

博士論文

B 型肝炎ウイルス制御を目指した HBx-DDB1 結合阻害剤の探索

關場 一磨

B 型肝炎ウイルス制御を目指した HBx-DDB1 結合阻害剤の探索

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

指導教員 小池和彦教授

關場 一磨

目次	頁
1. 要旨	4
2. 序文	5
3. 方法	9
① 細胞	9
② プラスミド	10
③ 化合物	12
④ 化合物スクリーニング	12
⑤ HBV minicircle DNA 抽出	13
⑥ プラスミドのトランスフェクションおよびウイルスのトランスダクション	14
⑦ Western Blot 法および抗体	15
⑧ 免疫沈降法	16
⑨ <i>in vitro</i> GST プルダウン法	16
⑩ Gluc および Cluc 活性測定	17
⑪ 細胞障害性試験	17
⑫ 初代ヒト肝細胞における HBV 感染法	18
⑬ HBV RNA 定量	19
⑭ HBV DNA 定量	20

⑮	HBV cccDNA の単離	20
⑯	droplet digital PCR (ddPCR)による cccDNA の定量	20
⑰	Southern Blot 法	21
⑱	培養上清中 HBs 抗原定量	22
⑲	統計分析	22
4.	結果	23
①	HBx-DDB1 結合阻害剤スクリーニング系の確立	23
②	HBx-DDB1 結合阻害剤の同定	25
③	ニタゾキサニド(NTZ) は HBx による Smc5/6 の分解を阻害する	29
④	NTZ は cccDNA からの HBV RNA の転写を阻害する	30
⑤	NTZ はウイルス蛋白および cccDNA 量を減少させる	35
⑥	NTZ は HBV 感染系において抗ウイルス効果を示す	38
5.	考察	42
6.	結語	46
7.	引用文献	47
8.	謝辞	64

1. 要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)の克服は世界的な課題である。HBV regulatory protein X (HBx) は宿主蛋白 DNA damage-binding protein 1 (DDB1) との結合を介して、宿主蛋白 structural maintenance of chromosomes 5/6 (Smc5/6) を分解し、HBV RNA 転写を促進する。本研究では、Split luciferase による HBx-DDB1 結合阻害剤スクリーニング系を確立し、ニタゾキサニド(NTZ) を同定した。NTZ は HBx-DDB1 結合阻害による Smc5/6 の回復を通して、抗 HBV 効果を示した。NTZ は HBV 新規治療薬となる可能性がある。

2. 序文

B型肝炎ウイルス(HBV)の克服は全世界的な問題である。1964年のウイルス蛋白の発見[1]および1970年のウイルス粒子の発見[2]以降、HBVに対する研究は進歩を遂げてきたが、未だ根治は困難であり、多くの課題が残されている。感染予防ワクチンがあるにもかかわらず、世界中の約3人に1人がHBVに暴露し、約2億4千万人が持続感染しているとされ、毎年約90万人がHBV感染の合併症である肝硬変症や肝細胞癌等により死亡している[3-5]。

そうしたHBV関連死を防ぐための長期治療目標として Functional cure と呼ばれるHBV表面抗原(HBs抗原)の陰性化が掲げられている[6-10]。しかしながら、現在のHBV治療薬であるインターフェロン α (IFN α)や核酸アナログ製剤では Functional cure の達成は困難で、HBV関連死が無くならない大きな要因となっており、新規治療薬の登場が必要とされている[11-17]。

HBVビリオンにはrelaxed circular DNA(rcDNA)と呼ばれる全長3.2 kbの不完全2本鎖DNAが内包されている。HBVがナトリウムタウロコール酸共輸送体[18]を介して肝細胞に侵入すると、rcDNAは放出され、核内に移行し、covalently closed circular DNA(cccDNA)が形成される。このHBV cccDNAはウイルスRNA転写の鋳型として肝細胞核内で安定的に存在する[19,20] (図1)。

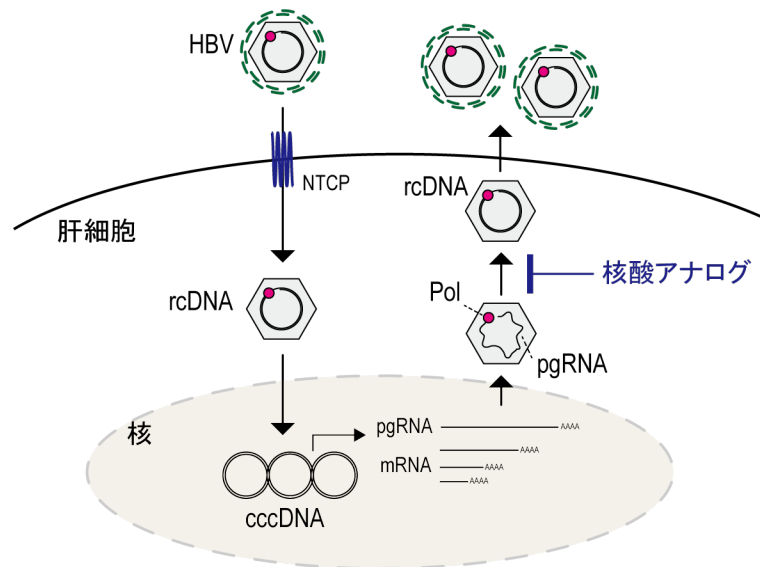


図1 B型肝炎ウイルス(HBV)の生活環および核酸アナログ製剤の作用点

HBV ビリオンはナトリウムタウロコール酸共輸送体(NTCP)を介して肝細胞内核内に侵入すると、relaxed circular DNA (rcDNA)の状態から covalently closed circular DNA (cccDNA)の安定な形態をとるようになり、ウイルス RNA はそれを鋳型として転写される。pregenomic RNA (pgRNA)は Polymerase (Pol)により rcDNA に逆転写され、再び HBV ビリオンとして放出される。核酸アナログ製剤は逆転写を阻害し、HBV DNA 量を抑制するが、cccDNA やウイルス RNA、ウイルス蛋白量を直接的に抑制することはできない。

HBV RNA 転写は HBV regulatory protein X (HBx) によって促進されることが知られている[21,22]。この転写促進には HBx と DNA damage-binding protein 1 (DDB1) との結合が必要であること[23–25]が分かっていたが、その詳細な機序は長らく不明であった。しかし、近年、HBx は HBx–DDB1–CUL4–ROC1 E3 ユビキチン酵素複合体を形成し、本来は cccDNA からのウイルス RNA 転写に抑制的に働く structural maintenance of chromosomes 5/6 (Smc5/6) を分解していることが報告された[26–28] (図 2)。

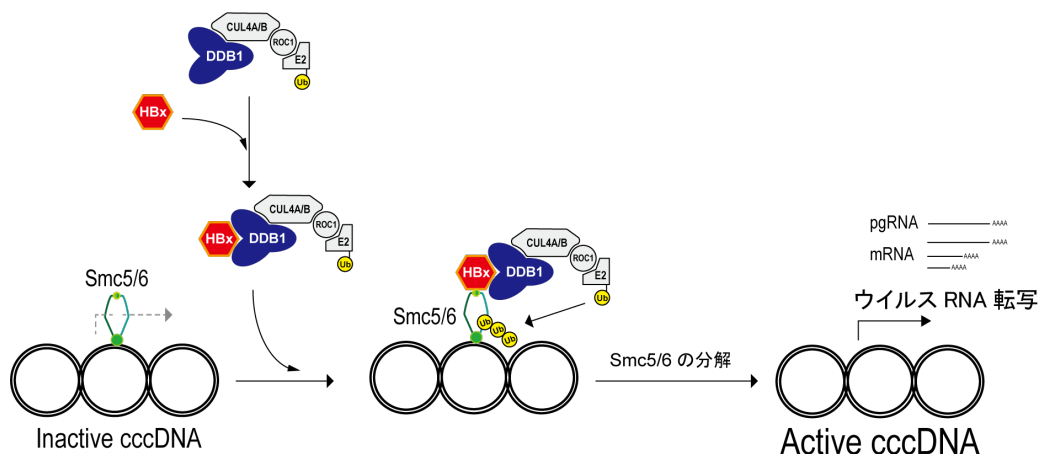


図2 HBx は DDB1 との結合を介して Smc5/6 を分解し、ウイルス転写を活性化する
宿主蛋白 Smc5/6 は本来、HBV cccDNA と結合しウイルス転写を抑制する。しかし、HBx は宿主蛋白 DDB1 と結合することで、HBx-DDB1-CUL4-ROC1 E3 ユビキチン酵素複合体を形成し、Smc5/6 をユビキチン化し分解する。これにより、HBV cccDNA からのウイルス転写が促進される。

これらの知見から、もし HBx-DDB1 結合を阻害する化合物を同定することができれば、その化合物は HBx による Smc5/6 の分解を防ぎ、ウイルス RNA や以降のウイルス産物の生成を抑制する HBV の新規治療薬となる可能性があると考えられた(図 3)。

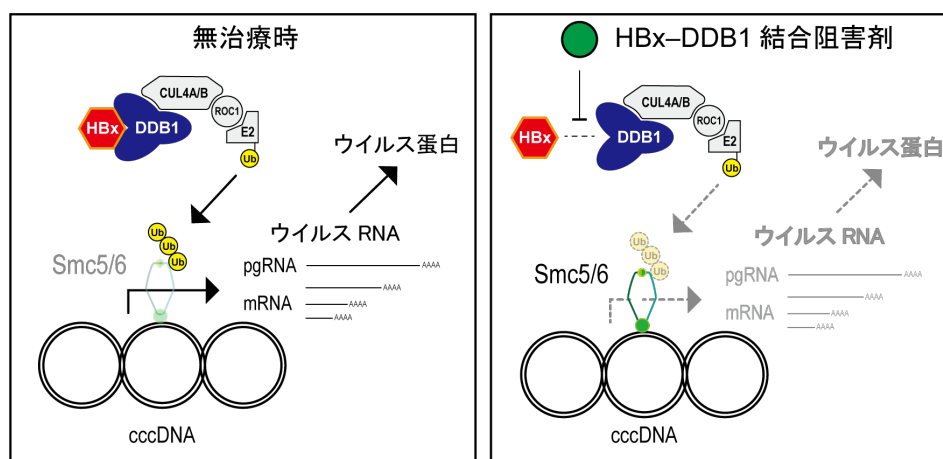


図3 仮説:HBx-DDB1 結合阻害剤は functional cure のための新規治療薬となり得る
HBx による DDB1 との結合を介した Smc5/6 の分解はウイルス RNA やウイルス蛋白の産生を促進する(左パネル)。理論上は HBx-DDB1 結合阻害剤が作用すれば、Smc5/6 の分解を阻害し、ウイルス RNA やウイルス蛋白の産生が抑制され、HBV functional cure (HBs 抗原陰性化)を達成できる可能性がある(右パネル)。

そこで、本研究では、HBV functional cureを達成するための新規治療薬を同定する目的で Split luciferase を応用した HBx-DDB1 結合阻害剤のスクリーニング系を確立し、実際にそれを用いて新規 HBV 治療薬候補を同定したので報告する。

3. 方法

① 細胞

ヒト胎児腎細胞株 HEK293T およびヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 は The American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)から購入し、10%胎児ウシ血清 (FBS)および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。テトラサイクリン・プロモーター制御下で HBV pregenomic RNA (pgRNA) を発現する HepAD38 細胞株は C. Seeger 教授 (Institute for Cancer Research, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA)から提供を受け、10% FBS を添加した Ham's F-10/DMEM 培養液で培養した。この際、1 $\mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリン添加の有無によって HBV pgRNA の発現を制御した。初代ヒト肝細胞はコラゲナーゼ灌流法によりヒト肝細胞キメラマウスから単離されたもので、Phoenix Bio (Hiroshima, Japan)より購入した。ヒト肝細胞の割合は 95%以上であった。初代ヒト肝細胞はコラーゲン I コートプレートに播種され、dHCGM (10% FBS および 20 mM HEPES、44 mM 炭酸水素ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン、15 $\mu\text{g/mL}$ L-プロリン、0.25 $\mu\text{g/mL}$ インスリン、 5×10^{-8} M デキサメサゾン、5 ng/mL 上皮成長因子、2% DMSO、0.1 mM L-アスコルビン酸を添加した DMEM)で培養した。全ての細胞は 37°C、20% O₂、5% CO₂ 環境下にて培養した。

② プラスミド

HBV pgRNA (ゲノタイプ D, GenBank accession number V01460)を発現する TL7 プラスミド[29]は Loeb 教授 (McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, WI, USA)から提供を受けた。

Split luciferase 発現ベクターは、The Flexi Vector System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて推奨プロトコールに従って作製した。具体的には、まず、HBx および DDB1 の DNA をそれぞれ TL7 プラスミド、Halo-tagged DDB1 プラスミド (Promega) を鋳型として PCR 法にて増幅した。この際用いたプライマーは以下の通りである。HBx, 5'-GCGATCGCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGC-3' (sense) および 5'- GTTTAAACG GCAGAGGTGAAAAAGTTGCA-3' (antisense); DDB1, 5'- ATGTCGTACAACACTACGTGGTA-3' (sense) および 5'-ATGGATCCGAGTTAGCTCCTC -3' (antisense)。増幅した DNA 断片は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて精製した。これらを制限酵素 SgfI および PmeI で処理した pF4A CMV Flexi Vector (Promega) にライゲーション反応で挿入した。そして、これら HBx または DDB1 cDNA を含む pF4A CMV Flexi ベクターをアクセプターFlex ベクターと混合し、サブクローン法にてアクセプターベクター挿入した。N 末端融合には、pFN33K LgBiT TK-neo および pFN35K SmBiT TK-neo Flexi ベクターを使用し、C 末端融合には pFC34K LgBiT TK-neo および pFC36K SmBiT TK-neo Flexi ベクターを使用した。HaloTag-SmBiT をエンコードする NanoBiT ネガティブコントロールベクターを陰性対照として使用した。

Flag-HBx 発現プラスミドは Infusion 法 (Clontech, Mountain View, CA, USA) にて作製した。まず、TL7 ベクターを鋳型に FLAG 配列を含むプライマーで Flag-HBx DNA 断片を増幅し、それを Infusion 法で pCDH-CMV-puro レンチウイルスベクターに挿入した。この際用いたプライマーは、

5'-ATTTAAATCGGATCCACCATGGACTACAAAGACGATGACG-3' (sense) および

5'-GATCGCAGATCCTTCTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGC-3' (antisense) である。

CMV プロモーター制御下に ostracod *Cypridina noctiluca* (Cluc) を発現する pCMV-Cluc 2 control プラスミドは、New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) より購入した。

Minicircle HBV cccDNA with a *Gausssia* luciferase (Gluc) reporter-containing プラスミド (pre-mcHBV-Gluc) は Su 教授 (Linebarger Comprehensive Cancer Center, Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA) より提供を受けた。このプラスミドはゲノタイプ C の配列に由来する[30]。pre-HBV circle genotype D プラスミド[31]は Gao 博士 (Roche Innovation Center Shanghai, Shanghai, China) より提供を受けた。

pre-mcHBV-Gluc から HBx 発現を欠損させた変異体 (pre-mcHBV-Gluc-ΔX) は QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて、HBx の 8 番目のアミノ酸 Gln (塩基配列 CAA) をストップコドン (塩基配列 TAA) に変異させることで作製した。この点変異は他の HBV 蛋白質に影響を与えない[30]。この変異導

入には 5'-CGCAGGATCCAGTTAGCAGCACACCCGAG-3' (sense) および 5'-CTCGGGTGTGCTGCTAACTGGATCCTGCG-3' (antisense)のプライマーを用いた。

③ 化合物

Screen-Well Food and Drug Administration (FDA)-approved drug library V2 version 1.0は Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, USA)より購入した。ニタゾキサニド(NTZ) およびエンテカビルは Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Ontario, Canada)から、IFN α 2a は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) からそれぞれ購入した。

④ 化合物スクリーニング

HBx-DDB1 結合阻害剤のスクリーニング系の樹立には NanoBit Protein:Protein Interaction system (Promega)を用いた。まず、Split luciferase を付加した HBx と DDB1 の各発現ベクター1 μ g ずつ計 2 μ g を、10 cm ディッシュに 80%コンフルエンスで播種した HEK293T または HepG2 細胞にトランスフェクションをした。その 10 時間後、細胞を 5×10^4 細胞/well かつ 50 μ L 培地/well の条件で 96 穴プレートに再播種した。37°Cで 10 時間インキュベートした後、12.5 μ L の Nano-GloLive Cell Assay Regent を各ウェルに添加し、ルミノメーターを使用して発光を測定した。この初回測定の直後に、化合物を最終濃度 10 μ M で添加し、30 分ごとに発光値を測定した(図 4)。

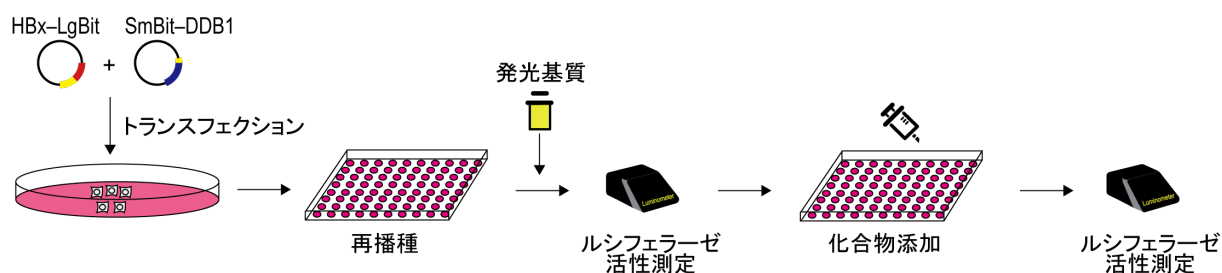


図4 Split luciferase を利用した HBx-DDB1 結合阻害剤スクリーニング系

HBx-LgBit および SmBit-DDB1 発現プラスミドをトランスフェクションし、翌日に 96 穴プレートに細胞を再播種する。発光基質を加え、ベースラインのルシフェラーゼ活性を測定したのち、スクリーニング対象の化合物を添加し、30 分毎に 2 時間後までルシフェラーゼ活性を測定する。

スクリーニング系の評価指標として使用される Z'スコアは $1 - ((3 \times \text{標準偏差}_{\text{DMSO}}) + (3 \times \text{標準偏差}_0) / (\text{平均}_{\text{DMSO}} - \text{平均}_0))$ で計算した。標準偏差₀ および 平均₀ は 96 穴プレートの両端列に設定した細胞を播種しないウェルの発光値から計算し、標準偏差_{DMSO} および 平均_{DMSO} は細胞を播種したそれ以外のウェルにスクリーニング化合物の対照として DMSO を加えた上で測定した発光値から計算した。Z'スコア 0.5 以上をスクリーニング系として許容可能と考えた[32]。

⑤ HBV minicircle DNA 抽出

Minicircle DNA の抽出は既報[33]に則って行った。まず、親プラスミド (pre-mcHBV-Gluc、pre-HBV circle genotype D、pre-mcHBV-Gluc-ΔX) を Θ C31 integrase および I-SceI endonuclease を発現することができる ZYCY10P3S2T *Escherichia coli* (System Biosciences) にトランスフォームした。翌日、50 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンを添加した 5 mL の Terrific Broth (pH 7.0) にコロニーをピックアップし、37°C で 250 rpm にて 4 時間振

盪した後、その培養液 50 μ L を 200 mL の Terrific Broth (pH 7.0, 50 μ g/mL カナマイシン) に添加し、16 時間 32°C 250 rpm で振盪した。次いで、Minicircle 誘導液 (200 mL Luria-Bertani broth, 8 mL 1 N 水酸化ナトリウム, 0.2 mL 20% L-アラビノース) を添加し、5 時間 32°C 250 rpm で振盪した。そして、Minicircle DNA を HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) で抽出した。推奨プロトコールから倍量の P1, P2, P3 を使用した。アガロースゲル電気泳動で genomic DNA および親プラスミド DNA のコンタミネーションがないことを確認した。

⑥ プラスミドのトランスフェクションおよびウイルスのトランスダクション

トランスフェクションには Effectene Transfection Reagent (Qiagen) を用いた。mcHBV-Gluc や mcHBV-Gluc- Δ X のトランスフェクションの際には Gluc activity を標準化するために control plasmid として pCMV-Cluc を共にトランスフェクションした。

Flag-HBx 定常発現細胞の樹立には、Lentivirus Packaging System (System Biosciences) を用いた。具体的には、1.0 μ g の Flag-HBx 発現ベクターおよび 5.0 μ g pPACKH1 パッケージングプラスミドを HEK293T 細胞に共トランスフェクションした。その 24 時間後に、培養上清を回収し、1/4 量の PEG-it Reagent (System Biosciences) と混合した上で、ウイルス濃縮のために 4°C で 16 時間インキュベートした。溶液から遠心で得たペレットを 1 \times phosphate-buffered saline (PBS) に溶解し、レンチウイルス溶液とした。レンチウイルスは polybrene (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を用いて、HEK293T および

HepG2 細胞に導入し、6 mg/mL puromycin でセレクションを行った。

⑦ Western Blot 法および抗体

培養細胞に細胞溶解バッファー(50 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、1% Triton-X, 1 mM Na₃VO₄、50 mM NaF)を添加し、氷上で 10 分間反応後にセルスクレイパーを用いて溶解液を回収した。これを 10–20% SDS-PAGE にて電気泳動で展開し、PVDF メンブレン (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)へ転写を行った。5% ドライミルクで1時間ブロッキングを行った後、Immunoshot reagent 1 (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) で希釈した 1 次抗体を4℃ 振盪下で 16 時間反応させた。Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) で洗浄後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 IgG 二次抗体(GE Healthcare, Little Chalfont, UK) と振盪下にて室温で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、Immunostar 発色液 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)で発色させ、WSE-6100 LuminoGraph I (ATTO, Tokyo, Japan)でシグナルを観察した。

各一次抗体の入手先と希釈率は次の通りである。Smc5 (#ab18038, 1:10,000; Abcam, Cambridge, UK); β -actin (#A1978, 1:10,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA or #5125, 1:10,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); Hepatitis B preS2 (#NB100-93580, 1:1,000; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA); DDB1 および GST タグ(順に#5428, 1:1,000 および#2625S, 1:1,000; Cell Signaling Technology); FLAG (DYKDDDDK) タグ(#018-22381, 1:1,000; Wako Pure Chemical Industries Ltd.)。

蛋白バンド濃度は ImageJ software version 1.49v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて定量した。

⑧ 免疫沈降法

免疫沈降法には抗 DYKDDDDK タグ抗体磁気ビーズ (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) を用いた。磁気ビーズは IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM 塩化ナトリウム, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% ゼラチン, 0.02% アジ化ナトリウム)で事前に洗浄し、細胞溶解液と混合し、4℃で一晩反応させた。磁気分離器でビーズを単離し、IP buffer で洗浄後、4× SDS サンプルバッファー(0.25 mol/L Tris-HCl, 8% SDS, 40% グリセロール, 0.02% ブロモフェノールブルー, pH 6.8)と混合の上、95℃で3分間反応させることで沈降蛋白を溶出させた。DYKDDDDK タグ結合蛋白は前述の Western blot 法にて検出した。この際、免疫沈降した抗体の H 鎖と L 鎖による干渉を避けるため、TrueBlot anti-mouse IgG HRP (1:1,000; Rockland, Limerick, PA, USA)を2次抗体として使用した。

⑨ *in vitro* GST プルダウン法

GST-DDB1 蛋白(Abcam) および HBx 蛋白 (Abcam) を用いた。NTZ もしくは DMSO を添加した IP buffer に両蛋白を加え、4℃で20分間反応させたのち、GST-DDB1 とそれに結合した HBx 蛋白を抗 GST 抗体(#2625S, 1:200; Cell Signaling Technology)およびプロテイン A/G アガロースゲル (Santa Cruz Biotechnology)で沈降させた。沈降蛋白は

前述の Western blot 法で検出した。

⑩ Gluc および Cluc 活性測定

mcHBV-GLuc からの Gluc シグナルは分泌型のルシフェラーゼで、HBV pgRNA に由来し、cccDNA からのウイルス RNA 転写活性の指標となる[30]。Gaussia と Renilla は同じ基質を使用して光生成反応を触媒するため、Dual Reporter Assay System (Promega) の Renilla ルシフェラーゼ活性測定用試薬を使用して、Gluc 活性を測定した。Gluc 測定には、10 μ L の培養培地を 50 μ L の *Renilla* luciferase assay reagent (Promega) に加え、ルミノメーター (Lumat LB 9507; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) で 10 秒間積分して発光を測定した。Cluc の場合、1.0 μ L の培地を 10 μ L の Cluc アッセイ溶液 (BioLux Cypridina Luciferase Assay Kit, New England BioLabs) に加え、発光を測定した。特に指定がない限り、相対 Gluc 活性は Cluc で標準化し計算した。mcHBV DNA コピー数を標準化に使用する場合、mcHBV-Gluc DNA の定量は 5'-ATGGTGAATGGCGTGAAG-3' (sense) 、5'-TAGGTGTCATCGCCGCCAGC-3' (antisense) のプライマーを用いて定量 PCR で行った [34]。

⑪ 細胞障害性試験

Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いた。100 μ L の HepG2 もしくは HepG2^{Flag-HBx} 細胞懸濁液を 96 穴プレートに 5000

cells/wellで播種し、24時間培養した。その後、培養液を交換し、NTZを1.0、5.0、10、20、40、60、80、100、200 μ Mの各濃度で加え、さらに24時間培養した。10 μ LのCCK-8溶液を各ウェルに加え、3時間反応させたのち、microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で450 nmの吸光度を測定した。細胞生存率は、 A_{NTZ} をNTZを加えたウェルでの吸光度、 A_{blank} を細胞を播種していないウェルでの吸光度、 $A_{control}$ をNTZを加えていないウェルでの吸光度と定義した上で $[(A_{NTZ} - A_{blank}) / (A_{control} - A_{blank})] \times 100$ によって計算した。

初代ヒト肝細胞においては、48穴プレートに播種された細胞を用いた。細胞に1.0、5.0、10、20、50、80、100 μ Mの濃度でNTZを加え、3日間培養したのちに、上述の方法でCCK8溶液を加えることで細胞生存率を測定した。

⑫ 初代ヒト肝細胞におけるHBV感染法

初代ヒト肝細胞へのHBV感染は既報[35]に則って行った。Phoenix Bio Co.より購入したHBVゲノタイプCに感染させたヒト肝細胞キメラマウスの血清を1細胞当たり5 viral genomeの濃度で4% PEG 8000と共にdHCGMに加え、37°Cで24時間培養した。その後、細胞はPBSで洗浄し、dHCGMで培養した。培養上清はHBV感染後2日と7日で交換した。NTZ (20 μ M)またはDMSOは感染後2日目または8日目から開始した。NTZやDMSO添加培養液は5日連続で24時間毎に交換した。

⑬ HBV RNA 定量

細胞内 RNA の抽出は RNeasy mini kit (Qiagen)を用いた。この際、DNase 処理を行っている。抽出した RNA は SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA に逆転写した。定量 PCR は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo Co, Osaka, Japan) および StepOnePlus real-time PCR system を用いて行った。HBV 3.5-kb mRNA および全 HBV RNA 量は β -actin もしくは glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)量により補正し、定量した。用いたプライマーは次の通りである。HBV 3.5-kb mRNA, 5'-GAGTGTGGATTCGCACTCC-3' (sense) および 5'-GAGGCGAGGGAGTTCTTCT-3' (antisense) (標的配列:ゲノタイプ D(HE815465.1) および ゲノタイプ C (AB246345)における nucleotide (nt) 226 から 2390); 全 HBV mRNA, 5'-TCACCAGCACCATGCAAC-3' (sense for ゲノタイプ C) または 5'-GCACCAGCACCATGCAAC-3' (sense for ゲノタイプ D) および 5'-AAGCCACCCAAGGCACAG-3' (antisense) (標的配列:ゲノタイプ D (HE815465.1) およびゲノタイプ C (AB246345)における nt 1803 から 1894。これは全ての HBV RNA (3.5-および 2.4-, 2.1-, 0.7-kb mRNAs をカバーする); β -actin, 5'-CTGTGCTACGTCGCCCTGG-3' (sense) および 5'-GCCACAGGACTCCATGCCC-3' (antisense); GAPDH, 5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3' (sense)および 5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3' (antisense).

