

令和 2 年 4 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04084

研究課題名(和文)アモジアキンおよび誘導体の抗SFTSV効果に関する研究

研究課題名(英文)Antiviral activity of amodiaquine derivatives against SFTSV

研究代表者

馬場 昌範 (BABA, MASANORI)

鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・教授

研究者番号：70181039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：新しいアモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果について検討した。その結果、アモジアキンと比較して、抗ウイルス活性が 10 倍程度高い新規誘導体(#90)を同定することに成功した。#90 の作用機序について検討したところ、#90 はウイルス感染後の比較的早い段階に作用して、抗 SFTSV 効果を発揮していると思われる。また、#90 とファビピラビルとの併用効果については、相加的な抗ウイルス効果を示すことが分かった。一方、マウスに対する経口投与実験において、#90 の薬物体内動態に関する問題点が指摘されたことから、今後は #90 の製剤化もしくは化学構造修飾が必要であると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)はマダニによって媒介される致死的なウイルス感染症である。現時点での治療は対症療法しかなく、有効なワクチンや抗ウイルス薬は存在しない。従って、SFTS に対する有効な治療薬に関する研究は学術的にも社会的にも大きな意義があると思われる。さらに、本研究で同定した新規アモジアキン誘導体は強いエボラウイルスに対する増殖抑制効果を示すことが分かっている。そこで、ボストン大学の Robert Davey 教授のグループと新規アモジアキン誘導体の抗エボラ薬としての開発に向けた国際共同研究を開始している。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that the anti-malaria agent amodiaquine is active against the replication of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV). When the anti-SFTSV activity of 100 amodiaquine derivatives was examined, a novel derivative (#90) was identified as a potent and selective inhibitor of SFTSV in vitro. Its antiviral activity was approximately 10-fold higher than that of amodiaquine. When its mechanism of action was studied, #90 was appeared to act on a rather early event in the viral replication cycle and exert its anti-SFTSV activity. When #90 and favipiravir was combined, it exhibited an additive antiviral effect. The results of mouse experiments revealed that #90 had a problem of its pharmacokinetics, suggesting that its formulation change or chemical modification will be required.

研究分野：ウイルス学・化学療法学

キーワード：SFTSV 抗ウイルス薬 アモジアキン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は 2011 年に中国の研究者らによって報告された、ダニによって媒介されるウイルス感染症である<sup>1</sup>。原因ウイルスである SFTSV は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される。本研究の分担研究者である西條ら (国立感染症研究所) の調査によると、我が国では 2013 年 1 月に、国内で海外渡航歴のない人の感染が初めて報告されて以来、498 名の患者が SFTS と診断されている (2020 年 1 月 29 日時点)。患者の大部分は 60 歳以上の高齢者であり、498 例中 70 例が死亡するという、きわめて致死率の高い疾患である。患者の分布は中国、四国、そして九州地方に多く、中でも鹿児島県は 47 例が報告されており、これは都道府県別では 3 番目に多い<sup>2</sup>。主な症状は発熱と食欲低下、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛などの消化器症状で、重症化すると意識障害やけいれんなどの中枢神経症状や、血小板減少による出血傾向があらわれ、死亡することもある。ウイルス遺伝子およびウイルスに対する抗体の検査法が確立され、SFTS の診断は可能であるが、現時点での治療は対症療法しかなく、有効なワクチンや抗ウイルス薬は存在しない。2016 年に西條らは抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビルが、培養細胞およびマウスモデルにおいて、選択的な抗 SFTSV 効果を示すことを明らかにしている<sup>3</sup>。

(2) 研究代表者の馬場はこれまで長年にわたり、抗ウイルス薬に関する研究を続けてきた。その中でも、特に抗エイズ薬の研究に力を注ぎ、非核酸系逆転写酵素阻害薬エミビリンの発見と開発 (第 III 相臨床試験終了)<sup>4</sup>、1999 年には武田薬品工業との共同研究によって、世界で最初に HIV-1 のコレセプターである CCR5 の拮抗薬 TAK-779 を見出した<sup>5</sup>。また、昭和大学および米国エール大学と共同で、毒性がきわめて低い核酸系逆転写酵素阻害薬センサブジンの同定に成功している (第 II 相臨床試験終了)<sup>6</sup>。このような過去の実績から、研究代表者の研究室には国内外の大学や製薬企業などにおいて、抗ウイルス試験の目的で合成された薬剤が多数集積されている。一方、平成 26 年度に基盤研究 C 「重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に有効な抗ウイルス薬の探索研究」が採択され、鹿児島大学病院に入院していた SFTS 患者の臨床検体から SFTSV を分離し、培養細胞を用いた安全で再現性の高い抗ウイルスアッセイ系を確立した。さらに、それを用いて、種々の薬剤のスクリーニング試験を行ったところ、抗マラリア薬として臨床的に用いられているアモジアキンに、選択的な抗 SFTSV 効果を同定することに成功した。アモジアキンの 50% 有効濃度と 50% 毒性濃度は、それぞれ約 20  $\mu\text{M}$  と  $> 100 \mu\text{M}$  であった (平均値)。

## 2. 研究の目的

(1) 種々のアモジアキン誘導体について、それらの抗 SFTSV 効果を検討し、より活性の高い薬剤を得る。活性の高い薬剤が得られたら、アモジアキンの抗 SFTSV 効果の作用機序を明らかにする。また、リバビリンやファビピラビルなど、抗 SFTSV 効果を有する薬剤との併用試験を行い、相乗効果を示すかどうかを明らかにする。

(2) SFTSV 感染マウスモデルにおけるアモジアキンの効果を確認することで、アモジアキンの抗 SFTSV 薬としての臨床研究、および臨床開発を目的とした産学共同研究を実施するかどうかを判断する。

## 3. 研究の方法

(1) アモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果の検討: 研究代表者の研究室は、別の目的のために合成された約 100 種類のアモジアキン誘導体を保有している。そこで、これまでの研究において確立した「抗 SFTSV アッセイ法」を用いて、これらの誘導体の抗 SFTSV 効果について検討を行った。具体的には、SFTSV に高い感受性を示す Vero 細胞や HuH-7 細胞をマイクロプレートに播種し、24 時間培養後にウイルスを感染させるとともに、種々の濃度の薬剤を添加してさらに 3 日間培養を続けた。薬剤の抗ウイルス効果については、TaqMan Gene Expression Cells-to-CT™ Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた real-time RT-PCR を行い、細胞内のウイルス RNA 量を定量した。これと並行して、薬剤の細胞毒性は種々の濃度の薬剤を非感染細胞に添加し、3 日間培養後に色素法を用いて、生細胞数を測定した。この方法では、検体から RNA を抽出せずに、直接 RT-PCR 法を行うことで、RNA 定量における実験誤差を回避することが可能となった。研究代表者は既にこの方法を、HCV レプリコン細胞を用いた抗 HCV アッセイに使用しており、再現性が高く、抗ウイルスアッセイのように一度に多くの検体を扱う実験に適していることを明らかにしている<sup>7</sup>。

(2) アモジアキン誘導体の作用機序 (標的分子) の検討: アモジアキンが SFTSV の増殖サイクルのどの部分に作用するかを明らかにするため、time-of-addition 試験を行った。これは、ウイルスを細胞に high multiplicity of infection (MOI) にて感染させ、感染直後より一定時間間隔で順次薬剤を添加していくという実験である。どの程度の時間、薬剤の添加を遅らせても、抗ウイルス効果を発揮できるかを検討することにより、当該薬剤のウイルス増殖サイクルにおける標的部位の位置を予想する。この際、既に作用機序が分かっている薬剤 (例えば、ファビピラビルなど) について、同時に同じ実験を行い、両者の結果を比較することで、より正確な標的部位の位置を知ることができる。

(3) アモジアキン誘導体と他の薬剤との併用試験：アモジアキンは核酸誘導体であるリバビリンやファビピラビルとは化学構造が全く異なるため、作用機序もリバビリンやファビピラビルとは異なると予想された。一般的に、作用機序が異なる2つの抗ウイルス剤を併用すると、相乗効果を示すことが多いので、アモジアキンとこれらの薬剤との併用による抗 SFTSV 効果を検討した。併用効果の解析には、一般的に良く使用される median effect analysis<sup>8</sup> を基本としたコンピュータプログラムにて解析し、相乗効果の有無を判定した。

(4) 感染モデルマウスを用いたアモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果：1 型インターフェロン受容体ノックアウトマウスに  $1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) の感染性 SFTSV を感染させると、ほぼ 100% のマウスが死亡する。このマウスに  $1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> の SFTSV を感染させ、その 1 日後から種々の量のアモジアキンを投与した。投与量はファビピラビルの投与例を参考に、体重 1 kg 当たり 6.25, 25 および 100 mg/kg を 1 日 1 回、5 日間経口もしくは腹腔内に投与した。本実験におけるアモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果は、感染マウスの生存率、体重の推移などによって評価した<sup>3</sup>。

#### 4. 研究成果

(1) アモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果：以前の研究により、アモジアキンに選択的な抗 SFTSV 効果を認めたことから、研究代表者が所持する約 100 種類のアモジアキン誘導体について、それらの Vero 細胞における抗 SFTSV 効果について検討した。その結果、リードとなったアモジアキンと比較して、抗ウイルス活性が 10 倍程度高い新規誘導体 (#90) を同定することに成功した。#90 および対照として用いたファビピラビルの 50% 有効濃度は、それぞれ  $2.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$  および  $4.1 \pm 0.6 \mu\text{M}$  であった (図 1)。一方、50% 細胞毒性濃度は何れの薬剤も  $> 50 \mu\text{M}$  であった。以上のことから、#90 はファビピラビルと同等かそれ以上の抗 SFTSV 効果を有していると思われる。なお、リード化合物であるアモジアキンの 50% 有効濃度は  $19.1 \pm 5.1 \mu\text{M}$  前後であった。また、研究分担者が国立感染症研究所で保有している Vero 細胞と SFTSV 株を用いて、アモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果を検証したところ、アモジアキンおよび #90 の 50% 有効濃度は、それぞれ  $6.7 \mu\text{M}$  および  $2.5 \mu\text{M}$  であったことから #90 の選択的な抗 SFTSV 効果が裏付けられた。

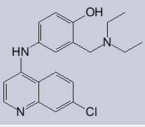
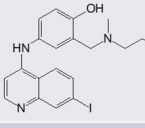
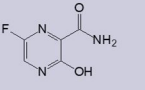
薬剤名	化学構造	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
Amodiaquine		$19.1 \pm 5.1$	$> 50$
# 90		$2.6 \pm 0.6$	$> 50$
Favipiravir		$4.1 \pm 0.6$	$> 50$

図 1. アモジアキン、アモジアキン誘導体 (#90) およびファビピラビルの抗 SFTSV 効果

(2) アモジアキン誘導体の作用機序とファビピラビルとの併用効果に関する検討：#90 が SFTSV の増殖サイクルのどの部分に作用するかを明らかにするために、time-of-addition 試験を行った。その結果、#90 が感染後 4~6 時間以降に薬剤を加えると、その抗ウイルス効果が減弱するのと比較して、ファビピラビルは感染後 12 時間後までに加えれば効果を示すようであった。このことから、#90 はウイルス感染後の比較的早い段階に作用して、抗 SFTSV 効果を発揮していると思われる。また、#90 とファビピラビルの 1:1 での併用効果について検討したところ、相加的な抗ウイルス効果を示すことが分かった。

