

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：82714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08870

研究課題名(和文) 低分子化合物を用いたデングウイルス複製機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of dengue virus replication mechanism using small molecule compounds

研究代表者

日紫喜 隆行 (Hishiki, Takayuki)

神奈川県衛生研究所・微生物部・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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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。東南アジアや中南米などの熱帯地域で大きな流行を繰り返しているが、未だに効果的な治療薬はなく新規開発は重要な課題とされている。本研究ではデングウイルス複製制御機構を解析し、新規抗ウイルス剤開発に繋がる基盤情報を得ることを目的とした。感染性デングウイルスおよびレプリコン細胞を用いた解析の結果、複数個の候補化合物が抗ウイルス活性を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗ウイルス化合物の同定と分子作用機序の解明は、デングウイルス生活環の新たな側面を明らかにするだけでなく、他のウイルス複製機構の解明、さらには宿主細胞の理解への波及効果をもたらす事が予想される。またそれらの知見は、新たな創薬標的分子を見いだすことに繋がり、より効率的な抗ウイルス剤開発への応用が期待される。さらに今回同定した抗ウイルス化合物のなかには承認薬も含まれている事から、ドラッグリポジショニングによる新薬開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Dengue virus (DENV), transmitted to humans by Aedes mosquitoes, is the aetiological agent of dengue fever and dengue haemorrhagic fever and continues to be a public health problem in the tropical and subtropical areas. However, there is currently no antiviral treatment for DENV infection. In this study, our aim was to analyze the DENV replication mechanism and obtain basic information leading to the development of new antiviral agents. As a result of analysis using infectious DENV and replicon cells, we identified some compounds that have potent anti-DENV activity and low cytotoxicity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：デングウイルス ジカウイルス 抗ウイルス化合物 ウイルス複製機構

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ジカ熱やエボラ出血熱の流行や、デング熱の国内患者が発生したことから、新興感染症の脅威に社会の耳目が集まっている。デングウイルス感染症は主に熱帯・亜熱帯地域で流行しており、当該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、「顧みられない熱帯病」のひとつと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、新規開発が喫緊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日本国内における流行が懸念されており、今後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

抗デングウイルス治療薬の開発が遅れている要因のひとつに、当該ウイルスの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ついて不明な点が多いことがあげられる。本研究では抗ウイルス化合物の作用機序解析をおこなうことによって、デングウイルス複製に關与する宿主因子の同定やウイルス複製制御機構を明らかにし、抗ウイルス薬開発に繋がる基盤情報を得る。

### 3. 研究の方法

対象化合物は、低分子化合物ライブラリーおよびデングウイルス以外のウイルスに対して抗ウイルス活性を有することが報告されている化合物を用いた。感染性デングウイルスを各化合物とともに共培養し、48時間後の培養上清中・細胞内のRNAウイルス量を定量RT-PCR法にて解析した。細胞内のウイルスタンパク質量についてはウェスタンブロット法によって解析した。培養上清中のウイルス力価はプラークアッセイによって解析した。また、レプリコン細胞については、培養上清中のルシフェラーゼ活性を指標に評価した。細胞毒性試験についてはテトラゾリウム塩・WSTを用いた。

### 4. 研究成果

低分子化合物ライブラリーおよびデングウイルス以外のウイルスに対して抗ウイルス活性を有することが報告されている化合物を用いて、化合物の終濃度 10  $\mu$ M の条件下で抗ウイルス活性を示す化合物のスクリーニングをおこなった結果、複数個の候補化合物が抗ウイルス活性を有することが示された。その後、それら候補化合物について感染性ウイルスやレプリコン細胞を用いてさらに詳細な解析を行った。化合物の終濃度が 10  $\mu$ M まで計 8 点の濃度について抗ウイルス活性解析ならびに細胞毒性試験をおこない、50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) ならびに 50%細胞毒性濃度 (CC<sub>50</sub>) をそれぞれ算出した。その結果、強い抗ウイルス活性を示す化合物の絞り込みに成功した。続いて、絞り込んだ化合物について別ロットの化合物を購入し、再度抗ウイルス活性解析および細胞毒性試験をおこない偽陽性を排除した。また、培養細胞上清中のウイルス力価だけでなく、細胞内外のウイルス RNA の発現量、ならびに細胞内のウイルスタンパク質量についても解析をおこない、抗ウイルス活性の強い化合物の絞り込みに成功した。それらの化合物は、血清型 1 から 4 まで全ての感染性デングウイルスに対して抗ウイルス活性を示した。また、化合物の詳細な作用機序解明をおこなうために、化合物耐性ウイルスの作出を試みたが成功しなか

った。作用機序の解明には至らなかったが、本研究結果が抗 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11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kato Fumihiko, Nio Yasunori, Yagasaki Kazumi, Suzuki Rieko, Hijikata Makoto, Miura Tomoyuki, Miyazaki Isao, Tajima Shigeru, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki, Takasaki Tomohiko, Hishiki Takayuki	4. 巻 172
2. 論文標題 Identification of inhibitors of dengue viral replication using replicon cells expressing secretory luciferase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 104643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2019.104643	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 -
1. 著者名 Okano Yuki, Saito-Tarashima Noriko, Kurosawa Madoka, Iwabu Ai, Ota Masashi, Watanabe Tadashi, Kato Fumihiko, Hishiki Takayuki, Fujimuro Masahiro, Minakawa Noriaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of novel imidazole nucleosides as potential anti-dengue virus agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2181 ~ 2186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.04.015	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 -
1. 著者名 Yamane D, Feng H, Rivera-Serrano E, Selitsky S, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight K, Misumi I, Hensley L, Lovell W, Gonzalez-Lopez O, Suzuki R, Matsuda M, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Hishiki T, Wauthier E, Oikawa T, Morita K, Reid L, Sethupathy P, Kohara M, Whitmire J, Lemon S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-019-0425-6	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
1. 著者名 Hishiki Takayuki, Kato Fumihiko, Nio Yasunori, Watanabe Satoru, Wen Tan Nicole Wei, Yamane Daisuke, Miyazaki Yasuyuki, Lin Chun-Chieh, Suzuki Rieko, Tajima Shigeru, Lim Chang-Kweng, Saijo Masayuki, Hijikata Makoto, Vasudevan Subhash G., Takasaki Tomohiko	4. 巻 165
2. 論文標題 Stearoyl-CoA desaturase-1 is required for flavivirus RNA replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 42 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2019.03.002	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

1. 著者名 Siddiqui Rokeya, Suzu Shinya, Ueno Mikinori, Nasser Hesham, Koba Ryota, Bhuyan Farzana, Noyori Osamu, Hamidi Sofiane, Sheng Guojun, Yasuda-Inoue Mariko, Hishiki Takayuki, Sukegawa Sayaka, Miyagi Eri, Strebel Klaus, Matsushita Shuzo, Shimotohno Kunitada, Ariumi Yasuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007372	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 該当する

1. 著者名 Tohma Daiki, Tajima Shigeru, Kato Fumihiro, Sato Hirotaka, Kakisaka Michinori, Hishiki Takayuki, Kataoka Michiyo, Takeyama Haruko, Lim Chang-Kweng, Aida Yoko, Saijo Masayuki	4. 巻 164
2. 論文標題 An estrogen antagonist, cyclofenil, has anti-dengue-virus activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 225 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-018-4079-0	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 -

1. 著者名 Ueda Youki, Gu Weilin, Dansako Hiromichi, Kim Hye-Sook, Yoshizaki Sayaka, Okumura Nobuaki, Ishikawa Tomohiro, Nishitsuji Hironori, Kato Fumihiro, Hishiki Takayuki, Satoh Shinya, Ishii Koji, Masuda Michiaki, Shimotohno Kunitada, Ikeda Masanori, Kato Nobuyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Multiple antiviral activities of the antimalarial and anti-hepatitis C drug candidates N-89 and N-251	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.05.007	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 Kato Fumihiro, Ishida Yuki, Kawakami Akihiko, Takasaki Tomohiko, Saijo Masayuki, Miura Tomoyuki, Hishiki Takayuki.	4. 巻 8
2. 論文標題 Evaluation of Macaca radiata as a non-human primate model of Dengue virus infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21582-9.	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 Hishiki Takayuki, Kato Fumihito, Tajima Shigeru, Toume Kazufumi, Umezaki Masahito, Takasaki Tomohiko, Miura Tomoyuki.	4. 巻 8
2. 論文標題 Hirsutine, an Indole Alkaloid of Uncaria rhynchophylla, Inhibits Late Step in Dengue Virus Lifecycle.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2017.01674.	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 Kato Fumihito, Matsuyama Shutoku, Kawase Miyuki, Hishiki Takayuki, Katoh Hiroshi, Takeda Makoto	4. 巻 64
2. 論文標題 Antiviral activities of mycophenolic acid and IMD 0354 against SARS CoV 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12828	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 -

1. 著者名 Gewaid Hossam, Aoyagi Haruyo, Arita Minetaro, Watashi Koichi, Suzuki Ryosuke, Sakai Shota, Kumagai Keigo, Yamaji Toshiyuki, Fukasawa Masayoshi, Kato Fumihito, Hishiki Takayuki, Mimata Ayako, Sakamaki Yuriko, Ichinose Shizuko, Hanada Kentaro, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Aizaki Hideki	4. 巻 94
2. 論文標題 Sphingomyelin Is Essential for the Structure and Function of the Double-Membrane Vesicles in Hepatitis C Virus RNA Replication Factories	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01080-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01080-20	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 日紫喜隆行、加藤文博、鈴木理恵子、田島茂、林昌宏、西條政幸、高崎智彦
2. 発表標題 Development of zika virus replicon cells expressing secretory luciferase
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、林昌宏、西條政幸、高崎智彦
2. 発表標題 分泌型ルシフェラーゼを有するジカウイルスー過性レプリコンの構築
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第65回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日紫喜隆行
2. 発表標題 デングウイルス感染症
3. 学会等名 第160回 日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Hishiki, Fumihiro Kato, Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki
2. 発表標題 Development of dengue virus replicon cells expressing secretory luciferase
3. 学会等名 2nd International Meeting on Arboviruses and their Vectors (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、高崎智彦
2. 発表標題 分泌型ルシフェラーゼ発現レプリコン細胞を用いた抗 Dengue ウイルス化合物の探索
3. 学会等名 第52回 日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関