑制及びその酵素不活性型変異体の共発現により、HBx 蛋白質との相互作用や共有結合を介した蛋白質修飾反応の著しい低下が認めら

れた。今後、同定された細胞内連結酵素群の機能を阻害できる化合物を探索し、それらの抗 HBV 活性の評価を検討する予定である (現在、神戸薬科大学との共同研究を進めている)。

2) HBV の感染を阻害する新規化合物の同定と抗 HBV 活性の評価

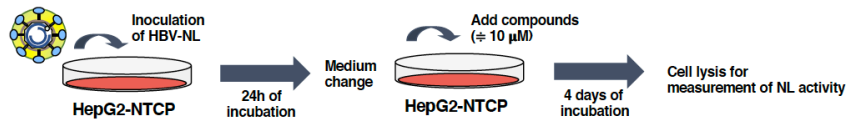
491 種類のヘテロ環化合物ライブラリーとレポーター-HBV (HBV-NL) を用いたハイスループットスクリーニング系を構築した。HepG2-NTCP 細胞に HBV-NL を感染させ、その 24 時間後に、終濃度 $10\mu\text{M}$ ~ $1\mu\text{M}$ の化合物を添加し、4 日間培養を行なった(プロトコル①)。その結果、これまでに、HBV-NL の感染を阻害する化合物を 4 種類、また HBV-NL の感染を促進する化合物が 2 種類得られた (化合物の名称および構造式は非公開)。また、HepG2-NTCP 細胞に化合物の前処理を行った後に HBV-NL を接種し、HBV の感染初期過程における阻害効果も検討した (プロトコル②)。その結果、HBV-NL の感染を阻害する化合物を 7 種類、また HBV-NL の感染を促進する化合物を 3 種類得られた (化合物の名称および構造式は非公開)。今後、得られた化合物の詳細な作用機序の解明が必要であるが、本研究より、新規の抗 HBV 製剤としての候補化合物が同定された。

ヘテロ環化合物による抗HBV活性の評価

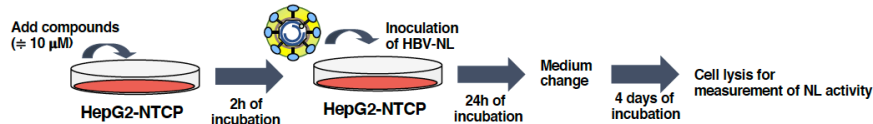
✓新しい合成手法に基づく多官能性複素環化合物類 (491化合物)を用いた、新規医薬品リード化合物の探索

神戸薬科大学 薬品化学研究室(上田昌史 教授)との共同研究

【プロトコル①】



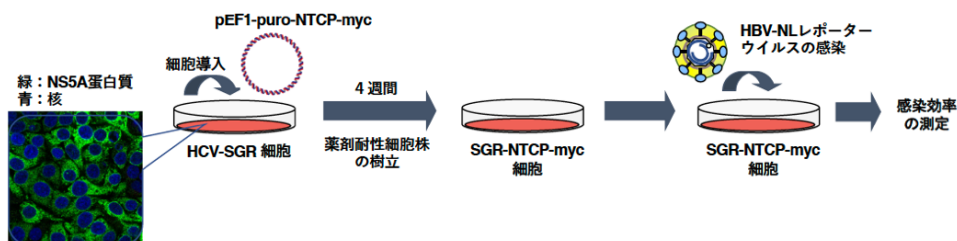
【プロトコル②】



3) HCV/HBV 共培養系の樹立

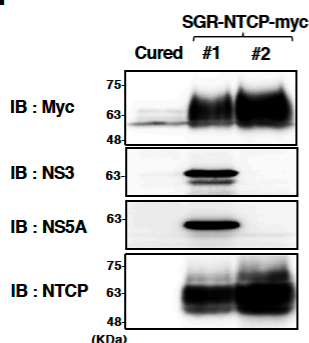
NTCP を安定的に発現する HCV 持続複製レプリコン細胞 (HCV-SGR 細胞) の樹立を試み、複数の薬剤耐性細胞株を得た (研究成果図. A を参照)。

A.

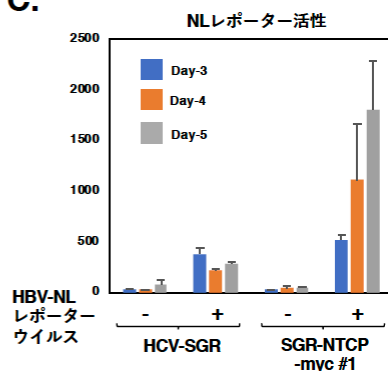


いずれの薬剤耐性細胞株も、Myc 抗体、ならびに NTCP 抗体を用いた免疫ブロットより NTCP の発現は強く確認されたが、HCV の持続複製を同時に維持できている細胞株は(#1)のみであった(研究成果図.Bを参照)。SGR-NTCP-myc-#1 に HBV-NL を接種し、経時的に

B.

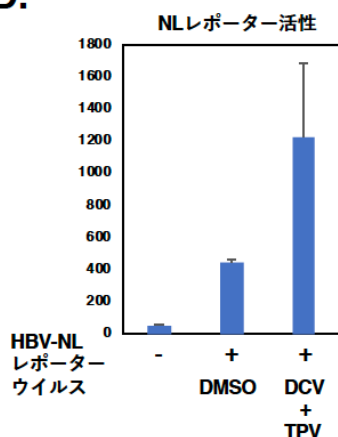


C.



細胞を回収した後、Nano-Glo レポーター測定試薬を用いて HBV-NL の感染効率を測定した。その結果、SGR-NTCP-myc-#1 細胞は、HCV-SGR 細胞よりも高いレポーター活性を示した(研究成果図.Cを参照)。これらの結果から、HBV が高率に感染・複製した HCV

D.



持続複製細胞株の樹立が確認された。SGR-NTCP-myc-#1 に HBV-NL を感染後、HCV 特異的阻害剤であるダクラタスビル (DCV) とテラプレビル (TPV) を加え、HCV 排除に伴う HBV 複製の影響を検討した。その結果、興味深いことに、DCV と TPV の処理で HCV 複製を阻害した細胞で、HBV-NL 感染によるレポーター活性の上昇が観察された(研究成果図.Dを参照)。これらの結果は、HCV と HBV が共存している状況下で、HCV 排除に伴う HBV の感染・複製が促進されたことを意味する。今後、同実験条件下における細胞内宿主遺伝子発現の網羅的な解析を行い、HBV の再活性化及び炎症誘導に関わる分子機序の解明を行う必要がある。

【研究がもたらす効果及び波及効果】

本研究の遂行にて、既存のコンセプトにはない新規の抗 HBV 製剤としての可能性を有する化合物、並びに標的因子を同定することができた。これらの成果は慢性 B 型肝炎の排除につながることを期待される。また、新たな HCV/HBV 共感染培養系が樹立できたことで、B 型肝炎の再燃・再活性化の分子機序が明らかにでき、その治療方法の開発が期待される。

【謝辞】この研究は、公益財団法人ひょうご科学技術協会からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。