

B型肝炎ウイルスによる肝発癌機構を新たに同定

1. 発表者：

- 關場 一磨（東京大学医学部附属病院 消化器内科 特任臨床医 ※研究当時；現在 スタッフ
オード大学留学中）
大塚 基之（東京大学医学部附属病院 消化器内科／東京大学大学院医学系研究科 内科学専
攻 消化器内科学 講師）
小池 和彦（東京大学医学部附属病院 消化器内科／東京大学大学院医学系研究科 内科学専
攻 消化器内科学 教授 ※研究当時；現在 関東中央病院 院長）

2. 発表のポイント：

- ◆今まで明らかとなっていなかった B 型肝炎ウイルス（HBV, 注 1）による肝発癌機構の一端を解明するとともに、HBV 関連肝発癌を抑止する新たな方法を見出しました。
- ◆HBV が感染した肝細胞では、HBV が産生するウイルス蛋白 HBx（注 2）により宿主蛋白 Smc5/6（注 3）が分解されることで、Smc5/6 蛋白の本来有する宿主 DNA ダメージ修復機能が低下し、肝発癌促進の原因になることを明らかにしました。
- ◆現在の HBV 治療の第一選択薬である核酸アナログ製剤（注 4）はウイルス DNA の産生を効率的に阻害しますが、肝癌の発生を完全に抑えることはできません。本研究成果をきっかけに HBV 関連肝発癌を抑止する新たな方法として、Smc5/6 蛋白の分解抑制という手法が発展していくことが期待されます。

3. 発表概要：

HBV は、全世界で 2 億 5 千万人以上が持続感染し、HBV 関連疾患により毎年約 82 万人が死亡しており、その克服は日本のみならず世界的な重要課題です。特に、死亡原因の多くを占めるのが肝癌ですが、既存の HBV 治療薬では発癌をゼロにすることはできず、また そもそもの発癌機構も十分には解明されていませんでした。

そうした中、ウイルス蛋白 HBx は宿主蛋白 Smc5/6 を分解することでウイルス複製を促進するという報告がなされました。本来、宿主蛋白 Smc5/6 は宿主 DNA ダメージ修復機構に重要な蛋白質であることから、東京大学医学部附属病院 消化器内科の關場一磨 特任臨床医（研究当時）、大塚基之 講師、小池和彦 教授（研究当時）らの研究グループは、「HBV が産生するウイルス蛋白 HBx は宿主蛋白 Smc5/6 を分解することで、ウイルス複製を促進するだけでなく、宿主 DNA ダメージの修復阻害にも働いているのではないか」と考え検証を行いました。

実際に、ヒト検体やマウスモデル、HBx 過剰発現細胞などを用いた検討で、宿主蛋白 Smc5/6 がウイルス蛋白 HBx により分解されると、宿主 DNA ダメージ修復能も低下することが分かりました。一般的に DNA ダメージの蓄積は主要な発癌促進因子であり、研究グループの検証でも宿主蛋白 Smc5/6 が分解されている細胞で腫瘍形成能の亢進を認めました。さらに、ウイルス蛋白 HBx の働きを抑制する化合物ニタゾキサニド（注 5）を HBV 感染細胞に投与すると、宿主蛋白 Smc5/6 の分解が阻害され、宿主 DNA ダメージ修復能が回復することが分かりました。

以上より、本研究は今まで明らかとなっていなかった HBV 関連肝発癌の機序の一端を解明するとともに、「Smc5/6 分解阻害薬による発癌抑止」という発癌予防の新たなコンセプトを提

唱するものとなりました。本研究成果は、中央ヨーロッパ夏時間 9 月 1 日に *Journal of Hepatology* (オンライン版) にて発表されました。

なお、本研究は日本医療研究開発機構 (AMED) 肝炎等克服実用化研究事業の肝炎等克服緊急対策研究事業 (研究開発課題名「近接依存性標識法を用いた HBV cccDNA 維持に関わる宿主因子の網羅的同定と制御」研究代表者：關場一磨、「B 型肝炎ウイルス RNA と相互作用する宿主因子の網羅的同定とその制御による病態制御法開発」・「慢性炎症を背景とした肝発癌の機序解明と肝癌高危険群の囲い込み法の開発」研究代表者：大塚基之) と B 型肝炎創薬実用化等研究事業 (研究開発課題名「新規メカニズムに基づく B 型肝炎治療薬の探索」研究代表者：森屋恭爾)、および文部科学省科学研究費補助金などの支援により行われました。

