

胆汁酸トランスポーターNTCP/SLC10A1 を標的とした

B 型肝炎ウイルスの感染阻害薬開発と感染機構の解明

Elucidation of Molecular Mechanism of Hepatitis B Virus Infection
and Drug Discovery Targeting Bile Acid Transporter, NTCP/SLC10A1

平成 27 年度入学 深野 颯人 (Fukano, Kento)

指導教員 小笠原 裕樹

～背景～

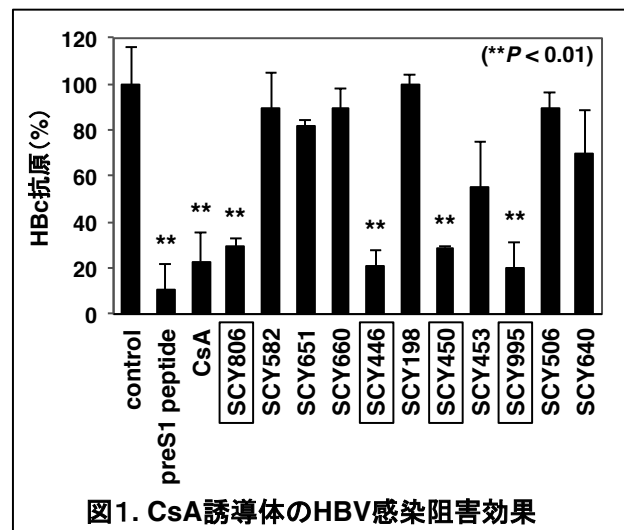
B 型肝炎ウイルス (HBV) は全世界でおよそ 2 億 6 千万人、日本に約 100 万人のキャリアが存在すると推定されており、その持続感染は肝硬変、肝細胞がんなど慢性肝疾患の発症リスクを高める。HBV に対する現行の抗ウイルス薬として、インターフェロン α (interferon-alpha: IFN α) 及びペグ化 IFN α などの IFN 類や、ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビルといった核酸アナログ型逆転写酵素阻害剤が用いられている。しかしながら、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現といった問題に加え、これらの治療薬は一度感染した細胞から HBV を完全に排除することは非常に困難である。そのため、これまでとは異なった作用機序を有する治療薬の開発が求められている。

HBV が肝細胞へ侵入する際に必須の宿主受容体として、肝細胞基底膜側表面に特異的に発現する胆汁酸トランスポーター sodium taurocholate cotransporting polypeptide / solute carrier family 10 member 1 (NTCP/SLC10A1) が 2012 年に報告されて以来、NTCP を標的とする HBV 侵入阻害化合物の探索が盛んに行われてきた。しかし、これまでに報告されている HBV 侵

入阻害化合物のほぼ全ては、HBV の侵入だけでなく NTCP 本来の機能である肝細胞内への胆汁酸取り込みも阻害してしまうため、胆汁酸代謝変化による様々な副作用が懸念される。そこで本研究ではまず、NTCP を標的としつつ、その生理機能には影響せずに HBV 感染を阻害できる特異的な HBV 吸着阻害化合物の探索及び作用の解析を行った。さらに別のアプローチとして、これまで標的とされてきた HBV の NTCP への吸着過程ではなく HBV の内在化に着目した。HBV 内在化機構に関しては、エンドサイトーシス依存的に細胞内に取り込まれることが知られるが、その詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。そこで内在化を阻害する化合物を探索し、これを用いて HBV 内在化分子機構の解析を試みた。

I. シクロスポリン誘導体を用いた HBV 吸着阻害化合物の探索とその作用機序の解析¹⁾

既に HBV の侵入阻害薬として報告されているシクロスポリン A (CsA) に着目し、その誘導体の活性を解析した。11 種のシクロスポリン誘導体のうち、4 種の誘導体 (SCY806、SCY446、SCY450、SCY995) は免疫抑制



