

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

B型肝炎ウイルス感染を抑制可能な高機能型核酸医薬品の開発に関する研究  
（HBV を標的としたアンチセンス核酸の設計・合成・機能評価）  
担当責任者 山本 剛史（大阪大学大学院薬学研究科・助教）

研究要旨

B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus; HBV）の感染を原因とするB型肝炎は、我が国に約150万人のHBV感染者が存在すること、その一部は肝硬変や肝臓に進行することから、大きな問題となっている。現在、B型肝炎治療薬としてはインターフェロン（IFN）や核酸アナログが使用されているが、種々の問題から画期的抗HBV薬の開発が期待される。アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）は、10～20塩基長の化学合成オリゴヌクレオチドであり、相補的な配列を有する標的遺伝子mRNAに結合することで、その発現を高効率に阻害すること、肝臓に効率良く集積することなどから、肝疾患に対する医薬品として適しており、実際にC型肝炎、高コレステロール血症などに対する医薬品として承認・新規開発が進んでいる。本研究では、ASOを用いてHBVの感染抑制を試みた。

研究協力者

櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科 准教授  
小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研究科 教授  
水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科 教授  
立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科助教  
山本 達郎 大阪大学大学院薬学研究科大学院生  
田中 靖人 名古屋市立大学大学院

医学研究科教授

脇田 隆字 国立感染症研究所ウイルス第2部 部長  
渡土 幸一 国立感染症研究所ウイルス第2部 主任研究官

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus; HBV）の感染を原因とするB型肝炎は、国内に約150万人のHBV感染者が存在すること、その一部は肝硬変や肝臓に進行することから、大きな

問題となっている。現在、B型肝炎治療薬としてはインターフェロン(IFN)や核酸アナログが使用されているが、種々の問題から画期的抗HBV薬の開発が期待される。アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)は、10~20塩基長の化学合成オリゴヌクレオチドであり、相補的な配列を有する標的遺伝子mRNAに結合することで、その発現を高効率に阻害すること、肝臓に効率良く集積することなどから、肝疾患に対する医薬品として期待されている。実際に、PSCK9に対するASOは家族性高コレステロール血症治療薬として承認・販売されており、C型肝炎ウイルスの増殖に必須のmiR-122aのASOは、C型肝炎治療薬として臨床開発が進められている。そこで本研究では、HBV感染を抑制可能なASOの開発を試みた。

## B. 研究方法

### B.1. HBx 遺伝子に対する ASO

#### (ASO-HBx)の設計

HBV・HBx 遺伝子において各 Genotype に保存されている領域に対し、449種の候補標的領域から選抜した16種のASOを化学合成した。それらのASOには、標的に対する親和性の向上ならびに分解に対する耐性の向上を目的に、種々の化学修飾を施した。

### B.2. ASO-HBx による HBV 感染抑制

Genotype DのHBV粒子を恒常的に産生するHepG2.2.15.7細胞に対しASO-HBxを終濃度100 nMでLipofectamine2000を用いてTransfectionした。Transfection72時間後、細胞内のRNAを回収し、HBx mRNA量を定量的RT-PCRにより定量した。さらに培養上清中のHBVゲノム量を定量的PCRにより検討した。

### B.3. ASO-HBx による細胞毒性の評価

HepG2.2.15.7細胞にASO-HBxを上記B.2.と同様に導入した。72時間後、培養上清中のLactate dehydrogenase(LDH)活性をLDH-細胞毒性テストワコー(和光純薬)を用いて評価した。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

## C. 研究成果

### C.1. HBx 遺伝子に対する ASO の設計

本研究では、標的遺伝子としてHBx遺伝子を選択した。HBVゲノムは4つの遺伝子(HBx, Core, Pol, S)から構成されている。HBx遺伝子産物は、HBVの複製、Reactive Oxygen Species(ROS)の産生など多くの機能を有しており、HBx遺伝子の発現を抑制することでHBVの感染を大きく抑制可能であることが報告されている(Shin et al., Virus Res., 2006)。設計にあたっては、HBx遺伝子のGenotype A-D間で共通の配列領域について設計した。共通

配列より 449 種の候補を生成し、既知の免疫惹起モチーフ (CpG モチーフ)・自己高次構造配列 (GGGG モチーフなど) を有するモノの排除、さらに結合力や配列相同性のパラメータを考慮し、活性アンチセンス核酸を選抜する独自アルゴリズムを用いて 16 種選択した。これら 16 種について BNA を搭載したアンチセンス核酸を化学合成した。

