

令和元年5月27日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18356

研究課題名(和文)新規牛白血病ウイルス感染性蛍光定量法を応用した感染阻害剤スクリーニング法の研究

研究課題名(英文) New screening methods for inhibitor of bovine leukemia virus using Luminescence Synchrony Induction Assay (LuSIA)

研究代表者

佐藤 洋隆 (Sato, Hirotaka)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：00708539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛白血病ウイルス複製阻害能を持つ化合物を選択するために、スクリーニング系の高感度化を行い、CC81-GREMG細胞を用いた高感度スクリーニング系を構築した。これを用いて、BLV感染による蛍光シンシチウム形成阻害能を示す化合物のスクリーニングを行った結果、生存率90%以上で蛍光シンシチウム形成を30%以上阻害する化合物が、16化合物得られた。そのうち6化合物で濃度依存性が見られたことから、これら6化合物について類縁体化合物のスクリーニングを実施した。その結果、化合物A、B、C、Eについて複数の低毒性かつ阻害率の高い類縁体化合物が得られ、構造活性相関による最適化が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高感度な第2世代レポーター細胞CC81-GREMGを開発したことにより、BLV感染性阻害剤スクリーニングの感度が向上し、多くの阻害剤候補を得ることに成功した。今回得られた高感度感染性測定法は、薬剤スクリーニングのみならず混入ウイルスの検出など幅広い活用が見込まれる。牛白血病ウイルスの複製を阻害する活性を持つ候補化合物はそれぞれ基本構造が異なっており、類縁体化合物のスクリーニングを行ったことで、より活性の高い化合物をそれぞれ見いだすことに成功した。今後は、最も活性の強い類縁体を用いて機能解析を進めていくことで、作用機序の解明および牛白血病治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)： We established new cell line, CC81-GREMG, to construct sensitive method of bovine leukemia virus (BLV) replication inhibitor. We start the screening using this method and 400 compounds of pilot library presented by RIKEN NPDEPO. In the result, we got 16 hit compounds, which showed over 90% of viability and over 30% inhibition of fluorescence syncytium formation. Furthermore, 6 compounds within the 16 hit compounds showed dose dependency at 10 to 0.1ug/mL. To find highly active analogs and confirm their activity, we are screening the analog library of 6 hit compounds. finally, we confirmed 4 highly active analogs from hit compound A, B, C and E, and these structures showed structure-activity relationships.

研究分野：細胞生物学

キーワード：牛白血病ウイルス ウイルス感染阻害剤 薬剤スクリーニング LuSIA

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

### 1. 研究開始当初の背景

牛白血病ウイルス(BLV)は牛に悪性 B リンパ腫である地方病性牛白血病(EBL)を惹起する、ヒト T 細胞指向性白血病ウイルス(HTLV)と近縁のデルタレトロウイルスである。BLV 感染牛のおよそ 70%は長期間、全く臨床症状を示さない未発症健康、30%は持続性リンパ球増多症(PL)、そして一部の感染牛(5%以下)は5年から10年の潜伏期間を経て、地方病性牛白血病(EBL)を発症する。EBLには有効な治療法はなく、一度発症すると必ず死の転帰をとることから畜産界に与える打撃は深刻である。しかし、発症率が低いために、牛白血病浄化対策が軽視されてきた結果として、その感染および発症率が世界的に急増しており、近年では陽性牛の淘汰、初乳処理、初乳廃棄、陽性牛の後継牛の不使用、医原性感染の防止の徹底など、様々な対策が行われているが、治療薬、ワクチンが実用に至っていないことから、牛白血病の発生頭数は増加の一方となっている。このように、BLV 感染が蔓延してしまった結果、隔離・淘汰による BLV の排除が大変に困難となっており、有効な BLV 対策が切実に求められている。これまでの成果から、低プロウイルス量を示す BLV 感染個体は、他の牛への伝播の可能性が低く、逆に高プロウイルス量を示す個体は牛群の感染源になる可能性が示唆されている。そのため感染拡大のリスクを低下させる治療薬の開発は、感染拡大を抑制する手段の一つとして、有効な選択肢となっている。

BLV の感染性を測定する方法として、ネコ腎由来細胞株 CC81 等の感染感受性の培養細胞をターゲット細胞として感染牛の末梢血単核球と共培養することで、ターゲット細胞の細胞膜上で発現した Env により生じる多核巨細胞(シンシチウム)を光学顕微鏡を用いて計数するシンシチウム法(SIA)が一般的に用いられているが、SIA は感度が低く、また目視による観察であるため多検体処理が難しく、客観性に乏しいことから感染阻害剤のスクリーニングはこれまで行われてこなかった。