4. 発表内容：

【研究の背景】

HBV は肝発癌を引き起こすウイルスで、既存の治療ではその発症をゼロにすることはできません。肝発癌の重要な因子として、HBV が産生するウイルス蛋白 HBx が知られていましたが、HBx 蛋白による詳細な発癌機序は十分に解明されておらず、新たな治療薬開発の大きな障害となっていました。研究グループは、「ウイルス蛋白 HBx が宿主蛋白 Smc5/6 を分解してウイルス転写を活性化している」という報告 (Decorsière *et al. Nature* 2016; Murphy *et al. Cell Rep.* 2016) と「宿主蛋白 Smc5/6 は DNA ダメージ修復に関わる」という報告 (De Piccoli *et al. Nat Cell Biol.* 2006) に着目して、「ウイルス蛋白 HBx による宿主蛋白 Smc5/6 の分解は、ウイルス複製の亢進だけでなく宿主 DNA ダメージの修復阻害という二つの働きを持つ」のではないかと仮説を立てました。

【研究内容】

まず、研究グループは HBV 陽性ヒト肝組織や HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウス (注 6)、HBx トランスジェニックマウス (注 7) を用いて、Smc5/6 の発現量と DNA ダメージ蓄積量との相関を検討したところ、HBV 感染や HBx 発現に伴い Smc5/6 の発現が低下している組織で、DNA ダメージの蓄積が有意に増加していることを確認しました。

そこで、細胞株を用いた検討で、Smc5 のノックダウン (注 8) を行い、DNA ダメージを誘導すると通常の細胞と比較して、宿主 DNA ダメージ修復が阻害されていることが分かりました (図 1)。HBx 強制発現細胞でも同様の結果が得られたうえに、Smc5/6 の分解能を持たない変異型 HBx ではこの宿主 DNA ダメージ修復阻害効果がないことを確認しました。

さらに、NTCP 強制発現細胞 (注 9) や初代ヒト肝細胞 (注 10) を用いた HBV 感染実験で、Smc5/6 が分解されると DNA ダメージ誘導時の修復が阻害されていることが分かりました。ここで、研究グループが以前に同定した、HBV 感染下で Smc5/6 分解阻害作用を有する化合物ニタゾキサニド (Sekiba *et al. Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019) を細胞に投与して Smc5/6 の分解を阻害すると、宿主 DNA ダメージ修復能も回復することが実証されました。また、Smc5/6 の分解を受けた細胞では腫瘍形成能が上昇していることを細胞株およびマウスを用いた実験系で確認しました。

以上のことから、HBV はウイルス蛋白 HBx を産生し宿主蛋白 Smc5/6 を分解することでウイルスの転写を活性化しているだけでなく、宿主 DNA ダメージ修復も阻害していることが示唆されました (図 2)。

【社会的意義・今後の予定】

これらの結果は、ウイルス蛋白 HBx による肝発癌機構を明らかにするとともに、宿主蛋白 Smc5/6 の分解阻害という肝癌抑制のための新たな治療標的を提唱するものであります。ニタゾキサニドに関しては、抗 HBV 薬の候補として国際的な治験 (NCT03905655) が行われており、そのウイルス複製阻害効果を注視するとともに、発癌抑制効果についても検証を重ねて、臨床応用の可能性を探っていきたいと本研究グループは考えています。

5. 発表雑誌：

雑誌名： *Journal of Hepatology*

論文タイトル： Degradation of Smc5/6 Complex Impairs Homologous Recombination-Mediated Repair of Damaged DNA

著者： 關場一磨、大塚基之*、船戸和義、宮川 祐、田中恵理、清宮崇博、山上まり、堤 武也、奥新和也、宮川 敬、梁 明秀、小池和彦 (* 責任著者)

DOI 番号： 10.1016/j.jhep.2021.08.010

アブストラクト URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827821020055>

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 消化器内科

特任臨床医 (研究当時) 關場 一磨 (せきば かずま)

講師 大塚 基之 (おおつか もとゆき)

<取材に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター

担当：渡部、小岩井

電話：03-5800-9188 (直通) E-mail：pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

<AMED の事業に関するお問い合わせ>

日本医療研究開発機構 疾患基礎研究事業部 疾患基礎研究課

(肝炎等克服実用化研究事業 担当)

電話：03-6870-2225 FAX：03-6870-2243

E-mail：hepatitis@amed.go.jp

7. 用語解説：

注1) B型肝炎ウイルス： 血液や体液などを介して肝臓に感染する DNA ウイルス。感染したウイルスは炎症 (肝炎) を惹起し、肝硬変や肝癌の原因となる。世界保健機関 (WHO) は、B型肝炎ウイルス感染者は世界中で 20 億人、そのうち B型肝炎ウイルス持続感染者は 2.96 億人、さらに年間 82 万人が B型肝炎ウイルス関連疾患で死亡していると報告し、その克服を重要課題として挙げている。

注2) ウイルス蛋白 HBx： HBV が産生する蛋白質の一つ。ウイルス蛋白の中で、ウイルス複製の制御や発癌促進といった重要な役割を担うとされるが、その詳細は未だ不明な点も多い。

注3) Smc5/6: Structural maintenance of chromosomes 5/6 の略。B 型肝炎ウイルスの cccDNA (covalently closed circular DNA; B 型肝炎ウイルスが肝細胞内に侵入後に、もともと不完全環状二本鎖の形態をとっているウイルス DNA が核内に移行して形成される完全閉鎖環状二本鎖 DNA。核内に安定的に存在し続け、ウイルス RNA を作るための鋳型として働く) に結合し、ウイルス RNA 転写の強力な阻害因子となるはずが、ウイルス蛋白 HBx によって分解されてしまうことが近年明らかとなった。Smc5 と Smc6 はヘテロダイマーを形成して機能し、一方が分解されるともう一方も不安定化し分解される。

注4) 核酸アナログ製剤: B 型肝炎の治療に広く用いられているウイルス DNA 複製阻害剤。B 型肝炎ウイルスはその生活環の中で、プレゲノム RNA から DNA への逆転写を行うが、核酸アナログ製剤はウイルス DNA ポリメラーゼ/逆転写酵素による基質の取り込みを競合的に阻害して DNA 鎖の伸長を停止することでウイルスの増殖を阻害する。エンテカビルやテノホビルがその代表薬。その作用原理上、ウイルス RNA およびウイルス蛋白質の産生を阻害することはできない。

注5) ニタゾキサニド: チアゾリド系化合物で、米国では抗寄生虫薬としてアメリカ食品医薬品局で承認されている。その他の細菌やウイルスにも広範囲なスペクトルを持つことが報告されているが、本研究グループではウイルス蛋白 HBx と宿主蛋白 DDB1 との結合を阻害することで宿主蛋白 Smc5/6 の分解を阻害し抗 HBV 効果を発揮すると以前に報告 (Sekiba *et al. Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019) した。

注6) ヒト肝細胞キメラマウス: 肝臓の 70%以上を正常なヒト肝細胞に置換した特殊なマウス。HBV はヒトやチンパンジーなど、感染できる宿主が限られており通常のマウスでは感染実験を行うことができないため、ヒト肝細胞キメラマウスを用いる必要がある。

注7) HBx トランスジェニックマウス: 遺伝子組換え技術を用いて、ウイルス蛋白 HBx が肝細胞で発現するように遺伝子操作したマウス。

注8) ノックダウン: 特定の遺伝子の転写量を抑制する技術。

注9) NTCP 強制発現細胞: 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。実験に用いる通常のヒト肝細胞では NTCP の発現が低下しており、HBV の感染能を持たないため、遺伝子組換え技術により NTCP の発現量を強制的に増加した細胞が HBV 感染実験には必要。

注10) 初代ヒト肝細胞: ヒトから採取された肝臓組織から培養した細胞。NTCP 強制発現細胞よりも高い HBV 感染能を有する。

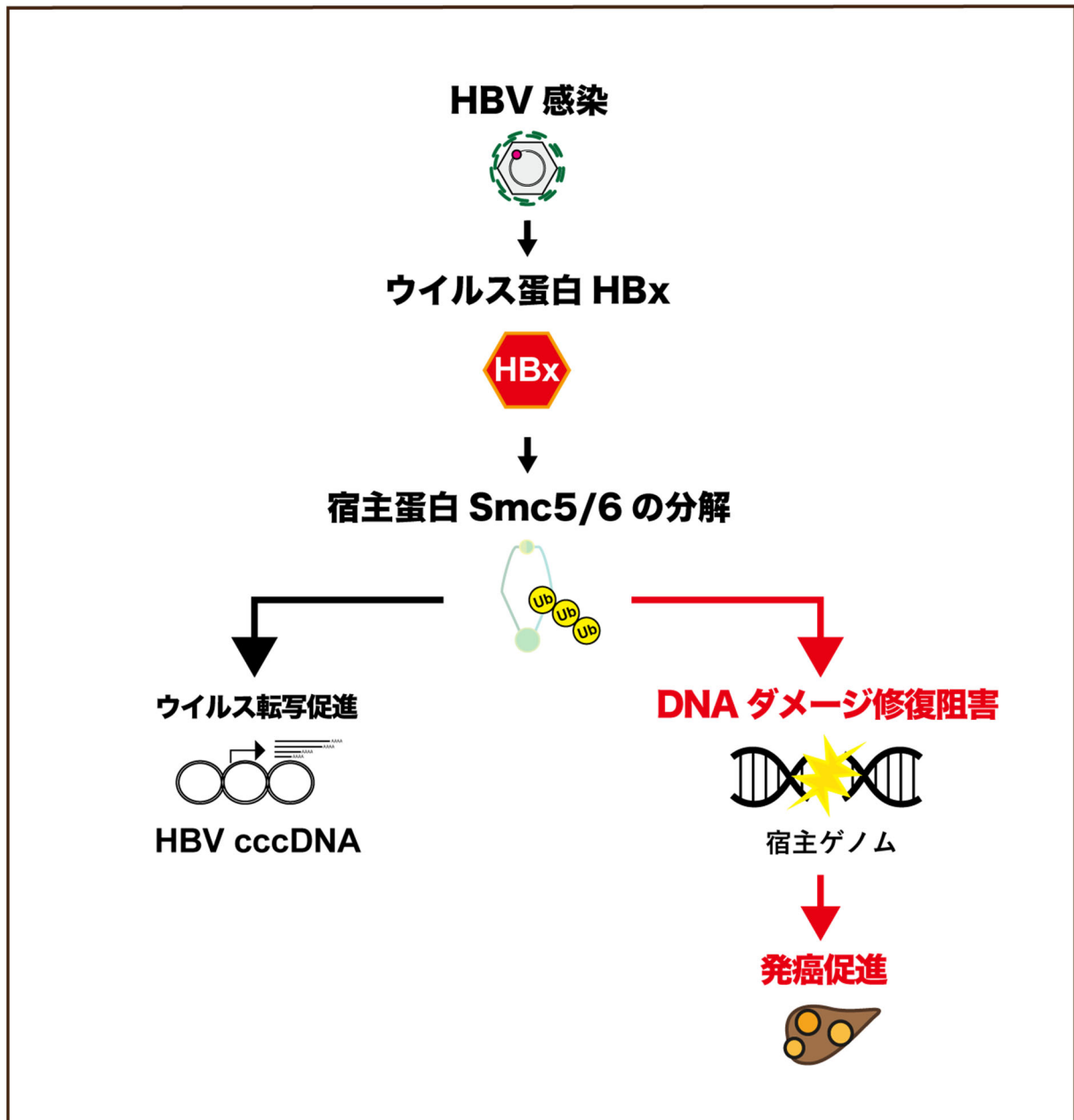


図2. ウイルス蛋白 HBx による Smc5/6 の分解を介した宿主 DNA ダメージ修復阻害
 肝細胞に感染した B 型肝炎ウイルス (HBV) はウイルス蛋白 HBx を産生する。HBx は宿主蛋白 Smc5/6 を分解することで、ウイルス転写を促進する。本研究では、それが宿主ゲノムの DNA ダメージ修復阻害にも働き、それによる DNA ダメージの蓄積が肝細胞の癌化を促進することを明らかにした。