

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（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
総括研究報告書

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に
関する研究

研究者 梅山秀明
北里大学・名誉教授

研究要旨

B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究班は、HBVのウイルス構造解析によって薬剤耐性のメカニズムとウイルスの変異の関係を明らかにし、in silico screeningによってウイルスタンパク機能阻害薬候を探索し、ウイルスの排除を目的とした新規治療薬開発を目指している。後半の計算機を使う目的を達成するために、当然のこととして、時には方法論を開発しながら、計算研究の道筋をいろいろ決定する必要がある、当該報告者はこの分野の担当をした。

A. 研究目的

当該報告者の属する当該研究班はHBVに感染した各患者様のDNA polymerase タンパクの構造解析を行い、現在使用しているラミブジン、アデフォビル、エンテカビルのDNA polymerase の catalytic domain との相互作用の起こりやすさを in silico screening を用いて推定し、薬効の治療効果予測を行うことを企画している。これらの情報を集積しHBVの株ごとの薬剤応答を幅広く臨床の場で利用できるようにデータベース化し公表するつもりである。この情報は慢性B型肝炎治療方法の標準化に有用であ

ると考えている。上記の状況において、当該報告者の目的の1つはHBV DNA polymerase タンパク質の catalytic domain の3次元構造の構築を計算機で行い、既存薬物との相互作用の起こり易さを、計算機で数値化して、視覚化することである。

当該報告者の、もう一つの主たる目的を以下に記述する。HBVはpreS/S、preC/C、X、DNA polymeraseと4種のORFを持っていることを踏まえて、計算プログラムで計算をしてみると、preS/S、XのORFに関して我々の開発したIsolated FAMDプログラムでは信頼できる3次元立体構造は得られ

ない。preC/C、DNA polymerase の立体構造は計算できるので、それぞれのタンパク質の機能を阻害する低分子化合物の探査を、我々の開発した in silico screening プログラム ChooseLD を用いて実行する。この方法の特徴を強調すると、市場で買うことができないような新規な活性低分子化合物候補を提示するのではなく、既存の薬剤バンクや、低分子化合物バンクにおいて、購入という手段で、手に入れられるものの中から提示する。当該ターゲットタンパク質との相互作用を計算して順位を付け、購入を勧めるものである。初期の研究ステージでは、合成研究者が新規に低分子化合物を合成することがないために、創薬の費用と時間が大幅に軽減する。平成 26 年度に続いて、平成 27 年度において、この方法を用いてウイルスの生活環に係る複数のポイントを阻害する薬剤の開発を成功させることを念じて初期段階の計算をする。ウイルス複製に必要な宿主側のタンパク質に注目して、以下のような低分子化合物を検討している。

(1) -glucosidase inhibitors、(2) LT R agonists、(3)TLR7 agonists の 3 種の化合物群においての in silico screening の可能性の検討である。即ち、これら -glucosidase、LT R、TLR7 のタンパク質の機能を阻害したり、促進したりする低分子化合物

物を探索している。

B. 研究方法

(1) 抗ウイルス薬候補の検索

HBV ゲノムにコードされている Large HBs (Pre S1, Pre S2, S)、HBcAg (capsid protein)、HBx protein、DNA polymerase (Reverse Transcriptase) のアミノ酸配列を query として、タンパク質立体構造データベース(PDB)を検索すると、HBcAg と DNA polymerase のみ、信頼できる 3 次元立体構造が得られるとの計算結果を得た。これらの 2 つのタンパク質において、低分子化合物を受容するような表面の空隙に、in silico screening (ChooseLD program) を用いて抗ウイルス活性を持つ低分子化合物の検索を行った。RT 領域について HIV の RT タンパク質をもとにした標的タンパク質モデルを創作し、in silico screening の方法で、purine 型、pyrimidine 型の核酸アナログを、探索して活性化合物を探し当てた。さらに、Capsid protein の X 線構造を参考にして、HBe タンパクのモデルを作成して、阻害剤を探索して、活性化合物を探し当てた。Large HBs タンパクのモデルは、信頼できる実験構造を見つけられないために、結果的に立体構造モデルが製作できないため、重合阻害剤を探索できなかった。一方、宿主の持つウイルスの複製に関与する因子に関して、抗ウイルス活性がありそうな (1) -glucosidase 阻害剤、(2) LT R

agonist、(3)TLR7 agonist の3種において in silico screening を用いて機能を変化させる低分子化合物の探索を検討し、
-glucosidase 阻害剤が適切なる選択であるとの予備計算を済ませている。

(2) ウイルス変異解析

当該研究班の棚橋、矢野、田口、村上のウイルス変異解析の実行と、熊田、豊田、河田、田守、榎本、本多からの検体と臨床情報提供によって、ウイルス変異解析に必要なリード数が得られ、PCR を行なった場合と遜色ない解析結果を得ることができているとのことである。故に、本格的に現在使用しているラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの DNA polymerase の catalytic domain との薬効に関係した相互作用の起こりやすさを protein-ligand docking program ChoosLD (in silico screening の機能も含むプログラム)を用いて推定し、薬効の治療効果予測ができる可能性も視野に入ってきた。

