

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

総括研究報告書

マイクロ RNA を標的とした新規抗 C 型肝炎ウイルス治療戦略の開発

研究代表者 渡土 幸一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

研究要旨：本研究では、マイクロRNA (miRNA)等宿主因子を標的とした新規抗C型肝炎ウイルス(HCV)治療法の開発を目的とした。そのために(1) miRNA阻害剤TPFによるHCV複製抑制効果、(2) miRNA以外のHCV複製増殖に関わる宿主因子の同定、(3) (2) を標的とした抗HCV剤のリード化合物の同定、を主におこなった。まず培養細胞においてTPFは主にHCV翻訳を阻害することによってHCV複製を阻害することが示唆された。また感染性HCV粒子産生系を用いたスクリーニングにより、TPFとは別系統の抗HCV作用を有するさまざまな低分子化合物が得られた。これらのうちhalopemideは宿主phospholipase Dを阻害することによりHCV放出過程を阻害すること、MA026は感染レセプターの一つであるclaudin-1と結合することによりHCV侵入を阻害すること、SCY-635はHCV感染細胞におけるPKRリン酸化の阻害を介したインターフェロン下流遺伝子群の翻訳上昇によりHCV複製を低下させることなどが明らかとなった。以上の結果は抗HCV剤の創薬標的となる新たな宿主因子およびこれを標的とするリード化合物を提示するものであり、新規抗HCV剤開発に有用な知見を提供するものである。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は本邦において約100万人存在すると推定されている。HCV治療としては現在まで主にペグインターフェロンとリバビリンの併用療法に加えプロテアーゼ阻害剤が用いられているが、これらの治療法はHCV遺伝子型によって効果が異なること、インターフェロンベースの治療法では特に副作用が問題になること、プロテアーゼ阻害剤に対しては薬剤耐性ウイルスの出現が否定できないことから、新たな抗HCV療法が求められている。特に長期投与に伴う薬剤耐性ウイルス出現を克服するためには、宿主因子を標的とした治療薬開発が重要である。本研究ではマイクロRNA(miRNA)等の宿主因子を標的とした新規治療法の開発を目指す。miRNAは

多様な宿主遺伝子発現を調節する小分子RNAであり、特に肝臓に高発現するmiR-122はHCVの複製補因子として認知されており、細胞内でのHCVゲノム複製を強く促進する。これまでに研究代表者はさまざまなmiRNA種の遺伝子サイレンシング経路を低分子化合物により阻害できることを初めて示した。そこで本研究ではまずmiRNA機能阻害によるHCV複製制御を目指してこのmiRNA阻害剤TPFを用いた解析をおこなう。またこれとは別の抗HCV作用を有する化合物を探索する。得られた化合物の抗HCV分子メカニズムの解析をおこなうことにより、抗HCV剤の創薬標的となる新規宿主因子の同定を目指す。

B. 研究方法

(1) miRNA阻害剤によるHCV複製抑制作

用メカニズムの解析

miR-122 依存的 HCV 複製は、miR-122 を過剰発現した HeLa 細胞に HCV RNA を導入し、コロニー形成アッセイによって評価した。また肝細胞での HCV 複製活性の測定には、HCV レプリコンを有する Huh-7 細胞を用いた。HCV 翻訳は、NS5B 内の酵素活性中心に変異を導入して RNA 複製活性が欠失した変異体レプリコンにより評価した。

(2) 抗 HCV 効果を有する低分子化合物の探索

HCV RNA を導入した Huh7-25 細胞に化合物を 72 時間処理し、培養上清中の HCV 感染力価を測定することにより、それぞれの化合物が感染性 HCV 産生に与える影響を評価した。

(3) halopemide の宿主標的の同定および抗 HCV 作用機序の解析

Huh-7.5.1 細胞への siRNA 導入には lipofectamine RNAiMax を用いた。また HCV core タンパク質とさまざまなオルガネラマーカートの細胞内局在は免疫蛍光法により検出した。

(4) MA026 の宿主標的の同定および抗 HCV 作用機序の解析

MA026 の宿主標的のスクリーニングには、MA026 を固相化したプレートおよびランダムペプチドライブラリーを表出するファージを用いたファージディスプレイ法を用いた。MA026 と claudin-1 との結合は表面プラズモン共鳴により評価した。

(5) SCY-635 のインターフェロン(IFN)経路修飾作用機序の解析

ISG15、MxA、PKR、リン酸化 PKR、eIF2a、リン酸化 eIF2a、HCV core、actin タンパク

質はイムノプロット法で検出した。

C. 研究結果

(1) miRNA 阻害剤による HCV 複製抑制作用メカニズムの解析

miRNA 阻害剤 TPF を処理することにより HeLa 細胞における miR-122 依存的 HCV 複製が減少した。また TPF によって Huh-7 細胞内のレプリコン活性も減少した。また HCV 複製抑制メカニズムの一つとして、TPF により用量依存的に HCV 翻訳活性の低下が認められた。

(2) 抗 HCV 効果を有する低分子化合物の探索

HCV RNA を導入した Huh7-25 細胞における感染性 HCV 産生を測定することにより、抗 HCV 作用を有する化合物をスクリーニングした。その結果、感染性 HCV 産生を 1/3 以下に低下させるものとして 17 化合物が得られた。この際、いずれも細胞毒性はほとんど示さなかった。

(3) halopemide の宿主標的の同定および抗 HCV 作用機序の解析

halopemide は HCV RNA 複製および粒子形成には影響を与えることなく HCV 放出を有意に低下させた。また halopemide の宿主標的の一つである phospholipase D (PLD) に対する siRNA を導入したところこの細胞からの感染性 HCV 産生が約 1/3 に減少した。PLD 阻害効果をもつ halopemide 以外の化合物を処理することによっても感染性 HCV 産生が減少した。また PLD 阻害によってアルブミン、アポリポタンパク質などの宿主分泌タンパク質の放出にはほとんど影響せず、またこの時、HCV core タンパク質がゴルジ

に蓄積していることが観察された。

(4) MA026 の宿主標的の同定および抗 HCV 作用機序の解析

pseudomonas より抽出された新規天然有機化合物 MA026 が HCV 侵入を阻害することを、感染性 HCV 粒子産生系で明らかにした。MA026 の標的分子をファージディスプレイ法により探索したところ、MA026 結合配列として単離されたペプチド配列の一つが、claudin-1 の細胞外ループと相同性を有していた。さらに表面プラズモン共鳴により MA026 とリコンビナント claudin-1 タンパク質の結合が確認された。

(5) SCY-635 のインターフェロン経路修飾作用機序の解析

SCY-635 を処理した HCV 感染細胞では ISG15、MxA などの IFN 下流遺伝子の mRNA 発現は変化することなく、これらのタンパク質量が増加することが明らかとなった。また SCY-635 処理によってリン酸化 PKR およびリン酸化 eIF2a の顕著な低下が認められた。この SCY-635 のリン酸化 PKR 低下作用はシクロフィリンの阻害を介していることが示唆された。

D. 考察

以上のように miRNA 阻害剤 TPF および他の宿主因子を標的とする抗 HCV 化合物 halopemide, MA026, SCY-635 の作用機序を解析した。その結果、halopemide は PLD 阻害によりゴルジからの HCV 輸送を阻害し、HCV 放出を低下させることが示唆された。MA026 は claudin-1 と結合する初めての低分子化合物であることが明らかとなり、これは HCV 侵入阻害効果を有することが示された。また SCY-635 はこれまで HCV RNA を直接阻害することが報告されていたが、そ

れに加えて今回の結果より IFN 下流遺伝子の発現上昇を介する HCV 複製抑制作用も有することが示唆された。

E. 結論

以上のように本研究では、miRNA およびそれ以外の宿主因子を標的とすることにより抗 HCV 作用を示す低分子化合物を同定した。これらの化合物を至適化することによりさらに良好な抗 HCV プロファイルを持つ化合物が同定できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T.: Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. **Hepatology** (in press)
- 2) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T.: Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. **Biochem Biophys Res Commun** 443: 808-813 (2014)
- 3) Shimura S, Ishima M, Nakajima S, Fujii T, Himeno N, Ikeda K, Izaguirre-Carbonell J, Murata H, Takeuchi T, Kamisuki S, Suzuki T, Kuramochi K, Watashi K, Kobayashi S, Sugawara F.: Total Synthesis and Anti-Hepatitis C Virus Activity of MA026. **J Am Chem Soc** 135: 18949-18956 (2013)

- 4) Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T.: Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. **J Gen Virol** 95 Pt 1: 60-65 (2014)
- 5) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T.: Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. **Biochem Biophys Res Commun** 440: 515-520 (2013)
- 6) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor- trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). **J Biol Chem** 288: 31715-31727 (2013)
- 7) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T.: Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. **PLoS Pathog** 9: e1003589 (2013)
- 8) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H.: Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. **PLoS One** 8: e68992 (2013)
- 9) 渡士幸一。薬学的視点からのウイルス学研究 - 肝炎ウイルス複製阻害化合物の同定とその作用機序 -。薬学雑誌、133,1169-1175,2013
- ## 2. 学会発表
- 1) K. Watashi. IL-1- and TNFalpha-triggered intracellular immune response against HBV. **1st Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B virus**, Tokyo(Japan), 2013
- 2) K. Watashi, T. Daito, A. Sluder, K. Borroto-Esoda, T. Wakita. Cyclophilin inhibitors potentiate interferon signaling through diminished PKR phosphorylation in HCV-infected cells. **European Association for the Study of the Liver 2013**, Amsterdam(Netherlands), 2013
- 3) 渡士幸一、中嶋翔。ウイルス感染系を基盤とした真菌由来天然化合物の生理活性探索。天然物ケミカルバイオロジー 第4回公開シンポジウム、つくば、2013
- 4) K. Watashi, T. Daito, A. Sluder, K. Borroto-Esoda, T. Wakita. Novel regulation mechanism of interferon signaling by cyclophilin through modulation of PKR in HCV-infected cells. **20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Melbourne(Australia), 2013
- 5) S. Nakajima, K. Watashi, S. Kamisuki, K. Takemoto, R. Suzuki, H. Aizaki, F. Sugawara, T. Wakita. Isolation of a natural product inhibiting the transcriptional activity of liver X receptor and reducing the production of infectious HCV. **20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Melbourne(Australia), 2013
- 6) A. Fujimoto, H. Aizaki, M. Matsuda, N.

- Watanabe, K. Watashi, R. Suzuki, T. Suzuki, T. Miyamura, T. Wakita. Dynamics of the cellular metabolome during hepatitis C virus infection – Regulation of the lipoprotein metabolisms by hepatic lipase -. **20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses**, Melbourne(Australia), 2013
- 7) K. Watashi, A. Sluder, S. Matsunaga, A. Ryo, S. Nakajima, M. Iwamoto, S. Tsukuda, K. Borroto-Esoda, M. Sugiyama, Y. Tanaka, M. Mizokami, T. Wakita. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Shanghai(China), 2013
- 8) K. Watashi, G. Liang, M. Iwamoto, H. Marusawa, K. Kitamura, M. Muramatsu, R. Suzuki, J. Li, S. Tong, Y. Tanaka, K. Murata, H. Aizaki, T. Wakita. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Shanghai(China), 2013
- 9) M. Iwamoto, K. Watashi, S. Tsukuda, H. Aly, R. Suzuki, H. Aizaki, O. Koiwai, H. Kusahara, T. Wakita. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Shanghai(China), 2013
- 10) S. Tsukuda, K. Watashi, M. Iwamoto, R. Suzuki, H. Aizaki, S. Kojima, T. Wakita. A retinoid derivative inhibits hepatitis B virus entry mediated by NTCP. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Shanghai(China), 2013
- 11) H. Aly, K. Watashi, K. Chayama, T. Wakita. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Shanghai(China), 2013
- 12) N. Ogura, K. Watashi, T. Wakita. Formation of covalently closed circular (ccc)DNA tetracycline inducible HBV expression cell line. **2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses**, Shanghai(China), 2013
- 13) S. Nakajima, K. Watashi. Analysis of bioactivity of fungal-derived natural products based on a virus infection system. **The 2nd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products**, Yokohama(Japan), 2013
- 14) 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字。シチジンデアミナーゼAID誘導を介した抗B型肝炎ウイルス細胞内免疫応答機構の解明。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 15) 大東卓史、渡士幸一、Ann Sluder、中嶋翔、Katyna Borroto-Esoda、藤田尚志、脇田隆字。PKR活性化制御を介するシクロフィリン阻害剤の新たな抗C型肝炎ウイルス作用機序。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 16) 内田奈々子、渡士幸一、中嶋翔、岩本

- 将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉丈、脇田隆字。C型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 17) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、アリ フセイン、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆字。ヒト NTCP 安定発現細胞株におけるB型肝炎ウイルス侵入機構の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 18) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。B型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定およびその NTCP を介した感染阻害機構の解明。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 19) 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字。Liver X receptor 転写活性および感染性C型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 20) フセイン アリ、渡士幸一、茶山一彰、脇田隆字。Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 21) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字。日本脳炎ウイルスレプリコンを用いたトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス粒子産生系の開発。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 22) 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字。C型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化と Hepatic Lipase 発現制御。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 23) 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字。C型肝炎ウイルス NS5A 結合膜タンパク質 ELAVL1 のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 24) 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗。細胞内発現抗体(イントラボディ)によるC型肝炎ウイルスの増殖抑制。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 25) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、SuSu Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和気健二郎、宮村達男、脇田隆字。PhospholipaseA2 および Autophagy によるC型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗HCV作用-。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 26) 小泉吉輝、岩見真吾、内田奈々子、脇田隆字、渡士幸一。数理モデルによる抗ウイルス薬の薬効評価系の確立。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 27) 古賀れい奈、宮川敬、松永智子、渡士幸一、脇田隆字、梁明秀。Tetherin/BST-2 はHBV複製を負に制御する。第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013
- 28) 馬場昌範、外山政明、伊藤涉、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、Sharon Ashoke。新規ピラノンカルボキサミド誘導体の

抗 HCV 効果とその構造活性相関。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

29) 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡土幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字。プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス産生系の確立。第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013

30) 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、SuSu Hmwe、渡邊則幸、渡土幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦知和、鈴木哲朗、和気健二郎、宮村達男、脇田隆字。PhospholipaseA2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御-グリチルリチンによる抗 HCV 作用-。第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他