

Sp1を標的としたHBVウイルスの新規阻害剤の探索

早川 路代¹ 梅山 秀明² 岩館 満雄² 田口 善弘^{2,a)} 村上 善基³

概要: B型肝炎ウイルス (HBV) は DNA ウィルスであり、一度感染すると cccDNA と呼ばれる HBV の鋳型の DNA を完全に除去しない限り根治が難しい。本研究では HBV の増殖に必要な Alpha-glucosidase (AG) を標的とする阻害剤をインシリコで創薬し、cccDNA の削減に成功したが、奇妙なことに見つかった阻害剤は AG を標的としていなかった。そこで阻害剤をセルラインに投与した場合の発現プロファイルの解析から転写因子である SP1 が標的であることを推測して実験で確認した。

Development of a novel anti-hepatitis B virus agent via Sp1

1. はじめに

B型肝炎は B型肝炎ウイルス (HBV) が感染することによって発症する肝炎であり、放置すると肝硬変を経て肝臓がんを発症し死に至る。このため、早期に治療を行うことが望ましい。しかし、HBV は DNA ウィルスであり、一度感染すると cccDNA という HBV の鋳型ウィルスを完全に取り除かない限り根治が困難な疾患となっている。

本研究では、ウィルスの複製 (増殖) に欠かせない Alpha-glucosidase (AG) を標的とする阻害剤 (Alpha-glucosidase inhibitors, AGI) をインシリコで創薬することを目指し、cccDNA の削減に成功したが、奇妙なことに阻害剤は AG を標的としていなかった。そこで、阻害剤を投与した培養細胞の遺伝子発現プロファイルを解析することで転写因子である SP1 が標的であることを推定し、これを実験的に確認した [1] ので報告する。

2. 材料と方法

2.1 培養細胞

阻害剤のスクリーニングにはマウスの肝臓を潰してシートにしたものに HBV ウィルスを感染させたもの (プライマリー) を利用した。RNAi による SP1 と E2F3 のノック

ダウンには肝臓がんの細胞から作られた不死化された培養細胞を用いた。

2.2 インシリコ創薬

FAMS と chooseLD を用いてインシリコ創薬を行った。PDB に登録されている 3LU4 構造 (2020年2月12日時点では取り下げ済み) をテンプレートとして、AGI の Q14697.3 (2020年2月12日現在、Q14697に更新済み) 配列の立体構造を FAMS で推定した。ChooseLD の実行には低分子化合物が結合したタンパクの立体構造が必要だが、これらの低分子化合物が結合したタンパクの立体構造としては DSK (PDB ID 3L4U, A chain), ACR (2QMJ, A), KTL (3L4V, A), MIG (3L4W, A), NR3 (3L4X, A), NR4 (3L4Y, A), SSD (3L4Z, A), 3CU (3CTT, A), 及び BJ1 (3L4T, A) が採用された。更に、ChEMBL307429, ChEMBL111326, ChEMBL108656, 及び、ChEMBL421040 の 4 つの低分子化合物を加えて finger print のテンプレートとした。AKos の化合物ライブラリから、テンプレートの低分子との Tanimoto Index を基準に、3089個の AGI 候補低分子化合物をスクリーニングし、最終的に 12個の AGI 候補化合物 (以下、AGI4-AGI15 と表記) を実験に回した (表 1)。

2.3 主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択

$x_{ij} \in \mathbb{R}^{N \times M}$ を i 番目の遺伝子の j 番目のサンプルの発現量とする。 X を x_{ij} を要素とする行列とし、 x_{ij} は $\sum_i x_{ij} = 0$ 及び $\sum_i x_{ij}^2 = N$ というように規格化されているとする。ここでグラム行列 $XX^T \in \mathbb{R}^{N \times N}$ (X^T は X の

¹ 京都府立医科大学
Kyoto Prefectural University of Medicine
² 中央大学
Chuo University
³ 東京医科大学
Tokyo Medical University
^{a)} tag@granular.com
本研究は原著論文として刊行済みである [1]。

