

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19109

研究課題名(和文) 抗 Dengue ウイルス化合物を用いたウイルス複製機構の解析

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of viral replication using anti-DENV compound

研究代表者

日紫喜 隆行 (HISHIKI, Takayuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：30535761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬理活性既知の低分子化合物ライブラリーから、フォーカス法を用いて新規抗 Dengue ウイルス活性物質の選抜を行った。次に、Time-of-drug-addition アッセイおよび一過性レポーターレプリコンの系を用いた解析から、候補化合物の作用点がウイルス生活環のなかで翻訳とゲノム増幅の間の過程であることが示された。また、化合物と Dengue ウイルスを共培養し続け化合物耐性ウイルスの作出および解析をおこなった結果、候補化合物の作用点はウイルスの非構造タンパク質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dengue virus (DENV) infectious disease is a major public health problem worldwide; however, specific antiviral drugs against this infection are not available. To identify novel anti-DENV compounds, we screened pharmacologically active compounds using focus reduction assay. We identified some compounds that have potent anti-DENV activity and low cytotoxicity. Time-of-drug-addition and time-of-drug-elimination assays revealed that compound inhibits translation and/or replication steps in the DENV life cycle. A subgenomic replicon system was used to verify that compound restricts RNA replication step. Furthermore, analysis of compound-resistant clone suggested that compound targets viral nonstructural protein.

研究分野：ウイルス学

キーワード：Dengue ウイルス 複製機構 抗ウイルス化合物

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスは蚊によって媒介されデング熱やデング出血熱を引き起こす。デングウイルス感染症は熱帯・亜熱帯地域だけで問題視されていたが、平成 26 年の 8 月、デング熱の国内感染事例が報告されたことから対岸の火事ではなくなっている。これまで流行地域の研究者を中心にウイルス複製機構の解析が行われているが、デングウイルス感染症は「顧みられない熱帯病」のひとつの認識があるように世界的に十分な対策がされておらず、特に基礎研究において進展が遅く不明点が多いのが現状である。また、国内外の製薬企業が抗デングウイルス薬の開発研究を行っているが、未だ実用化にはいたっておらず、新規開発が緊急の課題となっている。さらに、感染流行地域が年々北上していることから、今後も日本国内における流行が懸念されており、国内でも積極的に研究を行う必要性が考えられている。

2. 研究の目的

デングウイルス感染症に対する治療薬開発が遅れている要因のひとつに、基礎的研究があまり進んでおらずウイルス複製機構や病態発症機構に不明点が多いことがあげられる。本研究ではケミカルバイオロジー的手法を用いてデングウイルス複製に関与する宿主因子を同定し、ウイルス複製制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1 次スクリーニングとしてフォーカス法を用いた。感染性デングウイルスを各化合物（薬理活性既知の市販化合物ライブラリー）とともに共培養し、3 日後の細胞を抗エンベロプ抗体で免疫染色し、フォーカス数の減少から抗デングウイルス活性の有無を判定

した。また、2 次スクリーニングとして、細胞毒性試験 (MTT アッセイ) を行った。さらに、化合物の抗ウイルス活性 (半数効果濃度・ EC_{50}) および細胞毒性 (半数細胞毒性・ CC_{50}) を測定し、それらの比が高いもの、つまり抗ウイルス活性の強いものを選抜した。ウイルス生活環のどの過程に化合物が作用しているか明らかにするために、化合物の添加時間をずらす手法 (Time of addition アッセイ) や一過性レポーターレプリコンの系を用いて解析した。

4. 研究成果

フォーカス法を用いた 1 次スクリーニング、ならびに MTT アッセイによる 2 次スクリーニングの結果、強い抗ウイルス活性を示す化合物の選抜に成功した。次に、候補化合物を血清型 1 から 4 まで全ての感染性デングウイルスとそれぞれ 3 日間共培養し、その後培養上清中に放出されたウイルス力価をブランクアッセイによって解析した。その結果、フォーカスアッセイ同様顕著な抗デングウイルス活性が認められた。また、Time of addition アッセイおよび一過性レポーターレプリコンの系を用いた解析から、候補化合物の作用点はウイルス生活環のなかで翻訳とゲノム増幅の間の過程であることが示された。続いて、薬理活性情報から得られた候補化合物のターゲット宿主因子の発現を siRNA によって抑制した細胞にデングウイルスを感染させ、培養上清中のウイルス力価をブランクアッセイによって解析したところウイルス力価に変化が認められなかったことから、抗ウイルス活性は予想された宿主因子を介するものではないことが示唆された。また、化合物とデングウイルスを共培養し続け化合物耐性ウイルスの作出および解析をおこなった結果、候補化合物の作用点はウイルスの非構造タンパク質であることが示唆された。本研