⑭ HBV DNA 定量

培養上清中の HBV DNA の定量 PCR は SRL (Tokyo, Japan) に外注した。

⑮ HBV cccDNA の単離

mcHBV genotype D を用いた実験系においては、Hirt 法[36,37]により cccDNA を含む HBV DNA を抽出した。まず、培養細胞へ SDS を添加することで、脂質膜およびウイルス殻を破壊しウイルス DNA を抽出した。次いで、次に、高濃度の塩を添加し、SDS-蛋白質複合体の DNA に共有結合した高分子量の細胞クロマチンと蛋白質を沈殿させ、ウイルス DNA をフェノール・クロロホルム抽出法により単離した。Droplet digital PCR (ddPCR) を行う際には、抽出した DNA を二段蒸留水により、0.5 µg/µL に濃度を調整した。

初代ヒト肝細胞を用いた実験系においては、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) および plasmid-safe DNase (PSAD) (Epicentre, Madison, WI, USA) を用いて cccDNA を単離した。具体的には、まず QIAamp DNA Mini Kit で全 DNA を培養細胞から抽出し、200 ng の抽出 DNA を 2 µL 10× PSAD buffer、1 µL PSAD、0.8 µL 25 mM ATP と混合し、二段蒸留水で全量 20 µL に希釈した。この混合液を 37°C 2 時間で反応後、70°C 30 分で反応を停止させた。

⑯ ddPCR による cccDNA の定量

ddPCR は QX200 Droplet Digital PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用

いて行った。20 μ L ddPCR 反応液 (1 μ L テンプレート DNA、10 μ L 2 \times ddPCR Supermix for Probe [no dUTP]、900 nM forward および reverse プライマー、250 nM プローブ) と 70 μ L droplet generation oil を DG8 cartridge に添加し、ドロップレットを作製した。次いで、そのドロップレットを専用 PCR plate に移し T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いて、95°C 10 分、35 サイクルの 94°C 30 秒・57°C 60 秒、98°C 10 分の設定で PCR を行った。反応液は QX200 droplet reader および QuantaSoft software を用いて、絶対定量を行った。既報[38]に則って、cccDNA 定量用のプライマーは forward primer, nt 1561–1579 5'-CTTCTCATCTGCCGGACC-3' および reverse primer, nt 1865–1883 5'-CACAGCTTGGAGGCTTGA-3'とした。PCR 増幅シグナル検出のためのプローブは HBV DNA minus-strand gap 領域を標的とするように nt 1838–1861 FAM-5'-AGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT-3'-BHQ で設計した。

⑰ Southern Blot 法

10 μ g の Hirt 法で抽出した DNA を 1.2% TBE アガロースゲルで 25 V 16 時間電気泳動した。ゲル内で分離した DNA は Hybond-N+ membrane (GE Healthcare) にキャピラリートランスファー法で転写した。転写後のメンブレンは 120 mJ/cm² の紫外線照射でクロスリンクを行った。ハイブリダイゼーション用の HBV RNA プローブは推奨プロトコールに従って、DIG Northern starter kit (Roche, Basel, Switzerland) で作製した。mcHBV genotype D プラスミドを鋳型として T7 RNA polymerase プロモーターを含む

5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGTGC GCAGACCAATTTATGC-3' (sense) と 5'-GCACCATGCAACTTTTTTCAC-3' (antisense)のプライマーで PCR 反応を行い、*in vitro* transcription 法で digoxigenin-11-UTP ラベルをし RNA を精製した。作製した RNA プローブを DIG Easy Hyb (Roche) を用いてメンブレンにハイブリダイゼーションし、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche) でシグナルを検出した。各バンドの同定のために、85°Cで 5 分加熱した Heat-denatured Hirt DNA および、それをさらに制限酵素 EcoRI で切断した DNA を用いた。

⑱ 培養上清中 HBs 抗原定量

培養上清中の HBs 抗原測定のための Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)は SRL に外注した。

⑲ 統計分析

全ての統計解析は R version 3.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を用いて行った。連続変数は各群の平均値±標準偏差(SD)で表した。2群間の比較には Welch の *t* 検定を用いた。*P* 値 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

4. 結果

① HBx-DDB1 結合阻害剤スクリーニング系の確立

HBx-DDB1 結合阻害剤のスクリーニングを行うために、Split luciferase を活用した。

Large Bit (LgBit) (17.6 kDa) および Small Bit (SmBit) (11 アミノ酸)の大小に分割された NanoBit サブユニット自体同士の結合力は非常に弱いため、その結合は LgBit・SmBit を付加した蛋白同士の結合力に依存する[39]。この LgBit、SmBit を HBx および DDB1 に付加することで、HBx-DDB1 結合阻害剤のスクリーニング系を樹立することとした(図 5)。

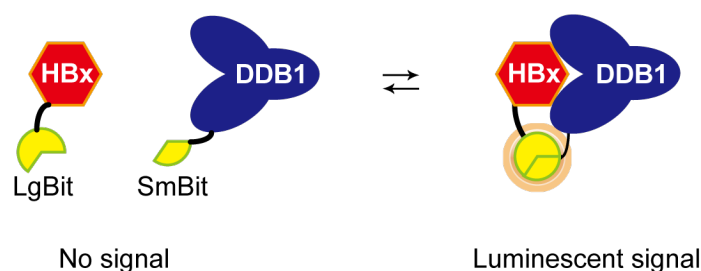


図 5 Split luciferase を利用した HBx-DDB1 結合活性測定

分割された NanoBit サブユニットである、Large Bit (LgBit)および Small Bit (SmBit) 同士の結合力は弱いため、それが付加された HBx および DDB1 が結合していない時は発色しないが、HBx-DDB1 結合が起こると、LgBit-SmBitも結合しルシフェラーゼ活性を示す。また、この反応は可逆的である。

この際、各ルシフェラーゼ断片を目的蛋白の N 端もしくは C 端のどちらに付加するかで、発色効率が変化することが知られているため[39]、まずは想定される 8 種類全ての付加位置の組み合わせでルシフェラーゼ活性を測定した(図 6)。

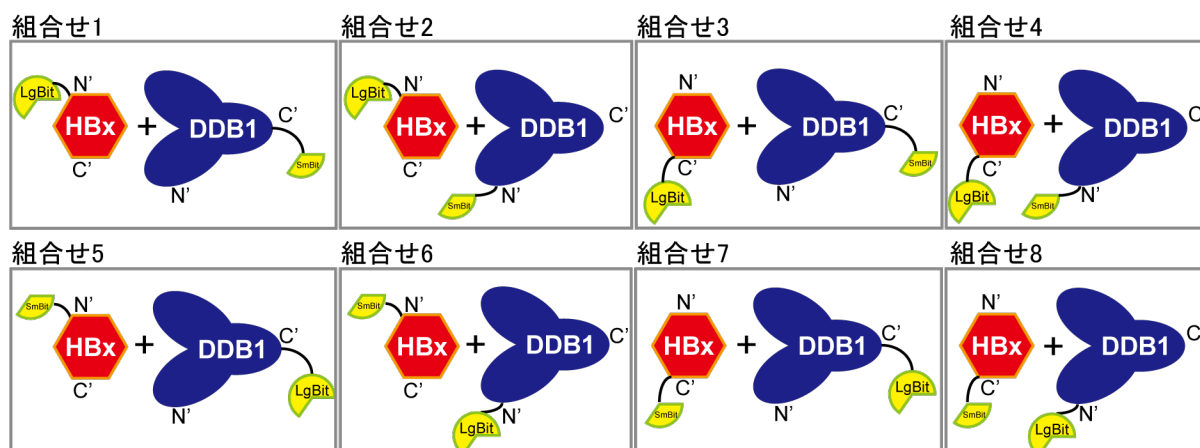


図6 Split luciferase の付加位置の全ての組合せ

Large Bit (LgBit)および Small Bit (SmBit)の適切な付加位置を決定するための全組合せ。
N', N 末端; C', C 末端。

結果、HBx の C 端に LgBit (HBx-LgBit)、DDB1 の N 端に SmBit (SmBit-DDB1)

を付加した組み合わせが最もルシフェラーゼ活性が高かった(図 7)ため、以降はこの組み合わせを用いることとした。

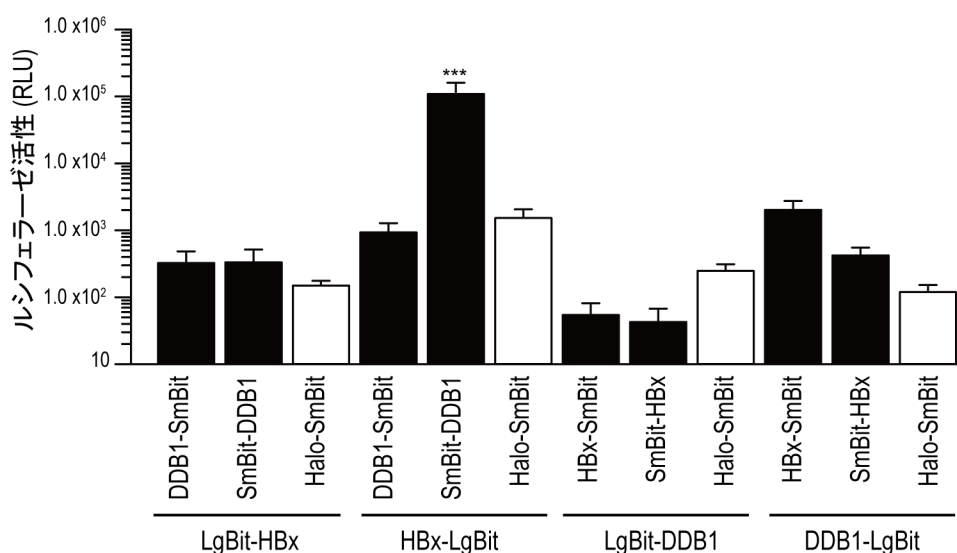


図7 HBx-LgBit と SmBit-DDB1 との組み合わせが最適である

HBx-LgBit と SmBit-DDB1 の組み合わせが最も高いルシフェラーゼ活性を示す。SmBit を Halo-tag の C 端に付加した Halo-SmBit を Negative Control として用いた。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。*** $P < 0.001$ (t 検定)。

② HBx-DDB1 結合阻害剤の同定

今回は、臨床応用への近道とされるドラッグリポジショニング[40]を目指して、817 種類の FDA 承認済薬剤で構成される化合物ライブラリーをスクリーニング対象とした。ルシフェラーゼ活性は化合物添加前と添加後 30 分毎に 120 分後まで測定した。化合物の HBx-DDB1 結合阻害活性は、化合物添加前のルシフェラーゼ活性で標準化した上で、化合物の溶媒である DMSO を添加したウェルと比較し検証した。なお、実際の検証前に、スクリーニング系の精度の指標として最も重要とされる Z'スコア[32]を計算したところ、0.6 を超える値であり、精度は十分に高いと評価できた(図 8)。

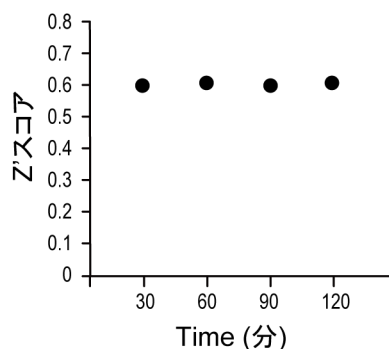


図 8 アッセイ系における Z'スコア

各ルシフェラーゼ測定タイミングにおける、系の精度の指標である Z'スコアの算出結果。

対 DMSO で 40%以上のルシフェラーゼ活性低下を有意と定義し、HEK293T 細胞株で行った一次スクリーニングにおいて、817 化合物中 5 化合物(トレミフェン、ロペラミド、ピモジド、ビンブラスチン、NTZ)に候補が絞り込まれた(図 9a)。この 5 化合物は pan assay interference compounds [41]と総称される偽陽性率の高い化合物ではなかった。使用する細胞株を HepG2 に変えた二次スクリーニングにおいては、NTZ のみが有意な阻害活性を示し

た(図 9b)。また、この NTZ の阻害活性は投与濃度依存的であることを確認した(図 9c,d)。

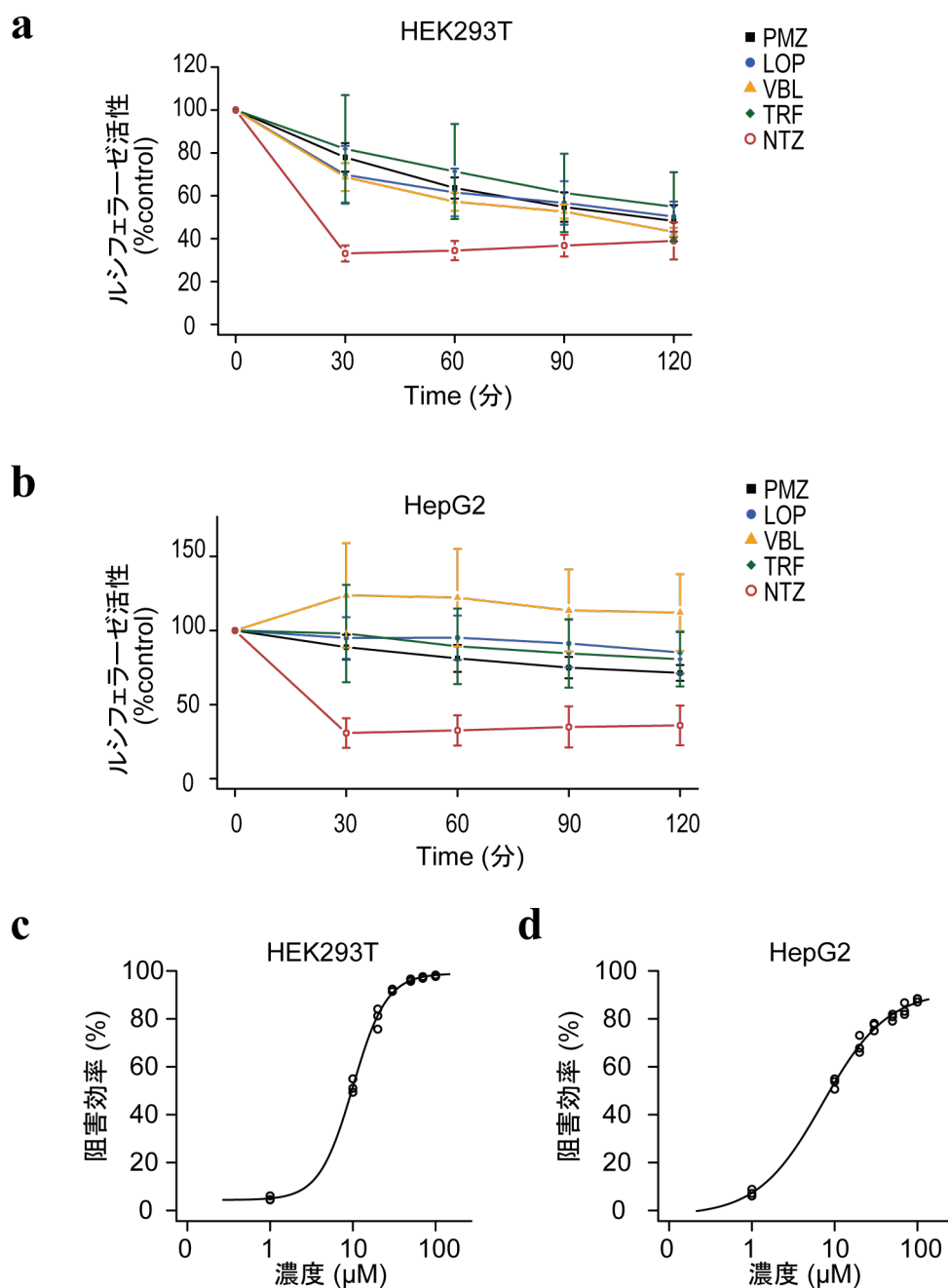


図 9 HBx-DDB1 結合阻害剤候補薬剤の同定

a, b, Split luciferase アッセイの HEK293T 細胞 (**a**) と HepG2 細胞 (**b**) とにおける時系列の結果。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。PMZ: ピモジド、LOP: ロペラミド、VBL: ビンブラスチン、TRF: トレミフェン、NTZ: ニタゾキサニド。各 10 μM 。

c, d, HEK293T 細胞 (**c**) と HepG2 細胞 (**d**) における NTZ の HBx-DDB1 結合阻害効果の投与濃度依存性。ルシフェラーゼ活性は化合物投与後 30 分で測定した。データは 3 回の独立した実験結果を示す。

