

公立大学法人 名古屋市立大学

国立大学法人 熊本大学

学校法人 北里研究所

文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会
名古屋教育医療記者会、熊本県内報道機関と同時発表

イベルメクチンが抗 HBV 作用を有することを発見

(イベルメクチンの抗 HBV 作用とその作用機序を解析)

科学雑誌「*Viruses*」

2022年11月8日午後2時(中央ヨーロッパ時間)掲載

(日本時間2022年11月8日午後10時)

研究成果の概要

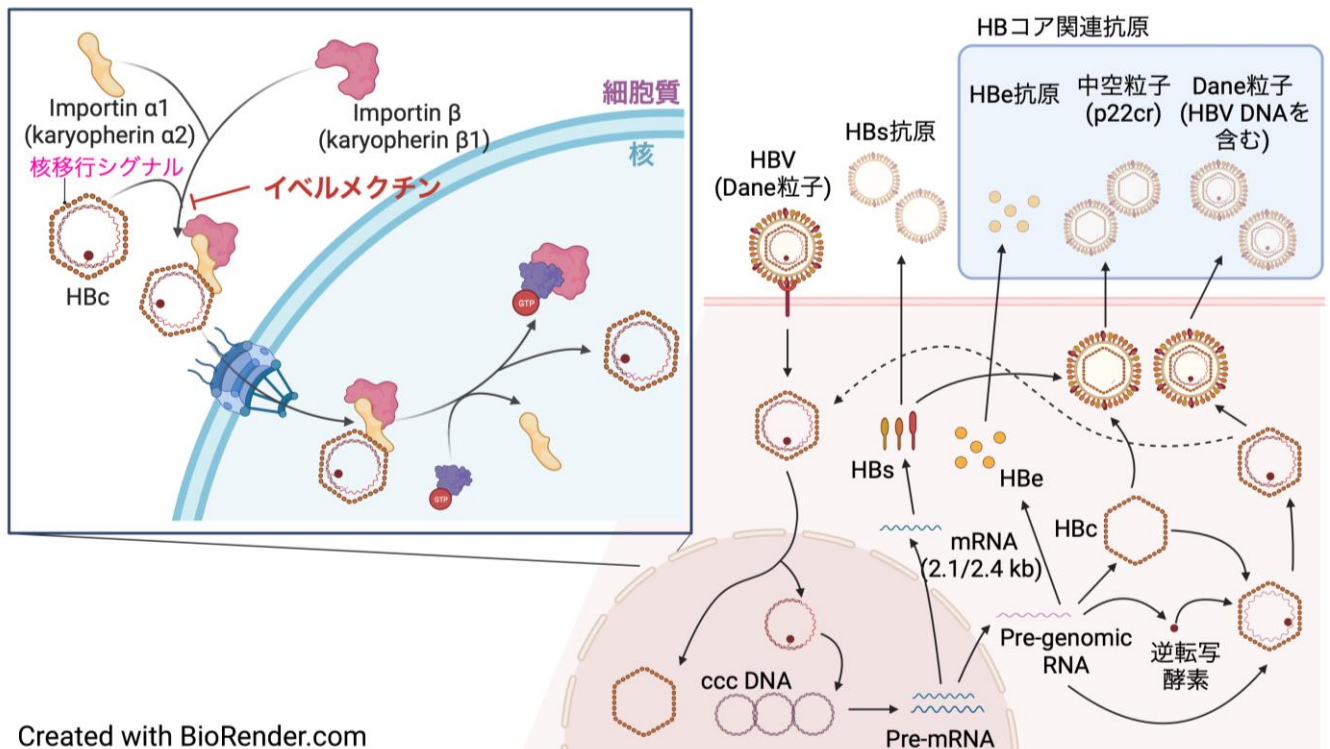
現在、B型肝炎ウイルス(HBV)(※1)感染による慢性肝炎の治療薬としては、主に核酸アナログ製剤(※2)が用いられています。核酸アナログ製剤は、HBV DNA量を非常に低レベルにまで減少させることが可能ですが、cccDNA(※3)やHBs抗原(※4)を陰性化することはできません。

名古屋市立大学大学院薬学研究科の松永 民秀 教授・坂下 真大 講師、熊本大学大学院生命科学研究部の田中 靖人 教授、北里大学大村智記念研究所の砂塚 敏明 教授・廣瀬 友靖 教授の研究グループは、近年複数のウイルスの抑制作用が注目されているイベルメクチン(※5)がHBV感染を抑制する作用を有することを明らかにしました。