そこで申請者らは高感度、客観的かつ定量的に BLV 特異的な感染性を測定する新規 BLV 感染性定量法(LuSIA)を開発した。この LuSIA では感染感受性細胞である CC81 に BLV の転写に必須な long terminal repeat (LTR) U3 領域をプロモーター領域に組み込んだ緑色蛍光タンパク質(EGFP)発現プラスミドを安定導入した CC81-BLU3G 細胞をターゲット細胞に用いることで、感染後、ウイルス複製早期に発現するウイルス由来転写因子 Tax が EGFP 発現を誘導し、感染細胞が蛍光を発するようになる。さらに翻訳されたウイルスの Env によりシンシチウムが形成され、通常の細胞より巨大な蛍光細胞として観察されることから容易に感染細胞を識別でき、自動化による客観的で定量的な多検体処理を可能とした独自の手法である。これを応用し、ターゲット細胞に BLV 感染性分子クローンを遺伝子導入し、化合物を添加することで BLV 感染を阻害する薬剤のスクリーニングが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、LuSIA を応用した、BLV 感染阻害スクリーニング法を用い、BLV 蔓延対策の一助となるようなシード化合物の探索を行うとともに、BLV レセプターなどの感染に寄与する因子を解析するための新たなツールを獲得することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)スクリーニング系の高感度化および最適化

LuSIA は感染細胞をターゲット細胞である CC81-BLU3G 細胞と共培養することで感染細胞の感染性を評価する方法として確立されている。そこで BLV 感染阻害能を持つ化合物スクリーニングに応用するため、測定系の高感度化と試験条件の最適化を行った。

CC81-BLU3G 細胞は BLV の long terminal repeat (LTR) の U3 領域のみをプロモーターとして持ち、BLV の感染により緑色蛍光タンパク質を発現するレポータープラスミドを CC81 細胞に安定導入して作成されているが、本研究課題ではスクリーニング系の高感度化を期して、LTR-U3 領域のグルコシルコイド応答配列(GRE)に変異を導入したレポータープラスミドを CC81 細胞に安定導入した、CC81-GREMG 細胞を新たに樹立した。

次に CC81-GREMG をレポーター細胞として 96well plate を用いたスクリーニング系の構築を行い、FLK-BLV 細胞共培養系について最適条件の検討を行った。

CC81-GREMG および BLV 恒常感染細胞株 FLK-BLV の 24 時間共培養における播種濃度の組み合わせについて、蛍光シンシチウムを最も高感度に分離可能な条件を検討した。

#### (2)低分子化合物の 1 次スクリーニング

最適化されたスクリーニング系を用いて、BLV 感染阻害作用をもつ低分子化合物のスクリーニングを実施した。スクリーニング対象とする化合物ライブラリーについては、食用または乳用に供される牛への投与を目標とすることから、天然物化合物にアドバンテージのある理研天然化合物バンクの保有するライブラリーを用いた。

理研天然化合物バンクから提供されたパイロットライブラリー 400 化合物を用い、96well plate で CC81-GREMG 細胞と BLV 発現細胞株 FLK-BLV を最終濃度 10ug/mL (0.1%DMSO 含有)の化合物存在下で 24 時間共培養、細胞固定後、自動化された蛍光顕微鏡によるスキャンを行い、0.1%DMSO コントロールと比較してシンシチウム形成阻害能を評価した。

また、最終濃度 10ug/mL の化合物を添加した培地で CC81-GREMG 細胞を 24 時間培養したの

ち、premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TaKaRa)を用いて化合物による細胞毒性を評価した。

### (3)感染阻害活性の濃度依存性試験

選択された化合物が添加濃度依存的に BLV の細胞間感染を阻害することを確認するため、段階希釈した化合物による感染阻害試験を行った。10ug/mL から 0.1ug/mL を添加した培地で CC81-GREMG 細胞と FLK-BLV 細胞を共培養する。細胞固定後、自動化された蛍光顕微鏡によるスキャンを行い、蛍光シンシチウムの発現量を測定し、50%阻害濃度  $IC_{50}$  を算出した。同様に WST-1 法を用いて 50%細胞毒性濃度  $CC_{50}$  を算出した。

良好な結果の得られた化合物を BLV 感染阻害薬のシード化合物とした。

### (4)類縁体化合物による 2 次スクリーニング

得られたシード化合物の類縁体をスクリーニングすることで、活性を持つ構造の確認と、より高い活性を持つ化合物を探索した。理研天然化合物バンクから類縁体合計 260 化合物の提供を受け同様のスクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

### (1)スクリーニング系の高感度化および最適化

LTR-U3 領域のグルココルチコイド応答配列 (GRE) に変異を導入したレポータープラスミドを作成し、CC81 細胞に安定導入し反応性の高い細胞株を選出した。その結果、BLV 感染細胞株 FLK-BLV 細胞と共培養した際に、従来の CC81-BLU3G 細胞よりも蛍光バックグラウンドが有意に低く、それにより認識可能な蛍光シンシチウム数が増加することで LuSIA の感度が増強される CC81-GREMG 細胞の樹立に成功した。

次にこの CC81-GREMG 細胞を用いたスクリーニング系の構築、最適化を行った。96well plate における FLK-BLV との 24 時間共培養における播種濃度の組み合わせについて検討した結果、CC81-GREMG 細胞  $4 \times 10^5$  cells/mL と FLK-BLV 細胞  $2 \times 10^5$  cells/mL を 50uL ずつ混合する条件が最適であった。

この条件を用いて plate 全 well でコントロール実験を行うパイロットランおよび理研天然化合物バンクから提供を受けた、既知の化合物を収載した標準化ライブラリー 80 化合物を用いたスクリーニング系のバリデーションを行い、測定系が十分な感度と信頼性を持つことを確認した。その結果、バリデーションの評価指標となる  $Z'$ -factor はそれぞれ 0.68 および 0.85 で、基準となる 0.5 以上を達成しており、測定系の信頼性が確認された。

### (2)低分子化合物の BLV 感染阻害能スクリーニング

理研天然化合物バンクから、250,000 化合物を構造的に 400 に分類した際の代表的化合物を集めたパイロットライブラリーの提供を受け、BLV 感染による蛍光シンシチウム形成阻害能を示す化合物のスクリーニングを行った。同時に化合物による細胞毒性について、WST-1 法を用いて評価した。10ug/mL の化合物存在下で 24 時間培養を行った結果、生存率 90%以上で蛍光シンシチウム形成を 30%以上阻害する化合物が、400 化合物中 16 化合物が得られた。

### (3)感染阻害活性の濃度依存性試験

得られたヒット化合物のうち入手可能であった 9 化合物について 10ug/mL から 0.1 ug/mL における感染阻害活性への濃度依存性を同様の試験で確認したところ、そのうち 6 化合物で濃度依存性が見られた。

### (4)類縁体化合物によるスクリーニング

6 化合物 A-F について理研天然化合物バンクの所有する類縁体化合物を検索し、それぞれ 200、22、5、24、20、4 化合物について同様のスクリーニングを実施した。その結果、化合物 A 類縁体は 46/200 化合物、化合物 B 類縁体は 5/22 化合物、化合物 C 類縁体は 3/5 化合物、化合物 D 類縁体は 1/24 化合物、化合物 E 類縁体は 4/20 化合物、化合物 F 類縁体は 0/4 化合物が 10ug/mL で蛍光シンシチウム形成阻害能を示した。

化合物 A、B、C、E 類縁体については複数の低毒性かつ阻害率の高い化合物が得られており構造活性相関による最適化が可能であると考えられた。化合物 D 類縁体は全体的に細胞毒性の強い化合物であり、得られた 1 化合物についても不溶性であり、化合物 F については入手可能な類縁体数も少なく、活性化合物が得られなかった。

### (5)考察

高感度な第 2 世代レポーター細胞 CC81-GREMG を開発したことにより、BLV 感染性阻害スクリーニングの感度が向上し、多くの阻害剤候補を得ることに成功した。また、類縁体化合物のスクリーニングを行ったことで、より活性の高い化合物を見いだすことに成功した。

今後は、最も阻害活性の強かった化合物 A、B、C、E 類縁体を用いた機能解析を行い作用機序の解明を進めていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] (計 1 件)

- (1) Sato, H., Watanuki, S., Murakami, H., Sato, R., Ishizaki, H., Aida, Y. Development of a luminescence syncytium induction assay (LuSIA) for easily detecting and quantitatively measuring bovine leukemia virus infection. Arch. Virol. 2018 Feb 17. doi: 10.1007/s00705-018-3744-7. 査読有

### [ 学会発表 ] (計 4 件)

- (1) Hiroataka Sato, Sonoko Watanuki, Lanlan Bai, Liushiqi Borjigin, Hiroshi Ishizaki, Yoko Aida. THE LUMINESCENCE SYNCYTIUM INDUCTION ASSAY (LuSIA) IS NEW METHOD FOR ANALYSING BOVINE LEUKEMIA VIRUS INFECTIVITY. The 30th International Workshop on Retroviral Pathogenesis (国際学会) .2018 年
- (2) 佐藤洋隆、Bai Lanlan、横山佳菜、間陽子。レセプター候補高発現レポーター細胞による牛白血病ウイルス感染性測定法 (Luminescence syncytium induction assay; LuSIA) の高感度化。第 161 回日本獣医学会学術集会。2018 年
- (3) 佐藤洋隆、綿貫園子、大附寛幸、白ランラン、佐藤礼一郎、村上裕信、石崎宏、間陽子。高感度変異導入レポーター細胞を用いた Luminescence Syncytium Induction Assay(LuSIA)による牛白血病ウイルス感染性の検出。第 160 回日本獣医学会学術集会。2017 年
- (4) 佐藤洋隆、綿貫園子、佐藤礼一郎、村上裕信、石崎宏、間陽子。新規牛白血病ウイルス感染性定量法 Luminescence Syncytium Induction Assay の開発と応用。第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会。2017 年

## 6 . 研究組織

- (1)研究分担者
- (2)研究協力者

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。