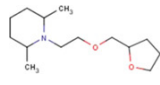
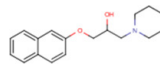
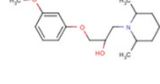
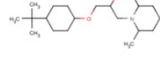
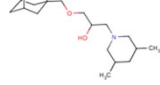
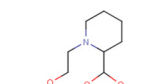
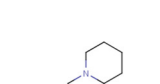
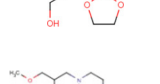
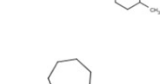
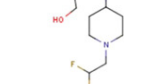
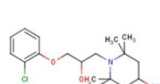
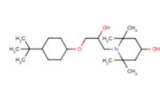
Code.No	Name of substrate / AKOS No / Ranking No.	MW / compositional formula / FPAS score	Structural formula
AGI1	Acarbose / — / —	660.1 / C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈ / —	—
AGI2	Miglitol / — / —	207.2 / C ₈ H ₁₇ NO ₅ / —	—
AGI3	Voglibose / — / —	267.3 / C ₁₀ H ₂₁ NO ₇ / —	—
AGI4	2,6-dimethyl-1-[2-(oxolan-2-ylmethoxy)ethyl]piperidine / AKOS016935375 / 231	242.3 / C ₁₅ H ₃₀ NO / 531.5	
AGI5	1-(4-methylpiperidin-1-yl)-3-naphthalen-2-yloxypropan-2-ol / AKOS016182856 / 236	300.4 / C ₁₆ H ₃₄ N ₂ O / 610.3	
AGI6	1-(2,6-dimethylpiperidin-1-yl)-3-(3-methoxyphenoxy)propan-2-ol / AKOS016050483 / 154	326.5 / C ₁₄ H ₂₈ NO ₂ / 586.1	
AGI7	1-(4-tert-butylcyclohexyl)oxy-3-(2,6-dimethylpiperidin-1-yl)propan-2-ol / AKOS016286797 / 142	326.5 / C ₁₇ H ₂₈ NO ₃ / 586.1	
AGI8	1-(1-adamantylmethoxy)-3-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)propan-2-ol / AKOS016318436 / 172	336.5 / C ₁₆ H ₃₄ N ₂ O / 554.0	
AGI9	2-(1,3-dioxolan-2-yl)-1-(2-methoxyethyl)piperidine / AKOS007774093 / 123	216.3 / C ₁₄ H ₂₅ N ₂ O / 528.8	
AGI10	3-[2-(1,3-dioxolan-2-yl)piperidin-1-yl]propan-1-ol / AKOS007869050 / 131	216.3 / C ₁₅ H ₃₀ NO ₃ / 481.3	
AGI11	1-methoxy-3-[4-(4-methylcyclohexyl)piperazin-1-yl]propan-2-ol / AKOS016924865 / 33	272.4 / C ₁₅ H ₂₄ NO ₃ / 511.7	
AGI12	[2-[[1-(2,2-difluoroethyl)piperidin-4-yl]amino]cycloheptyl]methanol / AKOS016984232 / 8	292.4 / C ₁₄ H ₃₀ N ₂ O / 539.4	
AGI13	1-[3-(2-chlorophenoxy)-2-hydroxypropyl]-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol / AKOS016128493 / 13	342.9 / C ₁₅ H ₃₀ F ₂ N ₂ O / 531.6	
AGI14	1-[3-(4-tert-butylcyclohexyl)oxy-2-hydroxypropyl]-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol / AKOS016287378 / 5	370.6 / C ₁₄ H ₂₈ NO ₄ / 543.4	
AGI15	1-[2-hydroxy-3-(3,3,5-trimethylcyclohexyl)oxypropyl]-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol / AKOS016287379 / 6	356.6 / C ₁₅ H ₃₂ N ₂ O ₂ / 542.1	

表 1 既知 AGI 化合物 (AGI1-AGI3) 及びインシリコ創薬でスクリーニングした AGI 候補低分子化合物 (AGI4-AGI15) の情報

Table 1 Information of known AGI compounds (AGI1-AGI3) and AGI candidate compounds (AGI4-AGI15) screened with *in silico* drug design.

転置行列) を定義し、固有ベクトル $\mathbf{u}_\ell \in \mathbb{R}^N$ を

$$X X^T \mathbf{u}_\ell = \lambda_\ell \mathbf{u}_\ell \quad (1)$$

の様に定義すると $u_{\ell i}$ は i 番目の遺伝子に付与された第 ℓ 主成分得点になる。この時、 j 番目のサンプルに付与され

る主成分負荷量 $v_{\ell j}$ はベクトル

$$\mathbf{v}_{\ell} = X^T \mathbf{u}_{\ell} \in \mathbb{R}^M \quad (2)$$

の第 j 成分で計算される。

主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択法 [2] では、まず、望ましいサンプル依存性 (今回の場合は $M = 3$ であり、 $j = 1$ が AGI7 を投与したサンプル、 $j = 2$ が AGI14 を投与したサンプル、 $j = 3$ が対称群なので、 $v_{\ell 1}$ と $v_{\ell 2}$ が同じ値で、 $v_{\ell 3}$ だけが値が異なっている、というような主成分負荷量が望ましい) をもつ主成分負荷量 \mathbf{v}_{ℓ} を選ぶ。