イベルメクチンは細胞内の核-細胞質輸送体であるimportin α/β (※6)を特異的に阻害することで、1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)やデングウイルスなどのRNAウイルスの複製を抑制することが知られています。本研究グループは、HBVの構成成分であるHBVコアタンパク質(HBc)がimportin α/β で核内に輸送されることに着目し、イベルメクチンによる抗HBV作用を調べました。その結果、イベルメクチンはNTCP強制発現肝がん細胞(※7)およびヒト肝キメラマウス由来肝細胞(※8)の両細胞においてcccDNAやHBs抗原を減少させることが分かりました。また、イベルメクチンはHBcおよびimportin α のサブタイプの一つであるimportin $\alpha 1$ (karyopherin $\alpha 2$, KPNA2)の核内における存在量も低下させました。また、KPNA2の発現を抑制した状態ではcccDNAやHBs抗原の産生が抑えられたことから、KPNA2がHBV感染に関与していることが示唆されました。

本研究により、イベルメクチンがRNAウイルスの複製抑制だけでなく、DNAウイルスであるHBVに対しても抑制作用があることを発見し、その抗HBV効果はKPNA2の阻害によるHBcの核内蓄積抑制であることを明らかにしました。本研究は、HBV感染機構の解明とともに、イベルメクチンのドラッグリポジショニング(※9)や新規抗HBV治療薬の開発に繋がることが期待されます。

【参考図】



Created with BioRender.com

図1 HBV の生活環とイベルメクチンの作用部位

HBV の構成成分である HBV コアタンパク質 (HBc) は、核移行シグナルを有しており、宿主由来の importin α / β を介して核内に HBV ゲノムを輸送する。イベルメクチンはこの importin α / β を阻害し、HBV 感染を抑制することが示唆された。

【背景】

HBV は肝細胞に感染し、慢性肝炎や肝硬変、肝がんを引き起こします。世界保健機関 (WHO) により、毎年 80 万人以上が B 型肝炎関連疾患で死亡していることが報告されていることから、HBV 感染は世界的に重要な課題となっています。

現在、HBV 感染による慢性肝炎の治療薬には、主に核酸アナログ製剤が用いられています。核酸アナログは、HBV の逆転写酵素 (※10) を阻害することで HBV DNA を除去することができますが、cccDNA や HBs 抗原を陰性化することはできません。近年、HBV DNA 濃度が低くても、HBs 抗原濃度が高い患者では肝病変への進展率や発がん率が高いことが報告されており、HBs 抗原の陰性化が重要であると考えられています。そのため、既存の治療薬とは異なる作用機序を有する新規治療薬の開発が求められています。

イベルメクチンは、細胞内の核-細胞質輸送体である importin α / β を特異的に阻害することが報告されています。HBV のゲノム DNA を格納している HBc も importin α / β を介して核内に輸送されることが報告されていますが、イベルメクチンが抗 HBV 作用を有するかどうかは検証されていませんでした。

これらの背景より本研究グループは、イベルメクチンによる抗 HBV 作用と importin α / β に着目した作用機序について解析しました。

【研究の成果】

本研究グループは、イベルメクチンが importin α のサブタイプの1つである importin $\alpha 1$ (karyopherin $\alpha 2$, KPNA2) の核局在を阻害することで HBc の核への移行を減少させ、HBV 感染の阻害作用を示すことを明らかにしました。

NTCP 強制発現肝がん細胞およびヒト肝キメラマウス由来肝細胞に対し、イベルメクチンを HBV 感染前後に暴露させることで、培養上清中に分泌された HBV DNA、HBs 抗原の量が有意に低下しました (図 2)。また、これらの HBV マーカーの産生源である cccDNA 量も有意に減少しました (図 2)。

