

A. 研究目的

小嶋を中心としたスクリーニンググループは、HBV生活環の様々なステップと付随する病態について独自のスクリーニング系を構築、もしくは相崎を中心とした有効性・安全性評価グループや松浦を中心とした臨床グループ、同事業他班から細胞スクリーニング系を導入。ハイスループットスクリーニングを行い、ヒット化合物、さらにはリード候補化合物を得る。キメラマウスを用いた動物モデルで薬効を検証し、相崎グループと連携して安全性を確認し、リード化合物を得ることを目的とする（図1）。

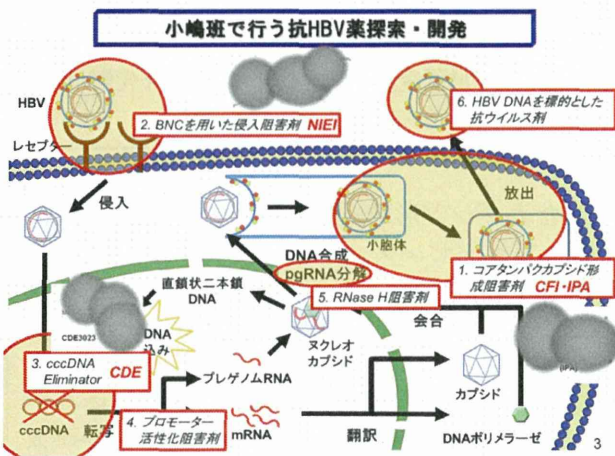


図1. 小嶋班でスクリーニング対象とするHBV生活環。

メインスクリーニング各項目の具体的な目的は以下のとおりである。*数値は図中の番号

カプシド形成阻害剤の抗HBV活性測定（1）

分泌型 Gaussia スプリットルシフェラーゼを利用したカプシド形成（コアタンパク HBc 二量体形成）阻害剤探索系で東京大学創薬オープンイノベーションセンター化合物ライブラリー14万化合物から得たヒット化合物（小川報告参照）の抗HBV活性を生ウイルスを用いて評価することと、構造類縁体の合成、収集を目的とした。

BNCを用いた侵入阻害剤スクリーニング（2）

バイオナノカプセル(BNC)は脂質二重膜にHBVの表面抗原が浮かんだ中空状粒子で、肝臓由来の細胞に効率よく取り込まれる。この性質を利用して、HBVの代わりにBNCを用いてウイルス侵入阻害剤のスクリーニングを行い、抗HBV活性を持つ低分子化合物を同定することを目的とした（田中班/上田班との共同研究）。

CDE誘導体の抗ウイルス活性測定（3）

CDE-3008(RO4948191)は、インターフェロン(IFN) α 受容体2のアゴニスト活性を有し、IFN α 誘導性遺伝子群(ISGs)の発現を促進するIFN様活性を持つHCV増殖阻害活性を有する化合物として開発されたがHBVに対する活性は分かっていた。今回、CDE-3008およびその誘導体がHBVの増殖を阻害し、さらに、cccDNAの形成阻害/分解促進活性を有することを見出し、一連の誘導体をcccDNA Eliminator(CDE)と命名、構造活性相関研究により最適化し、可溶性や安定性を向上させた非核酸アナログ抗ウイルス低分子化合物を作ることとしている。

HBVコアプロモータ阻害剤スクリーニング（4）

HBVは侵入した肝細胞の核内でcccDNAを形成した後に、これに含まれるプロモータの転写活性によりプレゲノミックRNA及び4種類のmRNAを合成し、HBV複製のためのパーツを作製する。これらのプロモータ活性を抑える低分子化合物をスクリーニングし、抗HBV活性を持つ転写阻害剤を同定することを目的とした（森屋班との共同研究）。

その他、RNase H阻害剤スクリーニング（5）の開始、スマートアンプ簡易HBV DNA測定系（6）の確立を行う（白井報告参照）と共に、HBVに伴う線維化抑制剤を理研創薬・医療技術基盤プロジェクトに導出し、劇症肝炎抑制剤の構造活性相関を行うことを目的とした。

B.研究方法

分泌型 Gaussia スプリットルシフェラーゼを利用したカプシド形成 (コアタンパク質 HBc の二量体形成) 阻害剤探索系(小川報告参照)など小嶋グループ内で構築したスクリーニング系に加え、相崎グループや松浦グループ、HepaRG 細胞や脇田班、田中班、森屋班を始めとする同事業の他班で構築した Hep2.2.15 細胞(脇田班)、HuS-E/2 細胞(田中班/脇田班)、HepG2-hNTCP-C4 細胞(脇田班)、Huh7#94 GL4.18 AeUS BCP 細胞(森屋班)、R6FLR-N 細胞(小原班)などの細胞株を用いる細胞スクリーニング系、BNC を用いた HBV 侵入阻害剤スクリーニング系などを導入・ハイスループット化し、これを用いて理研天然物化合物バンク(NPDepo)、市販、並びに東大ライブラリーの計 18 万化合物を、図 1 に示した標的について、大規模化合物スクリーニングを実行した。

メインスクリーニング各項目の具体的な目的は以下のとおりである。*数値は図中の番号

カプシド形成阻害剤の抗 HBV 活性測定 (1)

Core タンパク質の 2 量体阻害剤のスクリーニングおよびその後の 2 次スクリーニングにより得られたヒット化合物とその類縁体の 27 化合物について、Hep38.7-Tet 細胞およびヒト初代肝細胞である PXB 細胞を用いて抗ウイルス活性を評価した。テトラサイクリンにより HBV 発現を誘導することができる Hep38.7-Tet 細胞をテトラサイクリン存在下で 3 日間培養した後、テトラサイクリンを含まない培地で培養することによって HBV の発現を誘導すると同時にさまざまな濃度のヒット化合物を処理し、6 日後の培養上清中の HBV DNA 及び細胞毒性を測定した。

また、ヒト初代肝細胞である PXB 細胞を用いた抗ウイルス活性測定には Hep38.7-Tet 細胞由来の HBV を用い、HBV 感染時及び感染後の 12 日間化合物を処理し、培養上清中の HBV DNA 量を測定した。

スクリーニングヒット化合物の構造を基に、市販の化合物ライブラリーから構造類縁化合物を約 150 種抽出し、目視で 70 化合物に絞り込みを行ない、生物活性再評価結果に基づき、高活性化

化合物とそれらの構造類縁体を、1~6 段階程度の反応工程により合成した。

BNC を用いた侵入阻害剤スクリーニング (2)

まず、HepaRG 細胞を用いて、HBV の受容体の一つもしくは補助因子として近年同定された胆汁酸のトランスポーター (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide:NTCP) を標的とした HBV 侵入阻害剤スクリーニングを脇田班と連携して実施した。

BNC を黒田先生 (名古屋大学: 上田班) から供与して頂き、HepaRG 細胞に蛍光標識した BNC を取り込ませ、取込みの基本的性質を検討した後、HepG2-NTCP-C4 細胞を渡士先生 (感染研: 脇田班) より供与して頂き、BNC 取込みが HBV の受容体として同定された NTCP に依存しているかを検証した。数種類の肝臓由来の培養細胞を用いて BNC の取り込み量を比較し、スクリーニングに使用する細胞を選定した。同細胞に蛍光標識した BNC と終濃度 10 μg/ml NPDepo 化合物とを加え、1 日後に 1 細胞あたりの BNC 取込み量をイメージング細胞アナライザーにて測定し、BNC の取込みを阻害する化合物を同定した。次に、PXB 細胞に HBV とヒット化合物を加え 1 日培養し、さらに 1 日化合物処理し、12 日間培養した後に抗 HBV 活性を調べた。

さらに、NTCP 発現を標的とした HBV 侵入阻害剤スクリーニングを脇田班と連携して論文にまとめた。

CDE 誘導体の抗ウイルス活性測定 (3)

小原班より導入した HCV レプリコン細胞を用い、ISGs の 1 つ OAS-1 の mRNA 発現量を測定していた昨年までの実験系と比較して約 10 倍感度が良い IFN 様活性を測定できるようになった。また、HBV 感染 PXB 細胞を 14 日間 CDE 誘導体で処理し、IFN 様活性を HBV DNA 量と cccDNA 量から測定した。

HBV コアプロモータ阻害剤スクリーニング (4)

