

B型肝炎の新薬開発に成功！ 新しい機序の治療法の開発は、いよいよ治験準備段階へ

(ポイント)

- **B型肝炎ウイルス(HBV)※¹による肝疾患の深刻な状況:** B型肝炎ウイルス感染により生じるB型肝炎は毎年多くの方の死因となる重要な感染症ですが、現在の治療法では治療目標である“機能的治癒”を意味するHBs抗原※²の陰性化を達成することは困難です。
- **新規薬剤「SAG-524」の開発とその作用機序の解明:** 本研究チームは、3万種類の化合物からHBVのDNAと蛋白を効果的に減少させる「SAG-524」を開発しました。この薬剤はHBVのRNAを不安定化※³させることで、HBs抗原を低下させウイルスの複製を阻害する新しい作用機序を持ちます。
- **SAG-524の臨床試験に向けた展望と期待:** SAG-524はHBVに対して強力な効果を発揮し、かつ明らかな毒性は示さず、現在臨床試験に向けた準備が進んでおり、HBV治療の新しい選択肢として、特に核酸アナログ製剤との併用療法で、機能的治癒への期待が高まっています。

(概要説明)

熊本大学大学院生命科学研究部の田中靖人教授、渡邊丈久助教、林佐奈衣特任助教らの研究チームは、血液中のHBs抗原及びB型肝炎ウイルス(HBV)の複製を抑制する、強力で経口投与可能な新たな低分子化合物「SAG-524」を開発しました。この化合物は、HBVのRNAを不安定化させることによって、ウイルスのDNA及び表面抗原(HBs抗原)の量を大幅に低減させることができます。また、経口投与が可能であり、マウス・サルを用いた安全性試験では明らかな毒性は認めませんでした。

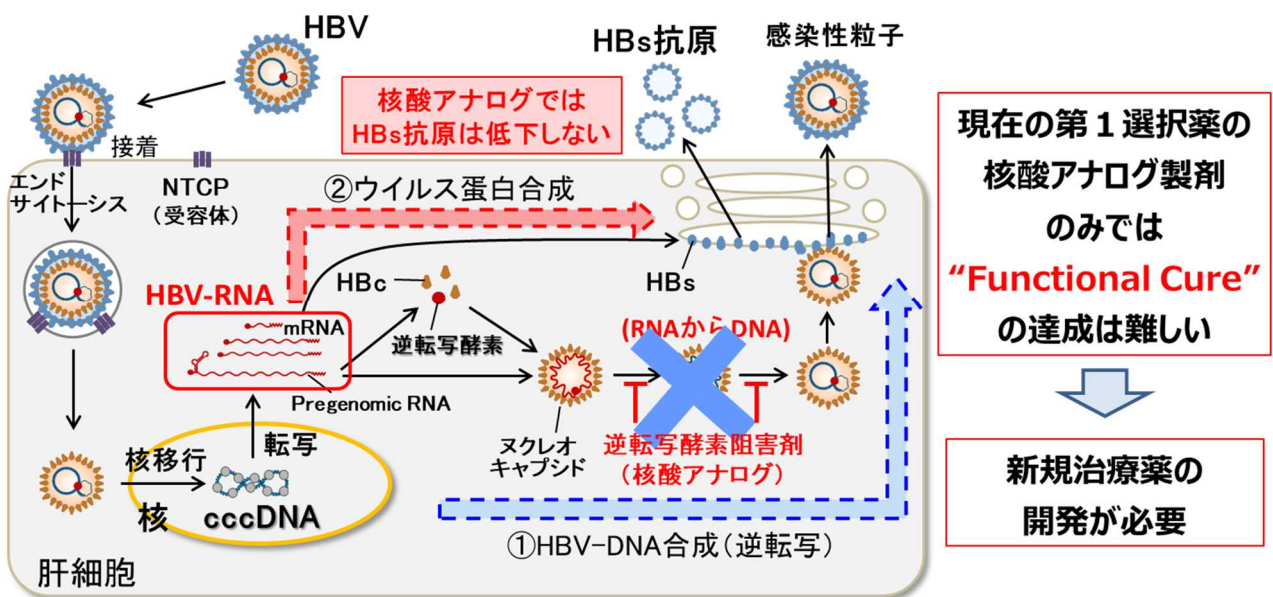
B型慢性肝炎の標準治療である核酸アナログ製剤は、HBVの設計図であるHBV-DNAを強力で減少させますが、機能的治癒とよばれB型肝炎の治療目標である血液中HBs抗原の消失への寄与は限られていました。