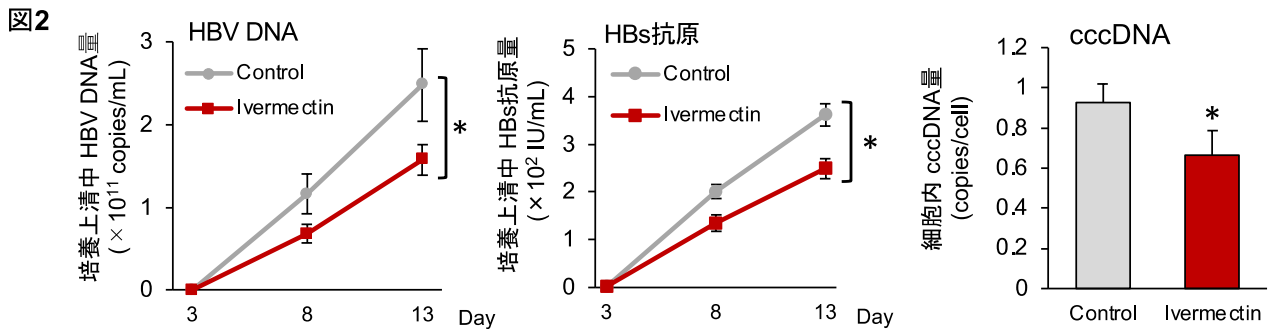


図 2 HBV 感染ヒト肝キメラマウス由来肝細胞に対するイベルメクチンの効果

ヒト肝キメラマウス由来肝細胞に HBV を感染させ、感染前後にイベルメクチンを暴露させた。イベルメクチンは HBV 感染 13 日後において細胞内の cccDNA および培養上清中の HBV DNA、HBs 抗原を有意に減少させた。

加えて、HBc を肝がん細胞に強制発現させ HBc の細胞内局在を調べたところ、イベルメクチンにより HBc の核内局在が有意に減少しました (図 3)。また、イベルメクチンによる importin α/β の細胞内局在への影響を調べたところ、KPNA2 の核内量のみ有意に減少することが明らかとなりました (図 4)。

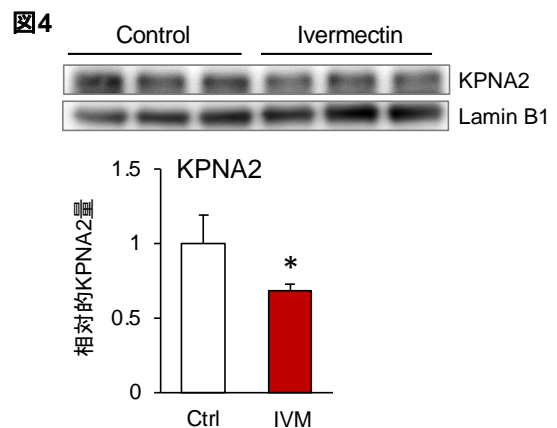
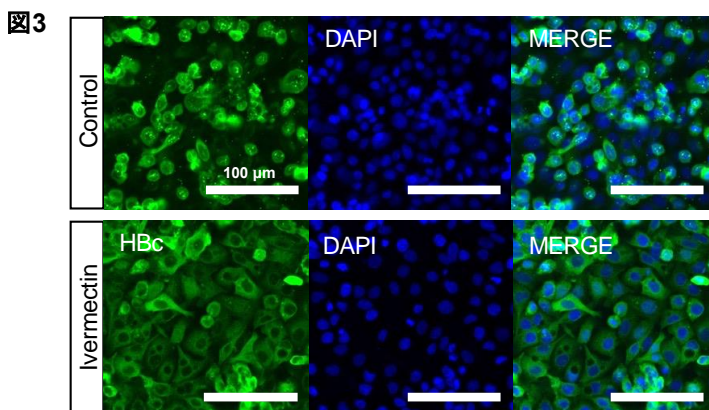


図 3 イベルメクチンによる HBc の細胞内局在変化

NTCP 強制発現肝がん細胞に HBc を発現させ、48 時間後の HBc の細胞内局在を免疫蛍光染色により調べた。イベルメクチンにより、核に存在する HBc 量が減少した。

図 4 イベルメクチンによる KPNA2 の核内量変化

NTCP 強制発現肝がん細胞に 48 時間イベルメクチン (IVM) を暴露させ、KPNA2 の核内量を調べた。イベルメクチンにより KPNA2 の核内量が非添加群 (Ctrl) と比較して有意に減少した。Lamin B1 は核マーカーである。KPNA2 量は Lamin B1 量で補正し、相対的 KPNA2 量は control の KPNA2 量を 1 として計算した。

さらに small interfering RNA (siRNA) を用いて肝がん細胞内の KPNA2 発現を抑制すると、HBV の産生が有意に抑制されました (図 5)。一方、importin β 1 (KPNB1) の核内量はイベルメクチンでは減少しませんでした。以上の結果から、イベルメクチンは KPNA2 の核内量を減少させることで HBc の核内局在を阻害し、HBV 感染を抑制していることが示唆されました。

図5

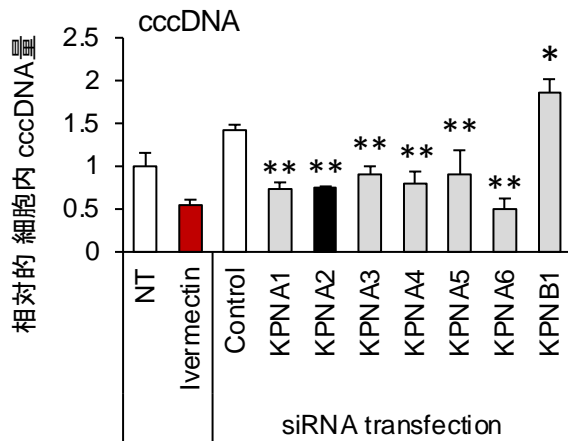


図5 KPNA1-6 および KPNB1 の発現抑制による HBV 感染への影響

siRNA を用いて NTCP 強制発現肝がん細胞内の KPNA1-6 および KPNB1 をそれぞれノックダウンし、その後 HBV を感染させた。KPNA1-6 をノックダウンすると cccDNA の産生量は有意に減少した。また、KPNB1 をノックダウンすると細胞死が誘発され、cccDNA が増加した。NT (non-transfection) は、siRNA を処理していない細胞を表す。NT における cccDNA 量を 1 として計算した。

【研究のポイント】

- ・ イベルメクチンが HBV 感染抑制作用を示すことを発見しました。
- ・ イベルメクチンは importin α/β の中でも特に KPNA2 を阻害することで HBc の核移行を抑制している可能性が考えられます。
- ・ HBV の感染機構の解明とともに、イベルメクチンのドラッグリポジショニングや新規抗 HBV 治療薬の開発に繋がることが期待されます。

【研究の意義と今後の展開や社会的意義など】

本研究では、イベルメクチンが抗 HBV 作用を有することを明らかにすることで、イベルメクチンの治療薬としての新たな可能性を示しました。しかし、イベルメクチンと HBc および importin の直接的な相互作用は未だ確認されておらず、今後は新たな解析方法を用いてこれらの相互作用を調べる必要があります。

また、importin は HBc の他に HBV の転写に関わるタンパク質の核輸送も担っていることから、イベルメクチンには HBc の核移行阻害以外の抗 HBV 機構が存在する可能性があります。イベルメクチンの HBV 感染慢性期への影響や生体内での効果については更なる検証が必要ですが、本研究はイベルメクチンの治療薬としての新たな可能性を示すものであり、HBV と宿主因子の相互作用の解明に繋がるものであると考えています。

【用語解説】

(※1) B型肝炎ウイルス (HBV) :

血液や体液などを介して肝臓に感染する DNA ウイルス。HBV は HBc が組み立てられて作られるキャプシドに格納されたゲノム DNA とそれを覆うエンベロープ抗原から構成されている。

(※2) 核酸アナログ製剤 :

HBV の逆転写酵素を特異的に阻害するため HBV DNA の産生は抑制できるが、逆転写酵素が関与しない HBs 抗原の産生は抑制しない。また、HBV DNA の産生源となる cccDNA も減少させることができない。

(※3) cccDNA :

HBV に感染後、細胞核内で前駆体 DNA (rcDNA) より形成される HBV に特徴的なゲノム DNA。Pre-genomic RNA や種々のウイルスタンパク質を作る mRNA 産生の鋳型となる。既存の治療薬では cccDNA の除去ができないため、完治が困難である。

(※4) HBs 抗原 :

HBV の外殻を構成するエンベロープタンパク質。三つのドメイン (preS1、preS2、S) から構成され、preS1 ドメインにある一部のアミノ酸領域が肝細胞への侵入に関与している。近年、HBs 抗原値と発がんとの関連が注目され、HBs 抗原の陰性化は治療成功のために重要である。

(※5) イベルメクチン :

放線菌から単離されたアベルメクチンを化学修飾して合成された化合物。グルタミン酸クロライドチャネルを阻害することにより駆虫効果を発揮するため、疥癬やオンコセルカ症の治療薬として使用されている。近年、importin α/β が関与する核内輸送経路を特異的に阻害することにより、HIV-1 や Dengue ウイルス感染を阻害することが報告されている。

(※6) importin α/β :