また、NTZ の細胞障害性は通常の HepG2 細胞および Flag-HBx を定常発現する HepG2 細胞 (HepG2^{Flag-HBx}) においても 50%細胞毒性濃度 57 μ M、60 μ Mと低く(図 10)、先に示した NTZ の結合阻害活性は細胞障害性に基づくものではないことが示された。

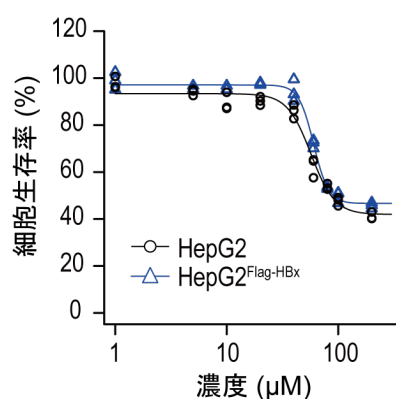


図 10 NTZ の細胞障害性は低い

HepG2 細胞または HBx 定常発現 HepG2 細胞 (HepG2^{Flag-HBx}) における NTZ 投与後の細胞生存率。各濃度の NTZ を 24 時間投与し、細胞数測定法により細胞生存率を計算した。データは 3 回の独立した実験から得た。

NTZ の HBx-DDB1 結合阻害効果を確認するために、Flag-HBx を用いた免疫沈降ウェスタンブロットを行った。HEK293T 細胞において、内因性の DDB1 に結合する Flag-HBx の量は NTZ の投与により有意に減少した(図 11a)。さらに、先述の5つの候補薬剤全てで免疫沈降ウェスタンブロットを行うと、NanoBit アッセイの結果と同じく、NTZ の Flag-X-DDB1 結合阻害効果が最も強かった(図 11b)。同様の結果は HepG2 細胞においても認められた(図 11c)。

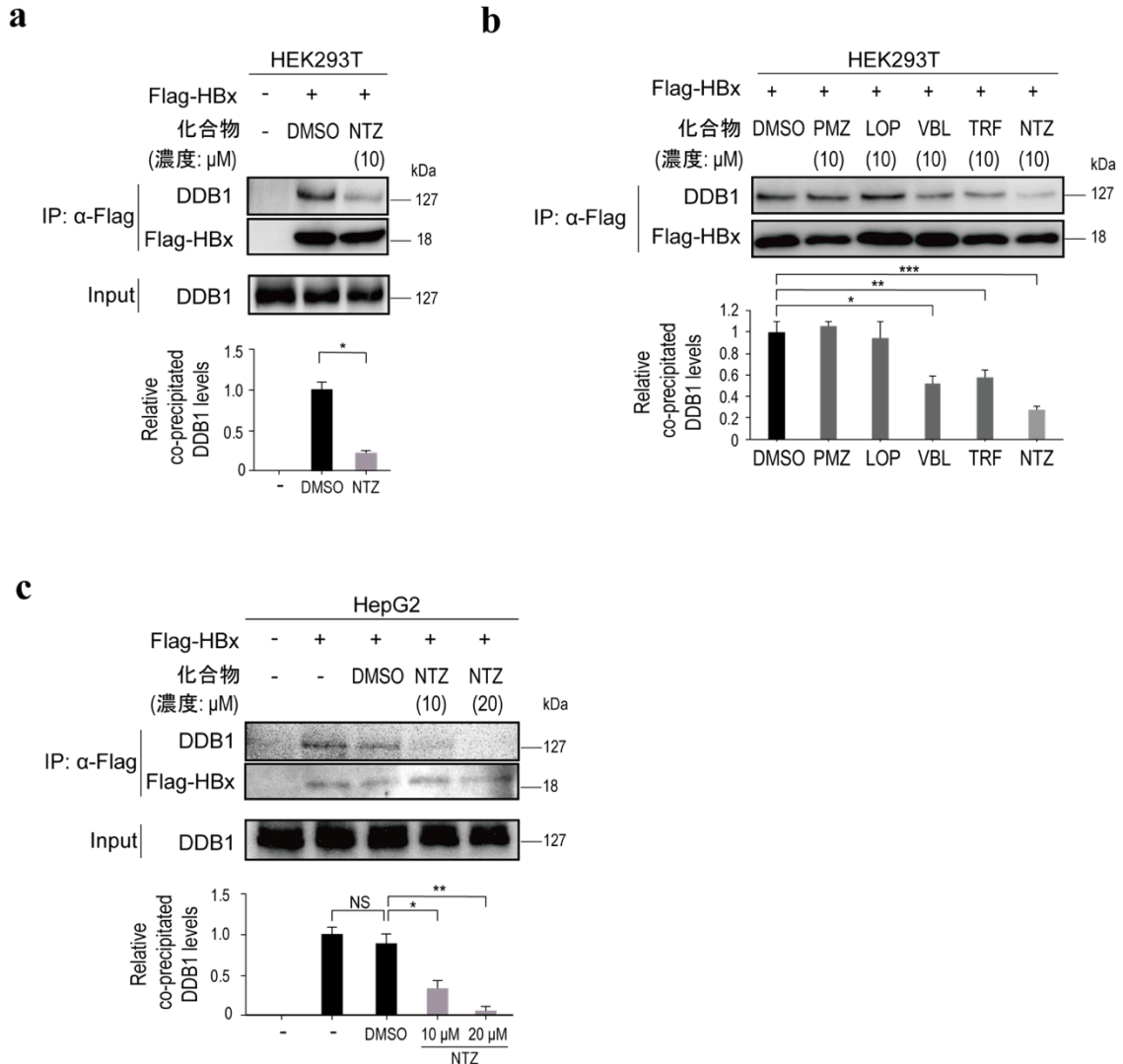


図 11 NTZ は HBx-DDB1 結合を阻害する

a, HEK293T 細胞に Flag-HBx をトランスフェクションし、NTZ (10 μM) もしくは DMSO を投与 24 時間後の抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降-ウェスタンブロットの結果。細胞溶解液の 5% を “Input” として用いた。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度 (免疫沈降 DDB1 バンド濃度/免疫沈降 Flag-HBx バンド濃度) を表す。 $*P = 6.8 \times 10^{-5}$ (t 検定)。

b, 候補 5 化合物 (全て 10 μM) 投与 24 時間後の免疫沈降-ウェスタンブロットの結果。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度(免疫沈降 DDB1 バンド濃度/免疫沈降 Flag-HBx バンド濃度)を表す。 $*P = 1.2 \times 10^{-3}$; $**P = 2.1 \times 10^{-3}$; $P = 1.5 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

c, HepG2 細胞での NTZ (10 μM , 20 μM) もしくは DMSO 投与 24 時間後の免疫沈降-ウェスタンブロットの結果。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度(免疫沈降 DDB1 バンド濃度/免疫沈降 Flag-HBx バンド濃度)を表す。NS, not significant ($P \geq 0.05$); $*P = 1.3 \times 10^{-3}$; $**P = 1.4 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

さらに、NTZ の HBx-DDB1 結合阻害効果が直接作用か間接効果かを検証するために、*in vitro* GST プルダウンアッセイを行った。NTZ は HBx に結合する GST-DDB1 の量を有意に減少させた(図 12)ため、NTZ の結合阻害効果は直接作用だと考えられた。これらの結果から、NTZ は HBx-DDB1 結合阻害効果を有すると考え、NTZ に着目して以降の実験を進めることとした。

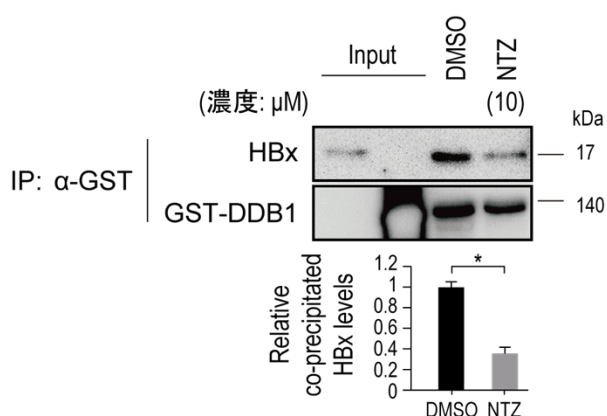
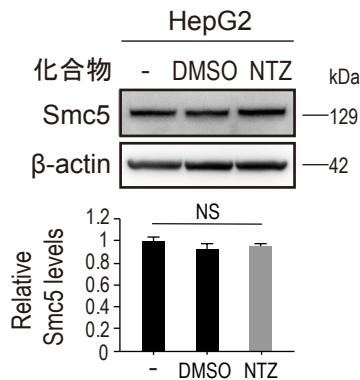
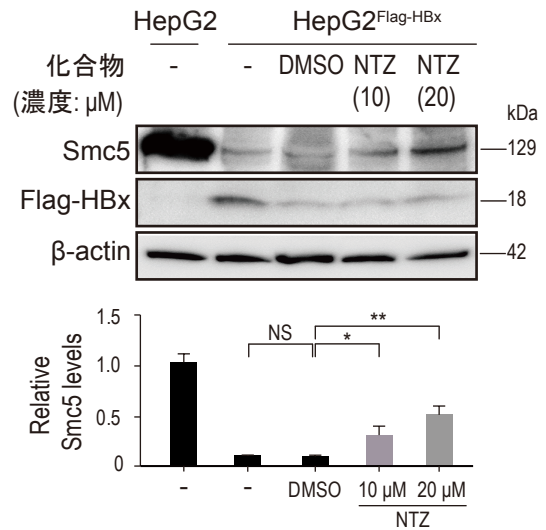


図 12 NTZ は HBx-DDB1 結合を直接阻害する

in vitro GST プルダウンアッセイの結果。GST タグの付いた DDB1 リコンビナント蛋白と HBx リコンビナント蛋白を混合し、NTZ (10 μM) もしくは DMSO を投与 20 分後に抗 GST 抗体で免疫沈降しウェスタンブロットを行った。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度(免疫沈降 HBx バンド濃度/免疫沈降 GST-DDB1 バンド濃度)を表す。 $*P = 7.1 \times 10^{-5}$ (*t* 検定)。

③ ニタゾキサニド(NTZ) は HBx による Smc5/6 の分解を阻害する

次に、NTZ が HBx による Smc5/6 の分解を阻害するか検討した。まず、NTZ は HepG2 細胞において Smc5 の発現量自体を変化させないことを確認した(図 13a)。既報[26-28]通り、HepG2^{Flag-HBx} 細胞において Smc5 は有意に分解されていたが、NTZ の投与によって部分的ではあるが発現が回復した。さらにこの効果は NTZ の投与濃度に依存した(図 13b)。これらの結果から、NTZ は HBx による Smc5/6 の分解を防ぐと考えられた。

a**b****図 13 NTZ は Smc5 発現を回復する**

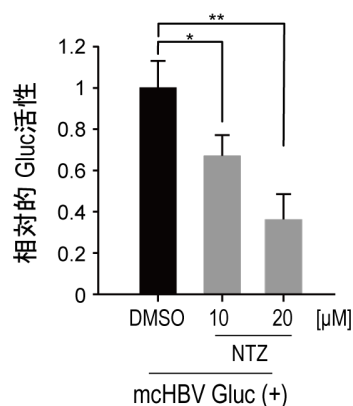
a, b, HepG2 細胞 (**a**) または HepG2^{Flag-HBx} 細胞 (**b**) における NTZ (10 μ M (**a**); 10 μ M または 20 μ M (**b**)) 投与 48 時間後の Smc5 発現量変化をみるためのウェスタンブロットの結果。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度を表す。NS, not significant ($P \geq 0.05$); * $P = 5.4 \times 10^{-3}$; ** $P = 1.1 \times 10^{-5}$ (t 検定)。

④ NTZ は cccDNA からの HBV RNA の転写を阻害する

次に、NTZ が HBV cccDNA からのウイルス RNA 転写を抑制するか、検討するために HBV 擬似複製モデルを用いて HBV RNA 量の変化を定量した。一つ目の HBV 擬似複製モデルとして、近年報告された HBV cccDNA を近似する minicircle DNA を用いた[30,31]。minicircle DNA は抗生剤耐性マーカーやその他のバクテリア・バックボーンを含まないため、余計な免疫応答等を惹起せず、長期間のウイルス RNA・蛋白発現を可能とし、HBV cccDNA も形成される[30,42]。まずは、分泌型ルシフェラーゼである *Gaussia luciferase* (Gluc) の発現配列を HBV ゲノム(ゲノタイプ C)の core 領域に組み込んだ mcHBV-Gluc を用いた。その設計により、上清中の Gluc 活性値は pgRNA 転写活性を近似する[30]。NTZ

はトランスフェクション効率補正のために共トランスフェクションした CMV-Cluc の活性に有意な影響を与えずに、Gluc 活性値を有意に低下させた(図 14a)。また、CMV-Cluc ではなく、定量 PCR で測定した細胞内の mcHBV-Gluc DNA レベルで Gluc 活性値を補正しても、NTZ の効果は同様に有意であった(図 14b)。

a



b

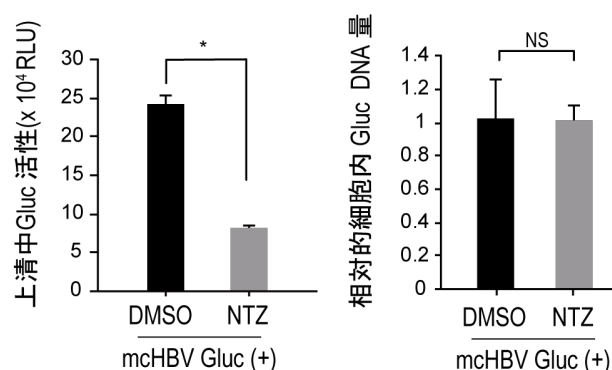


図 14 NTZ は HBV 擬似複製系においてウイルス RNA 転写を抑制する

a, mcHBV Gluc トランスフェクション後 HepG2 細胞における NTZ (10 μM または 20 μM) 投与 48 時間後 Gluc 活性測定の結果。相対的 Gluc 活性はコントロールプラスミド pCMV-Cluc 由来の Cluc 活性値による補正で算出した。データは 3 回の独立した実験から算出した平均 ± 標準偏差を表す。* $P = 2.0 \times 10^{-3}$; ** $P = 9.1 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

b, NTZ は mcHBV Gluc のトランスフェクション効率に影響しない。mcHBV Gluc トランスフェクション後 HepG2 細胞に NTZ (10 μM) 投与 72 時間後、上清中 Gluc 活性および細胞内 mcHBV Gluc DNA 量の定量結果。データは 3 回の独立した実験から算出した平均 ± 標準偏差を表す。* $P = 8.5 \times 10^{-6}$; NS, not significant ($P \geq 0.05$, t 検定)。

HBV 治療薬として現在用いられている核酸アナログ製剤のエンテカビルは逆転写酵素阻害剤であり、直接の HBV RNA 抑制効果は有さない。このことは mcHBV Gluc を用いた検討でも示された (図 15a)。IFN α は Gluc 活性抑制効果を示したが、NTZ はそれと比較して高い抑制効果を示した (図 15b)。

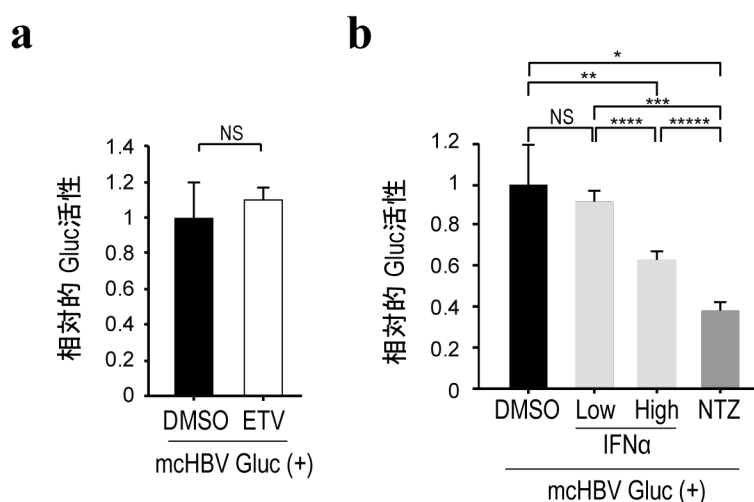


図 15 NTZ は既存薬よりも強いウイルス RNA 転写抑制を示す

a, mcHBV-Gluc トランスフェクション後 HepG2 細胞におけるエンテカビル (ETV, 25 nM) または DMSO 投与 48 時間後の相対的 Gluc 活性測定の結果。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。NS, not significant ($P \geq 0.05$, t 検定)。

b, mcHBV-Gluc トランスフェクション後 HepG2 細胞におけるインターフェロン α 2a (IFN α)、NTZ (10 μ M) または DMSO 投与 48 時間後の相対的 Gluc 活性測定の結果。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。IFN α Low, 1.0×10^3 units/mL; IFN α High, 5.0×10^3 units/mL; NS, not significant ($P \geq 0.05$); * $P = 2.8 \times 10^{-3}$; ** $P = 0.016$; *** $P = 1.0 \times 10^{-3}$; **** $P = 1.2 \times 10^{-3}$; ***** $P = 8.2 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

さらに、NTZ の効果は HBx 発現欠損変異体 mcHBV-Gluc- Δ X では消失したが、HepG2^{Flag-HBx} にトランスフェクションし HBx の発現を回復させることで、NTZ の効果も回復した (図 16)。これらの結果により、NTZ は HBV cccDNA における pgRNA プロモーター活性

を HBx 依存的に抑制することが示された。

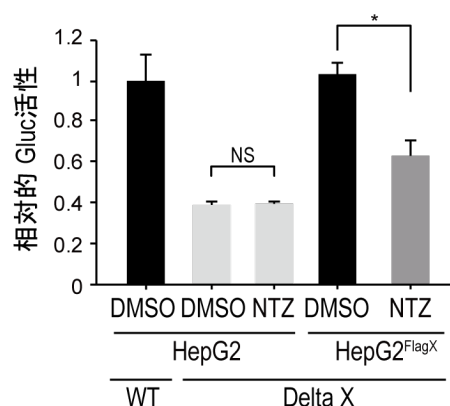


図 16 NTZ のウイルス RNA 転写抑制効果は HBx 依存的である

HBx 発現の有無による NTZ の相対的 Gluc 活性抑制効果。HepG2 または HepG2^{Flag-HBx} 細胞に mcHBV-Gluc (WT) または mcHBV-Gluc-ΔX (Delta X) をトランスフェクションし、NTZ (10 μM) または DMSO 投与 48 時間後の相対的 Gluc 活性を測定した。相対的 Gluc 活性は Gluc 活性値を共にトランスフェクションした pCMV-Cluc 由来の Cluc 活性値で補正したことを表す。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。 $*P = 1.1 \times 10^{-3}$; NS, not significant ($P \geq 0.05$, t 検定)。

次に、mcHBV-Gluc 由来のウイルス RNA 量を定量 PCR にて直接測定したところ、

NTZ は有意に全 HBV mRNA 量および 3.5 kb-HBV mRNA 量を低下させていた(図 17)。

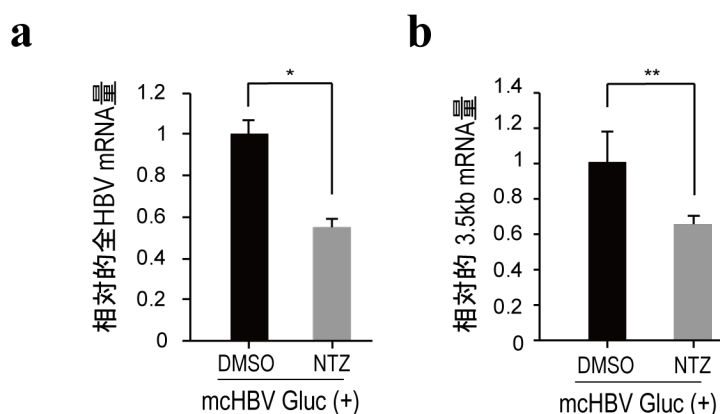


図 17 NTZ は mcHBV Gluc 由来ウイルス RNA 量を減少させる

a, b, mcHBV Gluc 由来の全 HBV mRNA 量 (**a**) および 3.5kb mRNA 量 (**b**) の NTZ (10 μM) 投与 48 時間による変化。相対化には β-actin 量を利用した。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。 $*P = 2.7 \times 10^{-4}$, $**P = 1.2 \times 10^{-2}$ 。

ここまでの結果を別のコンストラクトおよび他のゲノタイプで確認するために、Gluc 埋め込み無しの minicircle HBV ゲノタイプ D (mcHBV genotype D) [31]を用いた。NTZ の投与は mcHBV genotype D 由来の全 HBV mRNA および 3.5 kb mRNA を有意に低下させた(図 18)。

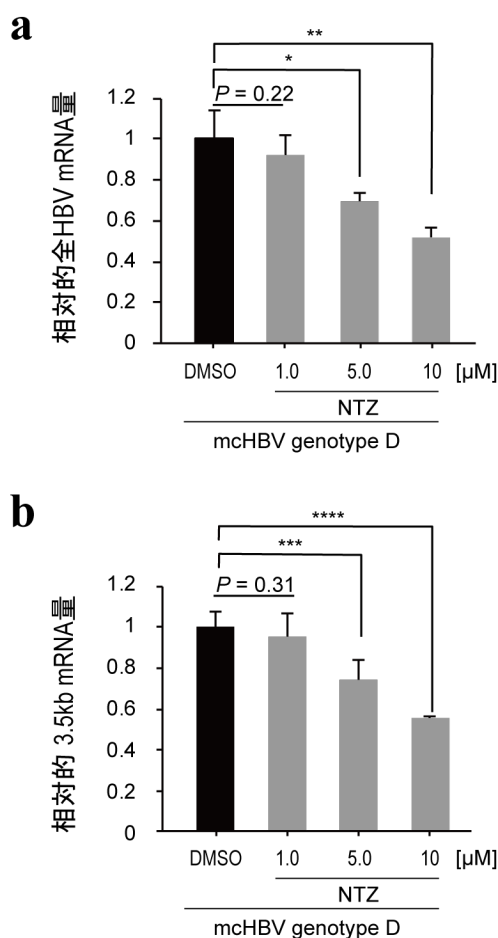


図 18 NTZ は mcHBV genotype D 由来ウイルス RNA 量を減少させる

a, b, mcHBV genotype D 由来の全 HBV mRNA 量 (**a**) および 3.5kb mRNA 量 (**b**) の NTZ (1.0 μM, 5.0 μM または 10 μM) 投与による変化。相対化には β-actin 量を利用した。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。 $*P = 9.7 \times 10^{-3}$; $**P = 2.2 \times 10^{-3}$; $***P = 1.1 \times 10^{-2}$; $****P = 2.4 \times 10^{-4}$ (*t* 検定)。

さらに、他の HBV 擬似複製系として HepAD38 細胞株[43]を用いた。この細胞株は HBV DNA 配列がゲノム DNA に組み込まれており、テトラサイクリン制御下で HBV pgRNA

を産生することができる。テトラサイクリン投与によりゲノム由来のHBV pgRNAの産生を停止させた2日後にNTZを投与したところ、cccDNA由来と考えられる3.5 kb HBV mRNA量は有意に低下した(図19)。以上の結果より、NTZは有意にcccDNAからのウイルスRNA転写を抑制することが示された。

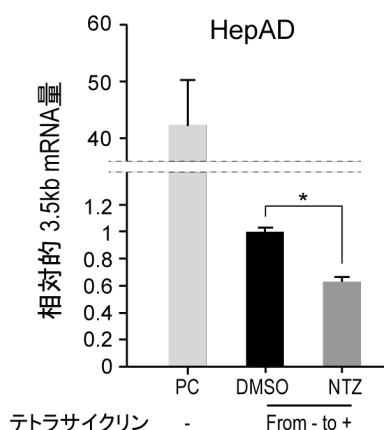


図19 NTZはHepAD38細胞においてもウイルスRNA量を減少させる

HepAD38細胞におけるNTZ (10 μ M) 投与5日間によるHBV 3.5 kb mRNA量の変化。相対化には β -actin量を利用している。NTZもしくはDMSO投与開始2日前にテトラサイクリンを培養液に添加している(From - to +)。データは3回の独立した実験から算出した平均 \pm 標準偏差を表す。 $*P = 7.3 \times 10^{-5}$ (t 検定)。PC, positive control (テトラサイクリン非含有培養液にて長期間培養した細胞)。

⑤ NTZはウイルス蛋白およびcccDNA量を減少させる

次に、NTZ投与によるウイルス蛋白量の変化をHBV擬似複製系で評価した。

mcHBV genotype Dをトランスフェクションし、6日後から12日後までNTZを投与し、ウェスタンブロットを行ったところ、Smc5の発現はNTZ投与濃度依存的に回復し、それに伴いHBs抗原量は有意に低下した(図20)。

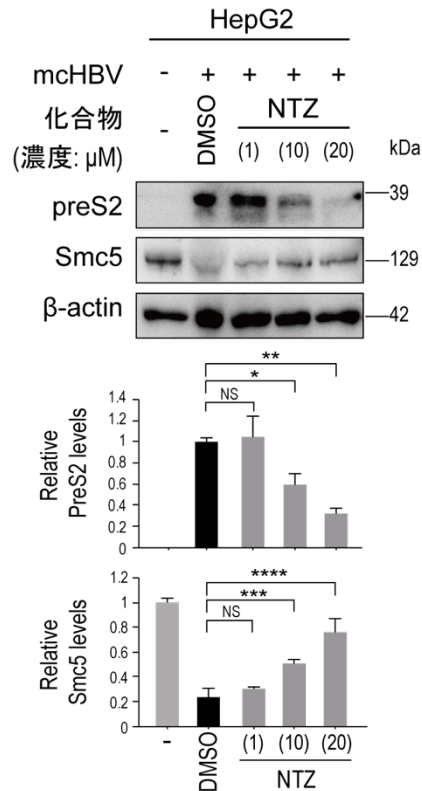


図 20 NTZ は mcHBV genotype D 由来ウイルス蛋白発現を抑制する
 mcHBV genotype D トランスフェクション後 HepG2 細胞におけるウェスタンブロット。NTZ (1 μM, 10 μM または 20 μM) 6 日間の投与による Smc5 および HBs 抗原量 (preS2) の変化。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度を表す。NS, not significant ($P \geq 0.05$); $*P = 1.6 \times 10^{-3}$; $**P = 1.1 \times 10^{-3}$; $***P = 1.6 \times 10^{-3}$; $****P = 1.1 \times 10^{-3}$ (t 検定)。

HBV RNA や蛋白の低下は cccDNA 量の低下につながり得る[20,44,45]ため、NTZ 投与後の cccDNA 量を定量することとした。Hirt 法[36,37]により cccDNA を抽出し、ddPCR[38]および Southern blot[37]により定量した。結果、わずかではあるが有意に cccDNA 量は NTZ 投与により低下した(図 21a)。これは pgRNA から新規に複製される cccDNA が pgRNA 量低下に伴って減少したこと[45]、また、HBx 蛋白量の低下により cccDNA の安定性が低下したこと[44]が理由として考えられた。ddPCR が cccDNA 量を測定するための特異性と精度を有していることを確認するため、Southern blot により cccDNA を

視覚化した(図 21b)。これらの結果により、NTZ が cccDNA からのウイルス転写を抑制し、cccDNA 量をわずかに低下させることが示された。

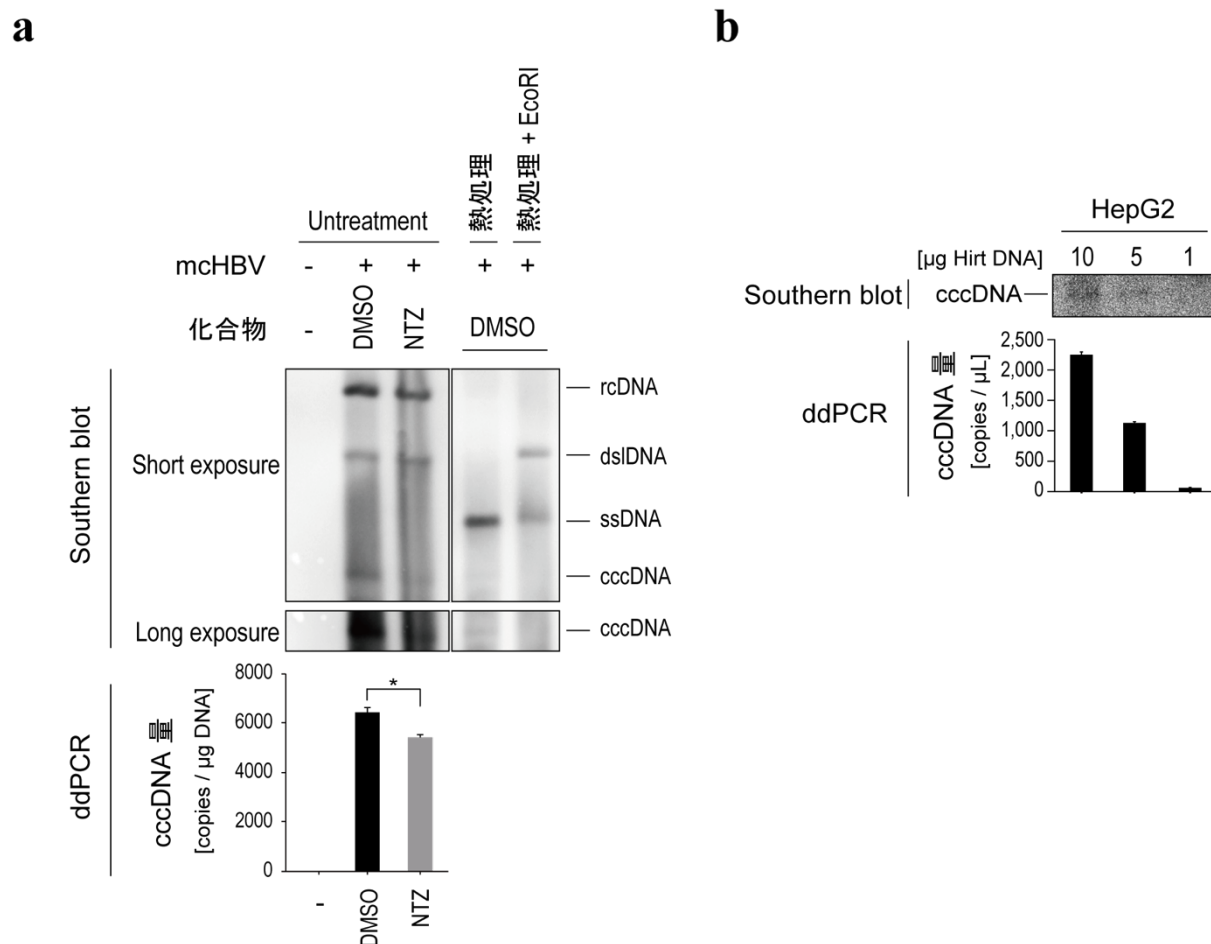


図 21 NTZ は cccDNA 量を減少させる

a, mcHBV genotype D トランスフェクション後 HepG2 細胞における NTZ (10 μ M)または DMSO 投与 48 時間後のサザンブロットおよび droplet digital PCR (ddPCR)。NTZ の投与により、cccDNA 量は減少する。未処理 (Untreatment) の Hirt DNA では relaxed circular DNA (rcDNA)、double strand linear DNA (dslDNA)、cccDNA のバンドが観察され、熱処理した Hirt DNA では single strand DNA (ssDNA)および cccDNA のみ、熱処理後に EcoRI 切断処理をした Hirt DNA では dslDNA、ssDNA のみが観察される。短時間露光画像 (Short exposure) と cccDNA 観察のために長時間露光した画像 (Long exposure) を示す。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。下段は同サンプルにて ddPCR を行った結果。データは 3 回の独立した実験から算出した平均 \pm 標準偏差を表す。* $P = 8.5 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

b, ddPCR の cccDNA 量測定精度。mcHBV genotype D トランスフェクション後 HepG2 細胞から抽出した Hirt DNA 10 μ g、5 μ g、1 μ g でサザンブロットと ddPCR で cccDNA 量の測定をした。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。

⑥ NTZ は HBV 感染系において抗ウイルス効果を示す

最後に、NTZ の抗ウイルス効果を初代ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系で検証した。

初代ヒト肝細胞には HBV が持続感染をし、その生活環が再現される[35]。HBV (ゲノタイプ C) を感染させ、NTZ もしくは DMSO 投与を 5 日間行い、Smc5 蛋白やウイルス RNA、ウイルス蛋白、cccDNA の量を評価した。各ウェル間で感染効率に差がないことを、NTZ もしくは DMSO 投与前の培養上清中の HBs 抗原および HBV DNA を定量することで確認した(図 22)。

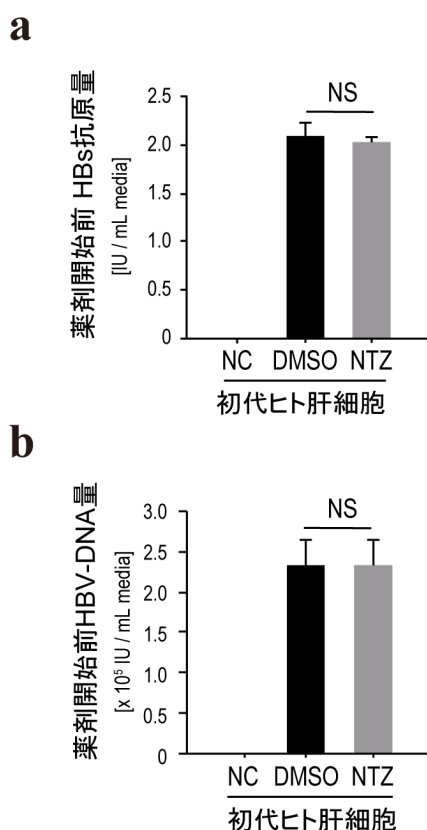


図 22 NTZ 開始前の HBV 感染効率に差はない

a, b, 初代ヒト肝細胞における HBV 感染後 8 日目の培養上清中 HBs 抗原量 (a) および HBV-DNA 量 (b)。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。NC, negative control (HBV を感染させていない初代ヒト肝細胞); NS, not significant ($P \geq 0.05$)。

また、NTZ は初代ヒト肝細胞への障害性が今回の使用濃度 20 μM において低いことを確認した(図 23)。

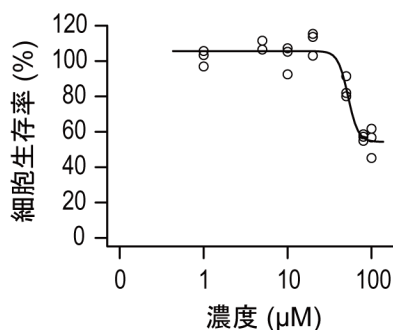


図 23 NTZ の初代ヒト肝細胞への細胞障害性は低い

初代ヒト肝細胞における NTZ 投与後の細胞生存率。各濃度の NTZ を 72 時間投与し、細胞数測定法により細胞生存率を計算した。データは 3 回の独立した実験から得た。

NTZ の 5 日間投与は Smc5 の分解を部分的に阻害した(図 24a)。これに伴い、ウイルス RNA 量も有意に低下した(図 24b,c)。培養上清中および細胞内の HBs 抗原量の有意な低下も認めた(図 24d,e)。同様に cccDNA 量に関しても部分的ではあるが有意な低下を認めた(図 24f)。

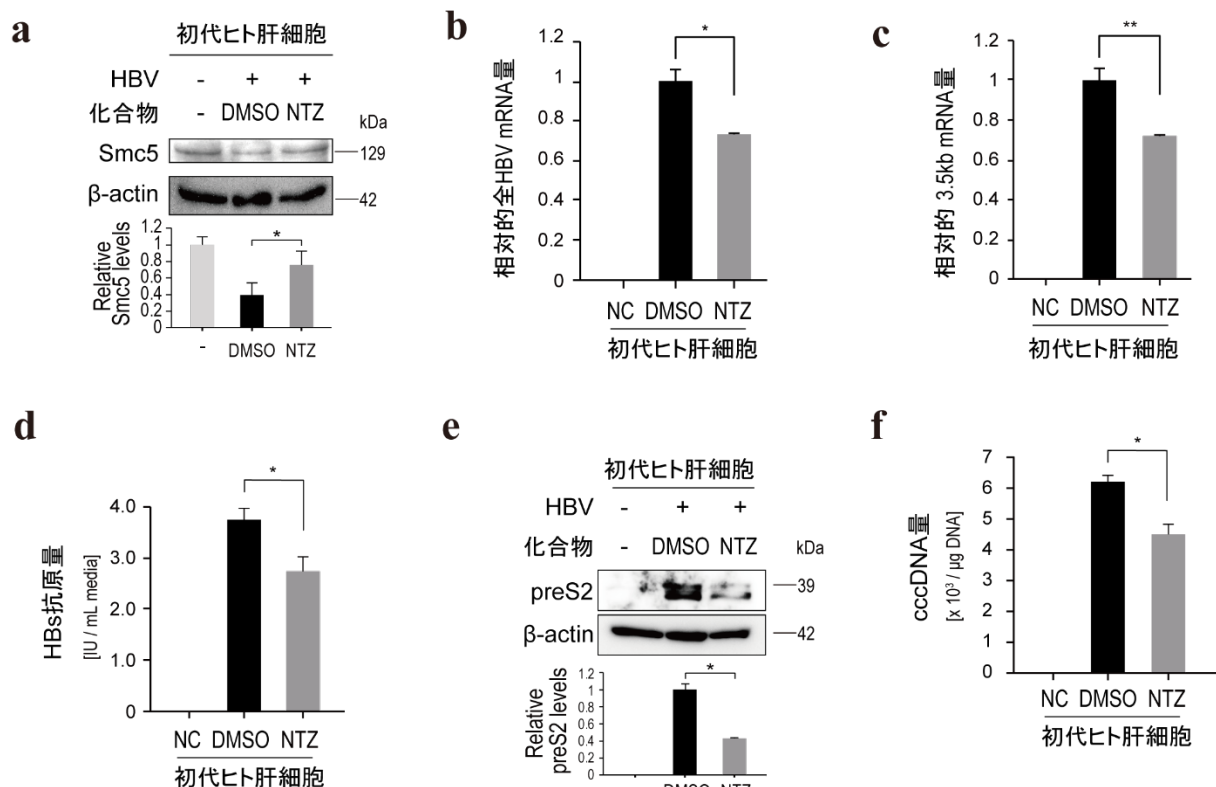


図 24 NTZ は初代ヒト肝細胞においても抗ウイルス効果を示す

a, 初代ヒト肝細胞における NTZ (20 μ M) もしくは DMSO を感染後 8 日目から 5 日間投与した後のウェスタンブロット。HBV 感染に伴い、Smc5 は発現低下するが、NTZ 投与により部分的に回復する。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度を表す。 $*P = 7.3 \times 10^{-5}$ (t 検定)。

b, c, (a)と同条件培養下における全 HBV mRNA (**b**) および 3.5 kb mRNA (**c**) の定量結果。相対化には β -actin 量を利用した。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。NC, negative control (HBV を感染させていない初代ヒト肝細胞); $*P = 3.3 \times 10^{-3}$; $**P = 3.8 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

d, (a)と同条件培養下における培養上清中の HBs 抗原量。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。NC, negative control (HBV を感染させていない初代ヒト肝細胞); $*P = 3.4 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

e, (a)と同条件培養下における細胞内ウイルス蛋白 (preS2) のウェスタンブロット。画像は 3 回の独立した実験から得た代表的な結果を表す。グラフは 3 回の独立した実験から算出した相対的バンド濃度を表す。 $*P = 5.8 \times 10^{-5}$ (t 検定)。

f, (a)と同条件培養下における droplet digital PCR による cccDNA 量。データは 3 回の独立した実験から算出した平均±標準偏差を表す。NC, negative control (HBV を感染させていない初代ヒト肝細胞); $*P = 6.7 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

また、NTZ 投与開始を感染後のより早期とすると、観察されるウイルス産物量の低下はより顕著となった(図 25)。以上の結果より、NTZ は Smc5/6 の回復を通じて、ウイルス RNA および蛋白の産生を抑制し、cccDNA 量の低下にも寄与することが示された。

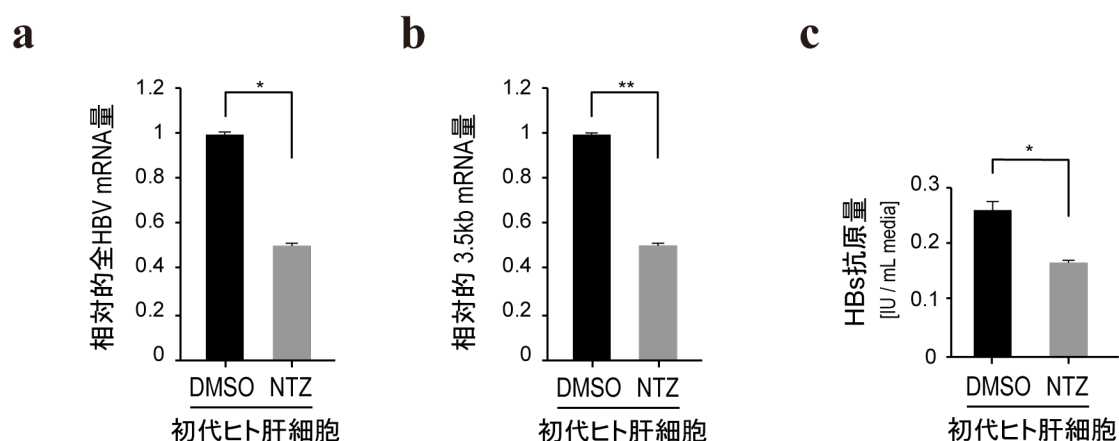


図 25 HBV 感染早期における NTZ の抗ウイルス効果

a, b, 初代ヒト肝細胞における NTZ (20 μ M) もしくは DMSO を感染後 2 日目から 5 日間投与した後の全 HBV mRNA (**a**) および 3.5 kb mRNA (**b**) の定量結果。相対化には GAPDH 量を利用した。データは 3 回の独立した実験から算出した平均 \pm 標準偏差を表す。 $*P = 2.7 \times 10^{-5}$; $**P = 1.7 \times 10^{-8}$ (t 検定)。

c, (**a, b**)と同条件培養下における培養上清中の HBs 抗原量。データは 3 回の独立した実験から算出した平均 \pm 標準偏差を表す。 $*P = 3.6 \times 10^{-4}$ (t 検定)。

5. 考察

本研究では、ドラッグリポジショニングを目指した化合物スクリーニングから NTZ を HBx-DDB1 結合阻害剤として同定した。NTZ は有意に HBV cccDNA からのウイルス RNA 転写を抑制し、以降のウイルス産物量を低下させることが示された。

既存の薬剤では HBV の長期治療目標である Functional cure の達成は困難である [11–17]。現在の第一選択薬である核酸アナログ製剤は HBV 生活環における逆転写の段階を効率良く抑制するものの、ウイルス RNA やウイルス蛋白量を直接的に抑制することはできず、肝細胞癌などの HBV 関連死を無くすことができないため、新規治療薬の開発が強く望まれている。そうした中、ウイルス蛋白 HBx は宿主蛋白である DDB1 に結合することで、HBx-DDB1-CUL4-ROC1 E3 ユビキチン酵素複合体を形成し、本来はユビキチン化を受けないはずの宿主蛋白 Smc5/6 をユビキチン化し分解することが近年報告された。Smc5/6 は HBV cccDNA からのウイルス RNA 転写を強く抑制するため、HBx と DDB1 との結合がウイルス RNA 転写制御に重要なステップとして、治療標的として注目されるようになった[26–28]。本研究で認めた NTZ による Smc5 の回復は、HBx 発現下でのみ観察されており、NTZ の Smc5 に対する効果は HBx-DDB1 結合阻害を介した HBx 依存的なものであると考えられる。

Smc5/6 の生体内における本来の重要な機能として、DNA 二本鎖切断に対する相同組換え修復の促進が挙げられる[46–51]。Smc5/6 は DNA 二本鎖切断部位へのコヒーシ

ンを誘導し、姉妹染色体と近接させ相同組換え修復を可能にすると言われおり[47]、Smc5/6の変異はDNAダメージの蓄積へと繋がる[52]。相同組換え修復の阻害はDNAダメージ蓄積に基づく発癌に寄与するとされており[53–55]、HBxによるSmc5/6の分解はウイルスRNA転写促進のみならず、相同組換え修復阻害による肝発癌促進効果をも有している可能性がある。