C. 結果

(1) 直接ウイルス作用型抗ウイルス剤と宿主因子阻害型抗ウイルス剤の探索

当該研究班代表のグループが、ヒト肝細胞由来の PXB 細胞を用いて HBV の安定感染系を樹立した。この方法を用いて新規核酸アナログ候補としてピリミジン型 100 種、プリン型 100 種を AKos library より in silico screening にて選別した、次に、既に他の疾患で使用されているも

の、文献的に報告があるもの、日本で手に入らないものは除外し、ピリミジン型 6 種、プリン型 6 種を選別した。そのうち細胞毒性がなく上清中ウイルス DNA を有意に減少させたものはピリミジン型 2 種、プリン型 2 種あった。

さらに preC/C に関係して、capsid 合成阻害候補を、同様に in silico screening で 100 種選別した。そのうち 16 種の抗ウイルス効果を実験で確認した所、細胞毒性がなく抗ウイルス効果があったものについて 4 種選択できた。しかし、これらの薬剤は 100 μ M の濃度で作用するために、より作用効果の強い低分子化合物の選択が必要である。具体的には低分子化合物の構造が類似しているもの、即ち Tanimoto 係数 0.8-0.9 のものと 0.7 程度の低分子化合物を選別し解析を行なう予定である。

また宿主側のウイルス複製に必要な低分子化合物を、(1) -glucosidase inhibitors、(2) LT R agonists、(3)TLR7 agonistsにおいて、ChoosLDプログラムが適用できる項目に限定して、in silico screeningを用いて機能を阻害する低分子化合物を探索する(平成26年度から平成27年度にかけて)。

(2) ウイルス変異解析

当該研究班代表グループを中心にして、エンテカビル治療前後におけるアミノ酸の変異を major/minor clone 別に解析した所、治療経過中に major clone で遺伝

子発現変異は同定できなかったが、minor clone には既報でエンテカビル耐性に関する変異を同定することができている。さらに PCR を用いずに行なった NGS 解析でも同様にエンテカビル耐性変異が minor clone で同定された。

HBcAg と DNA polymerase のみだが、信頼できる 3 次元立体構造が得られるので、これらに関係した機能に関連する範囲で、耐性変異を説明できる可能性があり、当該研究者としては、当てはまる実例を見つけたい。

D. 考察

研究代表者グループによる実験で、現時点で選択できた活性のある新規核酸アナログと capsid 合成阻害剤は、細胞毒性がないが、作用を発揮するために高濃度で投与する必要がある。そのため計算機による構造解析を再度行ない、Tanimoto 係数をもとに類似化合物を探索し、より作用効果の高い化合物を探索する必要がある。現時点では、上記で発見した化合物は高濃度で薬効を発揮しているが、例えば宿主側の免疫応答の改善薬として機能するインターフェロンと今回我々が得た新規化合物を併せて使用することも興味深い。また、現在研究中である新規の宿主因子阻害剤を組み合わせることにより、有効な治療成績が得られる可能性もある。

当該研究実験者らによって、ウイルス変異解析は新規の PCR を用いない方法で HBV のクローンをカタログ化し、ウイルス変異株の出現時期、薬剤応答との関連を明らかにできる可能性が高い状況にある。

当然、計算機を利用して、ラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの DNA polymerase の catalytic domain との相互作用の起こり易さを docking program ChooseLD を用いて推計算し、薬効の治療効果予測ができる可能性が高い。

E. 結論

当該研究者が計算機を用いてのタンパク構造解析により新規抗ウイルス薬候補を選別し、当該研究代表者グループが in vitro で薬効の存在と細胞毒性の無いことを確認し、in vivo 実験に進む薬剤を選択できる可能性があることがわかった。さらに、計算機を用いた構造解析で薬剤耐性獲得メカニズムを明らかにし、治療前に治療方法の選択可能なアルゴリズムを作成できるかもしれない。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. [Murakami Y](#), Hayakawa M, Yano Y, Tanahashi T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Iwadate M, Umeyama H. Discovering novel direct acting antiviral agents for HBV using in silico screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015 Jan 2; 456(1):20-8

学会発表

1. 村上善基、早川路代、河田則文。in silico screening を用いた新規抗 HBV 薬探索 第 51 回日本肝臓学会総会 平成 27 年 5 月 21 日 熊本市
2. Murakami Y, Iwadate M, Hayakawa M, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Y-h Taguchi, Umeyama H Attempt to development for direct acting antiviral agent for HBV 2014 HBV International Meeting 2014 Sep 4, Los Angeles CA

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし