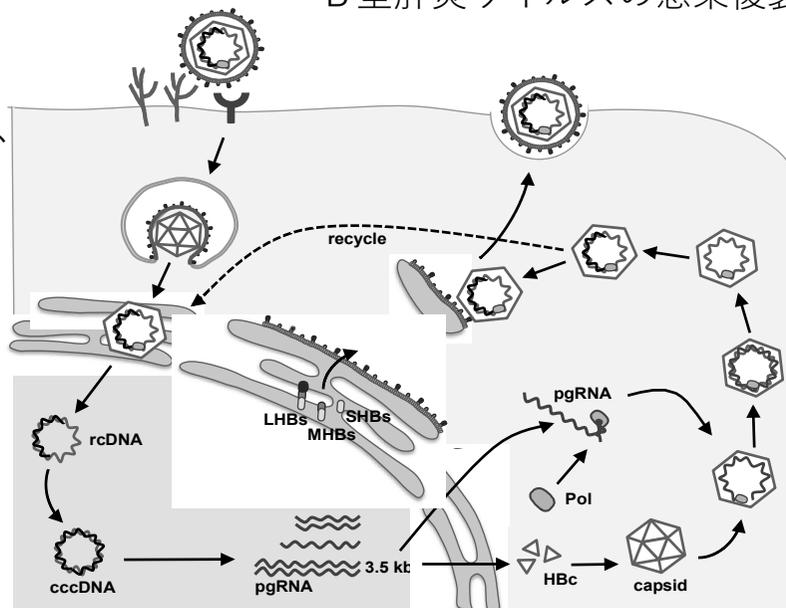


B型肝炎ウイルスの感染複製増殖機構の 解明による創薬基盤形成に関する研究

B型肝炎ウイルスの感染複製増殖機構の 解明による創薬基盤形成に関する研究

B型肝炎ウイルスの感染複製増殖解析

1. 初期感染過程
ウイルス吸着から侵入、
核への輸送の解析



4. ウイルス複製増殖に
関与する宿主因子の同定
と解析

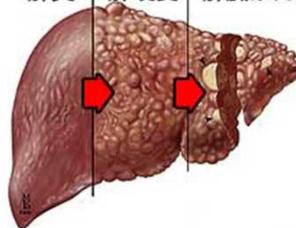
2. 遺伝子発現および転写機構の解析

3. ウイルス蛋白質の解析



5. 新たな実験系の開発

肝炎 肝硬変 肝臓がん



6. 病原性発現機構に関する解析



7. 新たな治療を目指した研究

研究の概要

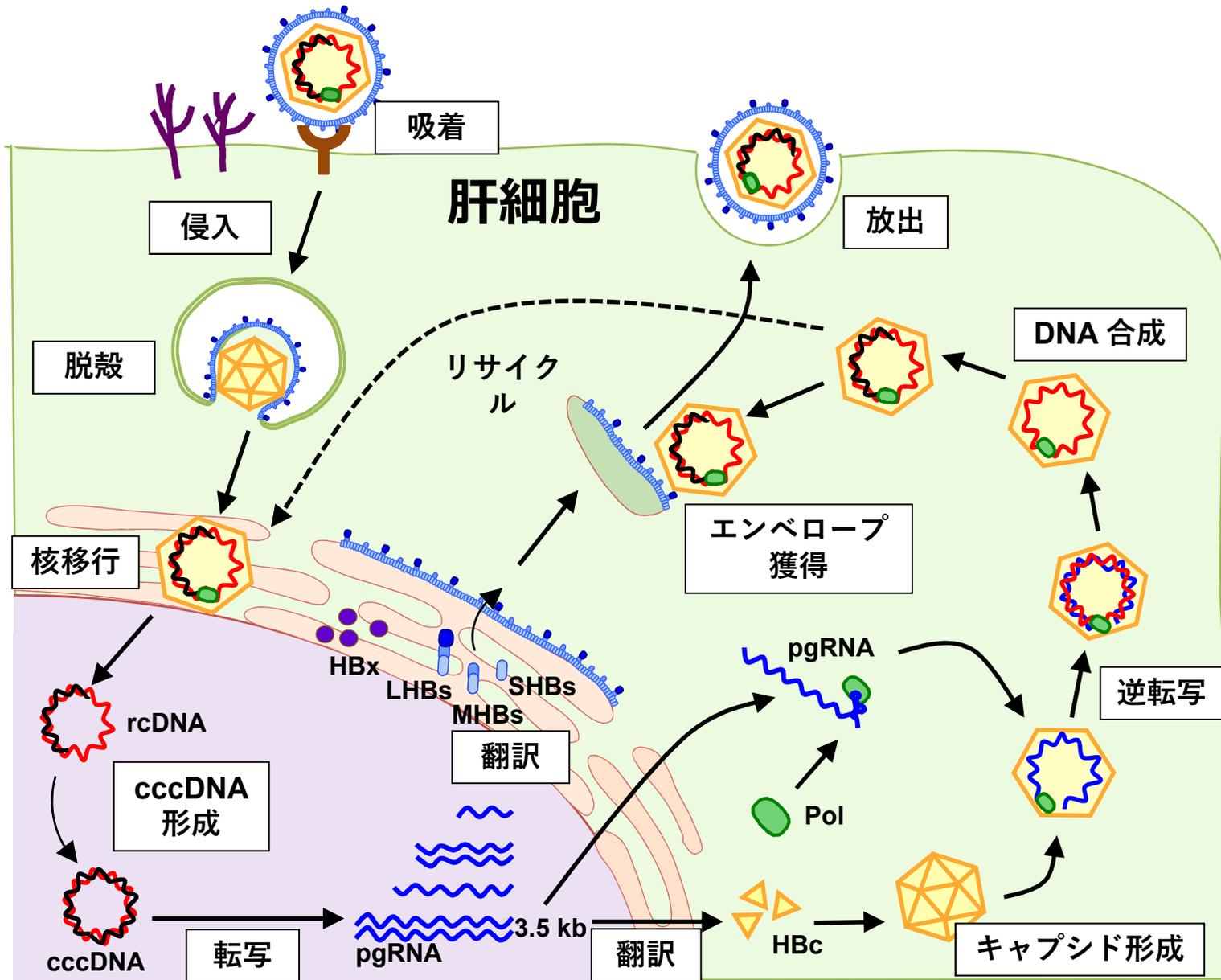
本研究はHBVの感染複製増殖機構の解明を目指す

- ✓ **HBVの生活環の各過程に関与する宿主因子を同定する**
- ✓ **各過程を解析する実験系により、新規創薬標的を同定し、
そのスクリーニング系を樹立する**
- ✓ **新規化合物のスクリーニングとその作用機序などの解析を
進める**
- ✓ **他の研究班との連携を推進する**

主な取り組み

- NTCPトランスポーター活性を阻害しない**エントリー阻害剤**の開発研究：特殊環状ペプチド、CsA誘導体、新規抗体など
- 逆転写酵素活性アッセイ系を利用した**逆転写阻害剤スクリーニング**を重点的に進める
- **キャプシド阻害剤、新規核酸アナログ（非RT阻害）**の臨床試験開始を目指す研究。企業との共同を開始。
- 新規抗HBVリード化合物について、**合成展開**により官能基最適化を図り、より高活性な抗HBV剤の開発を行う
- **HBc/HBsワクチン療法**の解析を進め、ワクチンとIFNおよび核酸アナログ併用による核酸アナログ離脱療法を確立する
- **ヒトiPS細胞由来肝芽**によるハイスループット創薬スクリーニング系を構築する
- **HBV複製増殖機構**の解明と関与する宿主因子同定、新規創薬標的の開発

B型肝炎ウイルスのライフサイクル (生活環)



B型肝炎ウイルス創薬標的

✓ エントリー阻害剤の開発

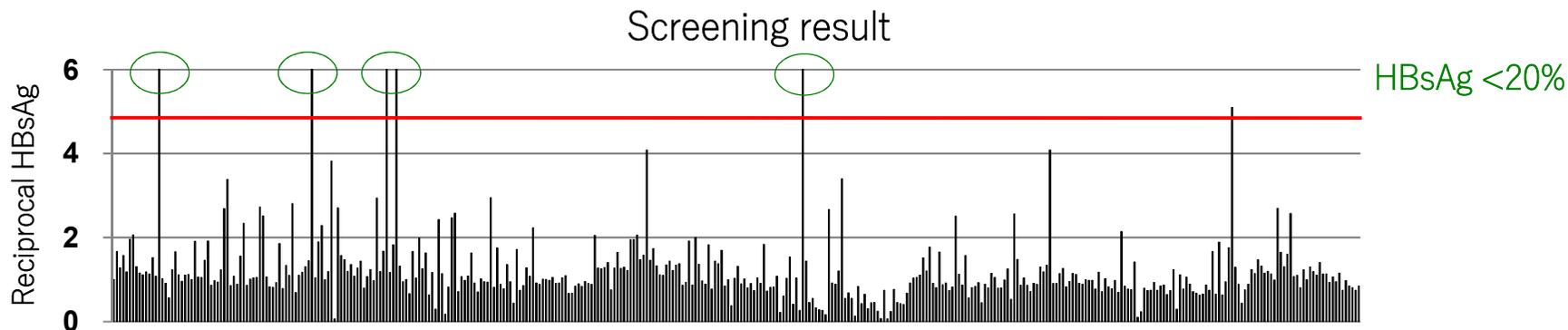
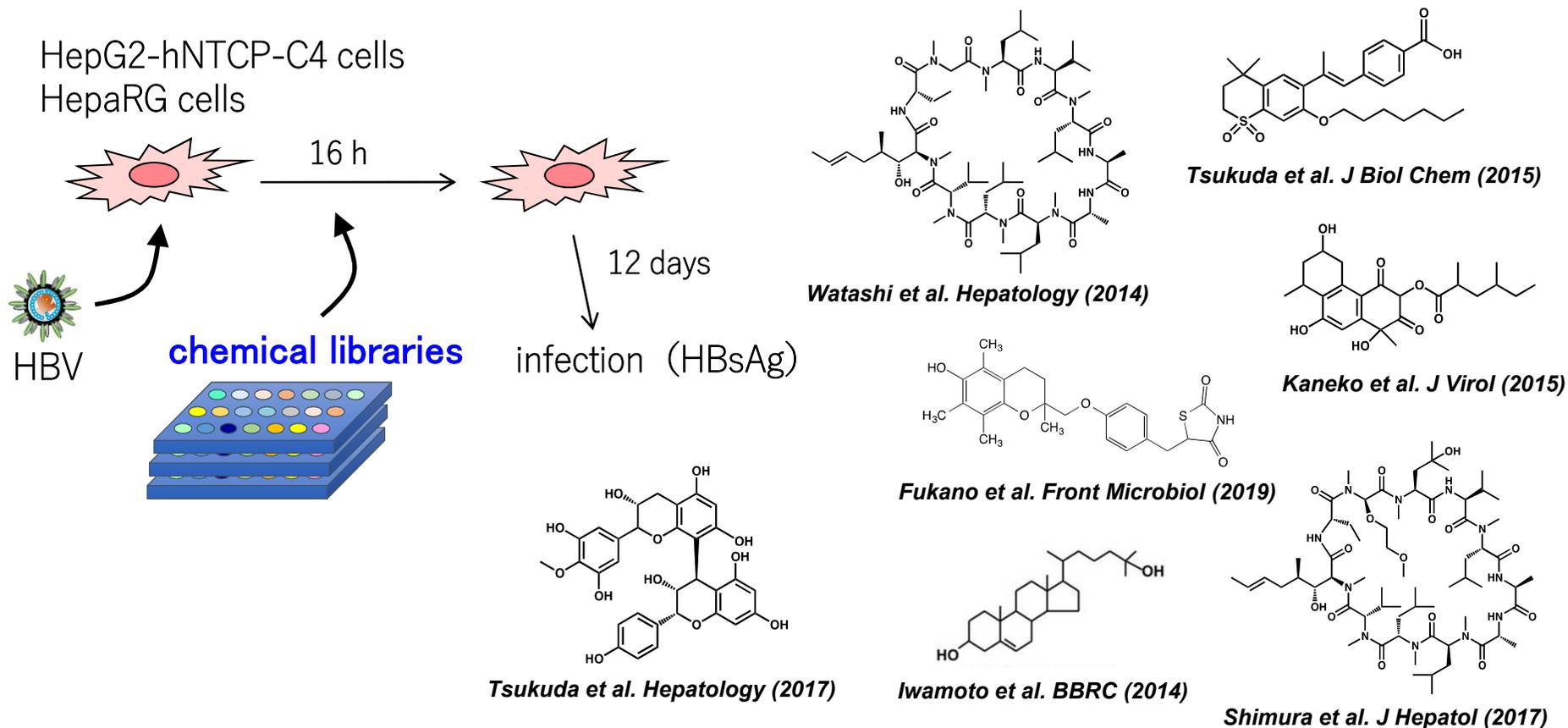
感染研 渡士

✓ 逆転写酵素アッセイの構築と阻害剤探索

✓ キャプシド阻害剤と新規核酸アナログの開発

✓ HBs抗原およびHBc抗原による治療ワクチン

ウイルス培養系を用いた化合物スクリーニング

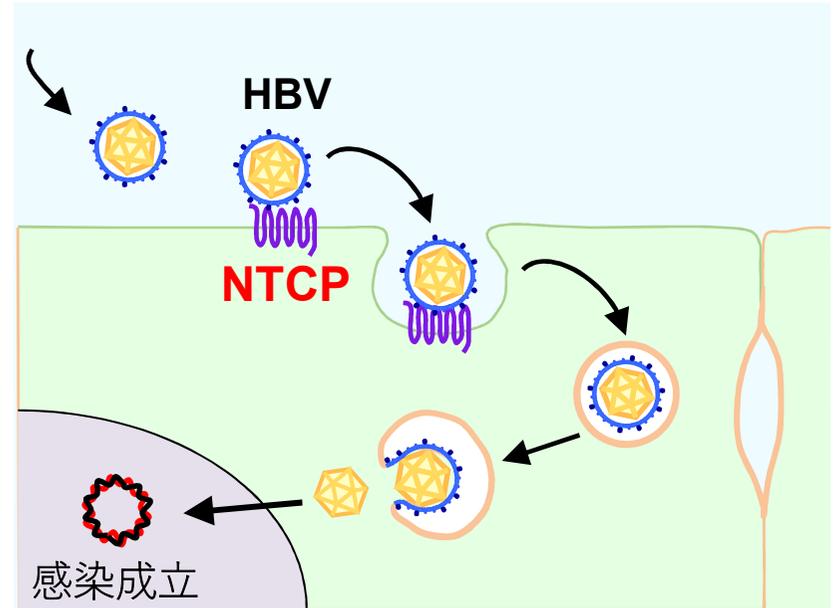


HBV侵入受容体NTCP

Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus

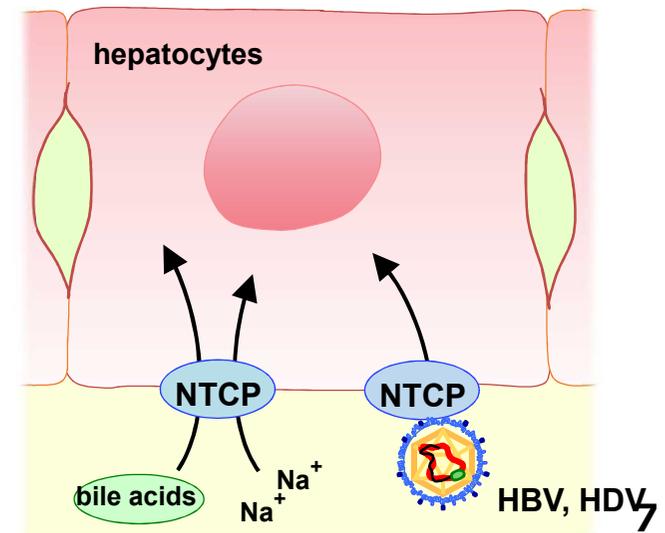
Huan Yan, Guocai Zhong, Guangwei Xu, Wenhui He, Zhiyi Jing, Zhenchao Gao, Yi Huang, Yonghe Qi, Bo Peng, Haimin Wang, Liran Fu, Mei Song, Pan Chen, Wenqing Gao, Bijie Ren, Yinyan Sun, Tao Cai, Xiaofeng Feng, Jianhua Sui, Wenhui Li

Yan H et al. eLife (2012)



Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1)

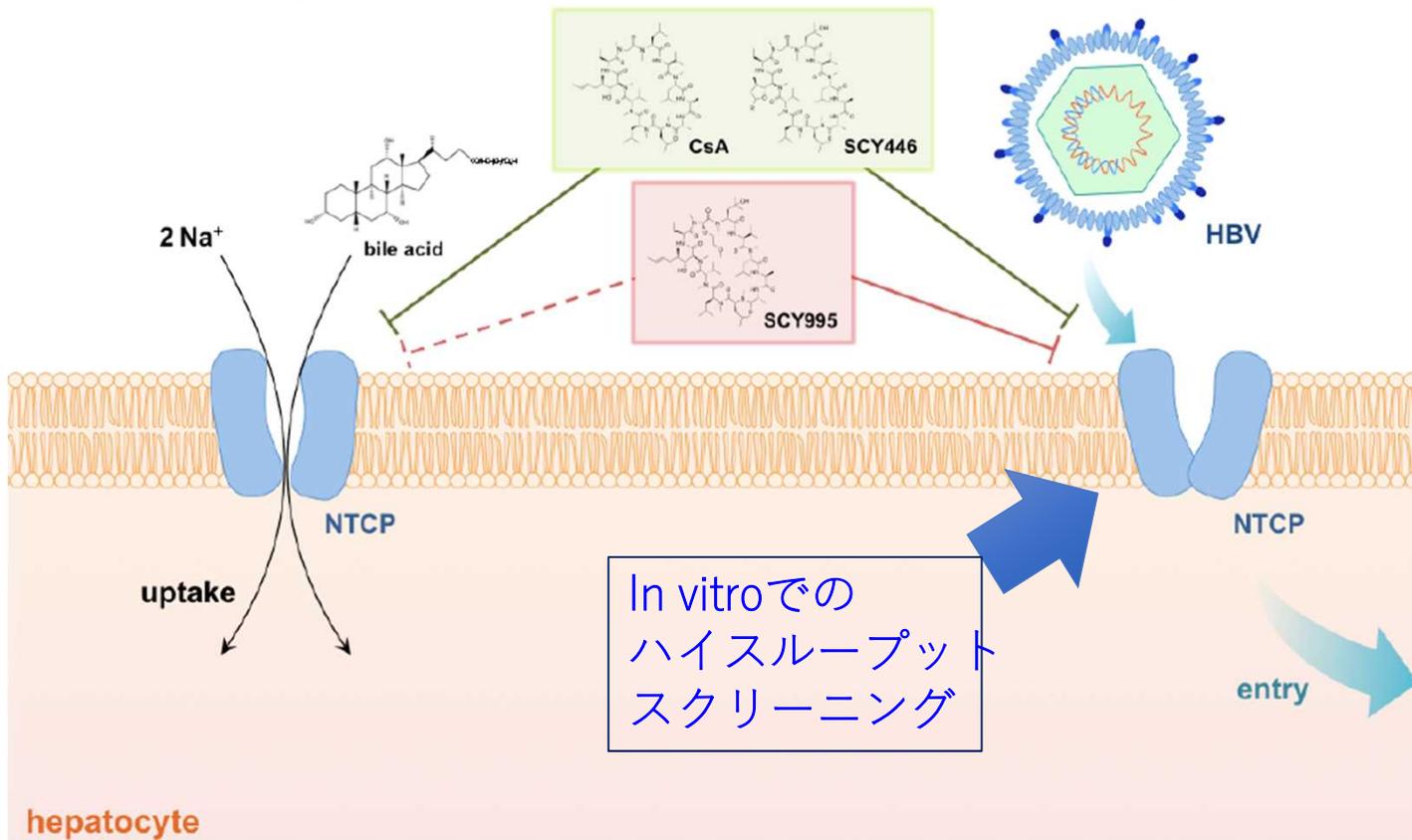
- 胆汁酸取り込みトランスポーター
- 肝細胞基底膜側に特異的に局在
- (推定) 7-9回膜貫通タンパク質