森屋班の森石先生(山梨大学)から導入しコアプロモータルシフェラーゼを高発現する Huh7 #94 GL4.18 AeUS BCP 細胞に終濃度 10 μg/ml

NPDepo 化合物を加え、Sp1 の阻害剤である Mithramycin をポジティブコントロールとして用い、これと同等の阻害活性を持つ化合物をスクリーニングした。一般的に、ウイルスのプロモータを阻害する化合物は様々な動物由来のプロモータを阻害し細胞毒性を示す。今回のスクリーニングでは HBV コアプロモータを特異的に阻害し、動物細胞のプロモータは阻害しない、つまり細胞毒性の低い化合物をヒット化合物とした。これらのヒット化合物の抗 HBV 活性を、PXB 細胞を 14 日間化合物処理し、HBV DNA 量から測定した。

HBV 線維化抑制剤については、昨年得られたヒット化合物 CMR46 (IC_{50} : 0.1 μ M) の uPA-SCID ヒト肝細胞移植キメラマウス HBV 線維化モデル（田中モデル）での有効性を解析した。

茶山 HBV 感染劇症肝炎モデルでの関与が判明した核トランスグルタミナーゼによる転写因子 Sp1 の架橋活性化による細胞死を抑制する核トランスグルタミナーゼ活性阻害剤 HTS 系でヒットした phenosafranin の構造類縁体 32 種を合成・収集し、阻害活性の比較をした。

（倫理面への配慮）

理研遺伝子組換え実験（承 2011-060(8)）、微生物実験（12-016(4)）、動物実験（H24-2-002）、ヒト材料実験（18-13）承認済。

C. 研究結果

小嶋スクリーニンググループでは、CFI-IPA の抗ウイルス活性確認、NIEI 並びにコアプロモータ阻害剤のスクリーニングでヒット化合物を得、CDE の抗ウイルス活性、cccDNA 形成阻害を確認した。HBV 線維化抑制剤スクリーニングでは動物実験で有効なリード候補化合物を取得した。

カプシド形成阻害剤の抗 HBV 活性測定(1)

東京大学・創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリー14万化合物をスクリーニングして得られたヒット化合物（小川報告参照）構造を基に、市販化合物ライブラリーからイソフタル酸アミド (isophthalamide, IPA) およびスルファモイル安息香酸アミド (sulfamoyl

benzamide, SBA) 構造を有する類縁体等を約 150 化合物抽出した。目視で、構造活性相関解析に必要な 70 化合物（IPA 20 種、SBA 40 種、その他 10 種）に絞り込みを行った後、10mM の DMSO 溶液に調製後、生物活性を測定した。化合物情報および化合物は、HBV 化合物データベースおよび HBV 化合物ライブラリーにそれぞれ登録、保管した。

上記 70 化合物を再評価した結果に基づき、高活性化合物と低活性対照化合物を 6 種、それらの構造類縁体を 4 種、1~6 段階程度の反応工程により合成した。概要は以下の通り。IPA 類縁体の骨格となるイソフタル酸誘導体は、対応する m-キシレン誘導体の過マンガン酸酸化により効率よく、安価に調製した。イソフタル酸誘導体とアミンとをカルボジイミドを縮合剤として縮合し、対称型 IPA 類縁体を 7 種作製した。SBA 類似体は 3-クロロスルフォニル安息香酸誘導体体体体にアミンを反応させて 7 種の 3-アルキルアミノスルフォニル安息香酸誘導体とし、この内 3 種にアニリン誘導体を縮合させ、3 種のスルファモイル安息香酸アミド誘導体を作製した。各々合成量は 50-200mg 程度。一方、高活性化合物 1 種については 2.5 g 合成し、動物試験、毒性試験に供した。

Hep38.7-Tet 細胞及び PXB 細胞の両実験系において HBV DAN 量を減少させる化合物を得た。これらの化合物について Hep38.7-Tet 細胞を用いて上記と同様の方法を用いて核酸アナログの entecavir、lamivudine、tenofovir と比較した結果、CFI-IPA1086、1100、1106 が tenofovir と同程度の抗 HBV 効果有することが示された。

BNC を用いた侵入阻害剤スクリーニング(2)

HepaRG 細胞に蛍光標識 BNC を取り込ませる際に過剰量の HBV 粒子を加えると、BNC の取り込みが阻害された。逆に、HepaRG 細胞に HBV を感染させる際に過剰量の BNC を加え、14 日間培養した後に HBV の増殖を定量 PCR により測定すると、HBV の感染・増殖が抑えられていた。BNC は HBV と同様な分子機構により肝臓由来の細胞に取り込まれることが双方向の競合阻害実験により示された。

HepG2-NTCP-C4 細胞への BNC の取り込み量を、HepG2 細胞をコントロールとして比較したところ、NTCP 発現に依存した BNC 取り込み量の上昇は見られず、BNC は NTCP に依存しない機構を介し肝臓由来の細胞に取り込まれることが分かった。数種類の肝臓由来の培養細胞への BNC 取り込み量を比較し、スクリーニングに使う細胞としては BNC を効率よく取り込んだ Huh-7.5.1 細胞を選択した。

同細胞を用いた蛍光標識 BNC の取り込み阻害剤のハイスループットスクリーニング系を構築、NPDepo 約 1 万化合物のスクリーニングを終えた。その結果、ポジティブコントロールのヘパリンと同等の阻害活性を示す 58 ヒット化合物を得た。PXB 細胞を用いて抗 HBV 活性を測定した結果、5 化合物について細胞毒性を伴わない抗 HBV 活性が認められた（図 2）。

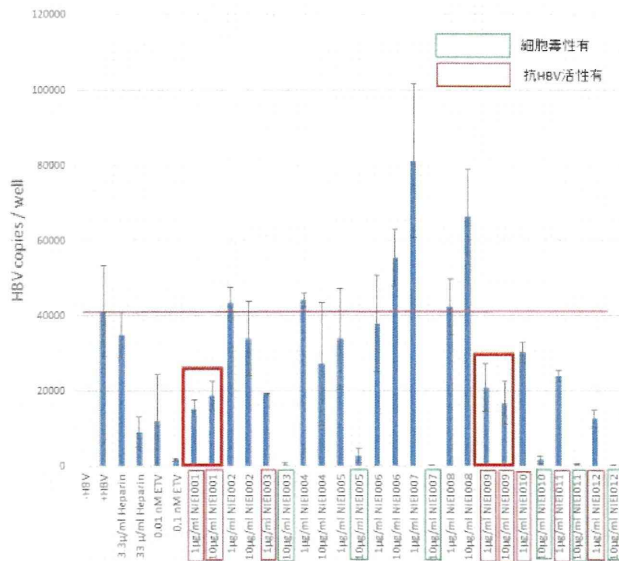


図 2. BNC 取込み阻害剤 NIEI001 と NIEI009 は細胞毒性を伴わず抗 HBV 活性を示した。

脇田班と連携して RO41-5253 を含む RAR 阻害剤が NTCP の発現レベルを低下させることで HBV 感染感受性を低下させることを明らかにし、論文発表した(九十田報告参照)

CDE 誘導体の抗ウイルス活性測定(3)

HCV レプリコン細胞を用いて 27 種の CDE 誘導体の活性を測定した結果、6 種に IFN 様活性が認められた。さらに、PXB 細胞を用いて HBV 増殖阻害活性を有するか測定した結果、CDE-3003,

3008, 3020, 3023 に抗 HBV 活性を確認し、cccDNA も HBV DNA と共に減少することが分った。（図 3）

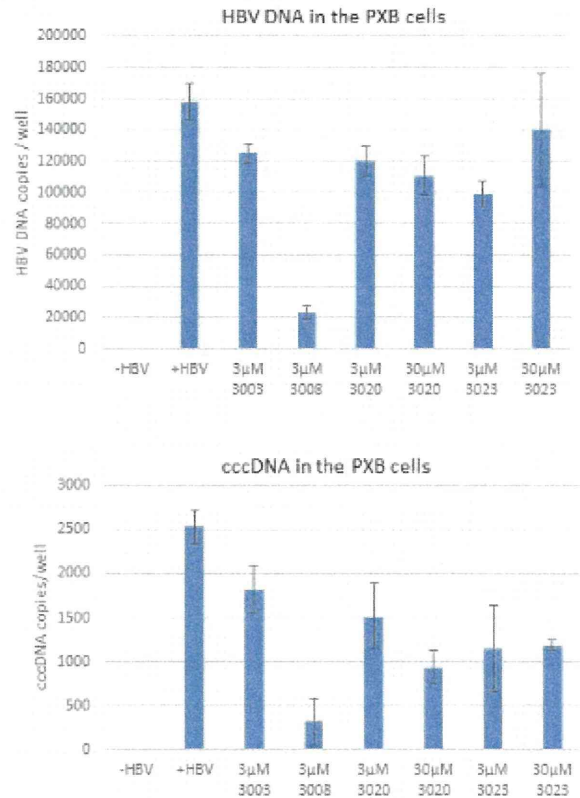


図 3. CDE 誘導体は IFN 様の活性を持ち HBV の増殖を抑制するのみならず、cccDNA を減少させる効果を示した。

HBV コアプロモータ阻害剤のスクリーニング(4)