究成果が抗 Dengue ウイルス薬開発の一助になることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Kato Fumihito, Ishida Yuki, Kawakami Akihiko, Takasaki Tomohiko, Saijo Masayuki, Miura Tomoyuki, Hishiki Takayuki. Evaluation of *Macaca radiata* as a non-human primate model of Dengue virus infection. *Scientific Reports*. 21;8(1):3421, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-21582-9. 査読有り

Hishiki Takayuki, Kato Fumihito, Tajima Shigeru, Toume Kazufumi, Umezaki Masahito, Takasaki Tomohiko, Miura Tomoyuki. Hirsutine, an Indole Alkaloid of *Uncaria rhynchophylla*, Inhibits Late Step in Dengue Virus Lifecycle. *Front Microbiol*. 30;8:1674, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01674. 査読有り

Kato Fumihito, Ishida Yuki, Oishi Shinya, Fujii Nobutaka, Watanabe Satoru, Vasudevan Subhash, Tajima Shigeru, Takasaki Tomohiko, Suzuki Yoichi, Ichiyama Koji, Yamamoto Naoki, Yoshii Kentaro, Takashima Ikuo, Kobayashi Takeshi, Miura Tomoyuki, Igarashi Tatsuhiko, Hishiki Takayuki. Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication. *Antiviral Res*. 12(131):141-7, 2016. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.04.014. 査読有り

Kato Fumihito, and Hishiki Takayuki. Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. *Viruses*. 8(5):122, 2016. doi: 10.3390/v8050122. 査読有り

Ishida Yuki, Yoneda Mai, Otsuki Hiroyuki, Watanabe Yuji, Kato Fumihito, Matuura Kanako, Kikukawa Minako, Matsushita Shuzo, Hishiki Takayuki, Igarashi Tatsuhiko, Miura Tomoyuki. Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6. *J Gen Virol*. 97: 1249-60, 2016. doi: 10.1099/jgv.0.000421. 査読有り

Suzuki Youichi, Chin Weixin, Han Qien, Ichiyama Koji, Lee Ching, Eyo Zhin, Ebina Hirotaka, Takahashi Hirotaka, Takahashi Chikako, Tan Beng, Hishiki Takayuki, Ohba Kenji, Matsuyama Toshifumi, Koyanagi Yoshio, Tan Yee, Sawasaki Tatsuya, Chu Justin, Vasudevan Subhash, Sano Kouichi, Yamamoto Naoki. Characterization of RyDEN (C19orf66) as an Interferon-Stimulated Cellular Inhibitor against Dengue Virus Replication. *PLoS Pathog*. 6;12(1):e1005357. 2016. doi: 10.1371/journal.ppat.1005357. 査読有り

Ujino Saneyuki, Nishitsuji Hironori, Hishiki Takayuki, Sugiyama Kazuo, Takaku Hiroshi, Shimotohno Kunitada. Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5;113(1):188-93. 2016. doi: 10.1073/pnas.1506524113. 査読有り

〔学会発表〕(計 8件)

日紫喜隆行、加藤文博、仁尾泰徳、宮崎恭行、田島茂、土方誠、高崎智彦、不飽和脂肪酸合成酵素阻害剤によるデングウイルス複製抑制機構の解析、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年

日紫喜隆行、デングウイルス感染症、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年

Takayuki Hishiki, Fumihiko Kato, Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Development of dengue virus replicon cells expressing secretory luciferase, 2nd International Meeting on Arboviruses and their Vectors, 2017 年

日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、高崎智彦、分泌型ルシフェラーゼ発現レプリコン細胞を用いた抗デングウイルス化合物の探索、第 52 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2017 年

日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、三浦智行、五十嵐樹彦、高崎智彦、小原道法、分泌型ルシフェラーゼを有するデングウイルスレプリコン細胞の樹立、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年

日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、三浦智行、五十嵐樹彦、高崎智彦、デングウイルス I 型レポーターレプリコン細胞の樹立、第 51 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2016 年

Hishiki Takayuki, Kato Fumihiko, Ishida Yuki, Oishi Shinya, Watanabe Satoru, Vasudevan Subhash, Tajima Shigeru, Takasaki Tomohiko, Miura Tomoyuki, Igarashi Tatsuhiko, Bromocriptine is a

novel inhibitor of dengue virus replication, 4th Antivirals Congress, Spain, 2016 年

日紫喜隆行、石田裕樹、加藤文博、川上朗彦、高崎智彦、三浦智行、五十嵐樹彦、デングウイルス感染霊長類モデル構築に向けた基盤研究、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年

〔図書〕(計 1件)

Hishiki Takayuki, Shimizu Yuko, Ujino Saneyuki, Nishitsuji Hironori, Shimotohno Kunitada. Lipid and Lipoprotein Components Play Important Roles in HCV Egress and Infectivity. *Springer book: Hepatitis C Virus 1*. 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日紫喜 隆行 (HISHIKI Takayuki)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員
研究者番号：30535761

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし