

Nrf2 活性化剤の新規抗 HBV 薬としての基礎基盤の確立

神戸大学大学院医学系研究科

鄧 琳

1 研究の背景と目的

B型肝炎ウイルス (HBV) は、全世界で2億5,000万人以上が持続感染しており、毎年約120万人が新規感染し、約100万人がHBV関連疾患 (主に肝硬変および肝細胞癌) により死亡している。本邦においても約100万人のHBV感染者が存在すると推定されており、日本を含めた世界規模での対策が急務である。しかしながら、HBVは体内からの完全排除が極めて困難であるため、現行の治療戦略では、血中HBV-DNAおよびHBs抗原の陰性化、すなわち「機能的治癒」が治療目標としている。現在、核酸アナログ製剤およびインターフェロン製剤が抗HBV薬として広く用いられているものの、機能的治癒の効果は限定的であり、作用機序の異なる新規抗HBV薬の開発が喫緊の課題である。

我々はこれまでに、HBV感染により転写因子Nrf2が活性化され、核内へ移行してHBVプロモーター活性を阻害することで、HBV複製を抑制することを明らかにした (Ariffianto et al., J Virol, 2023)。この知見は、Nrf2活性化剤が新規抗HBV薬の候補となる可能性を示唆している。さらに、既存のNrf2活性化剤の抗HBV効果を検討した結果、HBVコアプロモーター活性を有意に抑制する2種類の化合物 (No. 3とNo. 12) を見出した。そこで本研究では、HBV感染細胞を用いてこれら2種類のNrf2活性化剤の抗HBV効果を検証するとともに、その作用機序を解明し、機能的治癒の達成に資する新規抗HBV薬の創出に貢献することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

(1) 2種類の化合物 (No. 3 と No. 12) の選択性指数(SI)の評価

・ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞に異なる濃度の化合物を添加し、2日後に CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega 社) を用いて、HepG2 細胞に対する 50%細胞毒性濃度 (CC₅₀)を求める。

・HBV 遺伝子型 C 由来のコアプロモータールシフェラーゼレポーター遺伝子を HepG2 細胞に導入し、24 時間後に異なる濃度の化合物を添加する。処理 2 日後にルシフェラーゼアッセイを行い、コアプロモーター活性に対する 50%阻害濃度 (IC₅₀) を求める。これらの結果から、選択性指数(SI) (CC₅₀/ IC₅₀)を評価する。

(2) 2種類の化合物 (No. 3 と No. 12) の HBV 遺伝子型 A、B、C、D の複製に及ぼす影響の評価

・HBV 遺伝子型 A、B、C、D 由来のコアプロモータールシフェラーゼレポーター遺伝子を HepG2 細胞に導入し、24 時間後に化合物を添加する。処理 2 日後にルシフェラーゼアッセイにより、各遺伝子型由来のコアプロモーター活性に及ぼす影響を評価する。

・HBV 遺伝子型 A、B、C、D 由来の 1.3 倍長 HBV 発現プラスミドを HepG2 細胞に導入し、24 時間後に化合物を添加する。処理 2 日後に細胞内トータル RNA を抽出し、逆転写後、qPCR により各 HBV 遺伝子型の pgRNA 量を測定する。

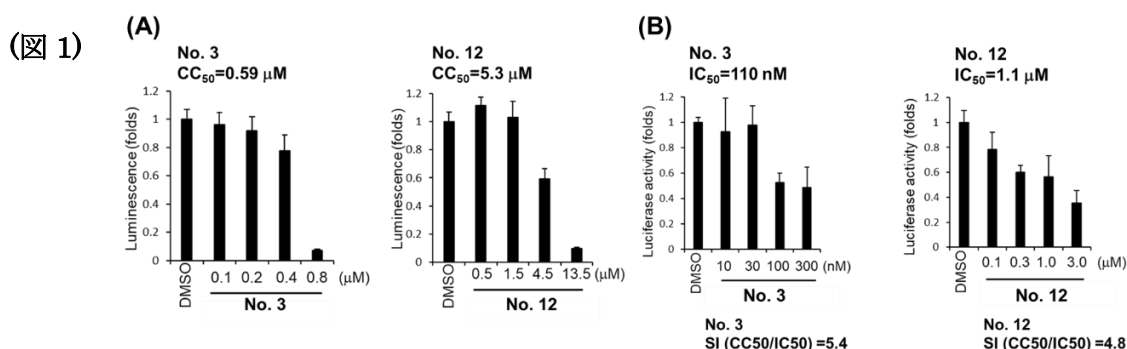
(3) HBV 感染細胞における複製に及ぼす化合物 (No. 3 と No. 12) の影響の評価

・HepG2-NTCP-Myc-His₆ 細胞に HBV(遺伝子型 D)を感染させた後、2 種類の化合物を添加する。処理 12 日後に細胞内トータル RNA を抽出し、逆転写後、qPCR により HBV pgRNA 量を測定する。

・初代肝細胞 (PXB 細胞) に HBV(遺伝子型 D)を感染させた後、No.3 の化合物を添加する。処理 12 日後に同様に qPCR により HBV pgRNA 量を測定する。また、ウェスタンブロッティングによりコアタンパク質および内在性 Nrf2 タンパク質量の変化を解析する。

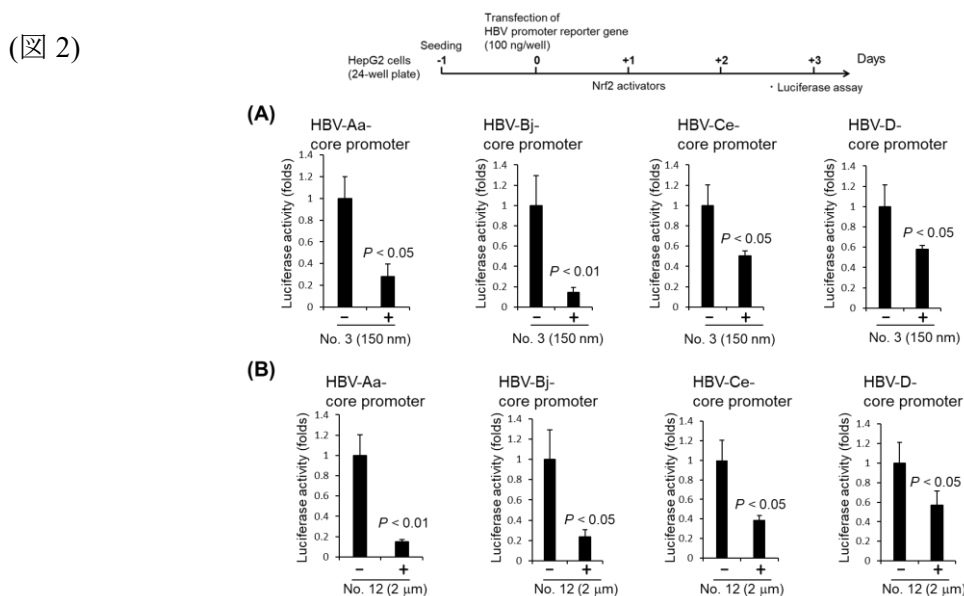
3 研究成果

(1) 2 種類の化合物 (No. 3 と No. 12) の選択性指数(SI)は、それぞれ 5.4 と 4.8 であった (図 1)。



これらの化合物の HepG2 細胞における 50%細胞毒性濃度 (CC₅₀)は、それぞれ 0.59 μM および 5.3 μM であり(図 1A)、コアプロモーター活性に対する 50%阻害濃度(IC₅₀)は、それぞれ 110 nM および 1.1 μM であった(図 1B)。これらの結果から、SI はそれぞれ 5.4 および 4.8 であった。

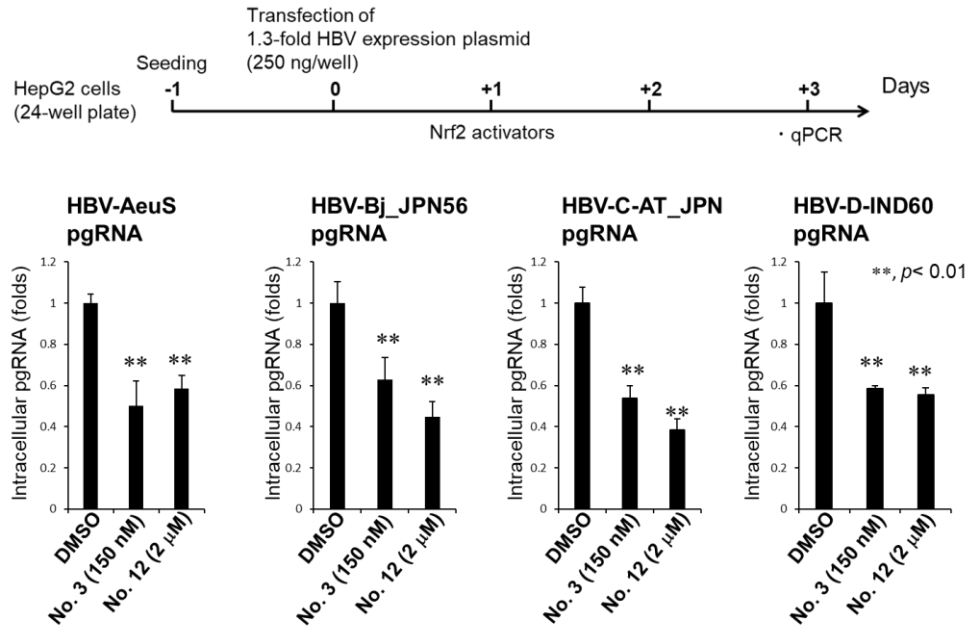
(2) 2 種類の化合物 (No. 3 と No. 12) は、いずれも HBV 遺伝子型 A、B、C、D のコアプロモーター活性を有意に抑制する (図 2)。



150 nM の No. 3 (図 2A)あるいは 2 μ M の No. 12 (図 2B) の処理により、HBV 遺伝子型 A、B、C、D のコアプロモーター活性は、いずれも有意に低下した。

(3) 2 種類の化合物 (No. 3 と No. 12) は、いずれも HBV 遺伝子型 A、B、C、D の pgRNA 量を有意に抑制する (図 3)。

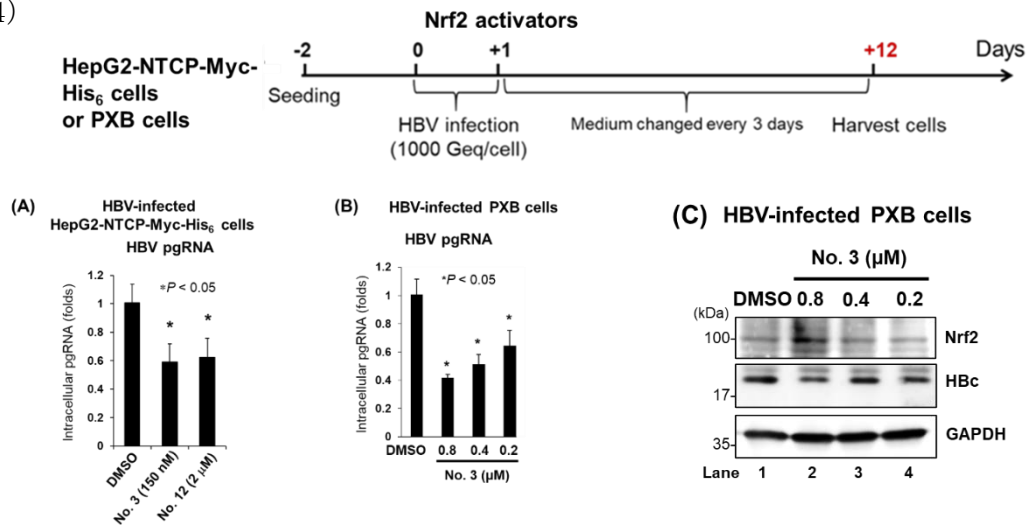
(図 3)



150 nM の No. 3 あるいは 2 μ M の No. 12 の処理により、HBV 遺伝子型 A、B、C、D の pgRNA 量はいずれも有意に低下した (図 3)。この結果から、Nrf2 活性化剤 (No. 3 と No. 12) はコアプロモーター活性の阻害を介して pgRNA の低下を引き起こすと考えられた。

(4) 2 種類の化合物 (No. 3 と No. 12) は、いずれも HBV 感染細胞における pgRNA 量を有意に抑制する (図 4)。

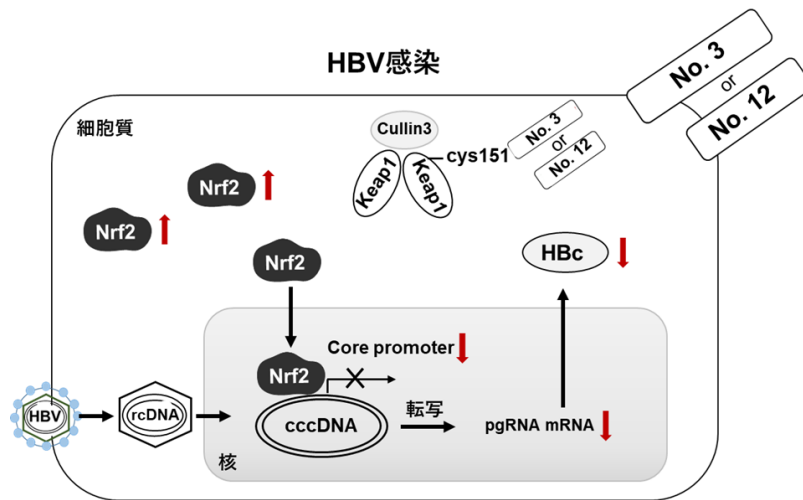
(図 4)



150 nM の No. 3 あるいは 2 μM の No. 12 で 12 日間処理することにより、HBV 感染した HepG2-NTCP-Myc-His₆ 細胞における pgRNA 量はいずれも有意に低下した(図 4A)。さらに、HBV 感染したヒト初代肝細胞 (PXB 細胞) においても、No.3 が濃度依存的に HBV pgRNA 量を抑制した (図 4B)。また、0.8 μM の No.3 処理により、コントロールと比較して内在性 Nrf2 タンパク質量が増加し、(図 4C、top panel、lane 1 と 2)、HBV コアタンパク質量が低下した (図 4C、second panel、lane 1 と 2)。

これらの結果から、Nrf2 活性化剤は細胞内の Nrf2 タンパク質量を増加させることで pgRNA 量を抑制し、コアタンパク質の低下を引き起こすと考えられた。

(5) Nrf2 活性化剤による HBV 複製抑制の分子機序モデル (図 5)



Nrf2 活性化剤 (No.3 と No. 12) は、Keap1 の 151 番目のシステイン残基に結合することで Nrf2 を安定化させる。細胞核に移行した Nrf2 は HBV コアプロモーター活性を抑制し、pgRNA 量を低下させ、これに伴いコアタンパク質量が減少すると考えられる。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究により得られる成果は、将来的に HBV 感染患者の生活の質の向上に寄与するとともに、既存治療では達成が困難な機能的治癒の達成率向上に貢献することが期待される。さらに、核酸アナログ製剤とは異なる作用機序を有する新たな治療戦略の確立につながる可能性がある。また、創薬シーズとしての展開により、関連産業の発展にも寄与すると考える。