活性を完全に欠失しているが、CsA と同等以上の HBV の感染阻害活性を有していた (図 1)。これらの誘導体は初代ヒト肝細胞への HBV 感染も濃度依存的に阻害し、その IC₅₀ は 0.4~2 μM であった。また興味深いことに、抗 HBV 効果を示した誘導体のうち SCY995 は、NTCP に直接結合するが胆汁酸の取り込みを低下させないことが明らかとなった (図 2)。さらに、こ

これらの化合物は様々な遺伝子型の HBV や核酸アナログに耐性を有する HBV の感染も抑制し、広範な抗ウイルス活性を有していた。

次に、 $[^3\text{H}]$ 標識胆汁酸を用いたカイネ

ティクスアッセイを行い、得られたミカエリスメンテンプロットから、CsA 及び SCY446 は NTCP の胆汁酸結合ポケットに相互作用することが示唆された (図 3)。また、HBV エンベロープペプチドを用いたカイネティクスアッセイより、SCY995 は NTCP の胆汁酸結合ポケット外側のウイルス吸着部位に相互作用することが示唆された。

NTCP の胆汁酸取り込みを阻害せず HBV 感染を選択的に阻害する化合物はこの SCY995 が初めて

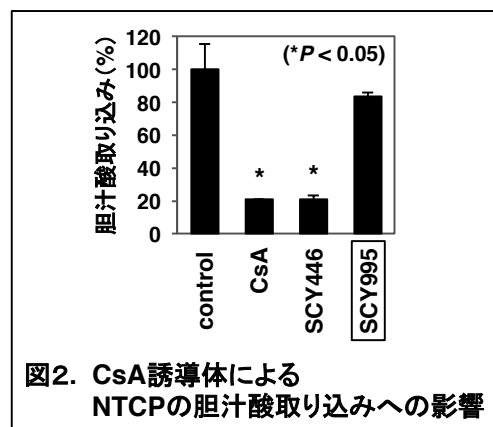


図2. CsA誘導体によるNTCPの胆汁酸取り込みへの影響

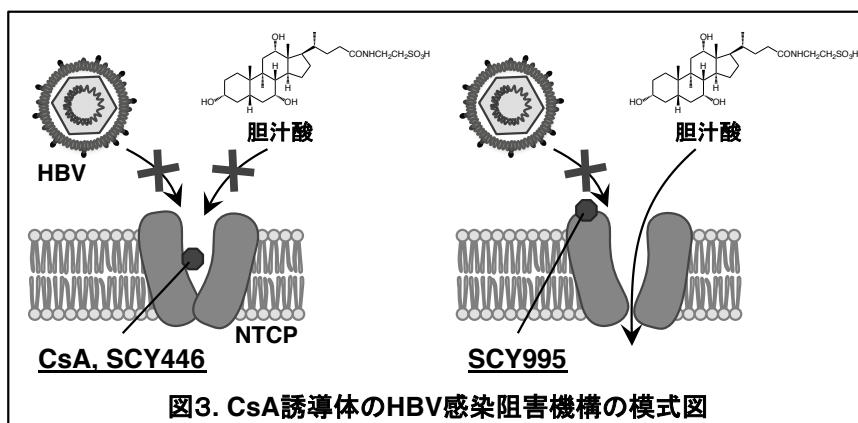


図3. CsA誘導体のHBV感染阻害機構の模式図

の例であり、この結果から NTCP の有するトランスポーター機能とウイルス受容体機能が分離可能であることが示された。

II. NTCP の胆汁酸取り込み機能に影響しない HBV 特異的侵入阻害ペプチドの探索²⁾

以上の培養系を用いたスクリーニングにより、NTCP を標的としながら選択的な HBV 侵入阻害化合物を得られることが示唆されたため、よりスループットの高い *in vitro* スクリーニング技術である RaPID (Random

Peptide Integrated Discovery) システムを利用して、高多様性特殊環状ペプチドライブラリーから NTCP に高い結合親和性を示すペプチド候補を見出した。さらに得られたペプチドの中に高

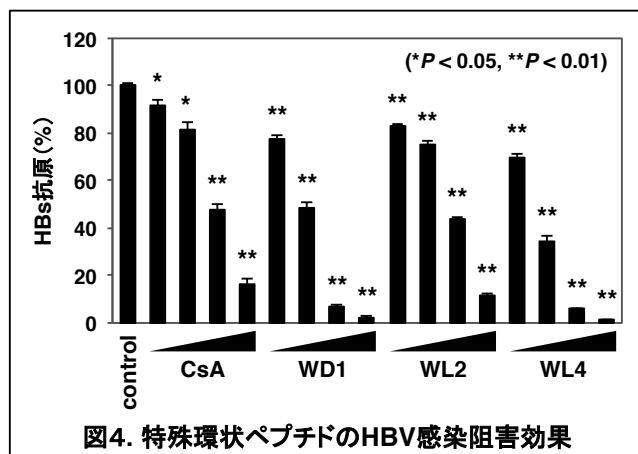


図4. 特殊環状ペプチドのHBV感染阻害効果

頻度に認められた配列を NTCP 結合モチーフと考え、この配列を持つフォークスライブラリーを用いてさらにスクリーニングを行い、10種の二次ヒットペプチドを得た。これらの中でも3種のペプチド(WD1、WL2、WL4)はHBVの感染を強く阻害し、CsAよりもその活性が高く、IC₅₀は0.66~2.5 μMであった(図4)。さらに、これらのペプチドは溶解最大濃度においてもNTCPの胆汁酸取り込みを低下させないことが明らかとなった(図5)。

また、これらのペプチドは様々な遺伝子型のHBVや核酸アナログ耐性HBV、ワクチン逃避HBVの感染も抑制することから、より副作用が少ない高活性な抗HBV薬のシーズになり得ると期待される。

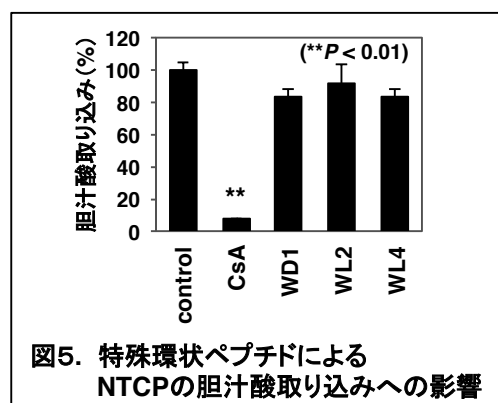
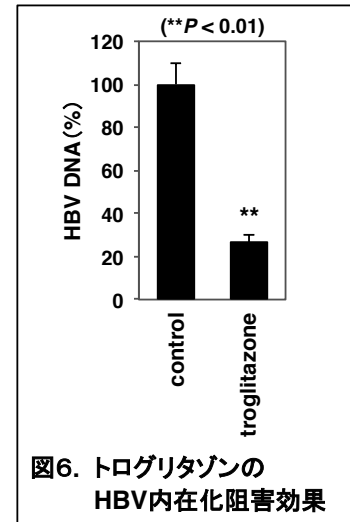


図5. 特殊環状ペプチドによるNTCPの胆汁酸取り込みへの影響

Ⅲ. HBV 内在化阻害化合物の同定³⁾

化合物スクリーニングにより、PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体トログリタゾンが高い抗HBV活性を持つことを見出した。さらに7つのチアゾリジン誘導体などを用いて構造活性相関を解析した結果、より強い抗HBV活性を有するシグリタゾンを見出した。しかし、これらの化合物が示す抗ウイルス活性は、PPAR γ アゴニスト活性非依存的であった。