HBx–DDB1 結合阻害剤スクリーニング系を樹立するために Split luciferase を用いた。この系の樹立における最も重要な段階は、Split luciferase サブユニットの適切な付加位置の同定である[39]。HBx–DDB1 結合活性測定においては、HBx–LgBit および SmBit–DDB1 の組み合わせが適切であった。このようにスクリーニング系を確立することができたため、本研究においては、817 種類という比較的小規模な化合物ライブラリーでスクリーニングを行ったが、より大規模な化合物ライブラリーを用いることも容易に実現可能である。そうした追加スクリーニングは、NTZ よりもより効果的な HBx–DDB1 結合阻害剤を同定することに繋がる可能性を秘めており、今後の研究課題としていきたい。

さらに、今回用いた Split luciferase によるスクリーニング系は他の蛋白–蛋白結合阻害剤のスクリーニングにも応用可能である。蛋白–蛋白結合は重要な薬剤標的の一つとされている[56]。事実、他の種々のウイルスは宿主因子と相互作用することで、ウイルス複製促進や病原性の発揮を達成している[57,58]。Split luciferase を基礎とした蛋白–蛋白結合阻害剤のスクリーニング系は HBV のみならず他疾患の治療薬探索の手段ともなり得る。

NTZ は 2-acetyloxy-N-(5- nitro-2-thiazolyl) benzamide で表される経口のチアゾライド系抗菌薬であり、現在は *Cryptosporidium parvum* や *Giardia lamblia* といった原虫感染で引き起こされる腸炎の治療薬として小児および成人を対象に FDA により承認されている[59]。近年、NTZ はインフルエンザウイルス[60]やロタウイルス[61]、日本脳炎ウイルス[62]、風疹ウイルス[63]、ジカウイルス[64]、C 型肝炎ウイルス[65,66]、HBV[66]で抗ウイルス効果を示す可能性が言われている。ジカウイルスでは NS2B-NS3 結合を阻害すること[64]、インフルエンザウイルスではヘマグルチニンの成熟を阻害すること[60]が言われているが、それ以外の HBV を含むほとんどのケースで作用機序は解明されていない。HBV における作用機序を本研究では明らかにしたが、それ以外のウイルスにおける NTZ の作用機序もウイルス蛋白-宿主蛋白結合阻害に基づくものかも知れない。そうした他のウイルスへの研究発展も今後の課題である。

ドラッグリポジショニングは臨床応用への近道として有用だと言われている[40]。他疾患で臨床使用が認可済みということは、毒性試験等の臨床使用までの多くのステップを通過しているということであり、一般的に 90%以上の化合物が臨床使用まで辿り着けないと言われている現在の状況下では大きなアドバンテージである[67]。NTZ は FDA 承認済み薬剤ライブラリーから同定したものであり、今後の臨床応用へ向けての費用および時間のかかる試験を省略できる可能性がある。

今回示すことができた NTZ の抗 HBV 効果は有意ではあるものの、今回の実験系においては HBs 抗原陰性化までは達成できなかった。今後、構造解析や *in silico* 解析によ

る NTZ の詳細な HBx-DDB1 結合阻害機序を同定のうえで、化合物の最適化を加えれば、抗ウイルス効果を高めることができるかも知れない[68]。また、核酸アナログ製剤との併用など投与方法の工夫が及ぼす効果の検証も今後の課題である。臨床応用への必要な検討課題はまだあるものの、ウイルス蛋白 HBx と宿主蛋白 DDB1 との結合を標的とした NTZ は HBV の functional cure へ向けた新たな治療戦略となる可能性がある。

6. 結語

HBx-DDB1 結合阻害剤のスクリーニング系を確立し、NTZ をその候補薬剤として同定した。NTZ は HBx-DDB1 結合を阻害し、Smc5/6 の回復を通じて抗ウイルス効果を示した。今回同定した NTZ の抗 HBV 効果は HBV functional cure の実現に向けた新規治療薬の開発に繋がる可能性がある[69](図 26)。

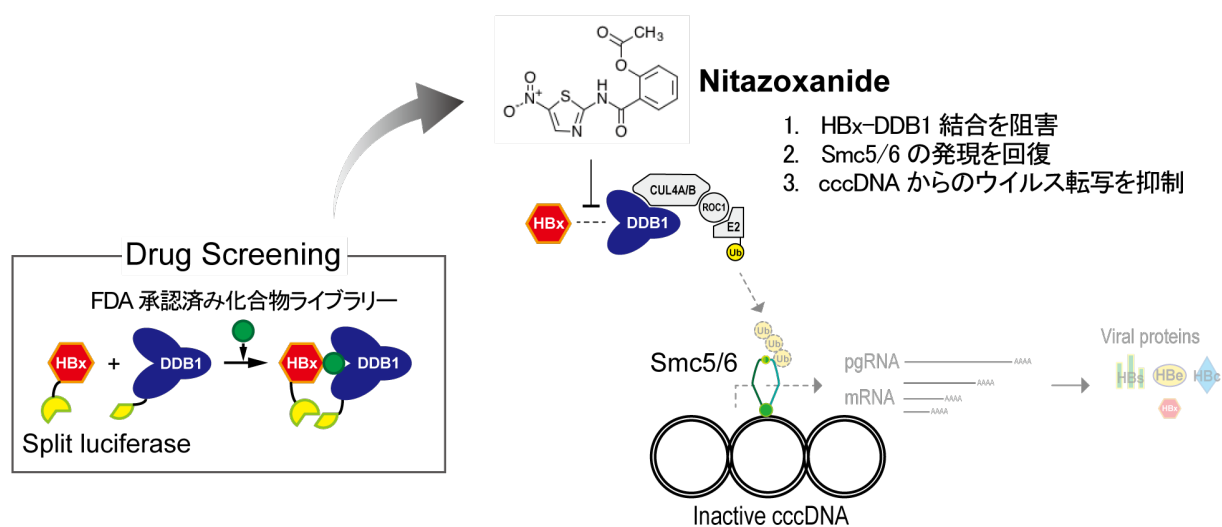


図 26 研究概要: HBx-DDB1 結合阻害剤の同定とその効果

7. 引用文献

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “new” antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;**191**:541–6
2. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970;**1**:695–8
3. Degenhardt L, Charlson F, Stanaway J, Larney S, Alexander LT, Hickman M, Cowie B, Hall WD, Strang J, Whiteford H, Vos T. Estimating the burden of disease attributable to injecting drug use as a risk factor for HIV, hepatitis C, and hepatitis B: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis* 2016;**16**:1385–98
4. Tang LSY, Covert E, Wilson E, Kottlil S. Chronic hepatitis B infection: a review. *JAMA* 2018;**319**:1802–13
5. World Health Organization. Global hepatitis report 2017. 2017.
6. Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines and the Japan Society of Hepatology. JSH guidelines for the management of hepatitis B virus infection. *Nihon Rinsho* 2015;**73**:221–7
7. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HLY, Chen CJ, Chen DS, Chen HL, Chen PJ, Chien RN, Dokmeci AK, Gane E, Hou JL, Jafri W, Jia J, Kim JH, Lai CL, Lee HC, Lim SG, Liu CJ, Locarnini S, Al Mahtab M, Mohamed R, Omata M, Park J,

- Piratvisuth T, Sharma BC, Sollano J, Wang FS, Wei L, Yuen MF, Zheng SS, Kao JH. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int* 2016;**10**:1–98
8. Terrault NA, Chang KM, Hwang JP, Mm J, Brown RS. Update on prevention, diagnosis, and treatment and of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance purpose and scope of the guidance HHS public access. *Hepatology* 2018;**67**:1560–99
 9. European association for the study of the liver. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017;**67**:370–98
 10. Hou J, Wang G, Wang F, Cheng J, Ren H, Zhuang H, Sun J, Li L, Li J, Meng Q, Zhao J, Duan Z, Jia J, Tang H, Sheng J, Peng J, Lu F, Xie Q, Wei L. Guideline of Prevention and Treatment for Chronic Hepatitis B (2015 Update). *J Clin Transl Hepatol* 2017;**5**:297–318
 11. Fung J, Cheung KS, Wong DKH, Mak LY, To WP, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Long-term outcomes and predictive scores for hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface antigen seroclearance after hepatitis B e-antigen seroclearance. *Hepatology* 2018;**68**:462–72
 12. Kim GA, Lim YS, An J, Lee D, Shim JH, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Lee YS, Suh DJ. HBsAg seroclearance after nucleoside analogue therapy in patients with chronic hepatitis B: Clinical outcomes and durability. *Gut* 2014;**63**:1325–32

13. Yuen MF, Wong DKH, Fung J, Ip P, But D, Hung I, Lau K, Yuen JCH, Lai CL.

HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;**135**:1192–9
14. Fanning GC, Zoulim F, Hou J, Bertoletti A. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat Rev Drug Discov* 2019;1–18
15. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitou S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H.

Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. *J Hepatol* 2012;**57**:508–14
16. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, De Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I, Tchernev K, Buggisch P, Weillert F, Kurdas OO, Shiffman ML, Trinh H, Gurel S, Snow-Lampart A, Borroto-Esoda K, Mondou E, Anderson J, Sorbel J, Rousseau F. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2011;**140**:132–43
17. Buti M, Gane E, Seto WK, Chan HLY, Chuang W-L, Stepanova T, Hui A-J, Lim Y-S, Mehta R, Janssen HLA, Acharya SK, Flaherty JF, Massetto B, Cathcart AL, Kim K, Gaggar A, Subramanian GM, McHutchison JG, Pan CQ, Brunetto M, Izumi N, Marcellin P. Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate for the

- treatment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2016;**1**:196–206
18. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012;**1**:e00049
 19. Miller RH, Robinson WS. Hepatitis B virus DNA forms in nuclear and cytoplasmic fractions of infected human liver. *Virology* 1984;**137**:390–9
 20. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;**51**:581–92
 21. Keasler V V, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BL. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J Virol* 2007;**81**:2656–62
 22. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, Zoulim F, Hantz O, Protzer U. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011;**55**:996–1003
 23. Sitterlin D, Lee TH, Prigent S, Tiollais P, Butel JS, Transy C. Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient

- X-insertion mutants. *J Virol* 1997;**71**:6194–9
24. van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, Decorsière A, Zoulim F, Hantz O, Strubin M.
Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from
extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* 2012;**56**:2116–24
 25. Hodgson AAJ, Hyser JM, Keasler V V., Cang Y, Slagle BL. Hepatitis B virus
regulatory HBx protein binding to DDB1 is required but is not sufficient for maximal
HBV replication. *Virology* 2012;**426**:73–82
 26. Decorsière A, Mueller H, Van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK,
Livingston CM, Niu C, Fletcher SP, Hantz O, Strubin M. Hepatitis B virus X protein
identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 2016;**531**:386–9
 27. Murphy CM, Xu Y, Li F, Nio K, Reszka-Blanco N, Li X, Wu Y, Yu Y, Xiong Y, Su L.
Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV
replication. *Cell Rep* 2016;**16**:2846–54
 28. Niu C, Livingston CM, Li L, Beran RK, Daffis S, Ramakrishnan D, Burdette D, Peiser
L, Salas E, Ramos H, Yu M, Cheng G, Strubin M, Delaney WE, Fletcher SP. The
Smc5/6 complex restricts HBV when localized to ND10 without inducing an innate
immune response and is counteracted by the HBV X protein shortly after infection.
PLoS One 2017;**12**:e0169648
 29. Lentz TB, Loeb DD. Development of cell cultures that express hepatitis B virus to high

- levels and accumulate cccDNA. *J Virol Methods* 2010;**169**:52–60
30. Li F, Cheng L, Murphy CM, Reszka-Blanco NJ, Wu Y, Chi L, Hu J, Su L. Minicircle HBV cccDNA with a Gaussia luciferase reporter for investigating HBV cccDNA biology and developing cccDNA-targeting drugs. *Sci Rep* 2016;**6**:36483
 31. Yan Z, Zeng J, Yu Y, Xiang K, Hu H, Zhou X, Gu L, Wang L, Zhao J, Young JAT, Gao L. HBVcircle: A novel tool to investigate hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *J Hepatol* 2017;**66**:1149–57
 32. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999;**4**:67–73
 33. Kay MA, He CY, Chen ZY. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1287–9
 34. Pan W, Dong Z, Li F, Meng W, Feng L, Niu X, Li C, Luo Q, Li Z, Sun C, Chen L. Visualizing influenza virus infection in living mice. *Nat Commun* 2013;**4**
 35. Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol* 2015;**185**:1275–85
 36. Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol*

Biol 1967;**26**:365–9

37. Cai D, Nie H, Yan R, Guo J-T, Block TM, Guo H. A Southern Blot Assay for Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA from Cell Cultures. *Methods Mol Biol* 2013;**1030**:151–61
38. Mu D, Yan L, Tang H, Liao Y. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system. *Biotechnol Lett* 2015;**37**:2063–73
39. Eggers CT, Binkowski BF, Lubben TH, Machleidt T, Schwinn MK, Wood MG, Zimmerman K, Wood K V., Encell LP, Dixon AS, Butler BL, Kirkland TA, Otto P, Hall MP. NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem Biol* 2015;**11**:400–8
40. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**:673–83
41. Dahlin JL, Nissink JWM, Strasser JM, Francis S, Higgins L, Zhou H, Zhang Z, Walters MA. PAINS in the assay: Chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS. *J Med Chem* 2015;**58**:2091–113
42. Yan Z, Zeng J, Yu Y, Xiang K, Hu H, Zhou X, Gu L, Wang L, Zhao J, Young JAT,

- Gao L. HBVcircle: A novel tool to investigate hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *J Hepatol* 2017;**66**:1149–57
43. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, Seeger C, King RW. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;**41**:1715–20
44. Gao Y, Feng J, Yang G, Zhang S, Liu Y, Bu Y, Sun M, Zhao M, Chen F, Zhang W, Ye L, Zhang X. Hepatitis B virus X protein–elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2017;**66**:1413–29
45. Ko C, Chakraborty A, Chou WM, Hasreiter J, Wettengel JM, Stadler D, Bester R, Asen T, Zhang K, Wisskirchen K, McKeating JA, Ryu WS, Protzer U. Hepatitis B virus genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels. *J Hepatol* 2018;**69**:1231–41
46. Potts PR, Yu H. Human MMS21/NSE2 Is a SUMO Ligase Required for DNA Repair. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:7021–32
47. Potts PR, Porteus MH, Yu H. Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* 2006;**25**:3377–88

48. De Piccoli G, Cortes-Ledesma F, Ira G, Torres-Rosell J, Uhle S, Farmer S, Hwang JY, Machin F, Ceschia A, McAleenan A, Cordon-Preciado V, Clemente-Blanco A, Vilella-Mitjana F, Ullal P, Jarmuz A, Leitao B, Bressan D, Dotiwala F, Papusha A, Zhao X, Myung K, Haber JE, Aguilera A, Aragón L. Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat Cell Biol* 2006;**8**:1032–4
49. Murray JM, Carr AM. Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;**9**:177–82
50. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;**27**:247–54
51. Georgoulis A, Vorgias CE, Chrousos GP, Rogakou EP. Genome instability and γ H2AX. *Int J Mol Sci* 2017;**18**
52. Stephan AK, Kliszczak M, Morrison CG. The Nse2/Mms21 SUMO ligase of the Smc5/6 complex in the maintenance of genome stability. *FEBS Lett* 2011;**585**:2907–13
53. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;**7**:a016600
54. Liu H, Zhang H, Wu X, Ma D, Wu J, Wang L, Jiang Y, Fei Y, Zhu C, Tan R, Jungblut P, Pei G, Dorhoi A, Yan Q, Zhang F, Zheng R, Liu S, Liang H, Liu Z, Yang H, Chen J,

