

令和元年6月25日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09929

研究課題名(和文) ファビピラビルを元にした重症RNAウイルス感染症に対する抗ウイルス薬の開発

研究課題名(英文) Study of antiviral agent for RNA virus infection based on favipiravir

研究代表者

大黒 徹 (DAIKOKU, TOHRU)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：80291409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ファビピラビルは、抗インフルエンザウイルス薬として承認されたが、RNAウイルスに広く効果を示す。そこでファビピラビルとその誘導体で、他のRNAウイルスにどの誘導体が最も効果が高いかを検討した。実験にはポリオウイルスを使用し、薬剤はファビピラビルの6位のフッ素を水素、塩素、臭素に置換した誘導体を用いた。インフルエンザウイルスでは、ファビピラビルより6位を水素置換した誘導体の方が効果が高いという報告があるが、ポリオウイルスでは、ファビピラビルが最も高い抗ウイルス効果を示し、塩素置換、臭素置換体は効果が低かった。ファビピラビルやその誘導体の抗ウイルス効果はウイルスの種類によって異なると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エボラ出血熱、重症急性呼吸器症候群(SARS)、中東呼吸器症候群(MERS)、黄熱、デング熱、ジカ熱等はいずれもRNAウイルスによる感染症で、それらのウイルスがいつ日本に持ち込まれてパンデミックを引き起こすかはわからない。ファビピラビルは抗インフルエンザウイルス薬として承認されたが、他のRNAウイルス感染症にも効果が期待されている。RNAウイルスの種類によって、ファビピラビル誘導体の中のどれが一番有効かを調べておく必要がある。今回、種々のファビピラビル誘導体でインフルエンザウイルスとポリオウイルスで比較したが、異なる結果を得た。現在、コロナウイルスやジカウイルスでも同様の検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Although favipiravir is approved as an anti-influenza virus drug, it also has antiviral effects of other RNA viruses. The aim of this study is to investigate the most effective compounds for several RNA viruses with favipiravir and its derivatives. Poliovirus strain Sabin type 1 was used and infected to infection African green monkey kidney cells (Vero cells) in this experiment. The antiviral effect was examined by plaque reduction methods. The drug focused on the 6-position fluorine of favipiravir, and used derivatives substituted with hydrogen, chlorine and bromine. It has been reported that derivatives substituted with hydrogen at position 6 more than favipiravir have higher antiviral effects for influenza viruses, however favipiravir was most effective for poliovirus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：抗ウイルス剤 RNAウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2014年にファビピラビル(商品名アビガン)は「新型又は再興型インフルエンザウイルス感染症(ただし、他の抗インフルエンザウイルス薬が無効又は効果不十分のものに限る)」に対して条件付きで製造販売承認された。インフルエンザウイルスの動物感染実験では、高ウイルス量の致死性感染実験において、ノイラミンダーゼ(NA)阻害薬より優れた有効性から、H5やH7等の新型インフルエンザに対する抗インフルエンザ薬の切り札として期待されている。本年春より中国で発生した鳥インフルエンザウイルスA(H7N9)の人への感染は、111名の確定診断患者のうち、27%(30名)が死亡と報告された。これらのウイルスはノイラミニダーゼ(NA)阻害薬に感受性であることがわかっているが、上海の研究者らの最近の報告では、阻害薬が奏効せずウイルス排出が続いて重症化した14名の患者のうち2名から、NA阻害薬(オセルタミビルおよびザナミビル)に耐性が懸念される遺伝子変異を有するウイルスが見つかったと報告された。このように耐性ウイルスが高い頻度で認められている現状を考慮すると、インフルエンザウイルスA(H7N9)に対する新たな備えが必要と考えられる。

また、ファビピラビルはインフルエンザウイルスのみならず広範囲のRNAウイルスに対してもウイルス由来のRNA依存性RNA合成酵素を阻害することで抗ウイルス活性を示すことがわかっている。さらに、西アフリカでの臨床試験ではエボラ出血熱患者の死亡率が半減したとの報告もあり、重症RNAウイルス感染症に対する有効性で世界から注目されている。

2. 研究の目的

ファビピラビルは、抗インフルエンザウイルス薬として承認されたが、他のRNAウイルスの増殖抑制効果も有する。そこでファビピラビルの化学構造を基に、デング熱、黄熱病、重症急性呼吸器症候群(SARS)、中東呼吸器症候群(MERS)、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)等の重症RNAウイルス感染症に広範囲に効果のある新規抗RNA依存性RNA合成酵素阻害薬の開発を最終目標として念頭に置く。インフルエンザウイルスに対して日本国内で製造販売承認を取得したファビピラビルは、ウイルスのRNA依存性RNA合成酵素を阻害するため、広範囲のRNAウイルスに対する有効性が確認されている。そこで重症RNAウイルス感染症の原因ウイルスのRNA依存性RNA合成酵素を合成遺伝子から酵素活性を有した蛋白質発現系を構築する。ファビピラビルと各種RNA依存性RNA合成酵素の結晶解析を行い、*in silico*でファビピラビルの化学構造を基にさらなる修飾を加え、より有効性の高い抗ウイルス薬をデザインすることを目標とする。

