

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 關場 一磨

B型肝炎ウイルス (HBV) の克服は世界的な課題である。約 2 億 4 千万人が持続感染していると推定され、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。長期予後改善のための治療目標として、**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が、インターフェロン製剤や核酸アナログ製剤といった現存の治療薬では達成困難であり、新規治療薬の登場が切望されている。

近年、ウイルス蛋白 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、ウイルス複製の鋳型として肝細胞核内に安定的に存在する HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) からの HBV RNA 転写を促進するということが報告された。よって、HBx-DDB1 結合はウイルス複製における重要なステップであり、その阻害剤は Smc5/6 の回復を介して HBV RNA 転写抑制剤として働くと考えられた。そこで本論文では、そのスクリーニング系の確立と同定化合物の効果の検証を行ったので報告する。

まず、蛋白-蛋白結合活性を容易に測定すべく、Split luciferase に着目した。Large Bit (LgBit) および Small Bit (SmBit) の大小に分割されたルシフェラーゼ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。この LgBit、SmBit が付加された HBx および DDB1 を発現する DNA コンストラクトを作製し、HBx-DDB1 結合阻害剤スクリーニング系を確立した。この際、LgBit と SmBit の付加位置が効率良いルシフェラーゼ活性に重要であるため、はじめに付加位置の全組み合わせ 8 種類でルシフェラーゼ活性を比較検討し、HBx の C 末端に LgBit (HBx-LgBit)、DDB1 の N 末端に SmBit (SmBit-DDB1) を付加した組み合わせが最適であることを見出した。また、このスクリーニング系は系の精度の最重要指標とされる Z'スコア 0.5 以上を満たしていた。

本研究においては、臨床応用への近道とされるドラッグリポジショニングを目指して、817 種類のアメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済み化合物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。HEK293T 細胞株を用いた 1 次スクリーニングでは、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、ニタゾキサニド (NTZ)) で有意な阻害活性を得た。細胞株を HepG2 に変えた 2 次スクリーニングでは、5 化合物のうち NTZ のみが有意な阻害活性を示した。NTZ のこの阻害効果は HEK293T 細胞および HepG2 細胞のどちらにおいても投与濃度依存的であった。また、細

胞障害性は低いことは細胞毒性試験により示され、その HBx-DDB1 結合阻害効果は殺細胞に基づくものではないと考えられたため、以降の研究は NTZ に着目して行うこととした。

次に、NTZ の HBx-DDB1 結合阻害効果を、抗 FLAG タグ抗体を用いた免疫沈降法で検証した。FLAG タグを付加した HBx を強制発現させ、それに結合する内因性 DDB1 の量を免疫沈降・ウェスタンブロット法で検証したところ、NTZ の投与によって共沈する DDB1 の量は有意に低下した。また、GST タグ付き DDB1 (GST-DDB1) リコンビナント蛋白とタグ無し HBx リコンビナント蛋白を用いて *in vitro* GST プルダウンアッセイを行ったところ、NTZ の投与は GST-DDB1 に結合する HBx の量を有意に低下させた。ここまでの結果により、Split luciferase の実験系で想定された通り、NTZ は HBx-DDB1 結合を直接的に阻害すると考えられた。

NTZ の HBx-DDB1 結合阻害効果が Smc5/6 の分解阻害に繋がるか検証すべく、HBx 定常発現細胞を作製した。この細胞においては、既報通り Smc5/6 が有意に分解されるが、NTZ の投与により Smc5/6 は有意な発現回復を得た。なお、HBx 発現のない細胞においては NTZ の投与による Smc5/6 の発現増強効果は認められなかった。

そこで、次の段階として、NTZ のウイルス RNA 転写抑制効果を HBV 擬似複製系で検証した。HBV 擬似複製系としては、近年報告された minicircle DNA 技術を用いた。minicircle DNA は特殊に設計された親プラスミドから目的配列のみを環状に抽出して得る DNA ベクターであり、目的配列を HBV ゲノムとした場合には cccDNA を近似することができる。この minicircle HBV DNA を用いた実験系において、NTZ の投与は有意に minicircle DNA 由来ウイルス RNA の量を低下させた。この効果は既存薬である核酸アナログ製剤 (エンテカビル) やインターフェロン $\alpha 2a$ よりも高いものであった。また、点変異導入により HBx 発現を欠損させた変異 minicircle DNA においては、NTZ は HBV RNA 転写抑制効果を示さなかったが、この変異 minicircle DNA を HBx 定常発現細胞に導入した際には、その抗ウイルス効果は回復した。よって、NTZ の効果は HBx 依存的なものと考えられた。

また、他の HBV 擬似複製系として、ゲノムに HBV 配列が組み込まれ、テトラサイクリンにてその発現を制御できる HepAD38 細胞株も用いた。この実験系においても、同様に NTZ は有意な HBV RNA 転写抑制効果を示した。

さらに、minicircle DNA を用いて、NTZ 投与のウイルス蛋白量に与える影響を検証したところ、NTZ の投与により有意なウイルス蛋白減少を認めた。また、cccDNA 量に関しても NTZ の投与により、わずかではあるが有意差をもって減少効果を認めた。これは NTZ の投与による pregenomic RNA の減少が新規に形成される cccDNA 量の減少につながった可能性や、HBx 蛋白の減少が cccDNA の不安定性をもたらした可能性などが理由として考えられた。

ここまでの結果より、NTZ は HBV 擬似複製系において有意な抗ウイルス効果を有することが示されたため、最後は、初代ヒト肝細胞を用いた HBV 感染系でその効果を検

証した。初代ヒト肝細胞はヒト肝細胞キメラマウスから単離された肝細胞で、HBVに感染し、その生活環を再現する。HBV感染後、5日間NTZの投与を行ったところ、Smc5は有意な回復を認め、それに伴いHBV RNA量は有意に低下した。さらにウイルス蛋白は上清中および細胞内共に減少を認め、上清中HBV DNA量も有意な減少を認めた。cccDNAについても、NTZの投与は、minicircle DNAでの実験系と同様に、部分的ではあったが有意な減少をもたらした。よって、NTZはHBV感染系においても有意な抗ウイルス効果を発揮することが示された。

以上、本研究では、Split luciferaseによるHBx-DDB1結合阻害剤のスクリーニング系を確立し、同定化合物NTZの抗ウイルス効果を実証した。NTZはHBx-DDB1結合阻害によるSmc5/6の回復を通して、抗HBV効果を発揮する。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。