今回の新たな化合物発見により、B型慢性肝炎の機能的治癒への道が開かれることが期待されます。

本研究成果は、2024年2月5日付で科学雑誌「Journal of Gastroenterology」(2024年4月号)に掲載されました。本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)肝炎等克服実用化研究事業「実用化に向けたB型肝炎新規治療薬の開発」の支援を受けて実施したものです。

[背景]

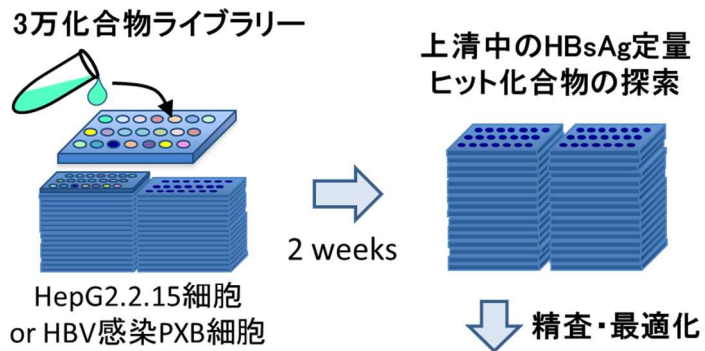
B型肝炎ウイルス(HBV)は、B型慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの肝疾患の原因であり、世界で2億9000万人以上が感染しており毎年68万6000人以上がこの病気によって死亡している重要な感染症です。一度肝細胞に感染すると完全には体内から排除できないHBVに対して、現在の治療目標はウイルス増殖の沈静化であり、HBVの設計図であるHBV-DNAとウイルス蛋白であるHBs抗原の血中からの消失は临床上重要な指標とされています。特に血中HBs抗原の血中からの消失は“Functional cure(機能的治癒)”と呼ばれており、肝発癌リスクが軽減することが分かっています。現在HBV治療の第一選択薬として使用されている核酸アナログ製剤は、HBV-DNAを強力に抑制しますが、血液中HBs抗原の低下効果(消失)は限定的であり、新規治療薬の開発が求められています(図1)。



(図1)HBVの生活環と薬剤の関係:ウイルスは肝細胞侵入後に細胞核内に安定対であるcccDNAを合成する。cccDNAからHBV-RNAが転写され、①逆転写によるHBV-DNA合成と、翻訳による②ウイルス蛋白合成が行われる。核酸アナログ製剤は①の逆転写を阻害する薬剤であり、②の経路を経るHBs抗原合成系には直接関与しない。

[研究の内容]

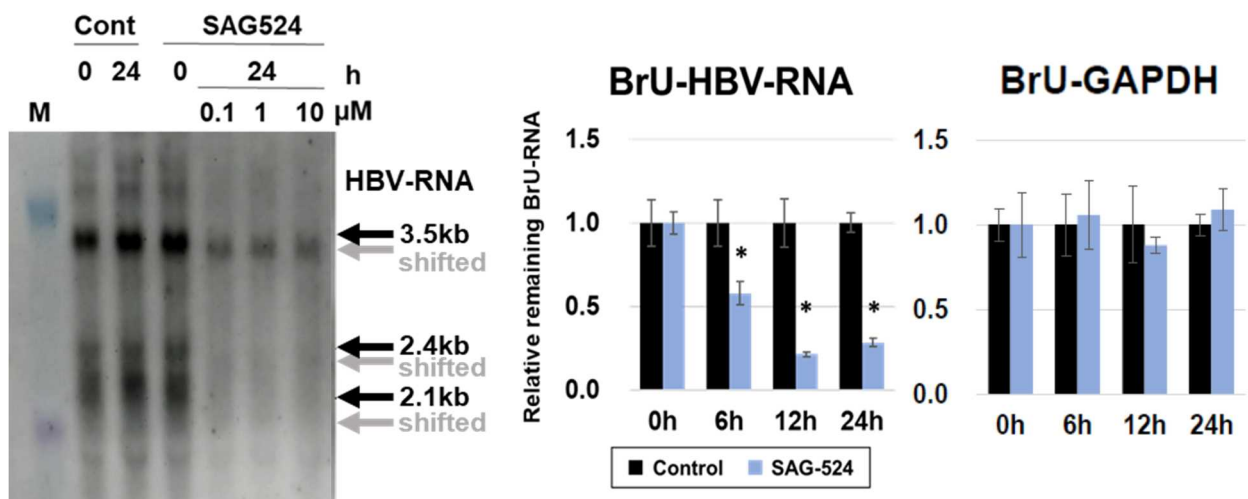
田中教授らの研究チームは、HBs抗原を効果的に阻害する薬剤の開発のために、3万種類の化合物に対して、HBV感染細胞モデルであるHBV感染ヒト肝細胞(PXB細胞)及びHBVを恒常的に産生するヒト肝臓細胞(HepG2.2.15細胞)の培地に薬剤を加え、培養上清中のHBs抗原量及びHBV-DNAを低下させる薬剤を選択する方法で、いくつかの候補薬剤を発見しました。さらに候補薬剤を最適化することで、非常に低い濃度でHBV-DNAとHBs抗原を強力に低減させることが可能で、かつ低毒性の化合物である「SAG-524」を開発しました(図2)。



	Extracellular HBV DNA	Extracellular HBsAg	Intracellular HBV DNA	CC ₅₀ (nM)
	EC ₅₀ ± SD (nM)			
SAG-524	2.33 ± 1.40	4.54 ± 0.27	1.86 ± 1.68	>1000

(図2) SAG-524の発見: HBV感染細胞モデル(HBV感染したヒト肝臓細胞(PXB細胞)、及びHBVを恒常的に産生するヒト肝臓細胞(HepG2.2.15細胞))を用いていくつかの候補薬剤を発見し、最適化を経て、非常に低い濃度でHBV DNAとHBs抗原を強力に低減させることが可能な低分子化合物である「SAG-524」を開発した。SAG-524は細胞へのダメージはなかった。

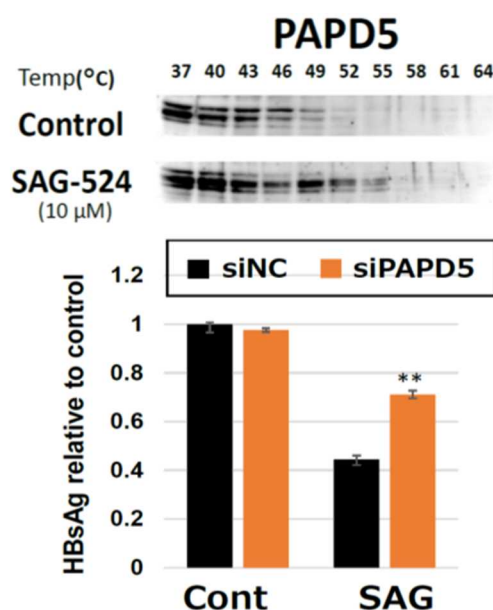
次に、本研究チームは、この化合物がどのようにして作用するか解析しました。その結果、SAG-524はHBV-DNAとHBs抗原両方の産生の起点となる細胞内のpgRNAやPreS/S mRNAなどのHBV-RNAを不安定化し分解されやすい状態にすることで、抗HBV作用を発揮することが分かりました。また、この作用はHBVに対し特異的であることも分かりました(図3)。



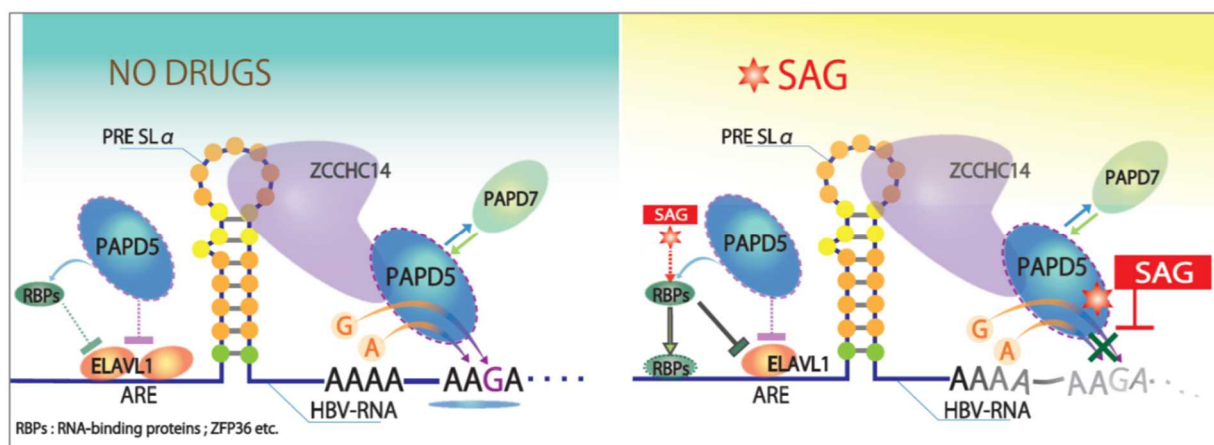
(図3) SAG-524によるHBV-RNAの不安定化。図3左: SAG-524はHBV-RNAを特異的に阻害することにより、抗HBV効果を発揮する。ノザンブロット^{※4}の結果、SAG-524により細胞内の各HBV-RNAが不安定化し、RNA長の短縮と分解が進んでいた。図3右: 細胞内RNA安定性実験であるBRICアッセイ(5'-bromouridine IP chase assay)^{※5}の結果、SAG-524によりHBV-RNAが特異的に不安定化された。