### C.2. ASO-HBx による HBV 感染抑制

次に設計・合成した ASO-HBx を Hep2.2.15.7 細胞に Transfection し、HBV 感染抑制能について検討した。その結果、2 つの ASO において HBx mRNA 量が 60% 以下に抑制された。さらに培養上清中の HBV ゲノム量についても、50% 以下に抑制された。また、Genotype D 以外の Genotype についても HBx mRNA 抑制効果を検討したところ、Genotype D のみならず、Genotype A-C の HBV において HBx mRNA 量を 40% 以下に抑制することに成功した。以上の結果より、ASO を用いて HBV の感染を抑制可能であることが示された。

### C.3. ASO-HBx による細胞毒性の評価

さらに、ASO-HB の細胞毒性について検討するために、ASO-HBx を Hep2.2.15.7 細胞に Transfection し、培養上清中の LDH 活性を測定した。その結果、上記 C.2 の検討において HBV 感染抑制効果を示した ASO では、未処理群と比較し有意な細胞毒性は観察

されなかった。従って、細胞毒性によって HBV 感染が抑制されたのではないことが示唆されるとともに、ASO が高い安全性を有することが示唆された。

### D. 考察

近年、ASO は次世代の革新的医薬品として大きな期待を集めている。ASO は、キャリアーを必要とせずに単体の状態で肝臓に送達可能であること、化学的に大量合成可能であること、核酸に化学修飾を施すことによって安定性や組織移行性を付与することが可能であるなどの特長を有している。既に米国においては ApoB に対する ASO が家族性高コレステロール血症に対する治療薬として承認を受けている。また miR-122a に対する ASO が C 型肝炎治療薬として Phase IIa に進んでいる。本研究では HBV 感染を抑制することを目的に、HBx 遺伝子に対する ASO を設計し、その抑制効率を検討した。HBV は 4 つの遺伝子から構成されており、今回標的とした HBx 遺伝子以外にも S 遺伝子や pol 遺伝子を標的として siRNA を用いて感染抑制が見られることが報告されている。しかしながら、HBx 遺伝子産物は種々のメカニズムを介して HBV の感染ならびに症状の発症に関与しており、本遺伝子をノックダウンすることで高い HBV 感染ならびに

発症の抑制が得られると考えた。今後は更に多くの ASO を用いてスクリーニングを行うとともに、in vivo における HBV 感染抑制を試みる。

#### E. 結論

- HBx 遺伝子を標的とした ASO を設計するとともに、本 ASO を用いて HBV 感染を抑制可能であった。
- HBV 感染抑制を示した ASO は、細胞毒性を示さず高い安全性を有することが示された。

#### F. 健康危険情報

該当事項無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamamoto, T., Yahara, A., Waki, R., Yasuhara, H., Wada, F., Harada-Shiba, M. and Obika, S. (2015) Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo. *Org Biomol Chem*.  
Mitsuoka, Y., Fujimura, Y., Waki, R., Kugimiya, A., Yamamoto, T., Hari, Y. and Obika, S. (2014) Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization,

and High Nuclease Resistance. *Org. Lett.*, **16**, 5640-5643.  
Yamamoto, T., Fujii, N., Yasuhara, H., Wada, S., Wada, F., Shigesada, N., Harada-Shiba, M. and Obika, S. (2014) Evaluation of multiple-turnover capability of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in cell-free RNase H-mediated antisense reaction and in mice. *Nucleic Acid Ther*, **24**, 283-290.

##### 2. 学会発表

櫻井文教、山本剛史、森大輔、山本達郎、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、立花雅史、小比賀聡、水口裕之。2',4'-BNA/LNA 導入型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる B 型肝炎ウイルスの感染抑制。2014 年 9 月 8-9 日 第 24 回アンチセンスシンポジウム  
山本剛史、藤井奈緒子、安原秀典、斯波真理子、小比賀聡、アンチセンス核酸の mRNA 切断反応における効率的回転に関する検討、2014 年 9 月 8-9 日、第 24 回アンチセンスシンポジウム  
堀真一郎、山本剛史、小比賀聡、アンチセンス核酸の簡便な in vitro 活性向上法、2014 年 9 月 8-9

日、第 24 回アンチセンスシンポジウム

Tsuyoshi Yamamoto, Naoko Fujii, Hidenori Yasuhara, Shunsuke Wada, Fumito Wada, Naoya Shigesada, Mariko Harada-Shiba and Satoshi Obika, Turnover Capability of BNA Antisense Oligonucleotides under Excess RNase H conditions and in Mice, 2014.10.11-16, 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society.

Shin-ichiro Hori, Tsuyoshi Yamamoto, Reiko Waki, Satoshi Obika, Simple addition of calcium chloride to media enhances the effect of various naked oligonucleotides, 2014.10.11-16, 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項無し。