NPDepo 約 7 千化合物の HBV コアプロモータ阻害活性を測定し、310 個のヒット化合物を得、

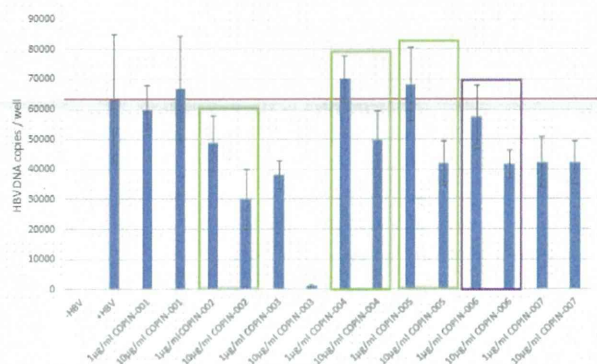


図 4. HBV プロモータ選択的阻害剤 COPIN-002 とその類縁化合物 COPIN-004, -005 は濃度依存的な抗 HBV 活性を示した。

そのうち細胞毒性を示さない 41 化合物を同定した。これらの化合物の抗 HBV 活性を、PXB 細胞を用いて測定した結果、これまでに 9 化合物の抗 HBV 活性を確認した。

慢性 HBV 肝線維化予防・治療候補薬の開発では、昨年得られたヒット化合物 CMR46 (IC₅₀: 0.1µM) の uPA-SCID ヒト肝細胞移植キメラマウス HBV 線維化モデル (田中モデル) での有効性を確認し、理研創薬・医療技術基盤プロジェクトに導出した。

劇症肝炎の治療薬スクリーニングでは、茶山 HBV 感染劇症肝炎モデルでの関与が判明した核トランスグルタミナーゼによる転写因子 Sp1 の架橋活性化による細胞死を抑制する核トランスグルタミナーゼ活性阻害剤 HTS 系で NPDepo 約 3 万化合物からヒットした phenosafranin の構造類縁体 32 種を合成・収集し、阻害活性の比較をしたが、phenosafranin を越えるものは得られなかった。

D. 考察

HBc の二量体形成 (カプシド形成) を阻害する CFI-IPA については、核酸アナログの entecavir、lamivudine、tenofovir と比較した結果、CFI-IPA 1086、1100、1106 が tenofovir と同程度の抗 HBV 効果を有すること (IC₅₀ < 0.5 µM) が示された。さらに急性毒性がないことを確認した (種村報告参

照) が、TK-NOG キメラマウス系の一部で HBV の低下傾向が観察されるものの、有意差はみられなかった (松浦報告参照)。溶解性に問題あるものと思われた。

NTCP 非依存の侵入阻害剤 NIEI については、双方の阻害実験から BNC は HBV と同様な機構により肝臓由来の細胞に取り込まれることが解り、また、NTCP 非依存的に肝臓由来の細胞に取り込まれるため、NTCP 以外のレセプターの関与が示唆された。BNC 取込み阻害剤スクリーニングから得られたヒット化合物が抗 HBV 活性を示したことから、NTCP 非依存的 HBV 侵入阻害剤抗ウイルス剤の同定に BNC が大変有効であることが解った。しかしながら、HBV の侵入阻害剤は、初期感染に対しては、有効であると考えられるが、一旦感染して HBV が cccDNA としてインテグレートされた肝細胞や動物モデルに対しても有効であるかどうかを検証する必要がある。

cccDNA を消去する低分子化合物は未だに開発されておらず、CDE 誘導体は有力な候補である。しかしながら、CDE 誘導体が複製の過程を抑制するために 2 次的 cccDNA の形成を阻害しているように見えている可能性は否定できず、ECO プローブの技術を応用して cccDNA 特異的に標識し、cccDNA 消去活性を確かめるとともに、トランスクリプトーム解析や網羅的リン酸化タンパク質のプロテオーム解析により cccDNA を消去するに至る分子機構を明らかにでき、これを指標にリード化合物を得られると考えている。

コアプロモータ転写阻害剤ヒット化合物には、COPIN-001 と基本骨格に相同性がある COPIN-004, -005 が含まれており、その他にも、COPIN-014 と COPIN-016、COPIN-019 と COPIN-020 など同一の基本骨格を持つものが含まれていた。COPIN-001 は抗 HBV 活性を示したことから、コアプロモータ阻害剤スクリーニング系の有効性が示された。

E. 結論

CFI-IPA については、in vivo での溶解性、吸収・血中安定性等の問題を解決するために、来年度は、ADMET 研究を進め、理研創薬・医療技術基盤プログラムに導出して medicinal chemistry を実行してリード化合物を得る。

NIEI については、スクリーニングを継続、ヒット化合物を増やすと共に、構造活性相関研究によりヒット化合物の最適化を行い、ADMET 研究を経て新規非核酸アナログ製剤の開発を目指す。

CDE については、cccDNA 形成阻害/分解誘導の機構解明、構造活性相関研究を進め、可溶性と安定性を向上させ、抗 HBV 活性をもつ CDE 誘導体リードを開発する。

HBV コアプロモータを特異的に阻害する低分子ヒット化合物を同定、構造活性相関研究により最適化して新規抗 HBV 剤の開発を目指す。

残り2年間で、カプシド形成阻害 CFI-IPA、HBV 侵入阻害 NIEI、cccDNA 形成阻害 CDE、さらには転写阻害候補薬の構造活性相関研究、ADMET 研究から開発候補を絞り、リード化合物を得る。RNase H 阻害候補薬のスクリーニングを完了すると共に、先行して進んでいる HBV 線維化阻害候補薬、劇症肝炎阻害候補薬を世の中に提示できる見込みである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- 1) Hara, M., Kirita, A., Kondo, W., Matsuura, T., Nagatsuma, K., Dohmae, N., Ogawa, S., Imajoh-Ohmi, S., Friedman, S. L., Rifkin, D. B., and Kojima, S. (2014) LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis. SpringerPlus 3:221.

- 2) 秦咸陽、小嶋聡一 (2014) 非環式レチノイドによる肝細胞癌の制御：基礎的検討、医学のあゆみ、249(11):1153-1158.
- 3) Tsukuda, S., Watashi, K., Iwamoto, M., Suzuki, R., Aizaki, H., Okada, M., Sugiyama, M., Kojima, S., Tanaka, Y., Mizokami, M., Li, J., Tong, S., and Wakita, T. (2015) Retinoic acid receptor modulates hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus through transcriptional regulation of NTCP expression. *J. Biol. Chem.* in press.
- 4) Hara, M., Matsuura, T., and Kojima, S. (2015) TGF- β LAP degradation products, a novel biomarker and promising therapeutic target for liver fibrogenesis. *In Innovative Medicine : Basic Research and Development* (Nakao, K., Minato, N., and Umeto, S. eds) Springer Tokyo, in press.

2. 学会発表

- 1) 古谷 裕、佐藤裕美、黒田俊一、田中靖人、小嶋聡一 “バイオナノカプセルを用いた B 型肝炎ウイルスのエントリー阻害剤のスクリーニング” 第 37 回日本分子生物学会年会 平成 26 年 11 月 26 日 横浜
- 2) Yutaka Furutani, Yumi Sato, Yasuhito Tanaka, Shun'ichi Kuroda, Soichi Kojima “Drug screening of hepatitis B virus entry inhibitors using bio-nanocapsule” The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B. November 20, 2014 Hiroshima, Japan

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- ①特許取得
なし
- ②実用新案登録
なし
- ③その他
なし

NTCP を介する HBV 侵入阻害剤の同定及び感染阻害機構の解析

研究協力者 九十田 千子 独立行政法人理化学研究所 訪問研究員（ウイルス肝炎研究財団）

研究要旨

B型肝炎ウイルス（HBV）の感染は、劇症肝炎あるいは慢性肝炎、肝硬変、肝がんなどさまざまな病態を引き起こす。現在臨床応用されている抗HBV剤は、インターフェロン α を含むインターフェロン類とラミブジンやアデホビル、エンテカビルなどの核酸アナログの2種類に限られており、新たな抗HBV薬の開発が望まれている。そこで、これまでの薬剤と異なる作用機序を持つ抗HBV剤を同定するため、HBVの宿主細胞への侵入過程に着目し、この過程を阻害する化合物を探索するとともにそのHBV感染阻害機構を解析した。本研究では、レチノイン酸受容体（RAR）がHBVの感染受容体NTCPの発現制御因子の一つであること、Ro41-5253を含むRAR阻害剤がNTCPの発現レベルを低下させることでHBV感染感受性を低下させることを明らかにした。

A.研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）の生活環を標的とした抗HBV剤は、逆転写酵素阻害剤である核酸アナログに限られている。これらの薬剤では、長期投与による薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっているため、ウイルスの生活環の異なる過程を標的とした薬剤の開発が必要である。

HBVの生活環の分子機構は不明な点が多いが、近年HBVの感染受容体として sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が同定された。本研究では、宿主がNTCPを介したHBV感染を制御する分子機構の一端を明らかにするとともに、この機構を標的とする低分子化合物を同定することを目的とした。

B.研究方法

HBV感染の評価には、主にHepaRG細胞及び初代ヒト肝細胞を用い、培養上清中のHBs抗原、HBe抗原をELISAにより、細胞内HBV DNA、cccDNA、HBe抗原をそれぞれリアルタイムPCR、免疫染色法により検出した。また、HBV複製過程への影響はHepAD38細胞を、HBV RNA合成への影響はHepG2.2.15細胞を用いて評価した。

NTCP mRNA発現レベル、細胞表面のNTCPタンパク質発現量、及び細胞中のNTCPタンパク質発現量はHepaRG細胞及び初代ヒト肝細胞を用い、それぞれRT-PCR、フローサイトメトリー、

ウェスタンブロットにより検出した。

NTCPプロモーター活性は、Gaussia Luciferase (Gluc)の上流にヒトNTCP (hNTCP)プロモーター領域 (nt -1143 ~ +108) が挿入されたレポーターベクターを用いた。このレポーターベクターを、あるいはレポーターベクターとレチノイン酸受容体 (RAR) 及びレチノイドX受容体 (RXR) の発現プラスミドをHuS-E/2細胞に導入し、導入後24時間後に化合物を添加し、さらに24時間後にGluc活性を測定した。また、hNTCPプロモーター (nt -1143 ~ +108) 上のRAR結合領域をGenomatix softwareを用いて予測し、得られた5つの結合候補領域 (nt -491 ~ -479、-368 ~ -356、-274 ~ -258、-179 ~ -167、-112 ~ -96) それぞれに、あるいは全てに変異を導入したレポーターベクターを作製し、同様にHuS-E/2細胞に導入してプロモーター活性を測定した。

また、RARとhNTCPプロモーターの結合をクロマチン免疫沈降法により解析した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。

C.研究結果

前年度までの研究において、宿主細胞の感染感受性を低下させる化合物スクリーニングにより、顕著な細胞毒性を示すことなく HepaRG 細胞において HBV 感染後の HBV DNA、cccDNA、HBs 抗原、HBe 抗原量、HBc 陽性細胞数を有意に低下させる化合物をして Ro41-5253 を同定した。今年度は、まず始めに Ro41-5253 は HBV 生活環の他の過程に影響を与えるかを解析した。その結果、Ro41-5253 は HBV 感染感受性を低下させる濃度において HBV RNA 合成過程、HBV DNA 複製過程に影響を与えないことが示された。

次に、Ro41-5253 が HBV 感染受容体 NTCP のプロモーター活性を抑制すること、及び受容体の発現量を低下させることを平成 25 年度に見出した。これに加えて本年度は、NTCP あるいは Ro41-5253 の既知の標的である RAR の内在性発現をノックダウンすることにより、Ro41-5253 の抗 HBV 阻害効果が低下する事が示された。また、ラット Ntcp (rNtcp) プロモーターの主要な制御因子は farnesoid X receptor (FXR) であり、FXR により発現が誘導される small heterodimer partner (Shp) が rNtcp 発現を負に制御することが知られている。ヒト由来の HepaRG 細胞において SHP の発現は FXR のアゴニストである GW4064 処理により促進されるが、NTCP の発現に影響を与えないことが示された。さらに、SHP の発現は RAR のアゴニスト ATRA やアンタゴニスト Ro41-5253 処理ではほとんど変化がないことが示された。従って、hNTCP プロモーターの制御メカニズムはラットとは異なっていることが示唆された。

NTCP プロモーター活性に与える影響の解析により、Ro41-5253 の濃度依存的に hNTCP プロモーター活性が阻害されること、RAR/RXR を強制発現させることによって hNTCP プロモーター活性が増強されることを平成 25 年度に明らかにした。本年度はさらに、内在性 RAR/RXR をノックダウンすることで hNTCP プロモーターの活性化が阻害されることが示された。また、クロマチ

ン免疫沈降法により RAR と hNTCP プロモーター (nt -1143 ~ +108) 領域が直接結合することが示された。さらに、このプロモーター上の RAR 結合候補領域に変異を導入したプロモーターベクターを用いた解析から、nt -112 ~ -96 領域が RAR による hNTCP プロモーター活性化に必要な部位であることが示された。

NTCP プロモーター活性影響を与える化合物を探索した結果、多くの RAR 類縁体がこの活性化を阻害するとともに HBV の感染感受性も低下させた。この中でも強い阻害活性を示した CD2665 は、異なる genotype の HBV やエンテカビル耐性 HBV に対しても同様に抗 HBV 効果を示した。さらに、ヒト初代培養細胞に Ro41-5253 及び CD2665 を持続的に処理することで HBV の感染の広がりを抑制できることが示された。

D. 考察

これまでに同定された HBV 侵入阻害剤は、HBV の受容体である NTCP と結合することにより HBV large surface protein 相互作用を阻害するものであった。本研究で見出した Ro41-5253 はこれまでとは異なり、NTCP の発現を制御し宿主の HBV 感染感受性を阻害した。そこで、NTCP の発現制御機構は HBV 感染感受性を低下させると考え、さらに HBV 侵入阻害剤を得るため、hNTCP プロモーター活性を阻害する化合物をスクリーニングした。得られたほとんどの化合物は、RAR を介するものであった。このスクリーニングで得られた化合物や Ro-41-5253 のように、RAR を不活性化する化合物は HBV の侵入も阻害した。従って、RAR は NTCP 発現を制御する重要な因子であり、NTCP 発現は HBV 感染感受性を規定する重要な要因である事が示唆された。

hNTCP プロモーターの制御メカニズムはあまり明らかとなっていない。これまでに Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 α や HNF4 α が hNTCP プロモーター活性に影響を与えること、HNF3 β や CCAAT/enhancer-binding protein が結合して転

写を調節することが報告されている。本研究で新たに RAR が新たに hNTCP プロモーターの制御因子であることが示された。本研究で用いたプロモーター領域は nt -1143 ~ +108 であったが、これよりも上流を評価することで新たな転写制御因子を見出し、NTCP の発現制御機構を明らかにすることが期待できる。

NTCP は肝細胞へ胆汁酸を取り込む主要な分子であり、これまで NTCP の輸送機能を阻害する分子が抗 HBV 薬となり得るか懸念されていた。しかし、今年になり NTCP ノックアウトマウスが作製されたと報告されたことから、NTCP の機能が損なわれても OATP などの同様の機能を持つ分子によって胆汁酸の輸送が代替されることが示唆された。NTCP 発現制御機構は新たな抗 HBV 剤開発の有用な標的となると考えられる。

E. 結論

Ro41-5253 を含む RAR 阻害剤が転写レベルで NTCP の発現を抑制することで宿主の HBV 感染感受性を低下させ、HBV の侵入を阻害することを同定した。また、RAR は hNTCP のプロモーターに直接結合して転写を制御していること、nt -112 ~ -96 領域 RAR による hNTCP プロモーター活性化に必要な部位であることを初めて明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of NTCP expression. *J Biol Chem*. 2014 Dec 30. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoic acid receptor plays an important role in mediating hepatitis B virus infection through regulation of NTCP expression. The 11th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis B: Recent Progress in Basic and Clinical Research", Hiroshima, 2014. 11.
- 2) 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, 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史, 脇田隆宇, レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014. 11、神奈川
- 3) 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, 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史, 脇田隆宇, レチノイン酸受容体は HBV 感染受容体 NTCP の発現調節及び感染感受性に関与する、日本レチノイド研究会学術集会、2014. 9、秋田
- 4) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. International meeting on molecular biology of hepatitis B viruses, LA, USA, 2014. 9.
- 5) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. Retinoic acid receptor regulates the expression of NTCP transporter and plays an important role in mediating hepatitis B virus infection. The 2nd International Retinoid Conference organizing committee, Itasca, USA, 2014. 6
- 6) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. A Retinoid Derivative Inhibits HBV Infection by Modulating NTCP Expression. TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Session4-2, Taipei, Taiwan, 2014.4

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

該当なし

②実用新案登録

該当なし

③その他

該当なし

等温核酸増幅法による HBV 迅速検出系構築

研究分担者 小嶋 聡一 ライフサイエンス技術基盤研究センター
微量シグナル制御技術開発特別ユニット ユニットリーダー
研究協力者 臼井 健悟 ライフサイエンス技術基盤研究センター
核酸診断技術開発ユニット ユニットリーダー

研究要旨

単一の反応温度(60°C)で 30 分程度の短時間で核酸増幅を達成する等温核酸増幅技術を応用し、培養上清中から HBV 放出の有無を迅速に判断できる簡易検出系の構築を行った。核酸増幅法として SmartAmp 法を用い、HBV ゲノムの S 領域を利用した異なる HBV subtype を共通して検出できる primer 構築を行った。同増幅法では、HBV 培養上清または HBV 含有血液検体を用いた場合においても、ゲノム精製の工程を必要としない簡易前処理(アルカリ熱処理法)によって HBV 検出が可能となった。次年度、本 HBV 検出系を利用し、HBV 培養上清からの HBV 薬剤スクリーニングを実施予定である。

A.研究目的

HBV 薬剤開発において、これまで宿主細胞への HBV 侵入、HBV 複製に関する薬剤の開発が進められてきたが、更なる新規薬剤の可能性として宿主細胞からの HBV 放出過程に作用する薬剤の観点がある。その薬剤スクリーニングの過程において、HBV 培養上清中の HBV 存在量を測定することが必要となるが、多くの薬剤候補を検討するにあたり、培養上清からの HBV ゲノム抽出を必要としない迅速/簡便なスクリーニングシステムが望まれる。

そこで本研究では、一定温度で短時間に対象核酸を増幅可能な等温核酸増幅法である SmartAmp 法を用いた、HBV 迅速検出系を構築し、薬剤スクリーニングに供することを目的とした。

B.研究方法

SmartAmp primer 設計の方針として、HBV の genotype によらず全ての HBV が検出できることを目指した。HBV database (<http://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/>) に登録されている Genotype A~H の配列比較の結果より、最も保存性の高い S 領域に着目し、S 領域のコンセンサス配列から進化的に変異頻度の低い共通保存領域を選抜し primer を設計した。

また、アルカリ熱処理法 (50 mM NaOH 存在下での 95°C5 分間の熱処理)による簡易検体前処理法を、HBV 培養上清、及びモデルマウスによる HBV 含有血液検体に適用し、SmartAmp 検出系にそれらの処理検体を加えることで直接的に HBV 検出が可能かどうかを検証した。

(倫理面への配慮)

本研究における現段階においては、ヒト由来試料(臨床検体)の使用はなく、またヒトゲノムに関する情報を用いていない。

C.研究結果

SmartAmp 法による増幅系において、HBV ゲノム配列を有する plasmid を鋳型 DNA とした DNA 増幅産物を SYBR Green I によってリアルタイム蛍光モニタリングを行った結果、 6×10^1 - 10^4 copy/reaction の濃度範囲において、相関係数 $R^2=0.97$ を示す定量性を有する反応系を構築でき、60 copy/reaction においても 60 分以内 (6×10^4 copy/reaction では 20 分以内)の迅速検出を達成した。また、HBV genotype C 及び D の 2 種のゲノム配列を鋳型とした増幅評価においては、各々のゲノムに対して良好に増幅を示し、HBV subtype 間で交叉性を有する事が期待された。この SmartAmp 増幅系では、50 mM 水酸化ナトリウムと HBV 培養上清を 2:1 で混合する簡

易前処理法により、直接培養上清中の HBV を検出できることが明らかとなった。また、HBV genotype C ウイルス (1.9×10^6 copy/ μ L) を含むマウス血清 (Phenix Bio 提供) からの検出を行った場合にも、問題なく検出が可能であった。

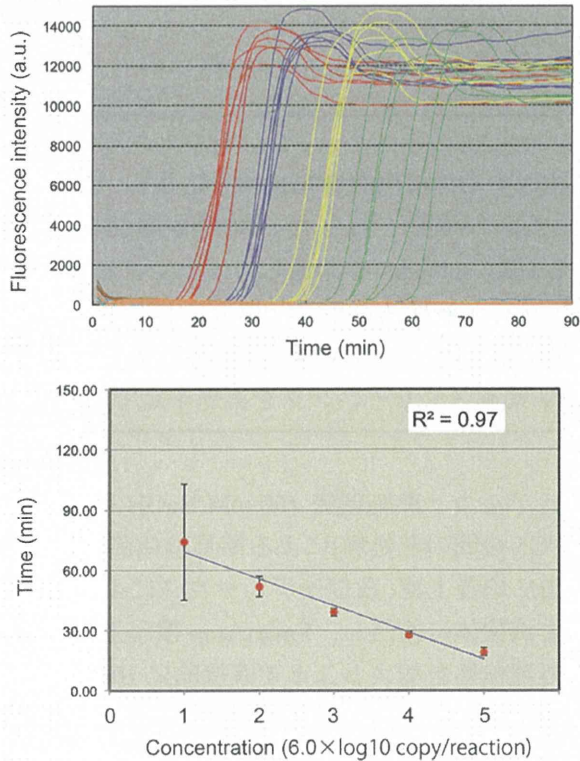


図8. SmartAmp 法による HBV ゲノムの定量的増幅検出結果。

上図: SmartAmp 増幅のリアルタイム蛍光曲線。各増幅曲線の濃度は、赤, 6.0×10^4 ; 青, 6.0×10^3 ; 黄, 6.0×10^2 ; 緑, 6.0×10^1 copy/reaciton。

下図: 増幅曲線の Ct 値(最大蛍光変化を示す時間)による定量性評価。

D. 考察

今回の研究において、SmartAmp 法を利用した血清中からの HBV 直接的検出が可能になった事から、医療現場での HBV 検出に対する応用性も期待できる。但し、実際の HBV 感染価の指標として、copy IU/ml が定義されているた

め、現状の反応容量である 25 μ L の系に HBV 培養上清を 5 μ L 分添加されると仮定すれば、現段階での検出限界は、 10^4 copy IU/ml のレベルとなる。よって、さらなる高感度化を満たすためには、培養上清中のウイルス濃縮過程を考慮する必要がある。また、今回の検出系では、HBV を subtype によらず普遍的に検出できることが示唆されたが、より医療現場での HBV サーベイランス業務に有用なツールとして、subtype 特異的に増幅を示す primer の構築についても実施すべきであると考えている。

E. 結論

SmartAmp による HBV 検出系の構築により、検体からのゲノム精製過程を経ずとも簡便に HBV の定量的検出が可能となる事が認められ、今後、薬剤スクリーニングのハイスループット化に寄与できるものと判断された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

① 特許取得

WO 2013/035875 A1 「プライマーセット及びそれを用いた標的核酸配列の増幅方法並びに変異核酸の検出方法」発明者/出願人: 林崎良英、木村靖将、臼井健悟、田中有希、川井雄輝

