

審査の結果の要旨

氏名 關場 一磨

本研究は B 型肝炎ウイルス (HBV) のウイルス転写抑制性に働く宿主蛋白 structural maintenance of chromosomes 5/6 (Smc5/6) の分解機構として重要な役割を果たすウイルス蛋白 HBV regulatory protein X (HBx) と宿主蛋白 DNA damage-binding protein 1 (DDB1) との結合に着目して、その結合阻害剤の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 蛋白-蛋白結合活性を容易に測定するために Split luciferase に着目し HBx-DDB1 結合阻害剤スクリーニング系を確立した。この際、大・小の各 Split luciferase 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 Large Bit、DDB1 の N 末端に Small Bit 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 以上を満たすことを示した。
2. 樹立したスクリーニング系を用いて、817 種類のアメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済み化合物をスクリーニングした。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。
3. 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。よって、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。

4. HBx 定常発現細胞を作製し、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。ここで、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。
5. 次に、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 技術が用いられた。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。
6. 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 細胞株も用いられ、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。
7. Minicircle DNA の実験系において、NTZ の投与により有意なウイルス蛋白減少を認めた。また、covalently closed circular DNA (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。
8. 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 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、本論文では、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明らかにした。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重要な貢献を成すと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。