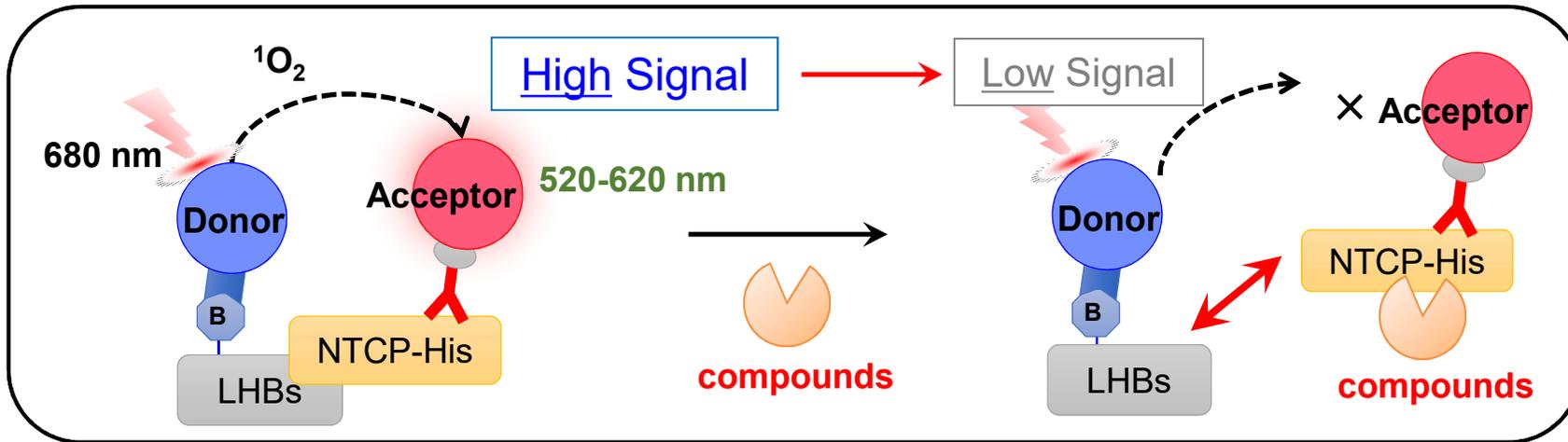
NTCPを標的としたin vitroスクリーニング

Bile acid transport

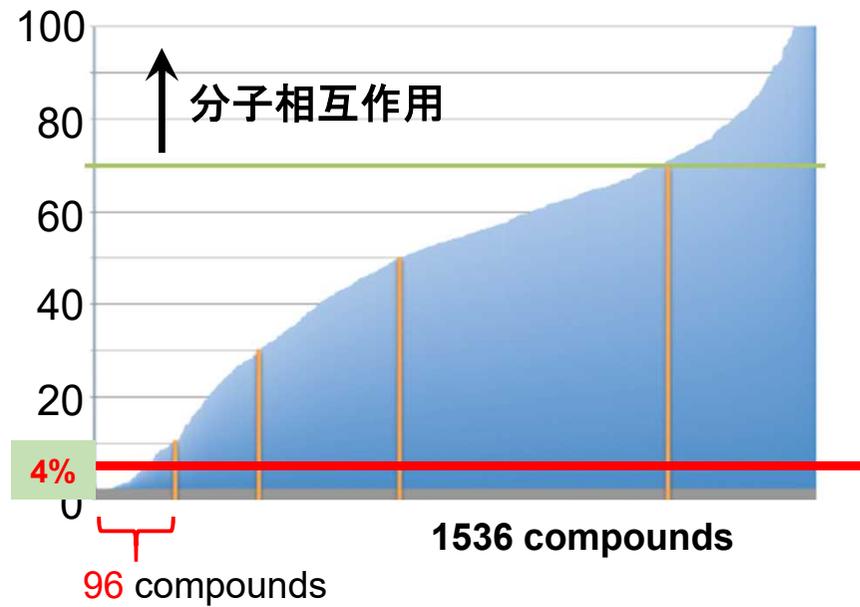
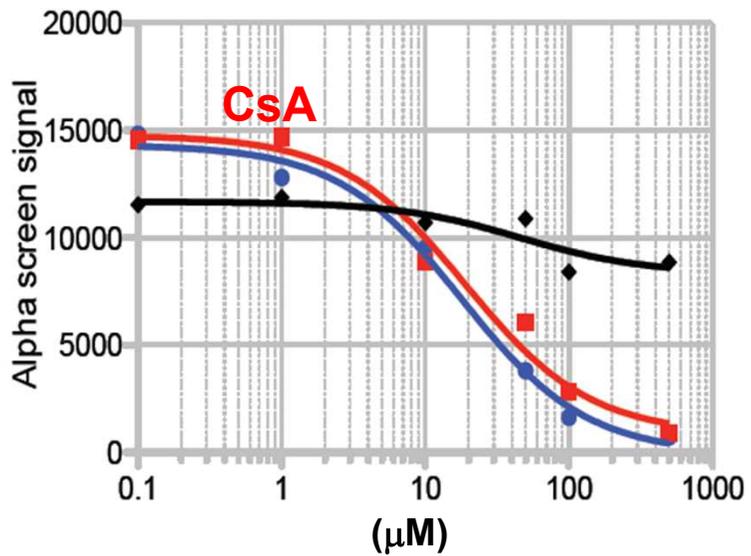
HBV entry



A) アルファスクリーン・アッセイでのスクリーニング

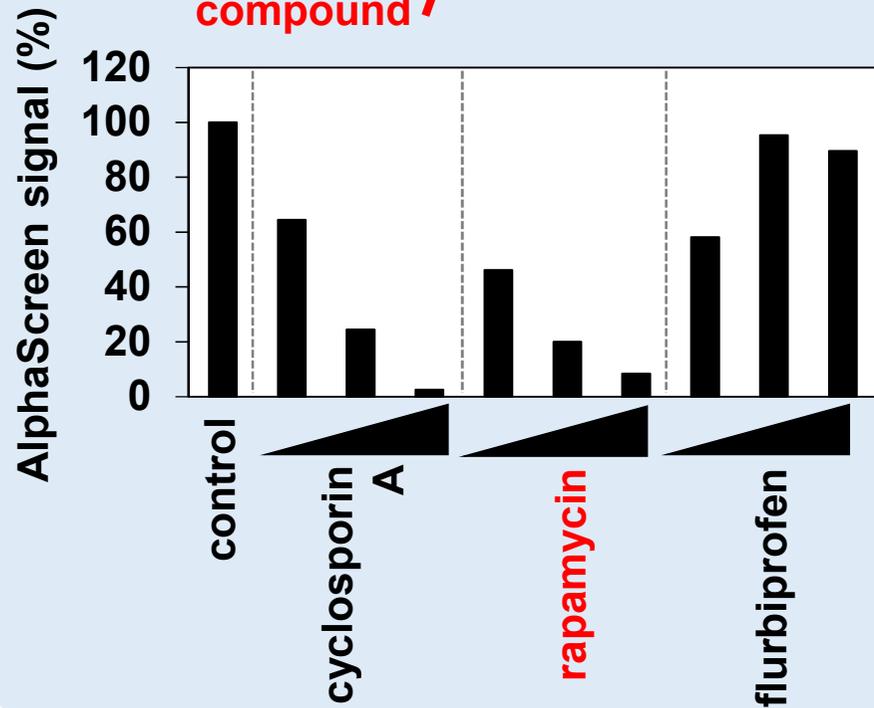
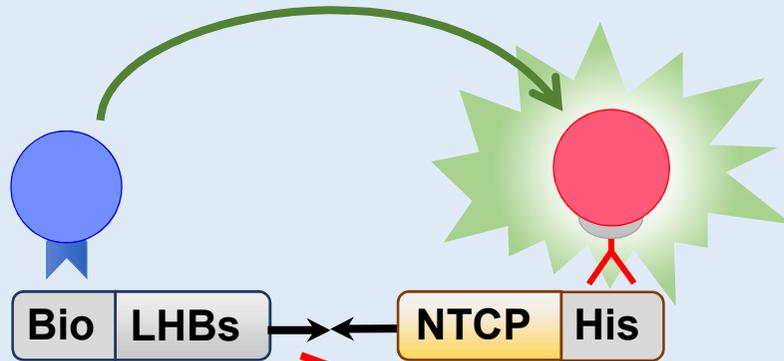


横浜市立大学・医 梁明秀先生
セルフリーサイエンス社
との共同研究

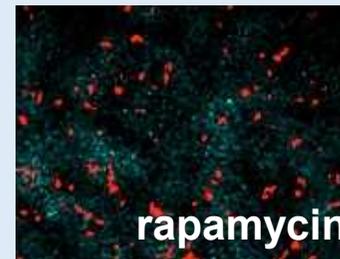
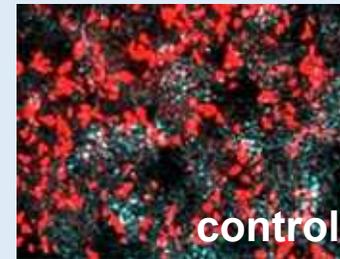


Small molecules screening using AlphaScreen

① AlphaScreen (LHBs-NTCP)