抗インフルエンザウイルス薬ファビピラビルは、広範囲のRNAウイルスに対して増殖抑制効果を有するので、ファビピラビルとその誘導体で、他のRNAウイルスに対する効果を検証し、各種RNAウイルスにどの誘導体が最も効果が高いかを検討することを目的としている。まずは小型のRNAウイルスであるポリオウイルスでの効果を検討した。

3. 研究の方法

本研究では下記の内容について実験研究を行った。

インフルエンザウイルスとは異なり、RNA合成を1種類の遺伝子産物で担っているポリオウイルスを用いて、ファビピラビル存在下で培養を行い、薬剤感受性変異株の分離とその変異部位の同定を試みた。得られた感受性変異株の一覧と50%阻害濃度(IC₅₀)、親株とのIC₅₀の比、アミノ酸変異部位を解析した。

ポリオウイルスは1型Sabin株を使用し、アフリカミドリザル腎臓細胞(Vero細胞)に感染させ、実験に用いた。抗ウイルス効果はプラーク減少法で検討した。

ファビピラビルは宿主細胞のヒポキサンチン・グアニン・リボースーリン酸化酵素(HGPRT)により活性型に変換されることが報告された。しかしながら、ファビピラビルのHGPRTに対する基質親和性(K_m値)は、本来の基質であるヒポキサンチンやグアニンと比較すると1,000倍程度も認識されにくい。そこで、様々なファビピラビル誘導体と、HGPRTとの親和性をドッキングシミュレーションによる*in silico*解析から計算し、より小さいエネルギーで結合する親和性の高い化合物については化学合成を行い、抗ウイルス活性試験を行う。本申請研究でのファビピラビル誘導体は、6位のフッ素に着目し、水素、塩素、臭素に置換した誘導体で*in silico*解析を行い、抗ウイルス作用を検討した。

4. 研究成果

Vero細胞にポリオウイルスを感染させ、ファビピラビル存在下で培養を行い、薬剤感受性変異株の分離とその変異部位の同定を試みた。得られた感受性変異株の一覧と50%阻害濃度(IC₅₀)、親株との

表1. ファビピラビル存在下で培養したポリオウイルスの遺伝子変異

株名	KA4	KWC1	KWC7	KA7	SA0
IC ₅₀ (μg/mL)	9.43	3.6	3.21	12.79	9.1
ratio	1.38	0.53	0.47	1.88	1.34
アミノ酸変異	V11A	N17S	N17S	N17S	K138R
アミノ酸変異	A120T	D98G	K394E		

IC₅₀ の比、アミノ酸変異部位を表 1 に示した。

これらの変異部位は、ポリオウイルスの RNA 合成酵素構造上の部位から、それらの関与は以下のように推定される。N17S: 鋳型とする RNA との結合に関する可能性が示唆される。D98G: ヘリックス構造に影響を与える可能性が示唆される。K138R: 塩基性アミノ酸同士の置換で影響は少ないと推察される。K394E: リボヌクレオド三リン酸のリン酸基との相互作用の可能性が推察される。また、親株との IC₅₀ の比より、いずれの株もファビピラビルに対して完全な薬剤耐性を獲得したとはいえ、この結果からもファビピラビル耐性ウイルスの分離が困難であることを再確認した。

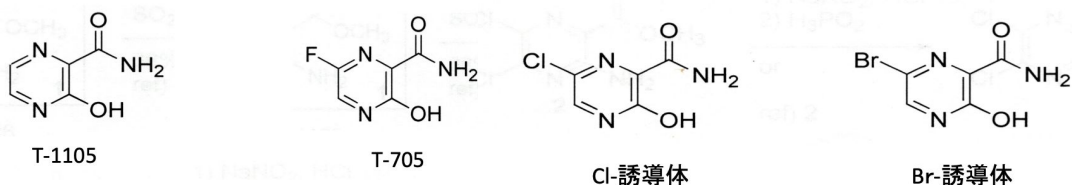


図 1. 本申請研究で使用したファビピラビルの 6 位置換体

ファビピラビル誘導体と HGPRT をドッキングシミュレーションによる *in silico* 解析から親和性を計算し、ファビピラビルより小さいエネルギーで結合するファビピラビル誘導体については化学合成を行い、抗ウイルス活性試験を行った。ここでは、ファビピラビル誘導体の 6 位のフッ素の置換体について報告する(図 1)。この中ではファビピラビルが最も高い抗ウイルス効果を示し、6 位のフッ素を水素に置換した誘導体が次に効果が高く、塩素置換、臭素置換誘導体は効果が低かった。

A 型、B 型インフルエンザウイルスでは、ファビピラビルより 6 位を水素に置換した誘導体の方が、培養細胞での抗ウイルス効果が高いという報告があるが、ポリオウイルスにおいてはファビピラビルが最も効果が高いことから、ファビピラビルやその誘導体の抗ウイルス効果はウイルスの種類によって異なると考えられる。現在、ヒトコロナウイルスやジカウイルスでも同様の検討を行っている。今後はファビピラビル誘導体を、6 位のハロゲン置換体だけでなく、さらに種類を増やし、各種 RNA ウイルスにおいて、最も効果の高いファビピラビル誘導体の探索を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Sadanari H, Fujimoto KJ, Sugihara Y, Ishida T, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. The anti-human cytomegalovirus drug triclin inhibits cyclin-dependent kinase 9. *FEBS Open Bio*. 2018; Feb, 20;8(4):646-654.

Itoh A, Sadanari H, Takemoto M, Matsubara K, Daikoku T, Murayama T. Triclin inhibits the CCL5 induction required for efficient growth of human cytomegalovirus. *Microbiology and Immunology*. 2018; May, 62(5):341-347.

Fujimoto KJ, Nema D, Ninomiya M, Koketsu M, Sadanari H, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. An in silico-designed flavone derivative, 6-fluoro-4'-hydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone, has a greater anti-human cytomegalovirus effect than ganciclovir in infected cells. *Antiviral Research*. 2018 Jun;154:10-16.

Akai Y, Sadanari H, Takemoto M, Uchide N, Daikoku T, Mukaida N, Murayama T. Inhibition of human cytomegalovirus replication by triclin is associated with depressed CCL2 expression. *Antiviral Research*. 2017; Dec, 148:15-19.

Daikoku T, Mizuguchi M, Obita T, Yokoyama T, Yoshida Y, Takemoto M, Shiraki K. Characterization of susceptibility variants of poliovirus grown in the presence of favipiravir. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2018; Oct, 51(5): 581-586.

Tanaka T, Kamiyama T, Daikoku T, Takahashi K, Nomura N, Kurokawa M, Shiraki K. T-705 (Favipiravir) suppresses tumor necrosis factor α production in response to influenza virus infection: A beneficial feature of T-705 as an anti-influenza drug. *Acta Virologica*. 2017; 61(1): 48-55.

Aiba N, Shiraki A, Yajima M, Oyama Y, Yoshida Y, Ohno A, Yamada H, Takemoto M, Daikoku T, Shiraki K. Interaction of Immunoglobulin with Cytomegalovirus-Infected Cells. *Viral Immunology*. 2017; Sep, 30(7):500-507.

Shiraki K, Toyama N, Daikoku T, Yajima M; Miyazaki Dermatologist Society. Herpes Zoster and Recurrent Herpes Zoster. Open Forum Infectious Diseases. 2017 Jan; 28, 4(1): ofx007.

Yajima M, Yamada H, Takemoto M, Daikoku T, Yoshida Y, Long T, Okuda T, Shiraki K. Profile of anti-herpetic action of ASP2151 (amenamivir) as a helicase-primase inhibitor. Antiviral Research. 2017; Mar, 139: 95-101.

Daikoku T, Tannai H, Honda M, Onoe T, Matsuo K, Onoye Y, Nishizawa M, Kawana T, Okuda T, Hasegawa T, Shiraki K. Subclinical generation of acyclovir-resistant herpes simplex virus with mutation of homopolymeric guanosine strings during acyclovir therapy. Journal of Dermatological Science. 2016; Jun, 82(3): 160-165.

〔学会発表〕(計 8 件)

梅田実希, 藤本和宏, 亀井 敬, 鎌田一希, 前崎将人, 野田佳加, 武本眞清, 定成秀貴, 村山次哉, 大黒 徹. ポリオウイルスに対するファビピラビルとその誘導体の効果. 日本薬学会第 139 年会 2019.

Takemoto M, Yasumura C, Sawano K, Satoh T, Sadanari H, Matsubara K, Murayama T, Daikoku T. Proinflammatory responses to varicella-zoster virus infection in human retinal cell lines. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018

Sadanari H, Kosaka K, Odagiri H, Ishida T, Kusano S, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. Effect of anti-human cytomegalovirus drug triclin on both MxA expression and ISG15 conjugation. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018

Sadanari H, Sugihara Y, Fujimoto K, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. Inhibition of phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain by anti-human cytomegalovirus drug triclin. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017

Takemoto M, Sadanari H, Daikoku T, Matsubara K, Murayama T. Triclin suppresses replication of herpes simplex virus type 1, type 2, and varicella-zoster virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 2017

Shiraki K, Kawana T, Honda M, Matsuo K, Daikoku T, Takemoto M, Yamada H, Morishima T, Ohno A. Tropism determined by UL13 of Herpes simplex virus 2 facilitates mother-to-infant transmission. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016

Murayama T, Akai Y, Sadanari H, Yamada R, Takemoto M, Daikoku T. Anti-inflammatory compound prevents replication of CCL2 dependent-human cytomegalovirus. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016

Sadanari H, Mogi K, Yamada R, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. Effect of anti-human cytomegalovirus drug triclin on the expression of interferon-stimulated genes. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。