- Wang P, Tang T, Peng W, Hu Z, Xu Z, Huang X, Wang J, Li H, Zhou Y, Liu F, Yan D, Kaufmann SHE, Chen C, Mao Z, Ge B. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis. *Nature* 2018;**563**:131–6
55. Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, Chambwe N, Gao GF, Cherniack AD, Fan H, Shen H, Way GP, Greene CS, Liu Y, Akbani R, Feng B, Donehower LA, Miller C, Shen Y, Karimi M, Chen H, Kim P, Jia P, Shinbrot E, Zhang S, Liu J, Hu H, Bailey MH, Yau C, Wolf D, Zhao Z, Weinstein JN, Li L, Ding L, Mills GB, Laird PW, Wheeler DA, Shmulevich I, Caesar-Johnson SJ, Demchok JA, Felau I, Kasapi M, Ferguson ML, Hutter CM, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Zhang J (Julia), Chudamani S, Lolla L, Naresh R, Pihl T, Sun Q, Wan Y, Wu Y, Cho J, DeFreitas T, Frazer S, Gehlenborg N, Getz G, Heiman DI, Kim J, Lawrence MS, Lin P, Meier S, Noble MS, Saksena G, Voet D, Zhang H, Bernard B, Dhankani V, Knijnenburg T, Kramer R, Leinonen K, Miller M, Reynolds S, Thorsson V, Zhang W, Broom BM, Hegde AM, Ju Z, Kanchi RS, Korkut A, Li J, Liang H, Ling S, Liu W, Lu Y, Ng KS, Rao A, Ryan M, Wang J, Zhang J, Abeshouse A, Armenia J, Chakravarty D, Chatila WK, de Bruijn I, Gao J, Gross BE, Heins ZJ, Kundra R, La K, Ladanyi M, Luna A, Nissan MG, Ochoa A, Phillips SM, Reznik E, Sanchez-Vega F, Sander C, Schultz N, Sheridan R, Sumer SO, Sun Y, Taylor BS, Anur P, Peto M, Spellman P, Benz C, Stuart JM, Wong CK, Hayes DN, Parker JS, Wilkerson MD, Ally A,

Balasundaram M, Bowlby R, Brooks D, Carlsen R, Chuah E, Dhalla N, Holt R, Jones
SJM, Kasaian K, Lee D, Ma Y, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Mungall
K, Robertson AG, Sadeghi S, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Thiessen N, Tse K,
Wong T, Berger AC, Beroukhim R, Cibulskis C, Gabriel SB, Ha G, Meyerson M,
Schumacher SE, Shih J, Kucherlapati MH, Kucherlapati RS, Baylin S, Cope L,
Danilova L, Bootwalla MS, Lai PH, Maglinte DT, Van Den Berg DJ, Weisenberger DJ,
Auman JT, Balu S, Bodenheimer T, Fan C, Hoadley KA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones
CD, Meng S, Mieczkowski PA, Mose LE, Perou AH, Perou CM, Roach J, Shi Y,
Simons J V., Skelly T, Soloway MG, Tan D, Veluvolu U, Hinoue T, Zhou W, Bellair
M, Chang K, Covington K, Creighton CJ, Dinh H, Doddapaneni HV, Drummond J,
Gibbs RA, Glenn R, Hale W, Han Y, Hu J, Korchina V, Lee S, Lewis L, Li W, Liu X,
Morgan M, Morton D, Muzny D, Santibanez J, Sheth M, Wang M, Xi L, Zhao F, Hess
J, Appelbaum EL, Bailey M, Cordes MG, Fronick CC, Fulton LA, Fulton RS, Kandoth
C, Mardis ER, McLellan MD, Miller CA, Schmidt HK, Wilson RK, Crain D, Curley E,
Gardner J, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton C, Shelton T,
Sherman M, Thompson E, Yena P, Bowen J, Gastier-Foster JM, Gerken M, Leraas KM,
Lichtenberg TM, Ramirez NC, Wise L, Zmuda E, Corcoran N, Costello T, Hovens C,
Carvalho AL, de Carvalho AC, Fregnani JH, Longatto-Filho A, Reis RM,
Scapulatempo-Neto C, Silveira HCS, Vidal DO, Burnette A, Eschbacher J, Hermes B,

Noss A, Singh R, Anderson ML, Castro PD, Ittmann M, Huntsman D, Kohl B, Le X,
 Thorp R, Andry C, Duffy ER, Lyadov V, Paklina O, Setdikova G, Shabunin A,
 Tavobilov M, McPherson C, Warnick R, Berkowitz R, Cramer D, Feltmate C,
 Horowitz N, Kibel A, Muto M, Raut CP, Malykh A, Barnholtz-Sloan JS, Barrett W,
 Devine K, Fulop J, Ostrom QT, Shimmel K, Wolinsky Y, Sloan AE, De Rose A,
 Giulianti F, Goodman M, Karlan BY, Hagedorn CH, Eckman J, Harr J, Myers J,
 Tucker K, Zach LA, Deyarmin B, Kvecher L, Larson C, Mural RJ, Somiari S, Vicha A,
 Zelinka T, Bennett J, Iacocca M, Rabeno B, Swanson P, Latour M, Lacombe L, Têtu B,
 Bergeron A, McGraw M, Staugaitis SM, Chabot J, Hibshoosh H, Sepulveda A, Su T,
 Wang T, Potapova O, Voronina O, Desjardins L, Mariani O, Roman-Roman S, Sastre
 X, Stern MH, Cheng F, Signoretti S, Berchuck A, Bigner D, Lipp E, Marks J, McCall S,
 McLendon R, Secord A, Sharp A, Behera M, Brat DJ, Chen A, Delman K, Force S,
 Khuri F, Magliocca K, Maithel S, Olson JJ, Owonikoko T, Pickens A, Ramalingam S,
 Shin DM, Sica G, Van Meir EG, Zhang H, Eijckenboom W, Gillis A, Korpershoek E,
 Looijenga L, Oosterhuis W, Stoop H, van Kessel KE, Zwarthoff EC, Calatozzolo C,
 Cuppini L, Cuzzubbo S, DiMeco F, Finocchiaro G, Mattei L, Perin A, Pollo B, Chen C,
 Houck J, Lohavanichbutr P, Hartmann A, Stoeck R, Stoeck R, Taubert H, Wach S,
 Wullich B, Kyrcle W, Murawa D, Wiznerowicz M, Chung K, Edenfield WJ, Martin J,
 Baudin E, Bubley G, Bueno R, De Rienzo A, Richards WG, Kalkanis S, Mikkelsen T,

Noushmehr H, Scarpace L, Girard N, Aymerich M, Campo E, Giné E, Guillermo AL,
 Van Bang N, Hanh PT, Phu BD, Tang Y, Colman H, Evason K, Dottino PR,
 Martignetti JA, Gabra H, Juhl H, Akeredolu T, Stepa S, Hoon D, Ahn K, Kang KJ,
 Beuschlein F, Breggia A, Birrer M, Bell D, Borad M, Bryce AH, Castle E, Chandan V,
 Cheville J, Copland JA, Farnell M, Flotte T, Giama N, Ho T, Kendrick M, Kocher JP,
 Kopp K, Moser C, Nagorney D, O'Brien D, O'Neill BP, Patel T, Petersen G, Que F,
 Rivera M, Roberts L, Smallridge R, Smyrk T, Stanton M, Thompson RH, Torbenson
 M, Yang JD, Zhang L, Brimo F, Ajani JA, Gonzalez AMA, Behrens C, Bondaruk J,
 Broaddus R, Czerniak B, Esmaeli B, Fujimoto J, Gershenwald J, Guo C, Lazar AJ,
 Logothetis C, Meric-Bernstam F, Moran C, Ramondetta L, Rice D, Sood A, Tamboli P,
 Thompson T, Troncso P, Tsao A, Wistuba I, Carter C, Haydu L, Hersey P, Jakrot V,
 Kakavand H, Kefford R, Lee K, Long G, Mann G, Quinn M, Saw R, Scolyer R,
 Shannon K, Spillane A, Stretch J, Synott M, Thompson J, Wilmott J, Al-Ahmadie H,
 Chan TA, Ghossein R, Gopalan A, Levine DA, Reuter V, Singer S, Singh B, Tien NV,
 Broudy T, Mirsaidi C, Nair P, Drwiega P, Miller J, Smith J, Zaren H, Park JW, Hung
 NP, Kebebew E, Linehan WM, Metwalli AR, Pacak K, Pinto PA, Schiffman M,
 Schmidt LS, Vocke CD, Wentzensen N, Worrell R, Yang H, Moncrieff M, Goparaju C,
 Melamed J, Pass H, Botnariuc N, Caraman I, Cernat M, Chemencedji I, Clipca A,
 Doruc S, Gorincioi G, Mura S, Pirtac M, Stancul I, Tcaciuc D, Albert M, Alexopoulou

I, Arnaout A, Bartlett J, Engel J, Gilbert S, Parfitt J, Sekhon H, Thomas G, Rassl DM, Rintoul RC, Bifulco C, Tamakawa R, Urba W, Hayward N, Timmers H, Antenucci A, Facciolo F, Grazi G, Marino M, Merola R, de Krijger R, Gimenez-Roqueplo AP, Piché A, Chevalier S, McKercher G, Birsoy K, Barnett G, Brewer C, Farver C, Naska T, Pennell NA, Raymond D, Schilero C, Smolenski K, Williams F, Morrison C, Borgia JA, Liptay MJ, Pool M, Seder CW, Junker K, Omberg L, Dinkin M, Manikhas G, Alvaro D, Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G, Gaudio E, Chesla D, Cottingham S, Dubina M, Moiseenko F, Dhanasekaran R, Becker KF, Janssen KP, Slotta-Huspenina J, Abdel-Rahman MH, Aziz D, Bell S, Cebulla CM, Davis A, Duell R, Elder JB, Hilty J, Kumar B, Lang J, Lehman NL, Mandt R, Nguyen P, Pilarski R, Rai K, Schoenfield L, Senecal K, Wakely P, Hansen P, Lechan R, Powers J, Tischler A, Grizzle WE, Sexton KC, Kastl A, Henderson J, Porten S, Waldmann J, Fassnacht M, Asa SL, Schadendorf D, Couce M, Graefen M, Huland H, Sauter G, Schlomm T, Simon R, Tennstedt P, Olabode O, Nelson M, Bathe O, Carroll PR, Chan JM, Disaia P, Glenn P, Kelley RK, Landen CN, Phillips J, Prados M, Simko J, Smith-McCune K, VandenBerg S, Roggin K, Fehrenbach A, Kendler A, Sifri S, Steele R, Jimeno A, Carey F, Forgie I, Mannelli M, Carney M, Hernandez B, Campos B, Herold-Mende C, Jungk C, Unterberg A, von Deimling A, Bossler A, Galbraith J, Jacobus L, Knudson M, Knutson T, Ma D, Milhem M, Sigmund R, Godwin AK, Madan R, Rosenthal HG, Adebamowo C,

- Adebamowo SN, Boussioutas A, Beer D, Giordano T, Mes-Masson AM, Saad F, Bocklage T, Landrum L, Mannel R, Moore K, Moxley K, Postier R, Walker J, Zuna R, Feldman M, Valdivieso F, Dhir R, Luketich J, Pinero EMM, Quintero-Aguilo M, Carlotti CG, Dos Santos JS, Kemp R, Sankarankuty A, Tirapelli D, Catto J, Agnew K, Swisher E, Creaney J, Robinson B, Shelley CS, Godwin EM, Kendall S, Shipman C, Bradford C, Carey T, Haddad A, Moyer J, Peterson L, Prince M, Rozek L, Wolf G, Bowman R, Fong KM, Yang I, Korst R, Rathmell WK, Fantacone-Campbell JL, Hooke JA, Kovatich AJ, Shriver CD, DiPersio J, Drake B, Govindan R, Heath S, Ley T, Van Tine B, Westervelt P, Rubin MA, Lee J Il, Aredes ND, Mariamidze A, Monnat RJ, Xiao Y, Wang C. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep* 2018;**23**:239-254.e6
56. Skwarczynska M, Ottmann C. Protein-protein interactions as drug targets. *Future Med Chem* 2015;**7**:2195–219
57. de Chassey B, Meyniel-Schicklin L, Vonderscher J, André P, Lotteau V. Virus-host interactomics: New insights and opportunities for antiviral drug discovery. *Genome Med* 2014;**6**:115
58. Prasad M, Ranjan K, Brar B, Shah I, Lalmbe U, Manimegalai J, Vashisht B, Gaury M, Kumar P, Khurana SK, Prasad G, Rawat J, Yadav V, Kumar S, Rao R. Virus-Host Interactions: New Insights and Advances in Drug Development Against Viral

Pathogens. *Curr Drug Metab* 2017;**18**:942–70

59. Rossignol JF, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* 2006;**368**:124–9
60. Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG. Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem* 2009;**284**:29798–808
61. Rossignol JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;**24**:1423–30
62. Shi Z, Wei J, Deng X, Li S, Qiu Y, Shao D, Li B, Zhang K, Xue F, Wang X, Ma Z. Nitazoxanide inhibits the replication of Japanese encephalitis virus in cultured cells and in a mouse model. *Virol J* 2014;**11**:10
63. Pereelygina L, Hautala T, Seppänen M, Adebayo A, Sullivan KE, Icenogle J. Inhibition of rubella virus replication by the broad-spectrum drug nitazoxanide in cell culture and in a patient with a primary immune deficiency. *Antiviral Res* 2017;**147**:58–66
64. Li Z, Brecher M, Deng YQ, Zhang J, Sakamuru S, Liu B, Huang R, Koetzner CA, Allen CA, Jones SA, Chen H, Zhang NN, Tian M, Gao F, Lin Q, Banavali N, Zhou J, Boles N, Xia M, Kramer LD, Qin CF, Li H. Existing drugs as broad-spectrum and

- potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Res* 2017;**27**:1046–64
65. Rossignol J-F, Elfert A, El-Gohary Y, Keeffe EB. Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype 4 treated with nitazoxanide, peginterferon, and ribavirin. *Gastroenterology* 2009;**136**:856–62
 66. Korba BE, Montero AB, Farrar K, Gaye K, Mukerjee S, Ayers MS, Rossignol JF. Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antiviral Res* 2008;**77**:56–63
 67. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol* 2014;**32**:40–51
 68. Hodos RA, Kidd BA, Shameer K, Readhead BP, Dudley JT. In silico methods for drug repurposing and pharmacology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016;**8**:186–210
 69. Sekiba K, Otsuka M, Ohno M, Yamagami M, Kishikawa T, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx–DDB1 interaction. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019;**7**:297–312

8. 謝辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科 小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたりまして東京大学消化器内科大塚基之先生に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

その他、様々な点で御協力いただいた東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。