② HBV infection

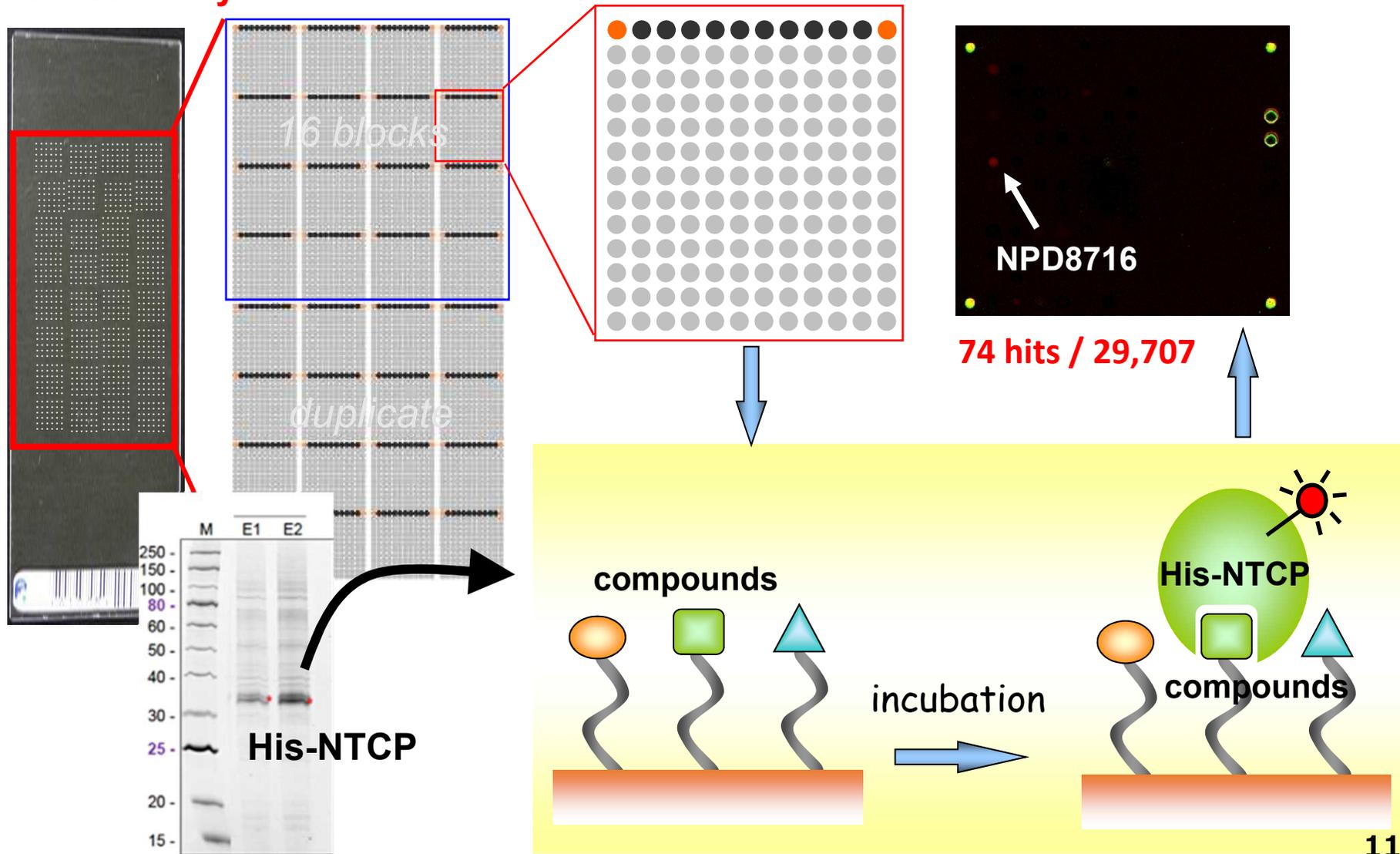


red: HBc
blue: nucleus

B) 化合物アレイによるスクリーニング

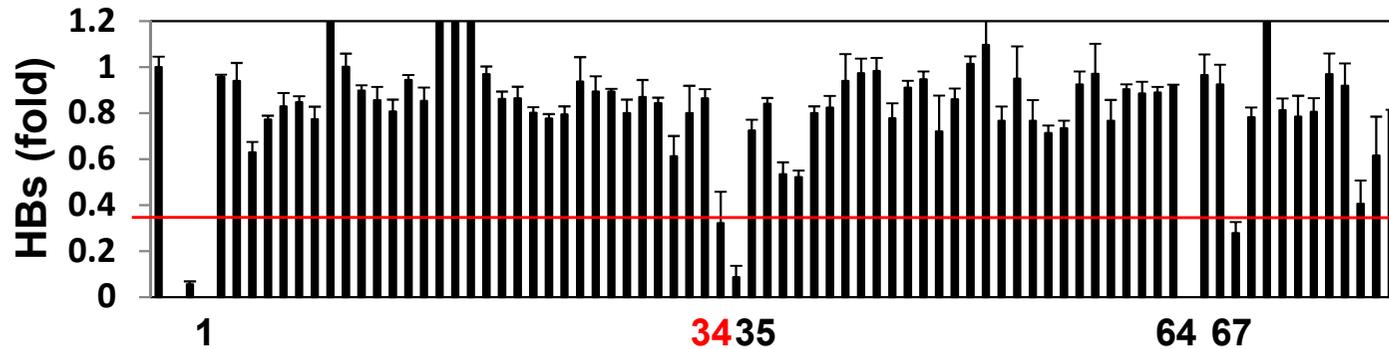
理化学研究所
長田 裕之 先生 との共同研究

Chemical array

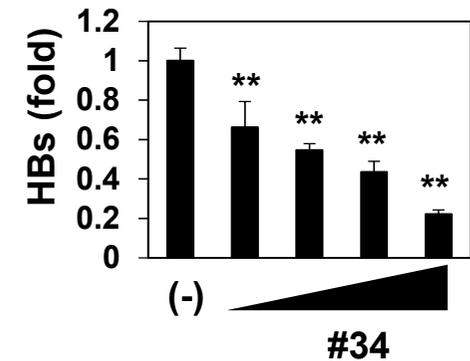
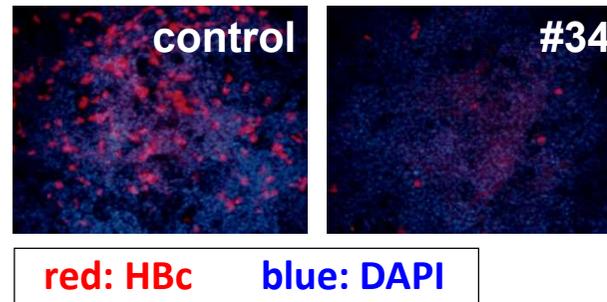
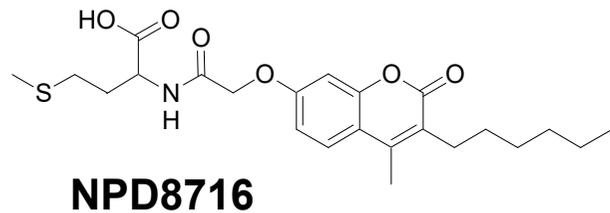


NPD8716の構造活性相関解析

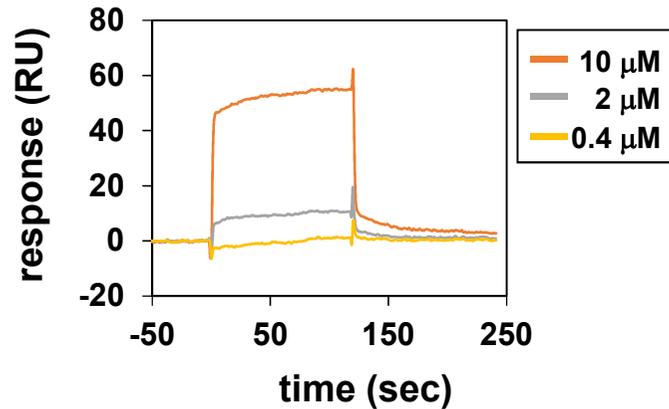
HBV infection



#1: chenodeoxycholic acid
#67: bile acid-derivative
#34: NPD8716

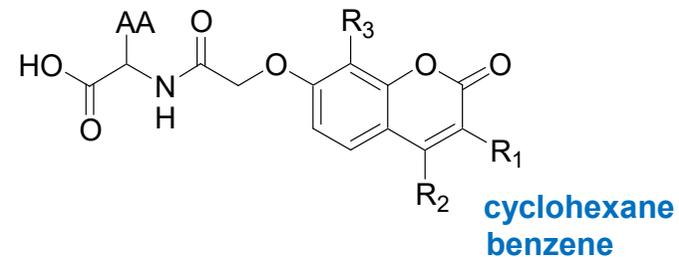


SPR (NPD8716-NTCP)



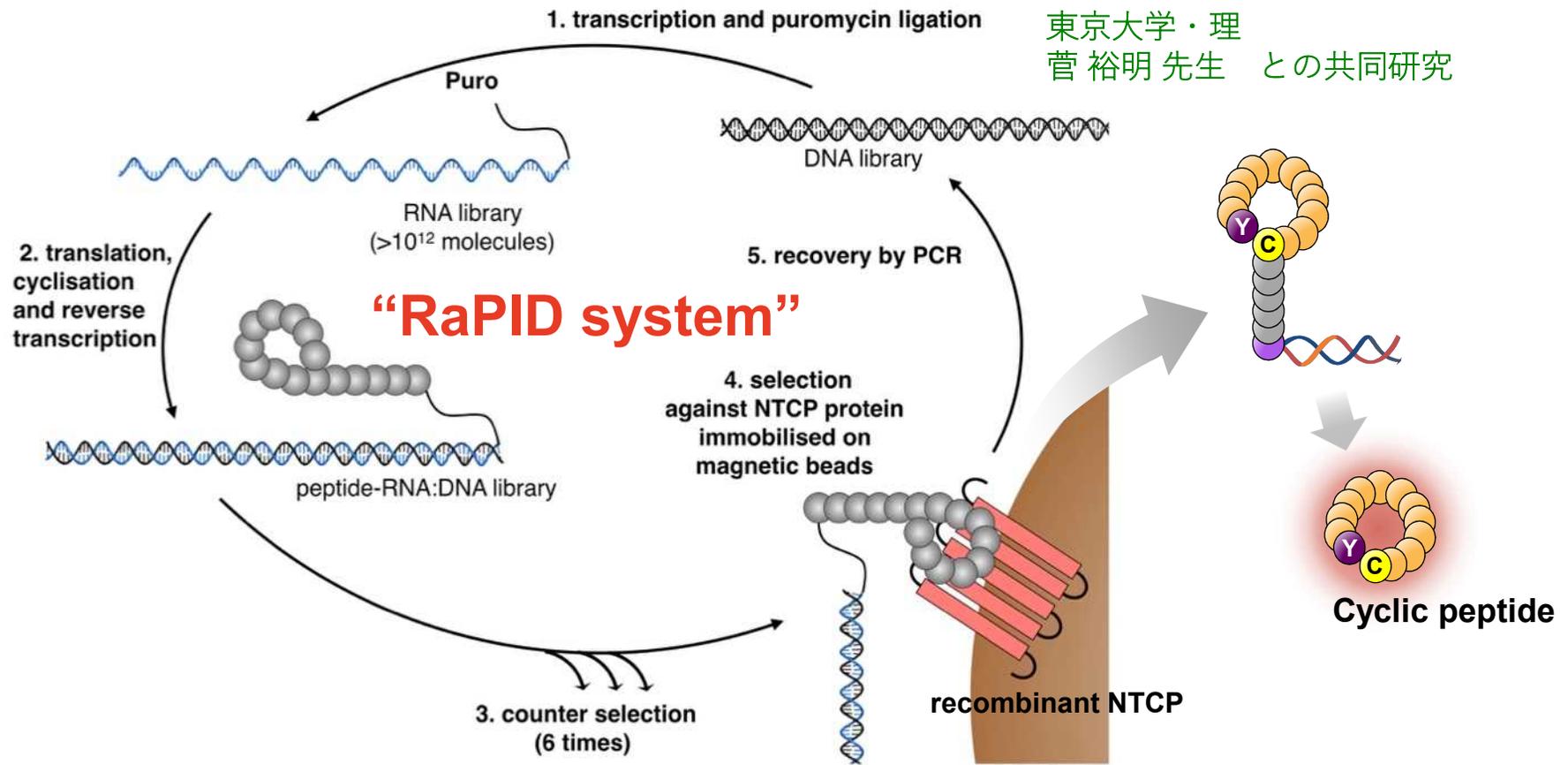
S-Bz-Cys >>> S-Me-Cys

CH₃ >>> H



C) RaPIDシステムでの NTCP結合特殊環状ペプチド同定

東京大学・理
菅 裕明 先生 との共同研究



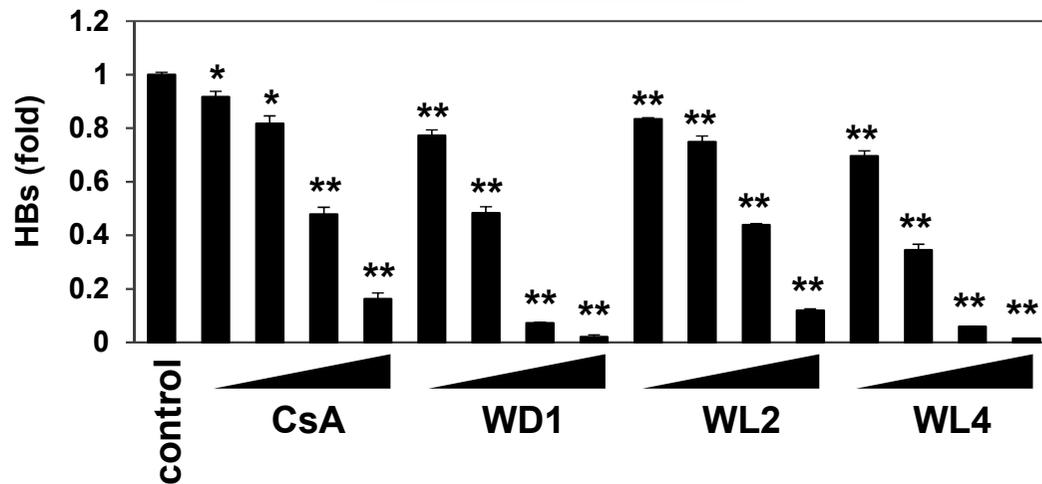
- 1st: 高多様性ライブラリー
- ヒット よりモチーフ同定
- 2nd: フォーカストライブラリー
- 10ペプチド同定 (WL4, WD1, WL2)