核-細胞質間のタンパク質の輸送を担う。Importin は karyopherin とも呼ばれており、 α と β のサブユニットを有している。Importin α は基質特異性の異なる 7 つのサブタイプ (karyopherin α 1-7, KPNA1-7) に分類される。Importin α は基質タンパク質上に存在する核移行シグナルという特定のアミノ酸配列を認識し、基質タンパク質と結合する。その後、importin β (karyopherin β 1, KPNB1) と複合体を形成し、核内に輸送される。肝細胞では KPNA7 の発現が低かったため、本研究では KPNA1-6 および KPNB1 について解析を行なっている。

(※7) NTCP 強制発現肝がん細胞 :

HBV を一過性に感染可能な肝がん細胞。HBV が肝細胞に侵入する際には細胞表面の NTCP という胆汁酸トランスポーターを利用する。これまでのヒト肝がん細胞では NTCP の発現が低下しており、HBV の感染能を持たなかった。本細胞は、遺伝子組換え技術により NTCP の発現量を強制的に増加させている。

(※8) ヒト肝キメラマウス由来肝細胞 :

肝臓の90%以上を正常なヒト肝細胞に置換した特殊なマウスから採取した肝細胞。肝がん細胞株では一過性の感染しか評価できないため、より正確な評価には本細胞を用いる必要がある。

(※9) ドラッグリポジショニング :

既存の治療薬の新たな薬効を発見し、別の疾患の治療薬として開発する方法。既存の治療薬ではヒトでの安全性や製造方法などが確認されているため、通常の新薬開発に比べて迅速に薬を医療現場に届けることができる。

(※10) 逆転写酵素 :

cccDNA から転写された pre-genomic RNA から、rcDNA を生成するために必要な酵素タンパク質。

【研究助成】

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

日本医療研究開発機構 (AMED) (JP21fk0310101)

研究課題名: 「実用化に向けた B 型肝炎新規治療薬の探索及び最適化」

研究代表者: 田中 靖人 (熊本大学大学院生命科学研究部 教授)

研究期間: 平成 29 年 4 月～令和 4 年 3 月

日本医療研究開発機構 (AMED) (JP22fk0310518)

研究課題名: 「実用化に向けた B 型肝炎新規治療薬の開発」

研究代表者: 田中 靖人 (熊本大学大学院生命科学研究部 教授)

研究期間: 令和 4 年 3 月～令和 7 年 3 月

【論文タイトル】

Ivermectin Inhibits HBV Entry into the Nucleus by Suppressing KPNA2

(イベルメクチンは KPNA2 を抑制することで HBV の核への侵入を阻害する)

【著者】

Anna Nakanishi ^{1,†}, Hiroki Okumura ^{1,†}, Tadahiro Hashita ^{1,2,*}, Aya Yamashita ², Yuka Nishimura ², Chihiro Watanabe ², Sakina Kamimura ², Sanae Hayashi ^{3,4}, Shuko Murakami ³, Kyoko Ito ³, Takahiro Iwao ^{1,2}, Akari Ikeda ⁵, Tomoyasu Hirose ⁵, Toshiaki Sunazuka ⁵, Yasuhito Tanaka ^{3,4,*}, and Tamihide Matsunaga ^{1,2}

1 名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

2 名古屋市立大学大学院薬学部 臨床薬学教育研究センター

3 名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学分野

4 熊本大学大学院生命科学研究部

5 北里大学大村智記念研究所

* 責任著者

† 共同第一著者

【掲載学術誌】

学術誌名 : Viruses

DOI 番号 : 10.3390/v14112468

参考 URL : <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/11/2468>

【研究に関する問い合わせ】

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 講師 坂下 真大 (はした ただひろ)

名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

TEL : 052-836-3791 FAX : 052-836-3792

E-mail : thashita@phar.nagoya-cu.ac.jp

【報道に関する問い合わせ】

名古屋市立大学 総務部広報室広報係

名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

TEL : 052-853-8328 FAX : 052-853-0551

E-mail : ncu_public@sec.nagoya-cu.ac.jp

熊本大学 総務部総務課 広報戦略室

熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1

TEL : 096-342-3271 FAX : 096-342-3110

E-mail : sos-koho@jimmu.kumamoto-u.ac.jp

学校法人北里研究所 総務部広報課

東京都港区白金 5-9-1

TEL : 03-5791-6422 FAX : 03-3444-2530

E-mail : kohoh@kitasato-u.ac.jp