② 実用新案登録

③ その他

HBVの複製を選択的に阻害する化合物の探索： マイナス鎖DNA合成を可視化する新規システムの構築と化合物の評価

研究分担者 小川健司 理化学研究所 専任研究員
研究協力者 市川保恵 理化学研究所 テクニカルスタッフ II

研究要旨

B型肝炎ウイルス（HBV）の二量体形成を可視化・数値化する高速評価系を用いた化合物の大規模スクリーニングを実施した結果、HBcの二量体化によるルシフェラーゼの再構成を濃度依存的に阻害し、全長ルシフェラーゼの活性を阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない43化合物が得られた。次に、HBVのマイナス鎖DNA合成（逆転写）を短時間で可視化・数値化するシステムを新規に構築し、ヒット化合物のHBV複製に対する効果を検討した。その結果、10化合物が、濃度依存的にHBVの複製を阻害した。このうち4化合物を選抜し、ラミブジン耐性およびエンテカビル耐性変異型HBV-PolによるHBV複製に対する効果を検討した。強力な核酸アナログ製剤であるエンテカビルは、野生型HBV-Polによるゲノム複製を濃度依存的に抑制したが、ラミブジン耐性変異型HBV-Polによるゲノム複製の阻害効果は弱く、エンテカビル耐性変異型HBV-Polによるゲノム複製はほとんど抑制できなかった。一方、選抜した4種類のヒット化合物は、野生型のみならずラミブジンおよびエンテカビル耐性変異型HBV-Polによるゲノム複製をも濃度依存的に抑制した。これらの化合物およびその誘導体は、新規抗HBV薬のリード化合物となることが強く期待される。

A.研究目的

現在、B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染者は、全世界で3億5000万人以上、我が国では100万人以上と推計されている。HBVによる持続感染の成立、慢性肝炎、肝硬変および肝細胞癌の発症に関する分子機構の詳細は不明な部分も多く、これらを根本的に解決する薬剤の開発は、基礎および臨床の双方に重要であり、B型肝炎制圧のために将に焦眉の急である。本研究の目的は、HBVの複製に働くウイルス由来タンパク質を標的とした高速評価系（High-throughput screening system: HTS）を構築し、HBVの感染・増殖およびHBV感染による病態の発生や進行を阻害する創薬リード化合物を探索することにある。そのため基本戦略として、(1)感染性のあるウイルス粒子を使用しないことにより安全かつ大規模なスクリーニングを実施し、(2)ウイルス由来のタンパク質を標的とすることにより副作用を可能な限り抑え、(3)生細胞を用いることにより細胞への浸透性に問題のある化合物や細胞毒性を示す化

合物を1次スクリーニングで排除し、確実に生体に作用する分子を評価、選抜することを目標として、HTSを構築し、大規模スクリーニングを実施した。

B.研究方法

【HBcの二量体形成を可視化する高速評価系を用いた化合物の大規模探索】

本研究では、HBVのヌクレオカプシドを構成し、ゲノムの複製に重要な役割を果たすCoreタンパク質（HBc）に着目し、この活性を可視化、数値化する評価系の構築を試みた。HBcは、全長183アミノ酸からなるタンパク質で、N末端のアッセンブリドメイン（1-144残基）とC末端のRNA/DNA結合ドメイン（145-183残基）からなる。ウイルス感染細胞で発現したHBcは、アッセンブリドメインによって二量体を形成し、この二量体を単位として多量体が形成され、HBVのヌクレオカプシドが作られる。我々は、HBcの二量体形成をin vitroで可視化するHTSの構築を

試みた。分泌型の海洋性カイアシ(*Gaussia princeps*)由来ルシフェラーゼ (Gluc) の N 末端 92 アミノ酸および C 末端 76 アミノ酸の分割断片（それぞれ GlucN および GlucC）と HBc のアッセンブリドメイン 144 アミノ酸との融合タンパク質をコードする哺乳動物細胞発現ベクターを製作した。それぞれの融合タンパク質の N 末端には、ヒト免疫グロブリン κ 鎖の分泌シグナル配列（22 アミノ酸）を導入し、ヒト由来の細胞で効率良く細胞外に分泌される様にデザインした。これらの発現ベクターを HeLa 細胞に遺伝子導入した結果、GlucN-HBc と HBc-GlucC の組み合わせを導入した細胞において高いレベルのルシフェラーゼ活性が培養上清中に認められ、HBc の二量体形成を数値化することが可能となった。このシステムを応用した HTS により、HyperGenesis 社カビキノコ抽出物ライブラリ ExMyco (800 抽出物)、理研 NPDepo 化合物ライブラリー (19,839 化合物)、HBV ライブラリー (1,073 化合物)、東京大学創薬オープンイノベーションセンター化合物ライブラリー (141,120 化合物) の大規模スクリーニングを実施した。

[HBV の複製を数値化する新規システムの構築とヒット化合物の評価]

化合物のより詳細な評価を行うために、HBV の複製を可視化・数値化するシステムを新規に構築した。HBV の感染および複製を解析するアッセイ系は複数存在するが、いずれも感染性のあるウイルスを使用する点から安全面に留意が必要であり、大量のサンプルを扱いつらい。HBV が確実に感染する細胞は、現段階ではヒト肝細胞初代培養系または HepaRG 細胞しか知られておらず、さらに比較的簡便な株化細胞 (HepG2.2.15、HepAD38 など) を使った系であっても、複製の検出までには長時間の培養を要することからスループット性に大きな問題がある。この状況が、HBV の新規創薬を困難にしていると想像される。そこで、我々は、感染性のあるウイルスを用いずに、HBV の複製を短時間で可視化・数値化する

システムの構築を試みた。HBV のゲノムは約 3.2Kb の不完全環状 DNA (rcDNA) である。感染後、宿主の核内で完全二本鎖となった DNA (cccDNA) のマイナス鎖を鋳型として mRNA が産生される。この内最大の 3.5kb の mRNA が、ゲノム DNA の鋳型となる pregenomic RNA (pgRNA) である。逆転写酵素である P タンパク質 (HBV-Pol) は pgRNA の 5' および 3' 両端に存在する RNA encapsidation signal epsilon (ϵ) と相互作用することによりヌクレオカプシドに取り込まれる。続いて、pgRNA を鋳型として HBV-Pol の逆転写活性によりマイナス鎖 DNA が合成される。我々は、この HBV のマイナス鎖 DNA 合成 (逆転写) を、短時間で測定して数値化する方法を開発した。HeLa 細胞を用いて解析した結果、ゲノムの複製には、HBc および HBV-Pol の存在が不可欠であり、HBx はその作用を更に増強することが示された。

C. 研究結果

HBc の二量体形成を可視化する高速評価系を用いた大規模スクリーニングにより、HBc の二量体化による Gluc の再構成を濃度依存的に阻害し、全長 Gluc の活性を阻害せず、かつ細胞傷害活性を示さない 2 抽出物および 43 化合物 (NPDepo、13 化合物および OCDD、30 化合物) が得られた。次に、HBV のマイナス鎖 DNA 合成を可視化・数値化する新規システムを用いてヒット化合物の HBV 複製に対する効果を検討した結果、ExMyco の 2 抽出物、NPDepo の 1 化合物および OCDD の 9 化合物が、濃度依存的に pgRNA の逆転写を阻害した。特に、OCDD9 種類の化合物の内、7 種類には構造的な類似性が見出された。我々は、OCDD の 7 化合物の内、代表的な 4 種類を選抜し、以後の実験に用いた。

現在、慢性 B 型肝炎の治療には、ラミブジンやエンテカビルに代表される核酸アナログ製剤が汎用されており、一定の効果を上げている。中でもエンテカビルは、核酸アナログ製剤の中でも耐

性ウイルスの出現頻度が低いとされているが、近年では耐性ウイルスの出現も報告されている。

我々は、ラミブジン耐性およびエンテカビル耐性変異型 HBV-Pol 発現ベクターを作製し、4種類のヒット化合物の効果を検討した。エンテカビルは野生型 HBV-Pol による逆転写を濃度依存的に抑制したが、ラミブジン耐性変異型 HBV-Pol によるゲノム複製の阻害効果は弱く、エンテカビル耐性変異型 HBV-Pol によるゲノム複製はほとんど抑制しなかった。一方、選抜した4種類のヒット化合物は、野生型のみならずラミブジンおよびエンテカビル耐性変異型 HBV-Pol によるゲノム複製をも濃度依存的に抑制した。

次に、4種類のヒット化合物を含む構造類縁体70化合物を購入し、それぞれの HBc 二量体化および HBV 複製（逆転写）におよぼす効果を、二つの評価系を用いて詳細に比較検討した。その結果、スクリーニングで得られた4種類のヒット化合物の内、2種類が、HBc 二量体化形成および HBV 複製の双方において、最も強い活性を示した。