WL4
WD1
WL2

Y	V	I	W	I	W	P	N	H	F	Y	Y	C		
	Y	F	I	I	V	MeG	T	W	T	W	T	W	S	C
	Y	I	W	I	W	P	G	Y	V	I	Y	C		

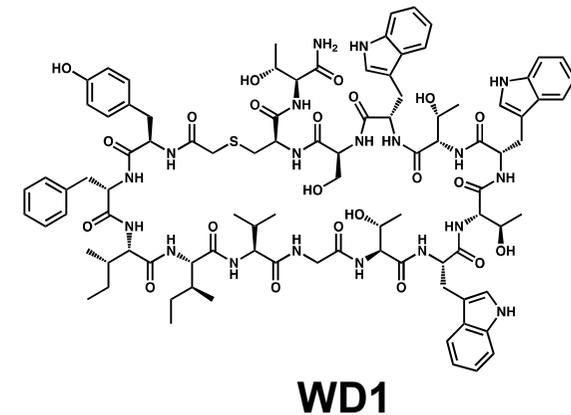
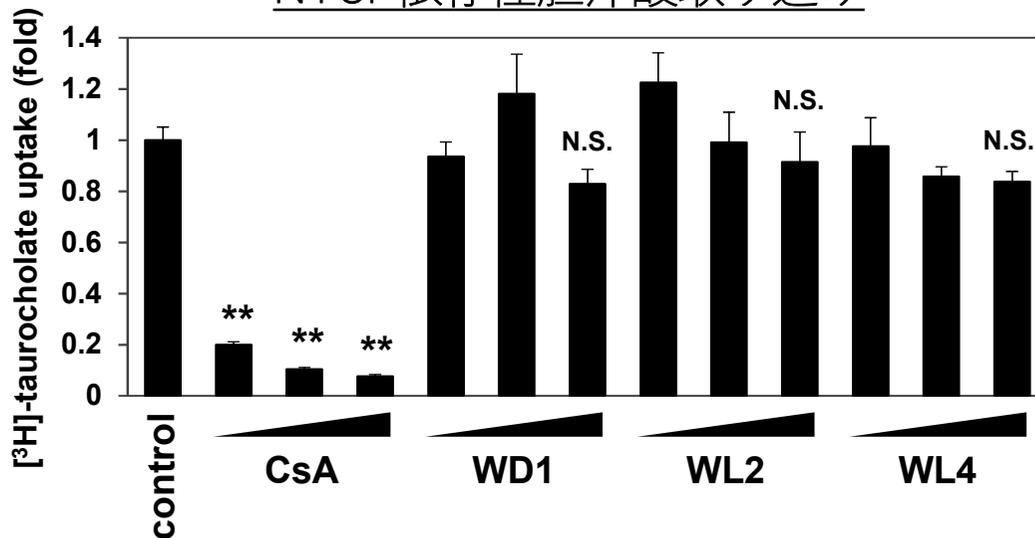
胆汁酸阻害活性のないHBV侵入阻害剤

HBV感染阻害活性



peptide	IC ₅₀ (μM)
CsA	3.17 ± 0.30
WD1	0.85 ± 0.01
WL2	2.54 ± 0.11
WL4	0.66 ± 0.03

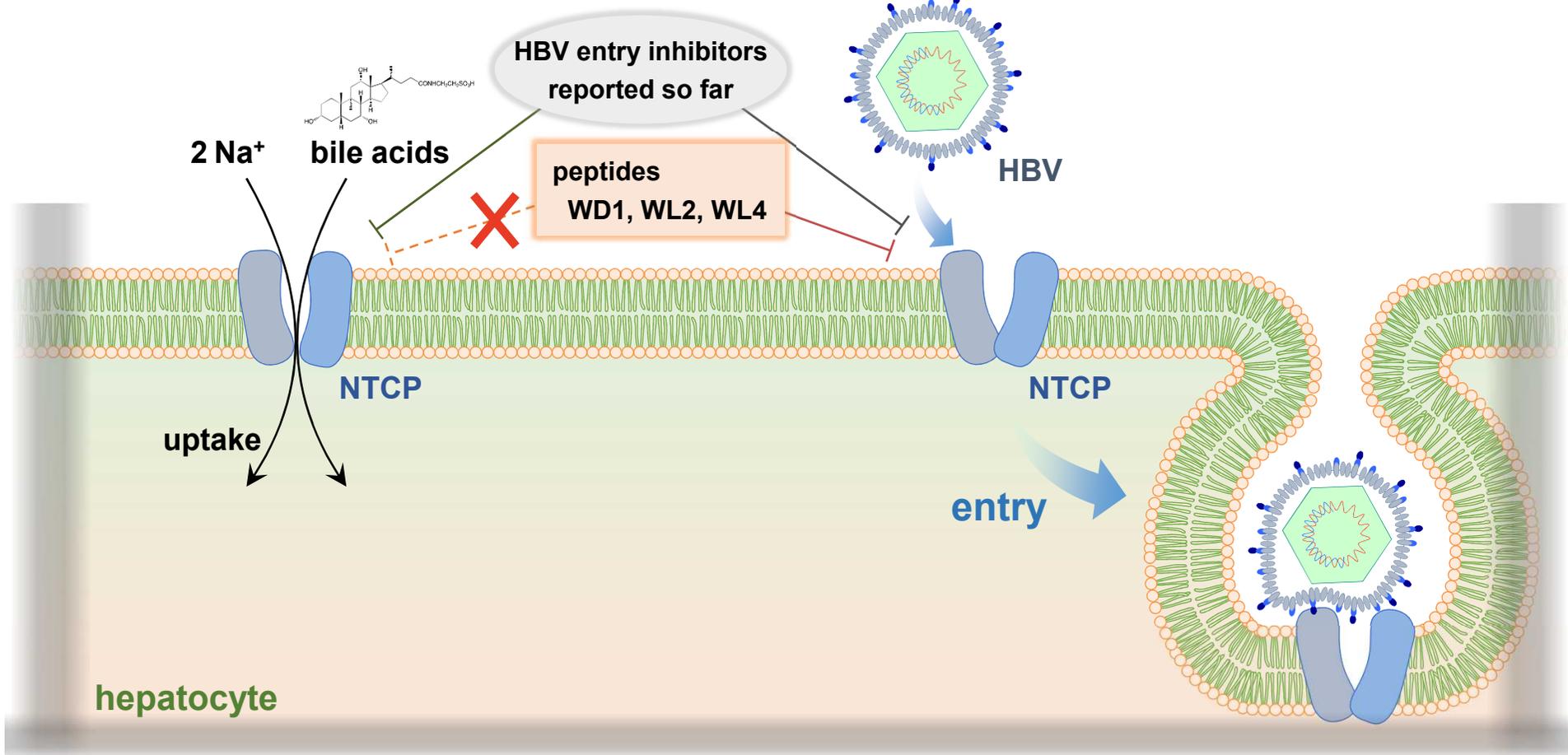
NTCP依存性胆汁酸取り込み



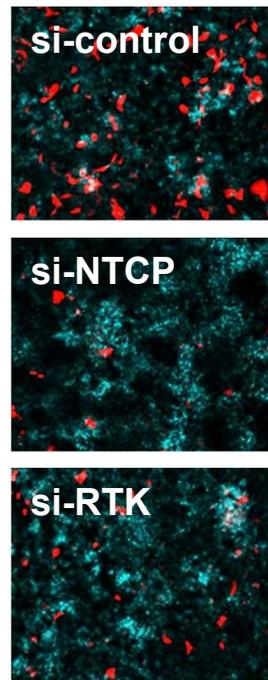
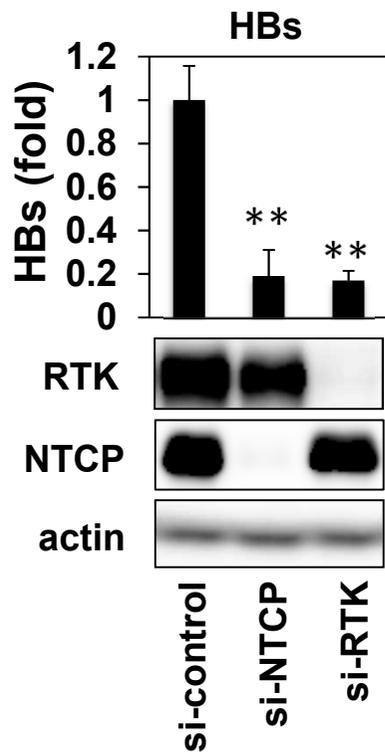
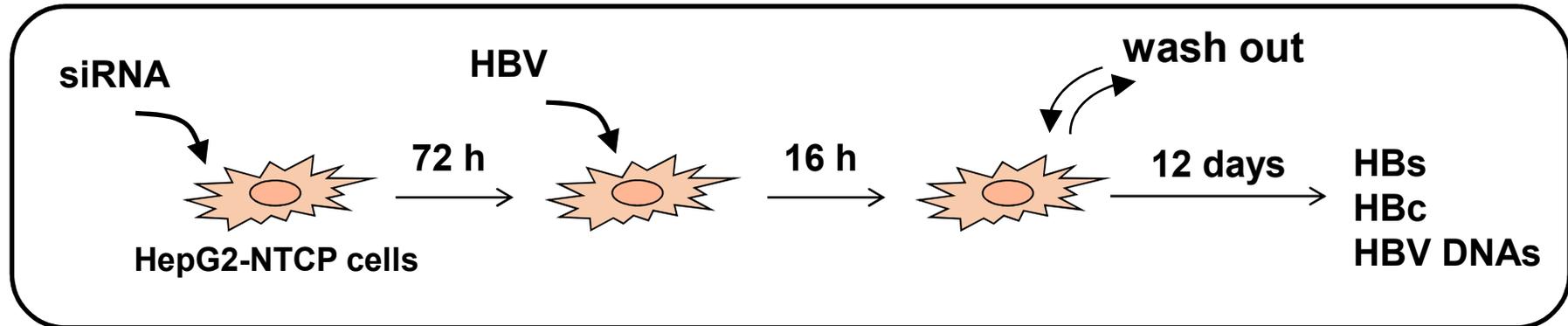
エントリー阻害剤開発のまとめ

Bile acid transport

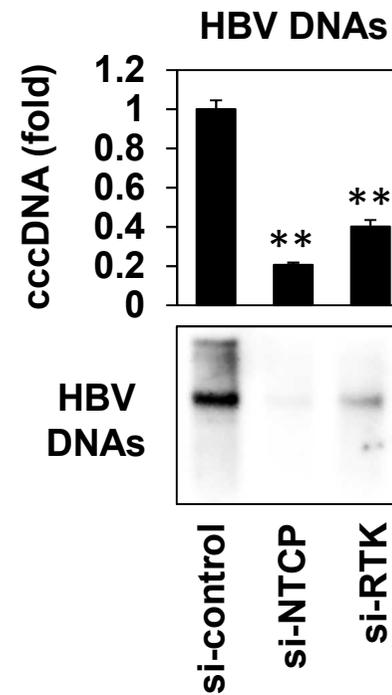
HBV entry



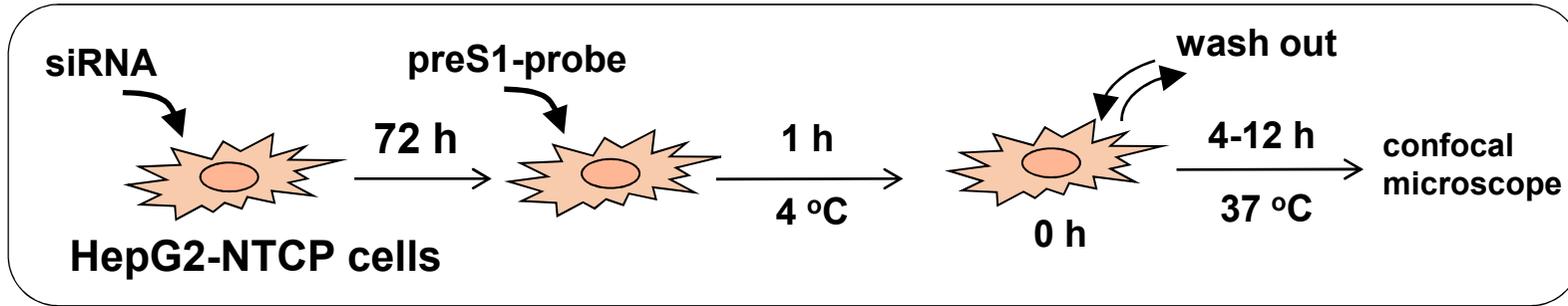
HBV感染に関する新規宿主因子の同定



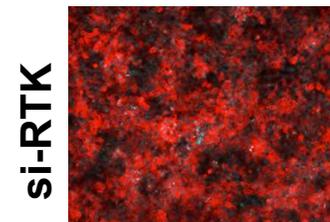
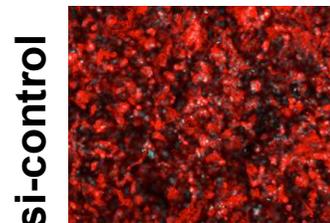
Red : HBc
Blue : nucleus



RTK はHBVの細胞表面への結合ではなく 細胞内への進入に関する

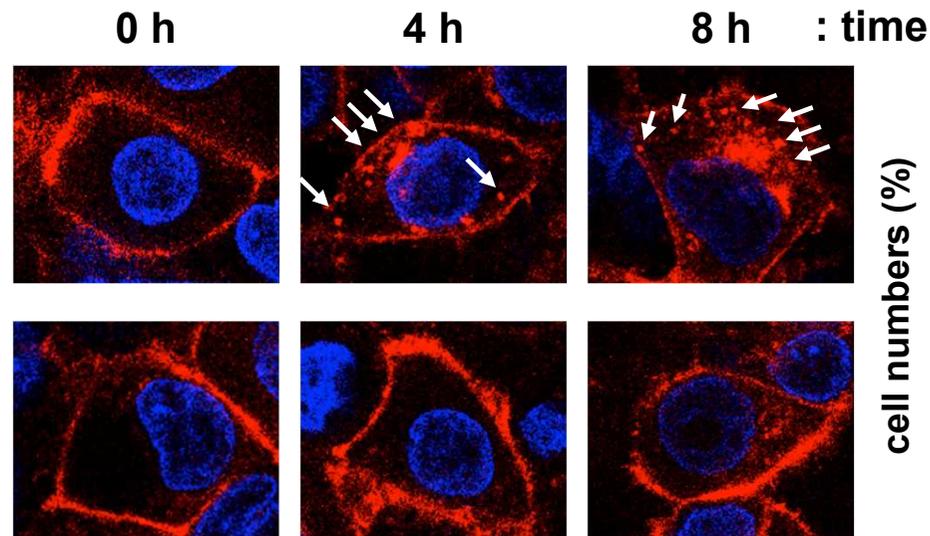


preS1-attachment

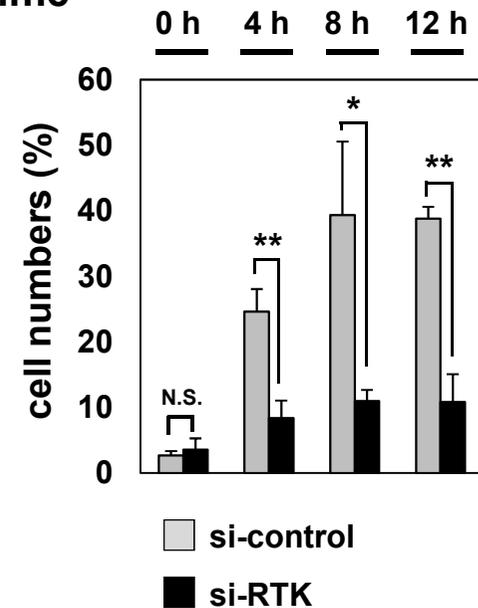


Red : preS1-probe
Blue : nucleus

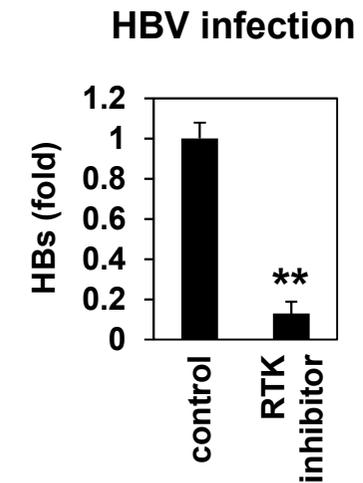
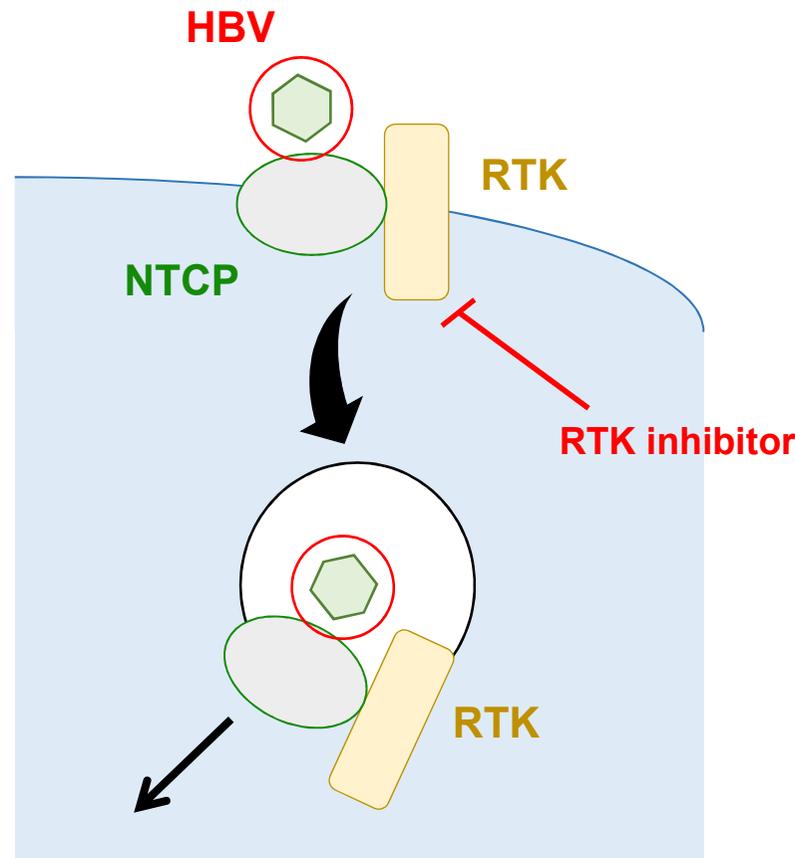
preS1-internalization



Red : preS1-probe Blue : nucleus



HBV感染におけるRTKの役割



RTK: A new target for anti-HBV agents

B型肝炎ウイルス創薬標的

✓ エントリー阻害剤の開発

✓ 逆転写酵素アッセイの構築と阻害剤探索

✓ キャプシド阻害剤と新規核酸アナログの開発

✓ HBs抗原およびHBc抗原による治療ワクチン

HBV逆転写酵素・RNase H阻害剤のハイスループットスクリーニング系の開発

RNase H阻害剤のスクリーニング系

長寿研 豊田先生
理研 古谷先生、小嶋先生

50 mM TrisHCl, pH 8.5

4 mM MgCl₂

1 mM DTT

0.02% Triton X-100

RNase inhibitor

0.2 μM HBV RNase H 681

20 nM probe : 5'-(6-FAM)-

rCrCrArCrArUrArGrGrCrUrArUrGrUrGrGrArArC

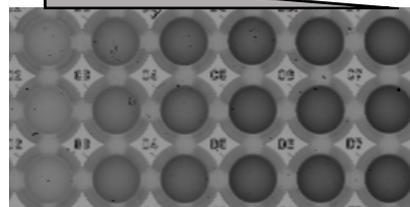
TTTTGTTCCACATAGCCTATGTGG-(Eclipse)-3'

up to 0.6 % DMSO

↓

42 °C, 8 hr.

阻害剤濃度 (%)



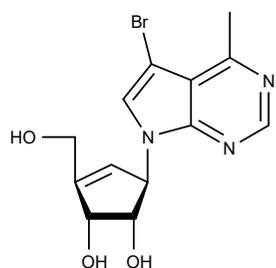
B型肝炎ウイルス創薬標的

- ✓ エントリー阻害剤の開発
- ✓ 逆転写酵素アッセイの構築と阻害剤探索
- ✓ キャプシド阻害剤と新規核酸アナログの開発
- ✓ HBs抗原およびHBc抗原による治療ワクチン

新規抗HBV薬の同定と開発（1）

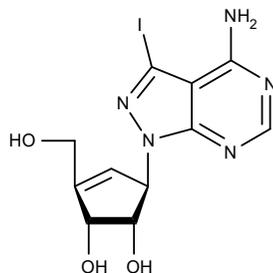
馬場昌範, 外山政明, 岡本実佳（鹿児島大）, 渡士幸一, 脇田隆字（感染研）

- 新規核酸誘導体に抗HBV効果を同定した。



AR-II-04-26

EC₅₀: 0.77 ± 0.23 μM
CC₅₀: > 100 μM



MK-III-02-03

EC₅₀: 0.83 ± 0.36 μM
CC₅₀: 67.8 ± 7.7 μM

図1. HepG2.2.15.7 細胞における HBV 増殖阻害効果

- これらの薬剤は既存の逆転写酵素阻害（3TC や ETV）とは異なり，感染細胞からの HBs および HBe 抗原の産生を阻害する。

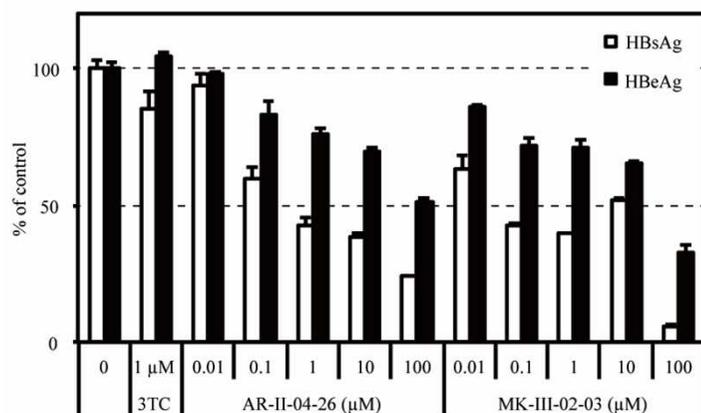


図2. HepG2.2.15.7 細胞における HBV 抗原産生阻害効果

- 新規薬剤はHBV感染初代肝細胞にも同様に抗HBV効果を示した。

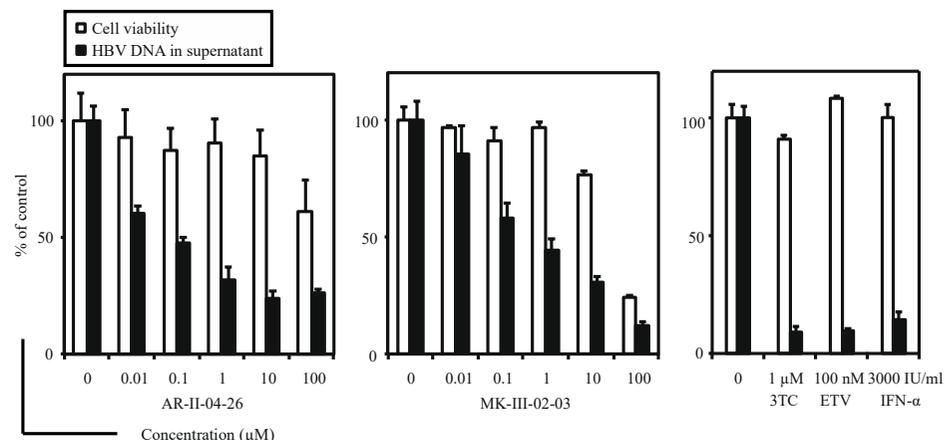


図3. HBV 感染初代肝細胞における HBV 増殖阻害効果

- 新規薬剤はHBV感染初代肝細胞もHBV抗原産生阻害した。

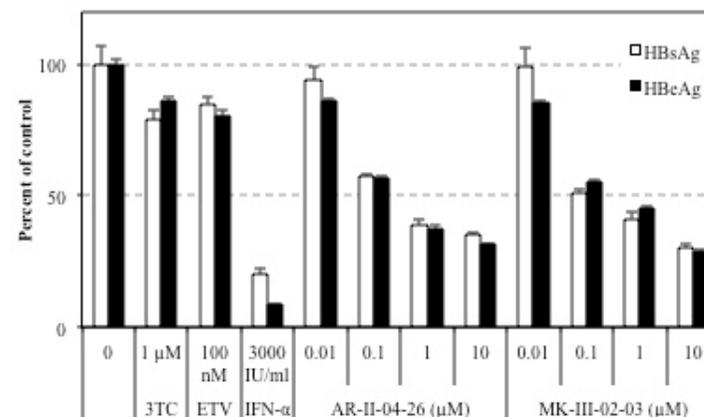


図4. HBV 感染初代肝細胞における HBV 抗原産生阻害効果

新規抗HBV薬の同定と開発（2）

馬場昌範, 外山政明, 岡本実佳（鹿児島大）, 渡士幸一, 脇田隆宇（感染研）

- 新規核酸誘導体はcccDNAから転写されるHBV RNAを減少させた。
- 新規核酸誘導体はHBV RNAの分解を促進した。

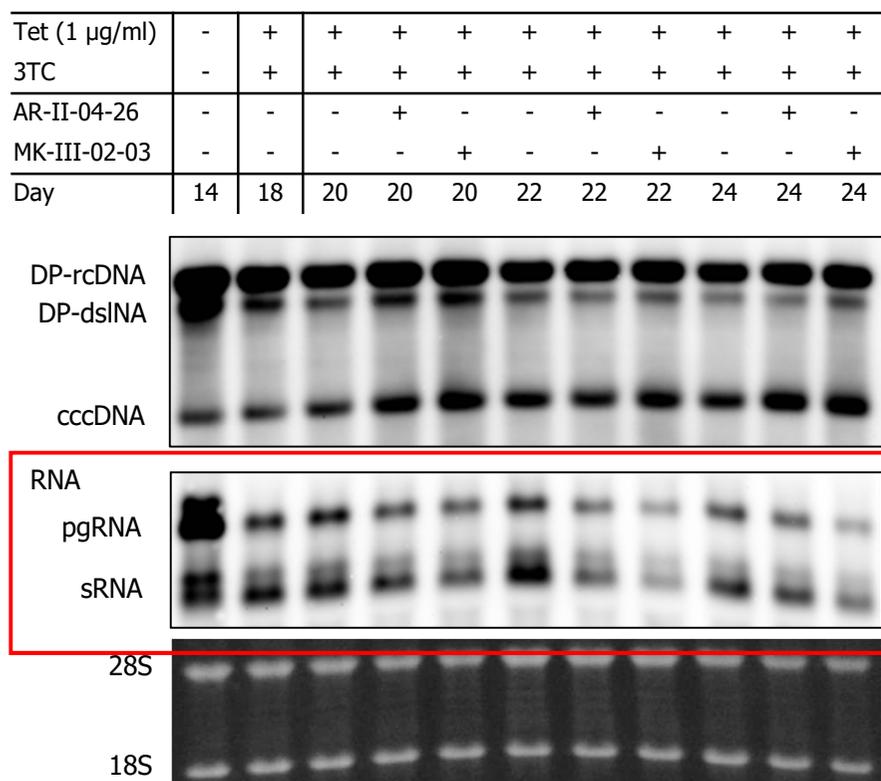


図3. cccDNA から転写されるHBV RNA に対する効果

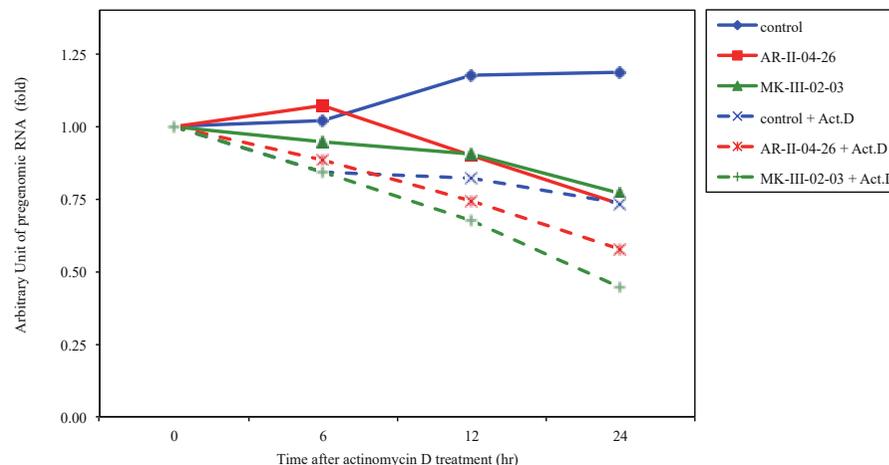
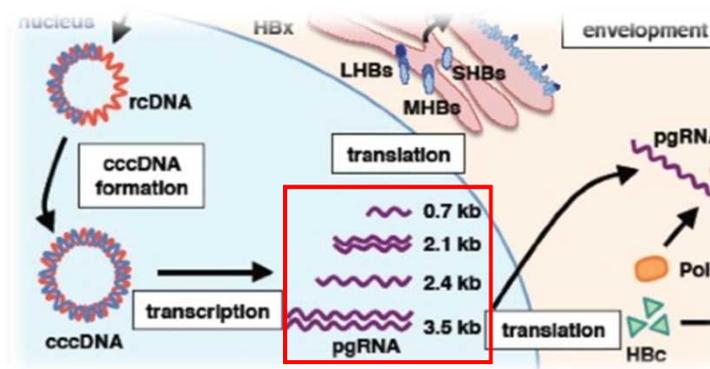


図4. 新規核酸誘導体のHBV RNA 分解に対する効果

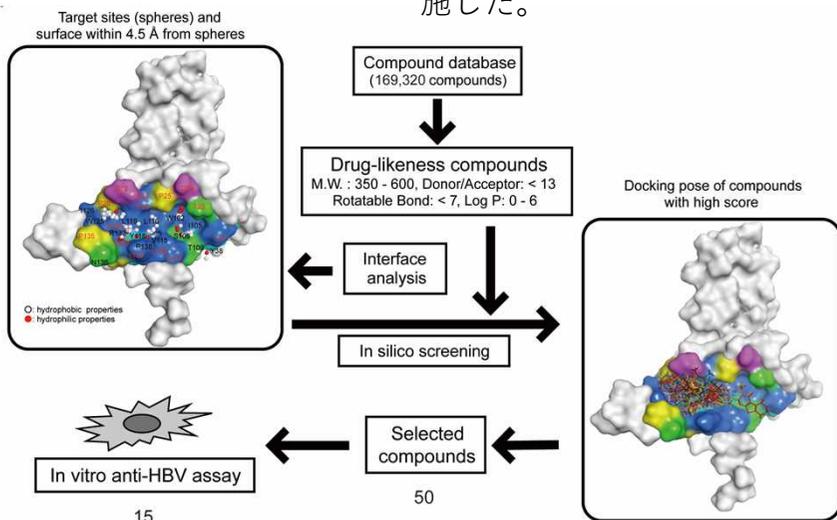
- 抗HBV作用機序はviral RNAの分解促進であることを明らかにした。



新規抗HBV薬の同定と開発 (3)

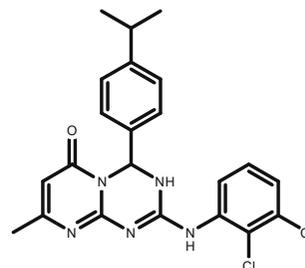
馬場昌範, 外山政明, 岡本実佳 (鹿児島大), 岡村浩昭, 鬼束聡明 (鹿児島大)
渡士幸一, 脇田隆字 (感染研)

- カプシドタンパク質を標的とした *in silico* screening を実施した。

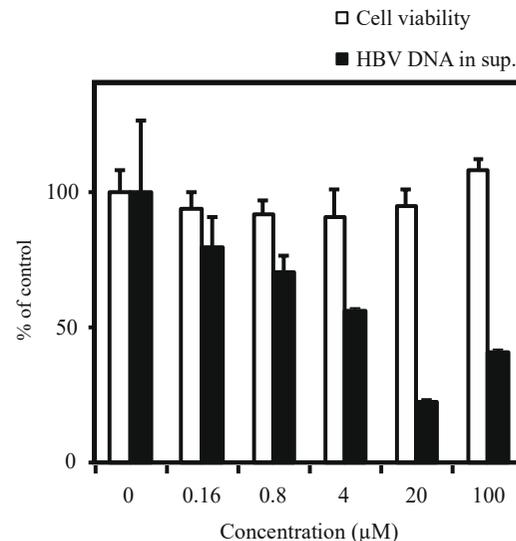


- さらに抗HBV効果の強い誘導体を同定した。

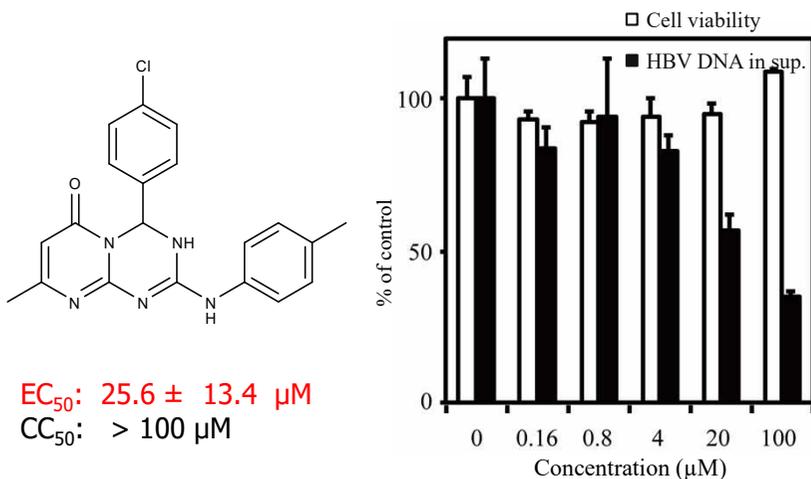
Compound 2a



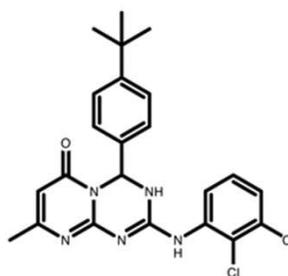
EC_{50} : $6.9 \pm 1.9 \mu\text{M}$
 CC_{50} : $> 100 \mu\text{M}$



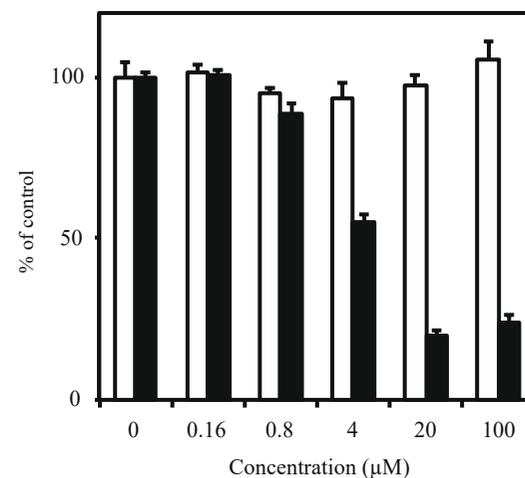
- In silico* screening 2より選ばれた化合物から, 選択的な抗HBV効果を有する化合物を同定した。



Compound 2b



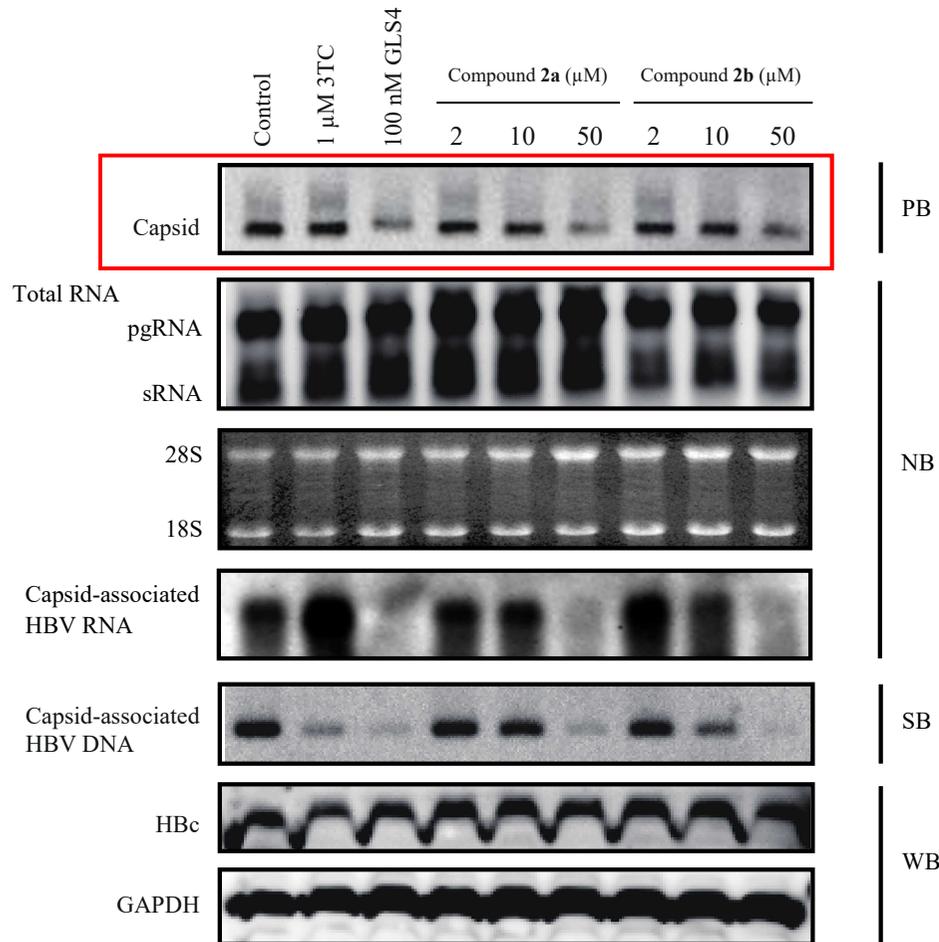
EC_{50} : $5.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$
 CC_{50} : $> 100 \mu\text{M}$



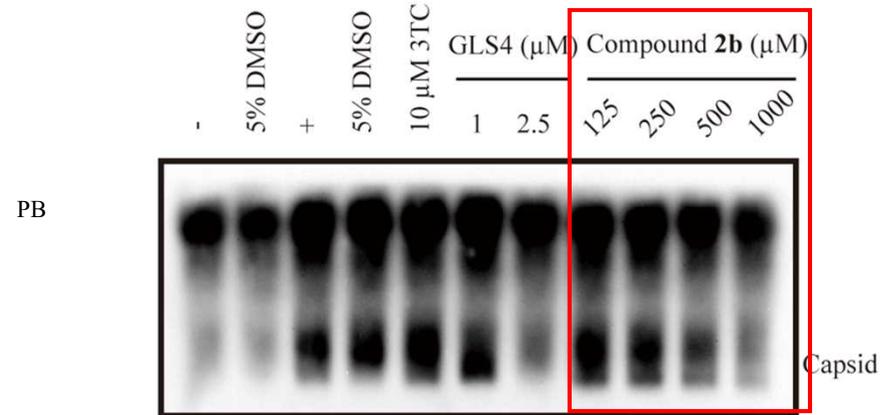
新規抗HBV薬の同定と開発（4）

馬場昌範, 外山政明, 岡本実佳 (鹿児島大), 岡村浩昭, 鬼束聡明 (鹿児島大学)
渡士幸一, 脇田隆字 (感染研)

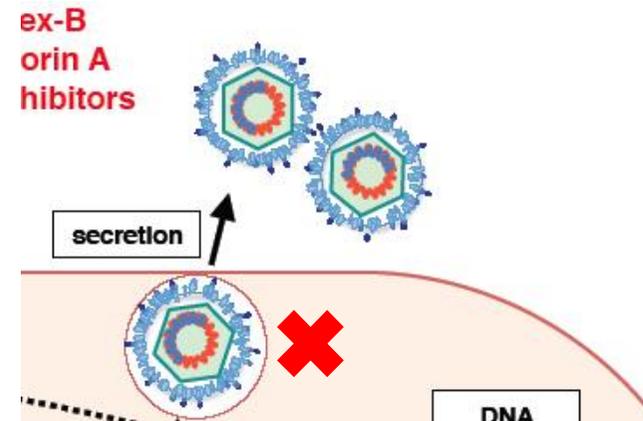
- In silico screening より得られた化合物は HepG2.2.15.7細胞の**カプシド形成を阻害**した。



- In silico screening より得られた化合物はカプシドタンパク質のみからの**カプシド形成を阻害**した。



- In silico screening より得られた化合物は**カプシド形成を阻害**することで抗HBV効果を示したことが明らかとなった。



B型肝炎ウイルス創薬標的

- ✓ エントリー阻害剤の開発
- ✓ 逆転写酵素アッセイの構築と阻害剤探索
- ✓ キャプシド阻害剤と新規核酸アナログの開発
- ✓ HBs抗原およびHBc抗原による治療ワクチン

**NASVAC (HBcおよびHBs抗原ワクチン) による
抗HBV, 肝臓保護、抗肝硬変を目指す新規免疫療法**

Fazle Akbar, MBBS, MD, PhD
Department of Pathology,
Protein Science-Center, Ehime University Graduate School of Medicine

NASVACの開発経過

1988-2006 → Proof Of Concept, Animal Study, In vitro in CHB, 正常成人
(愛媛大学およびキューバ)
(HBsAg単独ワクチンでは効果が得られず)

2009 → Phase I/II 臨床試験18名 慢性B型肝炎
(バングラデッシュ未治療患者)

2012 → Phase III 臨床試験160名、peg-IFNとの比較試験
(バングラデッシュ未治療患者)

2013 → 核酸アナログ既治療患者 (キューバ, アジア各国, 日本, バングラデッシュ)

2016 → 数カ国でNASVAC が薬剤として承認される

2016 → NASVACの有効性を核酸アナログ治療歴のある患者グループで
確認試験
NASVACの有効性のメカニズムを解析

B型肝炎創薬研究

背景と現状

HBワクチン、輸血のスクリーニングなどにより新規感染は減ったが、多数のHBVキャリアが存在する

核酸アナログ単独治療によるウイルス排除は困難

新規抗HBV治療法の開発が必要

目標：cccDNA排除、HBs抗原陰性
→ Drug free化

核酸アナログ + **新規抗HBV薬（特に抗cccDNA）**