

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08444
研究課題名（和文）新規抗ウイルス自然免疫機構を標的にした抗ウイルス薬スクリーニングシステムの開発

研究課題名（英文）Development of an antiviral drug screening system targeting a novel antiviral innate immune mechanism

研究代表者
新屋 政春（Shinya, Masaharu）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10405277
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Fbw7 の発現を特異性高く、高感度に検出できるハイスループットなスクリーニング系を構築し、Fbw7 の発現を誘導できる化合物を選び出した。スクリーニングした薬物は複数種のウイルスに対して抗ウイルス活性を有してした。我々がスクリーニングした薬物は今後発生するであろう新興ウイルス感染症のパンデミックに対抗できるツールになる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義
我々がスクリーニングした薬剤は、今後発生するであろう新興ウイルス感染症のパンデミックに対抗できるツールになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We constructed a high-throughput screening system that can detect the expression of Fbw7 with high specificity and sensitivity, and selected compounds that can induce the expression of Fbw7. The screened drugs possessed antiviral activity against several viruses. Our screened drugs may become a tool to combat emerging viral pandemics that may occur in the future.

研究分野：分子生物学

キーワード：抗ウイルス

1. 研究開始当初の背景

新興ウイルス感染症は、ひとたびアウトブレイクが起こると急激にパンデミックをもたらす危険性がある。既存の抗ウイルス薬やワクチンはウイルス特異性が高いため、さまざまな新興ウイルス感染症に対してあまねく効果を発揮することはできない。一方で、現在治療法のないウイルス感染症も多い。そこで、広範なウイルス種に対して抑制効果がある治療薬の開発が望まれる。我々は、薬剤の分子標的をウイルス由来分子ではなく、宿主細胞由来分子に設定し、ウイルスが複製に利用する宿主因子を標的分子にすれば、新興ウイルスや現在治療法のないウイルスを含めて、広範なウイルス種を抑制できる新規抗ウイルス薬が創出できると考えた。

最近我々は、p53 が関与する新しい抗ウイルス自然免疫機構を見出し、そのメカニズムを解析する過程で、Fbw7 が抗ウイルス薬の標的分子になりうる可能性を見出した。Fbw7 は、単純ヘルペスウイルス 1 (HSV1)、水疱性口内炎ウイルス (VSV) など、さまざまな DNA ウイルスや RNA ウイルスを抑制できることを見出しているため、本研究で得られる化合物は、広範なウイルス種に対して抑制効果を発揮することが期待できる。そこで、Fbw7 プロモーターの下流に高輝度バイオセンサーを搭載したレポーターベクターを導入した細胞を作製し、Fbw7 の発現レベルを高感度にリアルタイムモニターできるハイスプールプットなスクリーニング系を構築できると考えた。このスクリーニング系が確立されれば、Fbw7 の発現を特異的に誘導することによってウイルス複製を阻害する化合物を見出すことができると期待され、既存の抗ウイルス薬とは作用機序が全く異なる新しい分子標的抗ウイルス薬が開発できる。

2. 研究の目的

Fbw7 の発現を特異性高く、高感度に検出できるハイスプールプットなスクリーニング系を開発する。

化合物ライブラリーから Fbw7 の発現を誘導できる化合物を探索し、その中から、ウイルス感染細胞に添加するとウイルス複製を抑制する化合物を見出す。

得られた化合物をインフルエンザウイルス感染マウスに投与して抗ウイルス効果を評価する。

3. 研究の方法

1) Fbw7 レポーター細胞の作製

Fbw7 プロモーターの下流に高輝度バイオセンサー・ナノランタンを搭載したレンチウイルスベクターを作製し、細胞に感染させた後、ピューロマイシンでセレクションした。その後、Cre 遺伝子をトランスフェクションして、導入したレポーターからウイルス遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を除去した。

ウイルス感染以外に宿主因子の発現を誘導する条件 (最適な濃度、培養期間) をリアルタイム RT-PCR で検討した。

作製した Fbw7 レポーター細胞を、上記で最適化した条件で培養し、レポーター活性を評価した。

2) スクリーニング

作製した Fbw7 レポーター細胞を用いて、薬物をスクリーニングし、候補化合物を

選抜する。

候補化合物を種々の濃度で、細胞に加え、経時的に細胞を回収し、Fbw7 の発現を定量した。

3) 抗ウイルス活性の検証

細胞にウイルスを 1 時間感染させる。ウイルス感染後に、化合物を細胞に加えた。48 時間後に RT-qPCR 法で Fbw7 の発現を評価した。抗ウイルス作用は、RT-qPCR 法でウイルス核酸を定量し、プラークアッセイでウイルス力価を測定した。

4. 研究成果

1) Fbw7 レポーター細胞の作製

Fbw7 レポーターを導入した細胞に、p53 活性化する薬剤を種々の濃度で添加培養し、経時的に細胞を回収して、リアルタイム RT-PCR で Fbw7 の発現を調べた。薬剤添加後 24 時間目から、Fbw7 の発現が有意に上昇し、48 時間目でピークを迎え、その後、低下した。次に、同様の条件で、レポーターアッセイを行い、Fbw7 のレポーター活性もリアルタイム RT-PCR と同様の結果を示したことから、スクリーニング実験を薬剤添加後 48 時間目に行うことにした。

2) スクリーニング

Fbw7 レポーター細胞に薬物を添加し、48 時間培養し、レポーターアッセイを行った。コントロール群(薬剤非添加)に比べて、レポーター活性が有意に上昇した薬剤が数種類得られた。そのうちのいくつかについては、種々の濃度で、細胞に加え、経時的に細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR で Fbw7 の発現を調べたところ、薬剤非添加群に比べて、時間依存的・濃度依存的に Fbw7 の発現が上昇した。次に、抗ウイルス作用を検証する目的で、スクリーニングした薬剤の 1 つ(薬剤 X)をウイルス感染細胞に添加、培養した。細胞でのウイルス遺伝子の増幅をリアルタイム RT-PCR で、ウイルス力価をプラークアッセイで評価した。薬剤 X を添加した細胞では、薬剤非添加細胞に比べて、感染細胞でのウイルス遺伝子の増幅を有意に抑制するだけでなく、培養上清への新たなウイルスの産生も抑制した。

我々がスクリーニングした薬剤は、Fbw7 の発現を特異的に誘導することによってウイルス複製を阻害することができた。当初の計画では動物実験を予定していたが、実験系の構築とスクリーニング系の最適化に予想以上の時間を費やしたため、in vivo レベルでの抗ウイルス作用の検証は行えていない。本研究は新型コロナウイルス感染症のパンデミックになる前にスタートしているが、スクリーニングした薬剤は新型コロナウイルスを含む複数種のウイルスに対して抗ウイルス作用を有しており、今後発生するであろう新興ウイルス感染症のパンデミックに対抗できるツールになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Giuseppe Pezzotti, Eriko Ohgitani, Masaharu Shin Ya, Tetsuya Adachi, Elia Marin, Francesco Boschetto, Wenliang Zhu and Osam Mazda	4. 巻 10(6)
2. 論文標題 Instantaneous “catch and kill” inactivation of SARS CoV 2 by nitride ceramics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Transl Med.	6. 最初と最後の頁 e212.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ctm2.212.	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 Ohgitani E, Shin-Ya M, Ichitani M, Kobayashi M, Takihara T, Kawamoto M, Kinugasa H, Mazda O.	4. 巻 12.28.
2. 論文標題 Rapid inactivation in vitro of SARS-CoV-2 in saliva by black tea and green tea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 424533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.12.28.424533	査読の有無 無
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 Ohgitani E, Shin-Ya M, Ichitani M, Kobayashi M, Takihara T, Kawamoto M, Kinugasa H, Mazda O.	4. 巻 12.04.
2. 論文標題 Significant inactivation of SARS-CoV-2 by a green tea catechin, a catechin-derivative and galloylated theaflavins in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 412098;
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.12.04.412098	査読の有無 無
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 Ohgitani E, Shin-Ya M, Ichitani M, Kobayashi M, Takihara T, Kawamoto M, Kinugasa H, Mazda O.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid inactivation in vitro of SARS-CoV-2 in saliva by black tea and green tea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ohgitani E, Shin-Ya M, Ichitani M, Kobayashi M, Takihara T, Kawamoto M, Kinugasa H, Mazda O.	4. 巻 26
2. 論文標題 Significant inactivation of SARS-CoV-2 by a green tea catechin, a catechin-derivative and galloylated theaflavins in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------