D. 考察

本研究で得られたヒット化合物は、既存の核酸アナログ製剤とは作用機序が異なり、薬剤耐性変異型 HBV-Pol による逆転写をも抑制することが明らかになった。

E. 結論

本研究で得られたヒット化合物およびその誘導体は、新規抗 HBV 薬のリード化合物となることが強く期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 小川健司、市川保恵、安倍昌子、大貫哲男、斉藤臣雄、長田裕之、吉田稔「B型肝炎ウイルスの複製を阻害する化合物探索のための生細胞高速評価系の構築」日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会 2014年6月 大阪大学（豊中市）
2. 小川健司、市川保恵、大貫哲男、斉藤臣雄、長田裕之、吉田稔「ト B型肝炎ウイルスの複製を可視化する高速評価系の構築」第157回日本獣医学会学術集会 2014年9月（札幌市）
3. 小川健司、市川保恵、大貫哲男、斉藤臣雄、長田裕之、吉田稔「B型肝炎ウイルス Core タンパク質の複合体形成を可視化・数値化する高速評価系の構築」第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月（横浜市）
4. Ogawa K, Ichikawa Y, Onuki T, Saito T, Osada H, Yoshida M. Identification of compounds that selectively inhibit Hepatitis B virus replication. HBV International Meeting 2014. September 2014 (Los Angeles, USA)
5. Ogawa K, Ichikawa Y, Onuki T, Saito T, Osada H, Yoshida M. Development of a cell-based high-throughput screening system for identifying compounds that selectively inhibit hepatitis B virus replication. 11th JSH Single Topic Conference, "Hepatitis B: Recent Progress in Basic and Clinical Research.". November 2014 (Hiroshima, Japan)

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

- ①特許取得 該当なし
- ②実用新案登録 該当なし
- ③その他 該当なし

慢性 B 型肝炎線維化予防・治療候補薬開発

研究分担者 白水 美香子 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 副センター長
研究協力者 新野（柊元）睦子、岩崎わかな、津曲（三嶋）千恵美 理化学研究所タンパク質機能・構造研究チーム 上級研究員、専任研究員、技師

研究要旨

- (1) HBV 付随肝線維化治療薬の候補化合物 CMR-046 と TGF- β LAP タンパク質との複合体の X 線結晶構造解析を実施
- (2) コアタンパク質カプシド形成阻害抗ウイルス薬候補について、カプシド形成およびその前段階である 2 量体形成の *in vitro* での阻害能を検討

A. 研究目的

(1) TGF β LAP-D を標的とした HBV 付随肝線維化治療薬候補化合物について、TGF β LAP との複合体の立体構造解析を行い、阻害剤開発のための立体構造情報を提供する。

(2) HBV コアタンパク質のカプシド形成阻害能を持つ薬剤候補化合物について、生化学的アプローチならびに構造生物学的アプローチにより、その作用機構を分子～原子レベルで解明することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 結晶化試料として既に結晶構造の報告がある pig 由来 TGF- β LAP タンパク質を調製し、候補化合物 CMR-046 の存在下および非存在下で結晶化を実施した。析出した TGF- β LAP 単独結晶および CMR-046 との共結晶について SPring-8 BL32XU ビームラインで X 線回折データ実験を行った。

(2) カプシド形成阻害化合物を探索する準備として、コアタンパク質を無細胞合成系で調製し、動的光散乱、ゲル濾過、電子顕微鏡観察により性状の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う遺伝子組み換え実験に関しては理化学研究所横浜研究所遺伝子組換え安全委員会の承認のもと、関連する法令に従う。また、本研究で使用するヒトの遺伝子については、市販

の cDNA ライブラリーより取得されたものを使用するため、生命倫理上および法令上の問題は生じない。市販されていない遺伝子を取り扱う場合には、所内の倫理規程ならびに関連法令に従う。

C. 研究結果

(1) TGF- β LAP 単独結晶および CMR-046 との共結晶についてそれぞれ 3.3 Å および 3.7 Å 分解能の X 線回折データを得た。分子置換法による構造決定の結果、単独結晶と CMR-046 共結晶の立体構造に大きな差異は認められず、CMR-046 由来の電子密度は観測されなかった。

(2) 無細胞合成系から調製されたコアタンパク質が、2 量体およびカプシドを形成することを確認した。1 つの化合物共存下では、コアタンパク質の何らかの会合が促進されることが分かった。

D. 考察

(1) TGF- β LAP と CMR-046 の共結晶中に化合物が見えなかったことから、候補化合物とタンパク質の親和性が低いか結合様式が一定しない可能性が考えられた。

(2) コアタンパク質変異体を用いた会合実験により、薬剤候補化合物のうち一つについては、結合位置が推定された。

E. 結論

標的タンパク質の構造決定に成功し、インシリ

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

コ薬剤開発のために構造情報を提供した。HBV コ 該当なし
アタンパク質のカプシド形成阻害剤の作用機作
解明を続ける。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

②実用新案登録

③その他

新規B型肝炎治療薬候補化学物質の安全性・毒性評価に資する研究 ～候補化学物質（CFI-IPA1106）の毒性評価～

研究分担者 種村健太郎
東北大学大学院農学研究科 動物生殖化学分野 教授

研究協力者 水上拓郎
国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

新規B型肝炎治療薬の候補化学物質についての安全性評価に資することを目的とし、開発の早期段階で、候補化学物質についての潜在的毒性強度を評価する。平成26年度は、候補化学物質：CFI-IPA1106を用いた。用量0、15、150、1500MG/KGにてゾンデを用いて単回強制胃内投与を行った。その結果、急性～亜急性の異常は認められなかった。投与から5昼夜にかけての、ケージ内行動量測定装置による一般行動様式解析からも異常行動様式は認められなかった。投与7日後において、体重変化は正常であり、学習記憶異常も認められなかった。また主要臓器の肉眼病理解剖、血液・生化学検査に異常所見は認められず、肝臓組織切片にも異常像は認められなかった。

A.研究目的

創薬時における候補化学物質が新薬となる確率は非常に低い。その一つの理由として、効能が期待される候補化学物質に強い毒性が認められることが多くの場面で認められるという安全性担保の問題がある。そこで、本研究では新規B型肝炎治療薬の候補化学物質についての安全性評価に資することを目的とし、開発の早期段階で、候補化学物質についての潜在的毒性強度を評価することで、開発速度の加速に貢献することで、実用化への時間短縮をサポートする。その際、スループット性に配慮しつつ、一般毒性のみならず、生殖発生毒性や次世代毒性についても包括することを旨とする。

B.研究方法

平成26年度は、候補化学物質：CFI-IPA1106を検討した。生後8週齢のC57BL6雄マウスを、体重測定後、用量0、15、150、1500MG/KGにてゾンデを用いて単回強制胃内投与を行った（各投与群

投与物質は懸濁状態であった）。投与2時間後に一般状態観察を行うとともに、サーモグラフィによる熱画像診断を行った。その後、ケージ内行動量測定装置にて5昼夜の一般行動様式を観察し、投与6-7日後に情動認知行動解析を行い、行動解析終了後に採血、解剖し、血液・生化学検査（血中GOT、血中GPT、血中クレアチンフォスフォキナーゼ活性、血中乳酸脱水素酵素活性、血中コリンエステラーゼ活性、血中ブドウ糖、血中尿素窒素、血中総コレステロール、血中中性脂肪）、および主要臓器の一般状態を観察した。また肝臓については、常法に従い組織切片を作成し、HE染色標本作製し、鏡検を行った。

（倫理面への配慮）

いずれの動物実験についても関連法規を遵守するとともに、所属機関の内規に従い、3Rの原則に基づき適切に行った。

C. 研究結果

- ① CFI-IPA1106 投与 2 時間後に行ったサーモグラフィによる熱画像診断の結果、異常は認められなかった。また末梢神経系の異常行動様式も認められなかった。
- ② CFI-IPA1106 投与から 5 昼夜にかけての、ケージ内行動量測定装置による一般行動様式解析の結果、総行動量、及び社会性行動様式に変化は認められなかった。
- ③ CFI-IPA1106 投与 7 日後において、体重変化も正常であり、条件付け学習記憶試験からも異常は認められなかった。
- ④ CFI-IPA1106 投与 7 日後において、解剖に関しても主要臓器に異常所見は認められない。
- ⑤ CFI-IPA1106 投与 7 日後において、血液・生化学検査（血中 GOT、血中 GPT、血中クレアチンフォスフォキナーゼ活性、血中乳酸脱水素酵素活性、血中コリンエステラーゼ活性、血中ブドウ糖、血中尿素窒素、血中総コレステロール、血中中性脂肪）結果は正常の範囲であった。
- ⑥ 肝臓については、常法に従い組織切片を作成し、HE 染色標本を作製し、鏡検を行った結果、特に異常所見は得られなかった。

D. 考察

CFI-IPA1106 の単回強制経口胃内投与による影響に関して、現時点では毒性と判断される影響は確認されなかった。今後、投与経路の変更、複数回投与等について検討する必要がある。

熱画像診断、およびケージ内行動様式解析は、初期毒性スクリーニングに、その迅速性が非常に有用であると考えられる為、今後、異常誘発化合物を用いて、毒性判断の基準点を設定することで、従来の毒性試験に加えた毒性試験法として有用であると考えられるとともに、本研究計画の前進に貢献が期待できる。

E. 結論

CFI-IPA1106 単回強制経口胃内投与について、現時点では毒性と判断される影響は見いだされなかった。今後、溶媒の変更を含めた投与方法の変更を検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

① 特許取得

なし。

② 実用新案登録

なし。

③ その他

なし。

抗HBV薬創薬の2次・3次スクリーニング用の新規HBV感染増殖細胞系・ *in vivo*感染増殖系の構築

研究分担者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学 教授

研究協力者

池田 均（東京大学医学部 臨床病態検査医学 准教授）

坪田昭人（東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 基盤研究施設・
分子細胞生物学・教授）

鈴木哲朗（浜松医科大学 感染症学講座 教授）

清水弘樹（産業技術総合研究所 北海道センター 生物プロセス研究部門・
生物材料工学研究グループ 主任研究員）

研究要旨

新規開発抗HBV薬候補化合物の2次・3次スクリーニング系として、①HBV episomal複製細胞株の樹立、②TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* 評価系の構築、③FLC-4細胞を用いたHBV感染増殖系の構築を行った。①②は平成27年度以降の化合物の最適化を進める上で有用に利用できる。また、FLC-4ではNTCPの発現は最も高いものの、HBVの感染には成功しておらず、他の感染に必要なファクターの存在が示唆された。

A.研究目的

抗HBV薬創薬過程で、一次スクリーニングでピックアップされた化合物およびその最適化合物を2次・3次スクリーニングするための、①新規HBV複製細胞系、②*in vivo*感染増殖系を構築する。また、③HBVの新規感染・増殖細胞系の作製をめざした（図1）。

慢性B型肝炎でNA耐性になったと思われる患者血液から検出したウイルス(J6)の全遺伝子配列を検討した。次にNA耐性ウイルスの1.3x genome（一本鎖）を作製し、その発現をHuh-7細胞で確認した後、episomal型ベクター（pEBMulti）を用いて、1.3x HBV (J6) genomeが、細胞分裂と同調して複製・分配されるシステムを構築した。このepisomalな遺伝子複製システムでは、細胞に導入したplasmidは染色体に結合して存在し、HBV mRNAが産生される（図2）。

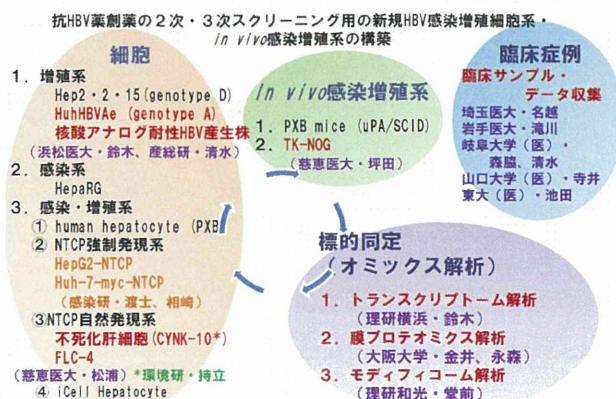


図1

B.研究方法

①核酸アナログ(NA)耐性HBVをepisomalに複製する細胞株と野生型HBVをepisomalに複製

Episomal型ベクターを用いたHBV持続複製細胞の樹立

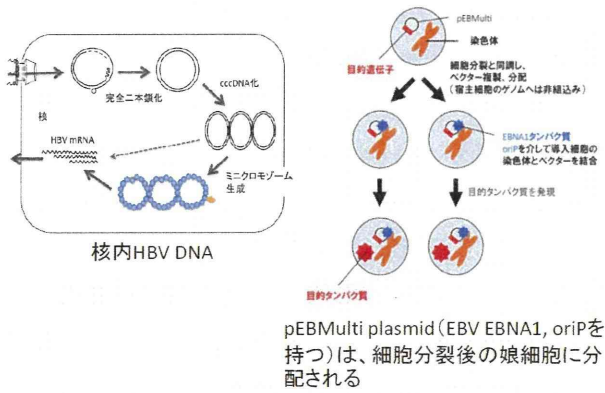


図 2

また、コントロールとして、野生型 HBV を episomal に複製する細胞株も樹立した。

②TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 化合物の *in vivo* 評価系の構築

自殺遺伝子である TK を肝細胞特異的に発現させた TK-NOG マウスに基質であるガンシクロビルを投与して肝傷害を惹起させ、相応に肝細胞が破壊された段階でヒト肝細胞を移植することによりヒト肝細胞キメラマウスを作製する。次に、その動物モデルを用いて抗 HBV 作用をスクリーニングした候補化合物の *in vivo* 効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究プロジェクトで、各施設の倫理委員会の許諾のもとで、臨床サンプル(血液)を採取した。

③HBV の新規感染・増殖細胞系の作製

抗 HBV 薬の開発には、複数のターゲットに関する検討が必要である。しかし、HBV のエンター・感染・複製・増殖・放出のすべてを一つの系で評価する系は、ヒト肝細胞を用いた系のみである。ヒト肝癌細胞で、全てのターゲットを検討できる系を作製するため、まず、ヒト肝細胞癌株の NTCP 発現について、リアルタイム PCR で検討した。

C.研究結果

①核酸アナログ(NA)耐性 HBV を episomal に複製

製する細胞株と野生型 HBV を episomal に複製する細胞株の樹立

HBV-J6 ウイルス株は、HBV genome L180, M204 の2か所に変異があり、Lamivudine (LAM), Telbivudine 耐性、Entecavir (ETV) 半耐性と推定された。実際に、核酸アナログ(NA)耐性 HBV をエピゾーマルに複製する細胞株 (EB-HBJ6, Huh-7 が母細胞) とコントロールの HBV 野生型複製細胞 (EB-HBCe) で ETV と LAM の効果を比較したところ、EB-HBJ6 では、予想通りの効果を再現できた (図 3)。

HBV J6株また野生株産生細胞を用いた核酸アナログ製剤のHBV阻害効果

(6日目)

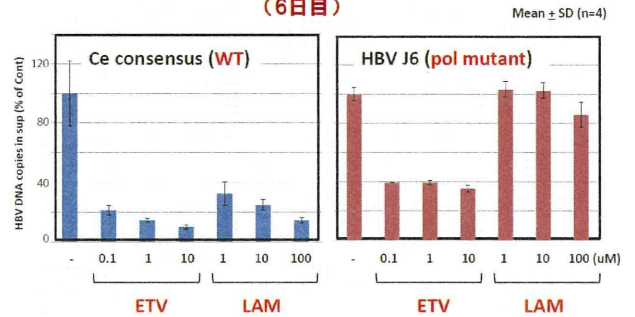


図 3

②TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗 HBV 化合物の *in vivo* 評価系の構築

TK-NOG ヒト肝細胞キメラマウスに HBV (genotype C) を感染させ、スクリーニングで抗 HBV 作用のあった化合物を経口投与して、*in vivo* での抗 HBV 作用を評価した (図 4)。

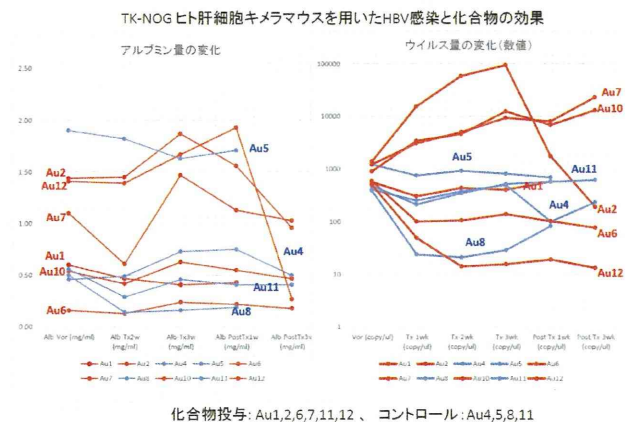


図 4

マウスを投与群・非投与群の2群に分け、化合