次に、本研究チームは SAG-524 が HBV-RNA を不安定化する機序を検討しました。RNA ポリ(A)ポリメラーゼである PAPD5^{*6} は HBV-RNA を安定化する分子の一つで、ポリ(A)合成時にランダムにグアニン(G)を挿入することで、デアニラーゼによるポリ(A)の分解を回避することで、HBV-RNA を安定化しています。蛋白結合アッセイの結果、SAG-524 と PAPD5 との結合が検出されました(図 4 上)。また、siRNA を用いて PAPD5 をノックダウンすると、SAG-524 の抗 HBV 効果が減弱しました(図 4 下)。このことから、SAG-524 の抗 HBV 作用は PAPD5 を介していることが判明しました。

以上の実験結果から、SAG-524 は PAPD5 の働きを阻害することで、HBV-RNA を不安定化すると考えられました(図5)。



(図4) SAG-524はPAPD5を介して抗HBV作用を示す。図4上:蛋白結合アッセイの結果、SAG-524処理によりPAPD5は熱分解されにくくなり、SAG-524とPAPD5との結合が検出された。図4下: siRNAを用いてPAPD5をノックダウンすると、SAG-524の抗HBV効果が減弱した。

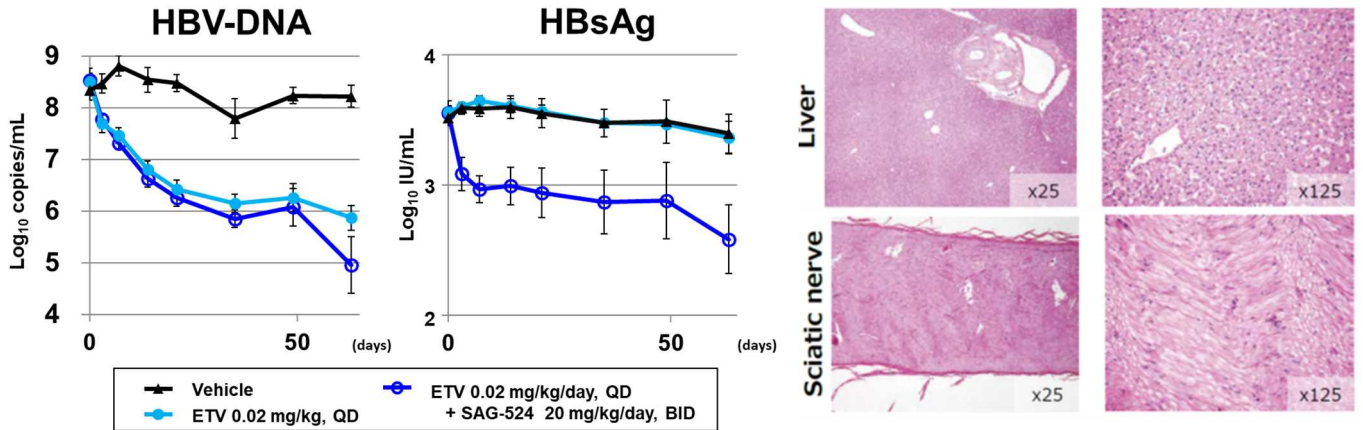


(図5) SAG-524はPAPD5を阻害しHBV-RNA不安定化する。図5左: HBV-RNAの3'側非翻訳領域の末端に連続してアデニン(A)が配置されるポリ(A)はHBV-RNAの安定化に重要である。ポリ(A)は細胞内のデアニラーゼにより分解されるが、ポリ(A)ポリメラーゼの一つであるPAPD5は(A)以外にランダムにグアニン(G)を挿入することで、デアニラーゼによるRNAの分解を回避し、HBV-RNAを安定化する。図5右: SAG-524がPAPD5を阻害しHBV-RNAを不安定化することで、抗HBV作用を発揮していた。

次に、本研究チームは肝臓をヒト化したキメラマウス(PXBマウス)にHBVに感染させたB型肝炎モデルマウスを用いて、生体でのSAG-524の抗HBV効果を検討しました。SAG-524を核酸アナログ製剤であるエンテカビル(ETV)と共に経口投与した併用療法実験では、ETV単剤投与よりさらに血清中HBV-DNAが低下するETVへの上