次に、対応する主成分得点 $u_{\ell i}$ がガウス分布することを仮定して、 χ 二乗分布を用いて i 番目の遺伝子に P 値を

$$P_i = P_{\chi^2} \left[> \left(\frac{u_{\ell i}}{\sigma_{\ell}} \right)^2 \right] \quad (3)$$

という式で付与する。但し、 $P_{\chi^2}[> x]$ は引数が x 以上になる場合の χ 二乗分布の累積確率であり、 σ_{ℓ} は標準偏差である。得られた P_i は多重比較補正 (Benjamini and Hochberg [3]) したあと、補正 P 値が 0.01 以下の遺伝子を選択する。

3. 結果

3.1 AGI 候補化合物の HBV 抑止力

図 1 は chooseLD で計算した、既知及び AGI 候補化合物の AG へのバインディング構造である。既知 AGI 化合物に比べると、AGI 候補化合物のバインディング構造はやや緩めである。

次に、HBV への効果を実験で確認した。既知 AGI 化合物 AGI1-AGI3 の HBV 増殖抑制効果を確認したが、効果が無かった。一方、AGI 候補化合物の中には HBV 増殖抑制効果のあるものが見られた (AGI5, AGI6, AGI7, AGI13, AGI14, 図 2)。AGI5, AGI6, AGI7, AGI13, AGI14 については IC50 を確認したが、数 μ M 程度で十分、薬剤として実用的なレベルであり、また、特に効果の大きい AGI7, AGI14 については、cccDNA の抑止効果があることも解り (図 3)、HBV 治療薬としての効果は揺るぎないものに思えた。

3.2 AGI 候補化合物の標的遺伝子

しかし、一方で、AGI 候補化合物の AGI 能を実験的に確認したところ、この効果は見られないことが解った (図 4)。むしろ、AGI 候補化合物の投与で AG の活性は上昇する傾向が見られた。つまり、AGI 候補として同定された化合物に、顕著な HBV 増殖抑止能が得られたにも関わらず、肝心の AG の阻害能は欠いているらしいことがわかったのだ。それでは同定された AGI 候補化合物の真の標的遺伝子はなんなのであろうか？

この点を明確にするため、培養細胞に AGI7 と AGI14 を投与した時と、対称群の三サンプルにたいして RNA-seq を

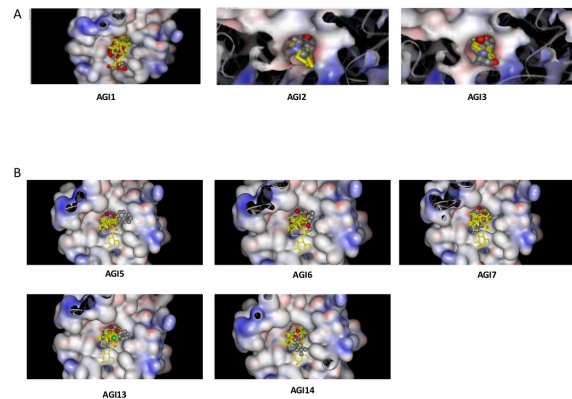


図 1 ChooseLD による既知 AGI 化合物 (AGI1-AGI3) の AG へのバインディングと AGI 候補化合物 (AGI5, AGI6, AGI7, AGI13, AGI14) の AG へのバインディング

Fig. 1 Binding configurations computed by chooseLD for known AGI compounds (AGI1-AGI3) and AGI candidates compounds (AGI5, AGI6, AGI7, AGI13, AGI14)

行い、主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択を用いて、AGI7, AGI14 に対して対称群にくらべて発現の変化がある遺伝子を同定した。図 5 は対象群、AGI7, AGI14 投与の三サンプルに、RNA-seq を適用して得られた遺伝子発現プロファイルに、主成分分析を適用して主成分得点を遺伝子に付与した場合の散布図である。極めて特徴的な正六角形の形状が見られることから、この 3 方向に何か特別な意味があると考えられる。これを見るために、第一、第二、第三主成分負荷量をプロットしてみた (図 6)。第一主成分負荷量は、対称群、AGI7, AGI14 投与サンプルで同じ寄与を持っており、薬物投与の効果が見られた遺伝子表現している。実際、図 5 を見ると、上の第一主成分得点と第二主成分得点の散布図に、 x 軸、つまり、第二主成分がゼロの領域に大きなバンドが見られる。このことから大多数の遺伝子は薬物投与によって動かないことを示している。これに対して、第二、第三主成分負荷量は顕著な薬物投与依存性を持っていることが解る。第二主成分負荷量は、AGI7 と AGI14 で逆の効果を持つ遺伝子を示し、第三主成分負荷量は対称群に対して、AGI7 と AGI14 の投与が同じ効果を持っている遺伝子を示している。このことを考慮して改めて図 5 の第二、第三主成分得点の散布図を見ると、 x 軸、つまり、第二主成分得点の軸上には遺伝子の高濃度の分布は無いことが解る。これは AGI7, AGI14 に対して逆の効果及ぼされるような遺伝子は少ないことを意味しており、AGI7 と AGI14 が同じような機能を持っているはずであるという我々の期待に反しない挙動である。一方、 y 軸、つまり、第三主成分得点の軸上には上下に遺伝子の高濃度の分布が存在しているので、これらが AGI7 と AGI14 で共通に発現が変化する遺伝子群であろうことが期

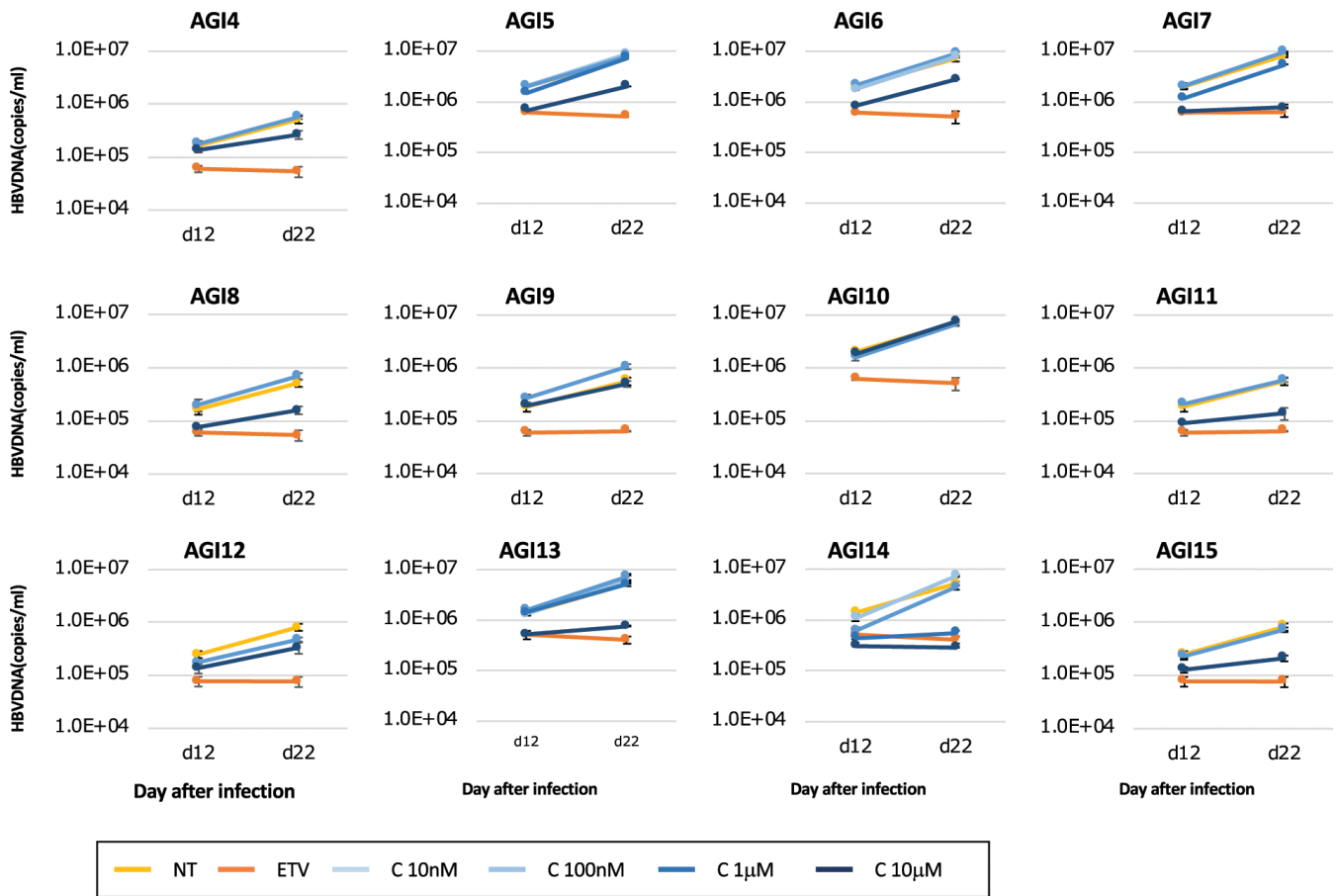


図 2 AGI 候補化合物の HBV 増殖抑制効果。NT:非投与群、ETV:既知 HBV 治療薬エンテカビル

Fig. 2 HBV suppression by AGI candidate compounds. NT: no treatment, ETV: known HBV drug Entecavir.

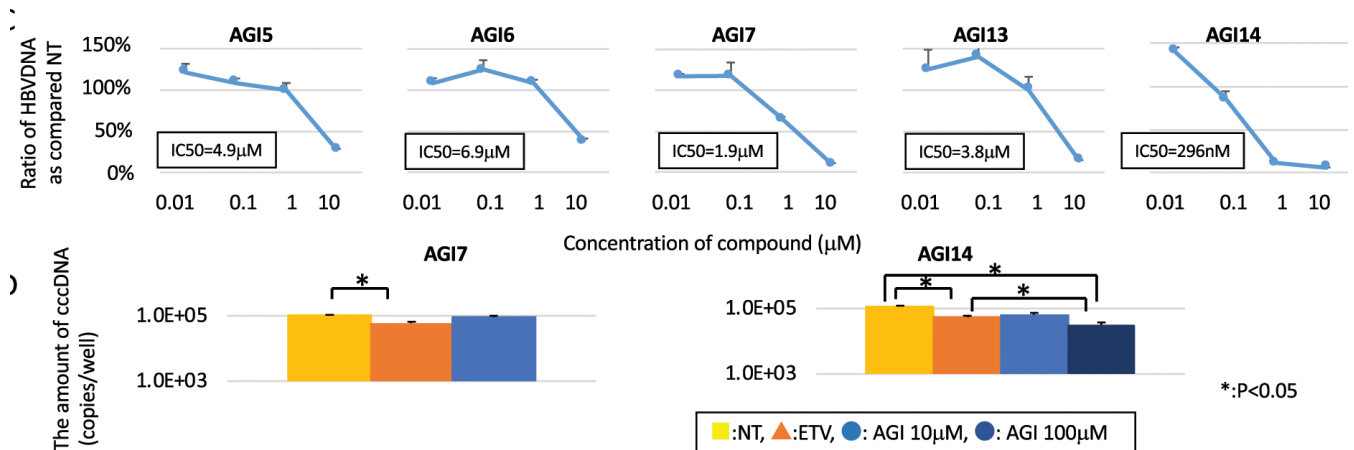


図 3 (上) 図 2 で HBV 増殖抑制効果が見られた AGI 候補化合物、AGI5,AGI6,AGI7,AGI13,AGI14 の IC50。(下) AGI7,AGI14 の cccDNA 抑制効果。

Fig. 3 Upper: IC50 for effective AGI candidate compounds, AGI5, AGI6, AGI7,AGI13, AGI14. Lower: cccDNA suppression effects of AGI7 and AGI14.

待された。そこで補正 P 値が 0.01 以下という基準で遺伝子を選択した ((図 5) の赤い部分)。薬物投与で発現が上昇する遺伝子が 194 遺伝子、下降する遺伝子が 208 遺伝子であった。

これらの遺伝子の意味を解釈するため、g:profiler [4] にアップロードした。その結果、発現が上昇する 194 遺伝子は E2F の標的であり、下降する 208 遺伝子は SP1 と E2F3 の標的であるという結果が得られた (図 7)。SP1 と

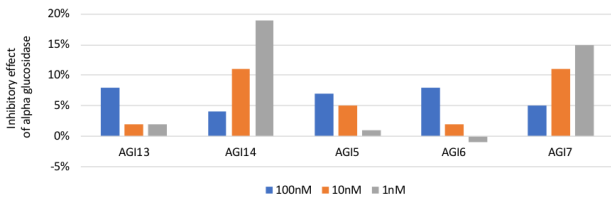


図 4 AGI 候補化合物の AGI 能

Fig. 4 Performance of AGI candidate compounds as AGI

E2F はいずれも転写因子であるが、結合状態で DNA にバインディングする場合と E2F3 単体で DNA にバインディングする場合は、結合モチーフが異なるため、SP1 と E2F の結合が AGI 候補化合物で阻害されて乖離し、SP1 と結合していた E2F が単体で DNA に結合する結果、「AGI 候補薬剤の投与で SP1 と E2F の標的遺伝子の発現が下がり、一方 E2F3 の標的遺伝子の発現は上がる」という結果をもたらすのではという予測がなされた。

3.3 AGI 候補化合物の SP1 へのバインディング可能性

当初、AGI 候補として同定された化合物の標的が SP1 であったということを確認するため、再び chooseLD を用いて、SP1 と AGI7, AGI14 の結合可能性を検討した (図 8)。その結果、AGI7 や AGI14 が DNA と SP1 の結合を阻害することはありうる事が確認された。

3.4 SP1 と E2F3 のノックダウン実験

AGI7 や AGI14 の SP1 への結合を直接実験的に確認することは出来なかった。そこで、代替措置として、siRNA を用いて、がんの培養細胞で SP1 と E2F3 のノックダウンで HBV ウィルスの増殖が抑止できるかを確認した (図 9)。その結果、SP1 のノックダウンでは HBV の増殖が抑止され、E2F3 のノックダウンでは HBV の増殖が加速されるという、必ずしも仮説と矛盾しない結果を得ることが出来た。

4. 議論

B 型肝炎は、難病であり、根治するための薬の開発が望まれている。今回我々はインシリコ創薬の方法を用いて、cccDNA の量を抑止できる治療薬候補を発見することが出来た。特に、HBV の増殖抑止能では既存薬であるエンテカビルを凌ぐような効果をもつ薬剤を発見できた。一方で、奇妙なことに当初の標的であった AG はスクリーニングされた AGI 候補薬剤では活性が抑止されないばかりか、既知の AGI 化合物が HBV 増殖抑止能をもたないということも判明した。実際の標的候補である転写因子は、AGI 候補薬剤の投与後の遺伝子発現プロファイルの解析から見出され、siRNA という間接的な手段ではあるが、その有効性が確認された。

従来から筆者の 1 名である田口は、インシリコ創薬のプ

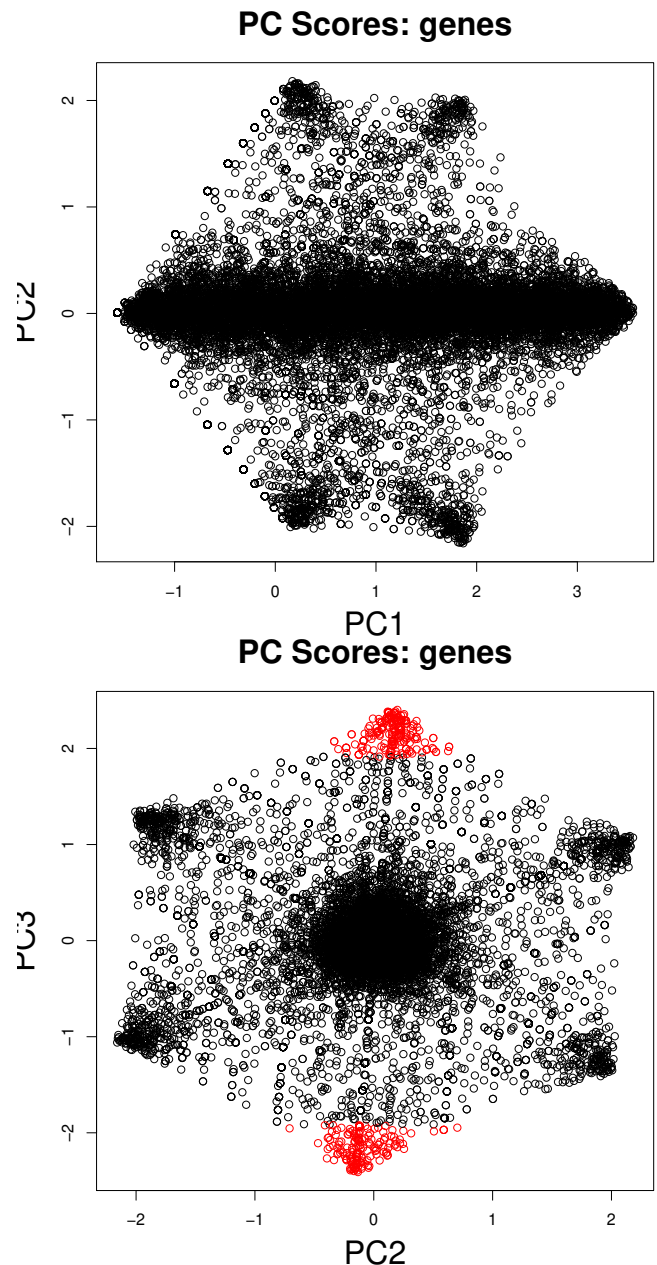


図 5 対称群、AGI7, AGI14 投与の計 3 サンプルの培養細胞の RNA-seq データに主成分分析を適用し、遺伝子に付与された主成分得点の散布図。(上) 横軸：第一主成分、縦軸：第二主成分、(下) 横軸：第二主成分、縦軸：第三主成分。赤：最終的に主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択で選ばれた遺伝子

Fig. 5 PC scores attributed to genes. They were computed with applying PCA based unsupervised FE to RNA-seq that measured control, and AGI7 and AGI14 treated cell line RNA-seq data.

ロセスに遺伝子発現プロファイルの解析も使うべきだという主張を展開してきた。今回、その有効性が実際に確認されたと思っている。また、今回の発現プロファイルは、3 つの実験条件 (対称群、AGI7 および AGI14 投与群) で各 1 サンプルしかないという条件であり、通常ならば有意に発現差がある遺伝子を統計的にスクリーニングすることが難しい条件であった。しかし、このような場合でも田口が従

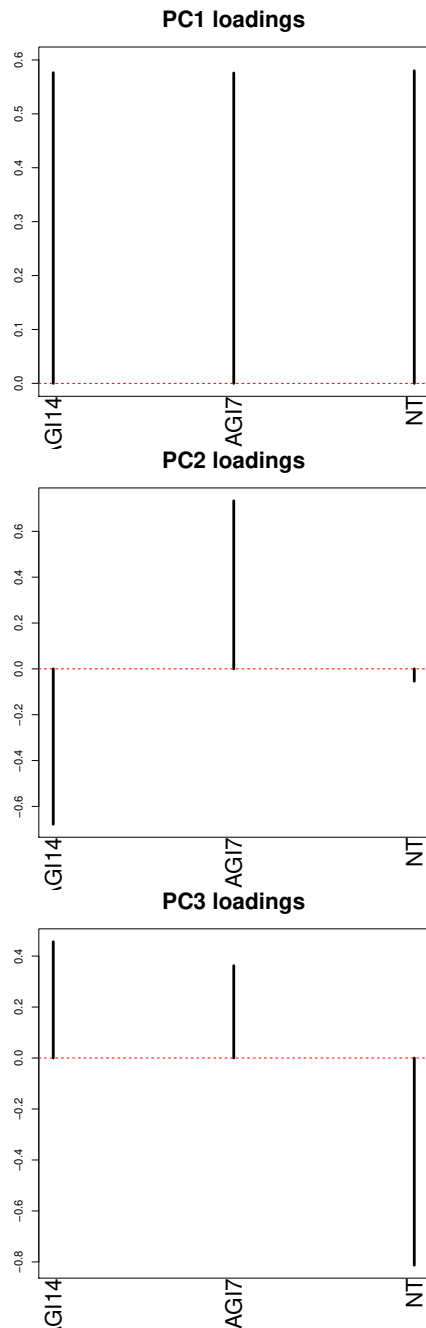


図 6 図 5 に対応する主成分負荷量。上から第一、第二、第三主成分得点。

Fig. 6 PC loading that corresponds to 図 5. From left to right, the first, second and third PC loading

来から提唱している、主成分分析/テンソル分解を用いた教師なし学習による変数選択法 [2] であれば、有意に発現差がある遺伝子を統計的にスクリーニングできることが示せたと思う。

今後もインシリコ創薬において、遺伝子発現プロファイルなどのオミックスデータ・セットを積極的に用いた展開がなされることが望まれる。

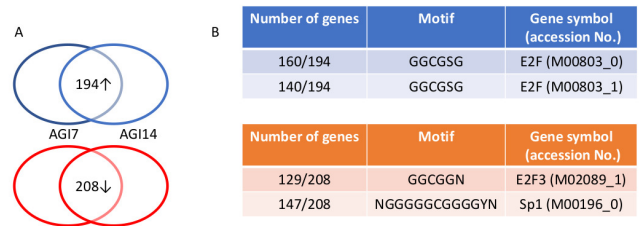


図 7 主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択で選ばれた遺伝子を標的とする転写因子。

Fig. 7 Transcription factors that target genes identified by PCA based unsupervised FE.

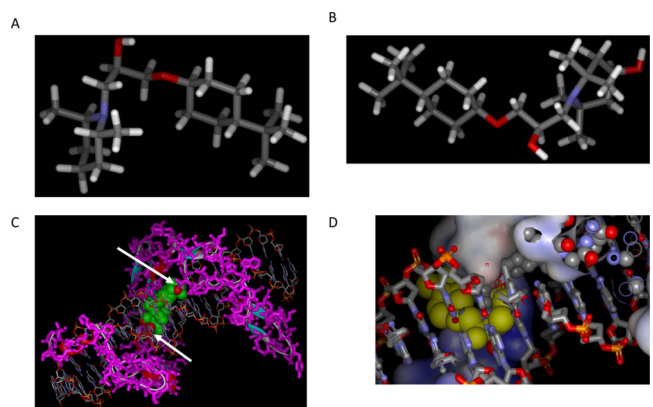


図 8 AGI7,AGI14 と SP1 の結合モデル。(A)AGI7 の棒モデル (B)AGI14 の棒モデル (C)AGI14 と SP1 の結合状態。4 箇所のエネルギー的に安定な AGI14 分子 (緑の CPK モデル) が DNA (棒モデル) と SP1 タンパク (ピンク色) と 2 つのグリセロールフィンガープリント (白矢印の先端) を介して繋がっている (D)AGI7,AGI14 と SP1 の結合。AGI7 と AGI14 はそれぞれ、大きな黄色の CPK モデルと、小さな CPK モデルで表現されている。この全結合モデルは AGI7 と AGI14 は SP1 への結合場所が異なっている可能性を示している

Fig. 8 The binding status of AG7, AGI14, and Sp1. (A) A stick model of AGI7. (B) A stick model of AGI14. (C) The binding status of AGI14 and Sp1. Four energetically stable molecules of AGI14 (green CPK model) were docked in the interface between the DNA (stick model) and Sp1 protein (colored magenta) using two glycerol fingerprints (white arrowhead). (D) The interconnection of AGI7 and AGI14 to Sp1. AGI7 is depicted in the large yellow CPK model, AGI14 is depicted in the small CPK model. This whole connected model indicates that the AGI7 and AGI14 binding sites to Sp1 were different.

参考文献

- [1] Hayakawa, M., Umeyama, H., Iwadate, M., Taguchi, Y.-H., Yano, Y., Honda, T., Itami-Matsumoto, S., Kozuka, R., Enomoto, M., Tamori, A., Kawada, N. and Murakami, Y.: Development of a novel anti-hepatitis B virus agent via Sp1, *Scientific Reports*, Vol. 10, No. 1, p. 47 (online), DOI: 10.1038/s41598-019-56842-9 (2020).
- [2] Taguchi, Y.-h.: *Unsupervised Feature Extraction Applied to Bioinformatics, A PCA Based and TD Based Ap-*

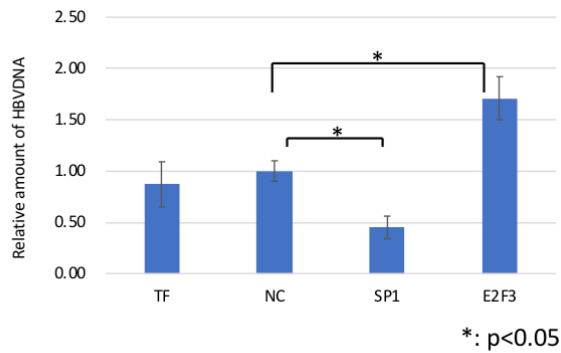


図 9 SP1 と E2F3 を標的とした siRNA の抗ウイルス効果。縦軸は対象群で正規化された HBVDNA の相対量。転写因子は siRNA の標的として表記されている。* は有意差 (P 値で 0.05 以下)。実験は 3 回ずつ繰り返した。

Fig. 9 Anti-viral effect of siRNA for Sp1 and E2F3. Vertical axis is the relative amount of HBVDNA (normalized on negative control). TF is denoted only transfection reagent. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$). Each experiment was repeated three times.

proach, Springer International (2020).

- [3] Benjamini, Y. and Hochberg, Y.: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol. 57, No. 1, pp. 289–300 (1995).
- [4] Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H. and Vilo, J.: g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update), *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, No. W1, pp. W191–W198 (online), DOI: 10.1093/nar/gkz369 (2019).