(3) アモジアキン誘導体のマウスにおける抗 SFTSV 効果：1 型インターフェロン受容体ノックアウトマウスを用いた in vivo 投与実験を行ったところ、SFTSV 感染マウスに対し、#90 の最大量 (100 mg/kg) の経口投与群においても、非投与群と比較して、有意な致死率の減少をもたらさなかった (図 2)。その理由として、#90 は in vivo における薬物体内動態 (経口吸収性など) に問題があると思われる。そこで、#90 の体内動態を改善することを目的に、原体 (フリー体) から塩体 (塩酸塩) への変換を行い、#90 塩酸塩を用いて、in vitro 活性試験および in vivo 活性試験を行った。その結果、#90 塩酸塩の水に対する溶解度は原体と比較して大幅に増加していた。また、#90 塩酸塩は in vitro において、原体と同様かやや強い抗 SFTSV 効果を有していることが分かった。一方で、マウスにおける経口薬物動態試験の結果から、#90 塩酸塩は経口吸収性

があるものの、抗ウイルス効果を示す濃度には達しないことが判明した。このため、#90 塩酸塩の in vivo 抗ウイルス試験を経口投与から腹腔内投与に変更して実施したが、明らかな抗ウイルス効果は認められなかった。以上のことから、今後は #90 塩酸塩の薬物動態改善のための製剤化もしくは化学構造修飾を行った上で、抗 SFTSV 効果を改めて検証する必要があるとの結論に達した。