乗せ効果と、HBs抗原の低下が確認されました(図6左)。

さらにマウスを用いた予備試験及び大型動物であるサルにSAG-524を経口投与した安全性試験では、最大1000 mg/kg/日という超高用量を投与した場合でも、明らかな毒性は認められませんでした(図6右)。



(図6) 動物モデルを用いたSAG-524の有効性と安全性の評価。図6左: 肝臓をヒト化したキメラマウス(PXBマウス)にHBVを感染させた“B型肝炎モデルマウス”にSAG-524と核酸アナログ製剤であるエンテカビル(ETV)を経口投与した併用療法実験では、血清中のHBV-DNAはETV単剤投与よりさらに低下し、HBs抗原も低下した。図6右: 大型動物であるサルに超高用量のSAG-524を2週間経口投与した安全性試験では血液検査と病理像に明らかな毒性は認めなかった。

[成果]

田中教授らの研究グループは、HBV-RNA を特異的に不安定化させることにより抗 HBV 作用を発揮し、HBs 抗原を減らすことが可能な新しい機序の薬剤である SAG-524 を開発しました。本薬剤は経口投与可能で、実験動物を用いた検討では従来の核酸アナログ製剤との併用療法も可能であり、上乘せ効果も確認されました。また、サルを用いた安全性試験でも高い忍容性が示されました。

[展開]

機能的治癒を目指し開発された SAG-524 は、現在臨床試験に向けた準備が進んでおり、さらに核酸アナログ製剤との併用による経口 2 剤併用療法など新しい治療法の開発も並行して進んでおり、B 型肝炎治療の新しい選択肢として期待されています。今後さらに研究が発展し機能的治癒への道が開かれることが期待されます。

[用語解説]

※1 HBV(B型肝炎ウイルス)

肝臓に感染し、急性及び慢性の肝炎を引き起こすことがある DNA ウイルス。一度感染すると完全に排除することが難しく、肝硬変や肝細胞癌の主要な原因の一つとなっている。

※2 HBs 抗原(B型肝炎表面抗原, HBsAg)

HBs 抗原は、HBV の表面に存在する抗原で、B型肝炎の病勢を示す臨床的に重要なウイルスマーカー。

※3 RNA 不安定化

生物を構成する蛋白の合成に必要な RNA 分子の分解を促進することにより、細胞内の RNA の量を調節し、その機能を制御する重要な機構。

※4 ノザンプロット法

特定の RNA 分子を検出し、そのサイズを決定するための分子生物学的手法。RNA サンプルをゲル電気泳動で分離し膜に移行させた後、膜上の RNA に対して相補的なプローブを使用してハイブリダイゼーションを行い、目的の RNA を検出する。遺伝子の発現分析に広く用いられている。

※5 BRIC アッセイ(5'-bromouridine IP chase assay)

細胞に 5'-bromouridine (BrU) を取り込ませ、時間経過とともに BrU を含む RNA 分子の減少を追跡することで細胞内の RNA 分子の安定性を定量的に分析する実験手法。特定の RNA 分子の半減期を決定し、その安定性に影響を与える要因を研究するのに有用。

※6 PAPD5(別名 TENT4B)

RNA の 3' 側末端にアデニン(A)を連続的に付加し、poly(A)と呼ばれる RNA 分子の安定化に必要な構造を追加する酵素である poly(A)ポリメラーゼの1つ。Poly(A)はデアニラーゼという poly(A)分解酵素により分解され、その結果 RNA 分子が崩壊する。非典型的 poly(A)ポリメラーゼである PAPD5 は、poly(A)の付加の際にランダムにグアニン(G)を取り込むことで、RNA がデアニラーゼによる分解を受けにくくすることで RNA を安定化する。

(論文情報)

論文名 : A novel, small anti-HBV compound reduces HBsAg and HBV DNA by destabilizing HBV RNA

著者 (いずれも熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科所属)

渡邊丈久、林佐奈衣、Yan Zhaoyu、稲田浩気、長岡克弥、立山雅邦、田中靖人 (責任著者)

掲載誌 : Journal of Gastroenterology. 2024 Apr;59(4):315-328. doi: Epub 2024 Feb 5.

doi: 10.1007/s00535-023-02070-y.

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-023-02070-y>

【お問い合わせ先】

熊本大学大学院生命科学研究部 教授

担当 : 田中靖人

電話 : 096-373-5150

e-mail : ytanaka*kumamoto-u.ac.jp

(*は@に変えてください)