The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Rimonabant suppresses RNA transcription of hepatitis B virus by inhibiting hepatocyte nuclear factor 4α
Author(s)	佐藤, あすか
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76460
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	佐藤あすか
論文題名 Title	Rimonabant suppresses RNA transcription of hepatitis B virus by inhibiting hepatocyte nuclear factor 4α（リモナバントはhepatocyte nuclear factor 4αを阻害することによりB型肝炎ウイルスのRNA転写を抑制する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

B型肝炎ウイルス(HBV)感染による慢性肝炎に対する治療には主に核酸アナログが用いられるが、耐性ウイルスの出現が問題となっている。そこで、耐性ウイルスを誘導しにくい新規薬剤探索のため、宿主因子を標的とする化合物を用いたスクリーニングを行うこととした。その標的としては、様々なウイルスの増殖に寄与しているとの報告があることから、G蛋白質共役受容体（GPCR）を選択した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

HBVに感受性を示すヒト肝癌由来細胞株のHepG2-hNTCP C4細胞に533種類のGPCR関連化合物を処理し、HBVを感染させたところ、一次スクリーニングでは56種類が、二次スクリーニングではそのうちの19種類の化合物が抗HBV効果を示した。これら19種類の化合物の中に2種類のカンナビノイド受容体１（CNR1）の阻害剤が含まれていたことから、本研究ではそのうちの一つである、Rimonabantに着目した。RimonabantがHBVの生活環のどの過程を阻害しているのかを確認するため、HepG2-hNTCP C4細胞にRimonabantを処理し、ウイルスの表面蛋白質の一部で、HBVの細胞接着と受容体への結合に関与するprS1蛋白質を加えて、蛍光活性化セルソーティングにより細胞表面への結合を観察したところ、 preS1の結合量に変化は確認されなかった。一方、RimonabantをHBV感染1日後から処理した場合でも抑制効果が確認されたことから、RimonabantはHBVの細胞への侵入過程には作用しないことが明らかとなった。また、感染細胞内のHBV増殖過程で産生されるcccDNAとpgRNAを定量したところ、Rimonabant処理によるcccDNA量の変化は見られなかったが、pgRNAの発現が顕著に抑制されていたことから、RimonabantはcccDNAからpgRNAが転写される過程を阻害することで、HBVの増殖を抑制している可能性が示唆された。さらに、ヒト肝癌由来細胞株のHuh7細胞に遺伝子型B型やC型のHBVの1.3倍長のゲノムを組み込んだplasmidを導入してRimonabantを処理したところ、細胞内のHBV遺伝子の発現量の顕著な低下が確認された。また、ヒト初代肝細胞（PHH）におけるRimonabantの50%細胞毒性濃度、50%効果濃度、および、Selectivity Indexはそれぞれ、2.77μM、40.4μM、14.6であり、PHHにおいても十分なHBV抑制効果が確認された。さらに、Rimonabantを処理したPHHでは、cccDNAの発現量の低下が見られたものの、その抑制はrcDNAに対するものより弱かった。これらの成績から、RimonabantはPHHにおいてウイルスの細胞侵入とcccDNA合成以外の過程に作用してHBVの増殖を抑制していることが示唆された。一方、Rimonabantの標的であるCNR1蛋白質の発現は、本実験で用いた細胞株では確認できなかった。そこで、Rimonabantを処理したPHHの遺伝子発現をRNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析で検討したところ、HBVのpgRNAの転写を促進することが報告されている、hepatocyte nuclear factor 4α（HNF4α）の発現が抑制されていた。さらに、HNF4αのmRNAと蛋白質の発現量を検討したところ、HNF4αのmRNA量には変化は認められなかったが、その蛋白質量の顕著な低下とHNF4αの下流因子であるALDOBとFABP1遺伝子のmRNA量の有意な減少が確認された。

〔総　括(Conclusion)〕

以上の成績から、RimonabantはHNF4α蛋白質の発現を低下させ、HBVのpgRNAの転写を阻害することでHBVの増殖を抑制することが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）佐藤あすか

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	松浦善治
	副　査	大阪大学教授	塩田達雄
	副　査	大阪大学教授	上田啓次

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス（HBV)の慢性感染の治療薬である核酸アナログは、耐性ウイルスの出現が問題となっている。本研究では、G蛋白質共役受容体の化合物ライブラリーを用いて、耐性ウイルスを誘導しにくい、宿主因子を標的とした新規薬剤の探索を行い、候補薬剤としてRimonabantを同定した。HBVに感染させたヒト肝癌由来細胞株をRimonabantで処理すると、HBV RNAの転写が阻害され、またヒト初代肝細胞においても抗HBV効果は確認された。一方、Rimonabantの標的蛋白質の発現は、本実験で用いた細胞株では確認できなかった。そこで、Rimonabantを処理したヒト初代肝細胞の遺伝子発現を解析した結果、HBV RNAの転写を促進すると報告のある、HNF4α蛋白質の活性が低下していた。以上の成績から、RimonabantはHNF4αの抑制を介してHBV RNAの転写を阻害し、HBVの増殖を抑制することが示唆された。本研究は学位の授与に値すると考えられる。