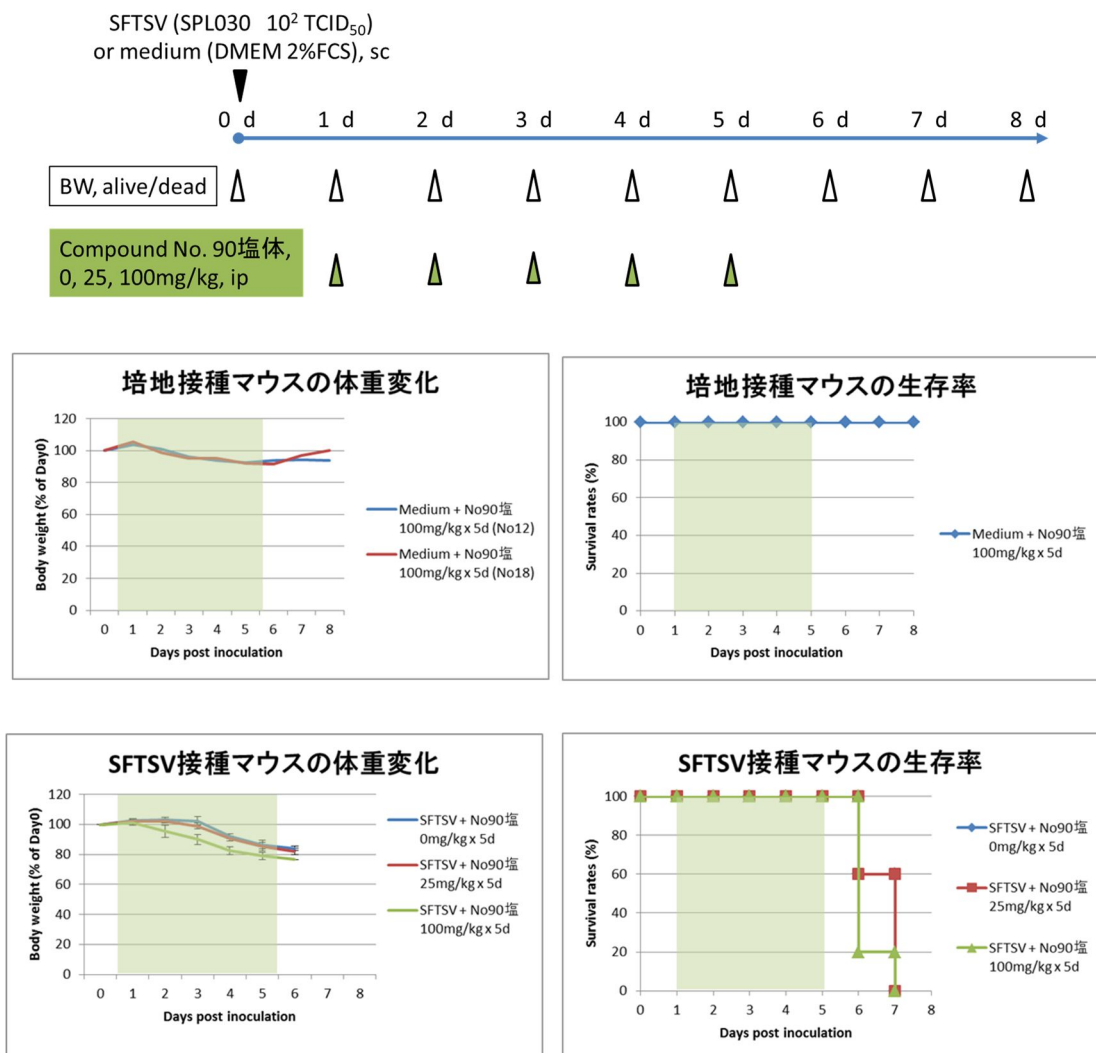


図 2 . アモジアキン誘導体 (#90) の SFTSV 感染マウスに対する投与実験

< 引用文献 >

Yu X-J, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *New Engl. J. Med.* 364: 1523-1532, 2011.

国立感染症研究所ホームページ「重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)」  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/sa/sfts.html>

Tani H, et al. Efficacy of T-705 (favipitavir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *mSphere* 1:e00061-000615 (2016).

Baba M, et al. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by 5-ethyl-6-phenylthiouracil derivatives through their interaction with the HIV-1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2356-2360, 1991.

Baba M, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5698-5703, 1999.

Nitanda T, et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3355-3360, 2005.

Salim MTA, et al. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 714-719, 2011.

Chou, TC and Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27-55, 1984.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masanori Baba, Masaaki Toyama, Norikazu Sakakibara, Mika Okamoto, Naomichi Arima, Masayuki Saijo	4. 巻 25
2. 論文標題 Establishment of an antiviral assay system and identification of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus inhibitors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Antiviral Chemistry and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 83-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2040206617740303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakurai Yasuteru, Sakakibara Norikazu, Toyama Masaaki, Baba Masanori, Davey Robert A.	4. 巻 160
2. 論文標題 Novel amodiaquine derivatives potently inhibit Ebola virus infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 175 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2018.10.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 馬場昌範
2. 発表標題 重症熱性血小板減少症候群（SFTS）とその治療薬に関する研究
3. 学会等名 日本学術会議九州・沖縄地区会議主催 学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Baba M, Toyama M, Sakakibara N, Okamoto M, Saijo M
2. 発表標題 Establishment of an antiviral assay system and identification of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) inhibitors
3. 学会等名 30th International Conference on Antiviral Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馬場昌範, 外山政明, 榊原紀和, 岡本実佳, 西條政幸
2. 発表標題 抗 SFTSV アッセイ系の構築とアモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果
3. 学会等名 第 27 回抗ウイルス療法学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馬場昌範
2. 発表標題 抗ウイルス薬の研究開発における最近の動向
3. 学会等名 第 70 回日本薬理学会西南部会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗重症熱性血小板減少症候群ウイルス薬	発明者 馬場昌範, 外山政明, 榊原紀和	権利者 鹿児島大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/000887	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗エボラウイルス薬	発明者 馬場昌範, 榊原紀和, Robert Davey, 櫻井康晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US2018/27528	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西條 政幸  (Saijo Masayuki)  (50300926)	国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長    (82603)	