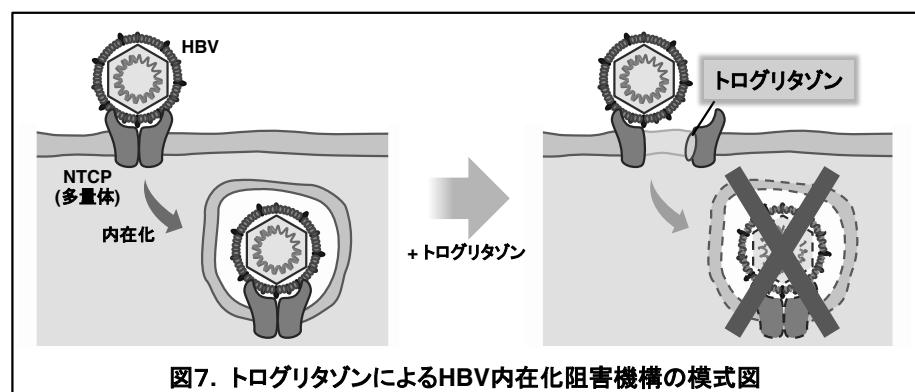
また、これらは HBV の侵入過程に作用するが、これまでの HBV 侵入阻害化合物と異なり、HBV の細胞表面への吸着は阻害しなかった。即ちトログリタゾンは、既知の阻害剤とは異なる機序により HBV の内在化を顕著に阻害することが示唆された (図6)。



IV. トログリタゾンを用いた HBV 内在化機構の解析³⁾

NTCP を含む多くの SLC トランスポーターは、その活性維持や Trafficking 制御のために二量体または多量体を形成することが知られる。そこで NTCP の多量体形成に着目し、トログリタゾンによる HBV の内在化阻害メカニズムを解析した。通常状態において一定量の NTCP は多量体を形成しているが、ウイルスエンベロープペプチドが吸着することにより多量体化が促進することを見出した。そしてトログリタゾンはその NTCP の多量体化を阻害することが明らかとなった (図7)。また、NTCP の多量体化に関わるタンパク質の領域を解析し、その領域から成るペプチドを用いて検討したところ、トログリタゾン同様に HBV 内在化の阻害を示した。この結果は、NTCP の多量体化が HBV 内在化に繋がる重要な現象であることを示唆する

とともに、この過程が新たな創薬標的になり得ることを示すものである。



～総括～

本研究では、NTCP に直接作用するが胆汁酸取り込み機能には影響しない特異的な HBV 感染阻害化合物として、シクロsporin誘導体 SCY995 及び特殊環状ペプチド WD1、WL2、WL4 を初めて見出した。これらは、環状構造ペプチドとして生体内での安定性が高いため経口投与できる可能性もあり、臨床試験中の HBV 侵入阻害薬が有する問題点を解決できる新規治療薬候補として期待される。また、これまでに報告のない新たな作用機序である HBV 内在化を阻害する化合物としてトログリタゾンを見出した。これは NTCP 多量体化及び HBV 内在化の過程が創薬標的になり得ることを初めて示す知見であり、トログリタゾンやその誘導体が抗 HBV 薬のシーズとしてだけでなく、今後の研究展開において、未だ明らかでない HBV 内在化過程のメカニズムを解析する有用なプローブになると考えられる。以上のように、本研究では HBV の侵入過程を標的とした創薬研究を行い、そのユニークな成果として、新たな特徴を持つ複数の候補化合物を得ることができた (図 8)。本研究成果は、現在強く求められている B

型肝炎治療薬の新たな開発戦略に有用であるとともに、未だ不明な点を残す HBV の侵入メカニズムを解明する上で重要な知見を提供するものである。

(参考文献)

- 1) Shimura S., Watashi K., Fukano K., Peel M., Sluder A., Kawai F., Iwamoto M., Tsukuda S., Takeuchi JS., Miyake T., Sugiyama M., Ogasawara Y., Park SY., Tanaka Y., Kusuhara H., Mizokami M., Sureau C., Wakita T., *J Hepatol.*, **66**, 685-692 (2017).
- 2) Passioura T., Watashi K., Fukano K., Shimura S., Saso W., Morishita R., Ogasawara Y., Tanaka Y., Mizokami M., Sureau C., Suga H., Wakita T., *Cell Chem Biol.*, **25**, 906-915 (2018).
- 3) Fukano K., Tsukuda S., Oshima M., Suzuki R., Aizaki H., Ohki M., Park SY., Muramatsu M., Wakita T., Sureau C., Ogasawara Y., Watashi K., *Front Microbiol.*, in press.

