

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06393

研究課題名(和文)承認済み医薬品によるコロナウイルス複製工場DMVs阻害メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of inhibition of coronavirus DMVs formation by approved drugs.

研究代表者

氏家 誠(Ujike, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50415478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：コロナウイルス(CoV)は、宿主細胞に感染すると、DMVと呼ばれるCoV専用の複製工場を形成する。我々は、これまでに、承認済み医薬品の小胞体グルコシダーゼ阻害剤(AGIs)及び一部のステロイド系抗炎症剤(SAIDs)が、DMV形成を阻害し、幅広いCoVsに対して抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。本研究では、この2種類の医薬品に見られたDMVs形成阻害機構の解明を行った。DMVはCoVの非構造タンパク質であるNSP3、NSP4、NSP6によって形成されるが、SAIDsの一部は主にNSP3またはNSP4に作用し、AGIはNSP4に作用することで、DMV形成を阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在も続く新型CoVの世界的大流行により、抗CoV薬の開発が求められている。現在開発中の抗CoV候補薬の多くは、ウイルス複製酵素やウイルス・宿主の蛋白分解酵素などを標的とし、DMVを標的とするものはほとんど開発されていない。本研究により見出された、2つの医薬品はin vitroで幅広いCoVsに高い抗ウイルス活性を示し、その効果はCoVのDMV形成阻害に起因することを明らかにした。残念ながら、このうちSAIDsは、新型CoV患者を対象とした臨床試験において、有意な治療効果を示すことができなかった。今後は、AGIsのDMV形成阻害メカニズムをさらに解析し、AGIsの臨床応用を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Coronaviruses (CoVs) infection induces double membrane vesicles (DMVs) derived from the host bilayer membrane as an CoV replication factory. Previous our studies have shown that endoplasmic reticulum -glucosidase inhibitors (AGIs) and some steroidal anti-inflammatory drugs (SAIDs) inhibit DMVs formation and that these drugs exhibit antiviral activity against a wide range of CoVs. In this study, we elucidated the mechanism of inhibition of DMVs formation observed in these two drugs. DMVs are formed by the CoV nonstructural proteins NSP3, NSP4, and NSP6, and we found that some SAIDs mainly affect NSP3 or NSP4, and AGIs affect NSP4, resulting in inhibition of DMV formation.

研究分野：獣医学

キーワード：コロナウイルス DMVs 小胞体 グルコシダーゼ阻害剤 小胞体ステロイド系抗炎症剤 ドラッグリボジシヨニング

## 1. 研究開始当初の背景

コロナウイルス (CoV) 科は、エンベロープ膜をもつ一本鎖 (+) 鎖 RNA ウィルスである。本科ウィルスは、ヒトや動物に重篤な病気を引き起こすウィルスを多く含んでおり、医学・獣医学上重要な存在となっている。特に、2020 年以降、新型 CoV (SARS-CoV2) が世界中で猛威を振るっており、治療薬の開発が求められている。CoV は、宿主細胞に感染すると、宿主由来の 2 重膜を変化させて CoV 専用の複製工場である Double Membrane Vesicles (DMVs) を形成する。DMVs は CoV の増殖に必須であるため、魅力的な薬剤ターゲットであるが、DMVs の形成を阻害する化合物は、ほとんど見つかっていない。

## 2. 研究の目的

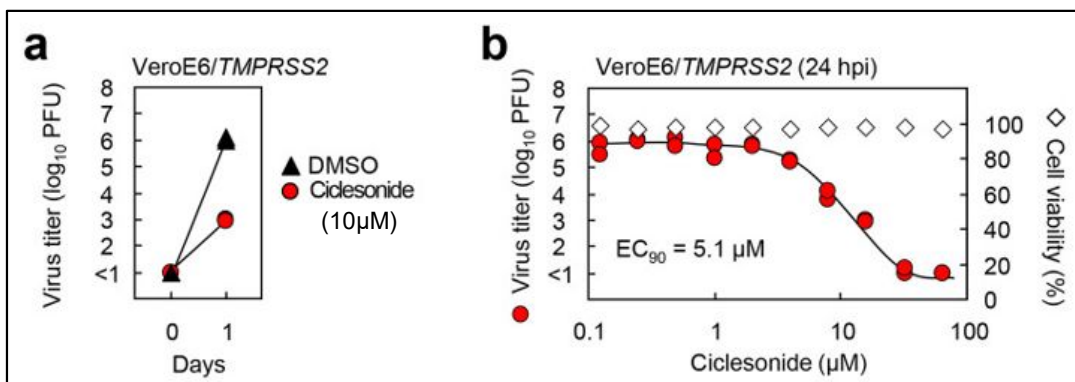
報告者らはこれまでの研究で、小胞体  $\beta$ -グルコシダーゼ阻害剤 (AGIs) 及び一部のステロイド系抗炎症剤 (SAIDs) の 2 種類の承認済み医薬品が、CoV の DMVs 形成を阻害し、幅広い CoVs に対して抗ウイルス活性を示すことを発見している。本研究の目的は、これら 2 種類の医薬品で観察される DMVs 形成阻害のメカニズムを解明するとともに、これら医薬品を CoV の治療薬に応用することであった。一方、本研究期間中に新型 CoV の世界的大流行が始まり、報告者らが見出した医薬品のうち、SAIDs のシクレソニドが、新型 CoV に対して強い抗ウイルス活性を有することが判明した。このため、シクレソニドは新型 CoV 治療薬として有望視され、日本で臨床試験が開始された。このような背景から、本研究では、特にシクレソニドによる DMVs 阻害メカニズムに焦点を当て解析を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 新型 CoV (SARS-CoV-2) に対するシクレソニドの抗ウイルス活性の評価
- (2) シクレソニド存在下における MERS-CoV 耐性ウィルスの出現とその解析
- (3) シクレソニド存在下における SARS-CoV-2 耐性ウィルスの出現とその解析

## 4. 研究成果

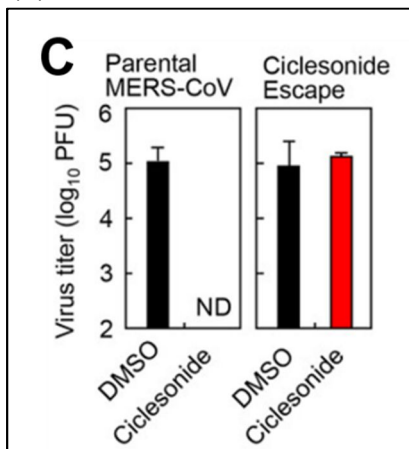
- (1) 新型 CoV (SARS-CoV-2) に対するシクレソニドの抗ウイルス活性の評価



報告者の以前の研究により、シクレソニドが MHV、HCoV-229E、MERS-CoV、SARS-CoV など様々な CoV に対して抗ウイルス活性を示すことが明らかになっている。そこで、SARS-CoV-2 に対するシクレソニドの抗ウイルス活性を評価した。シクレソニド存在下、SARS-CoV-2 を MOI=0.001 で感染させ、24 時間後にウィルス力価を測定した。その結果、VeroE6/TMPRSS2 (図 a,b) およびヒト気管支上皮 Calu-3 細胞 (データ示さず) において、濃度依存的に SARS-CoV-2 の複製が阻害され

た。

(2) シクレソニド存在下における MERS-CoV 耐性ウイルスの出現とその解析

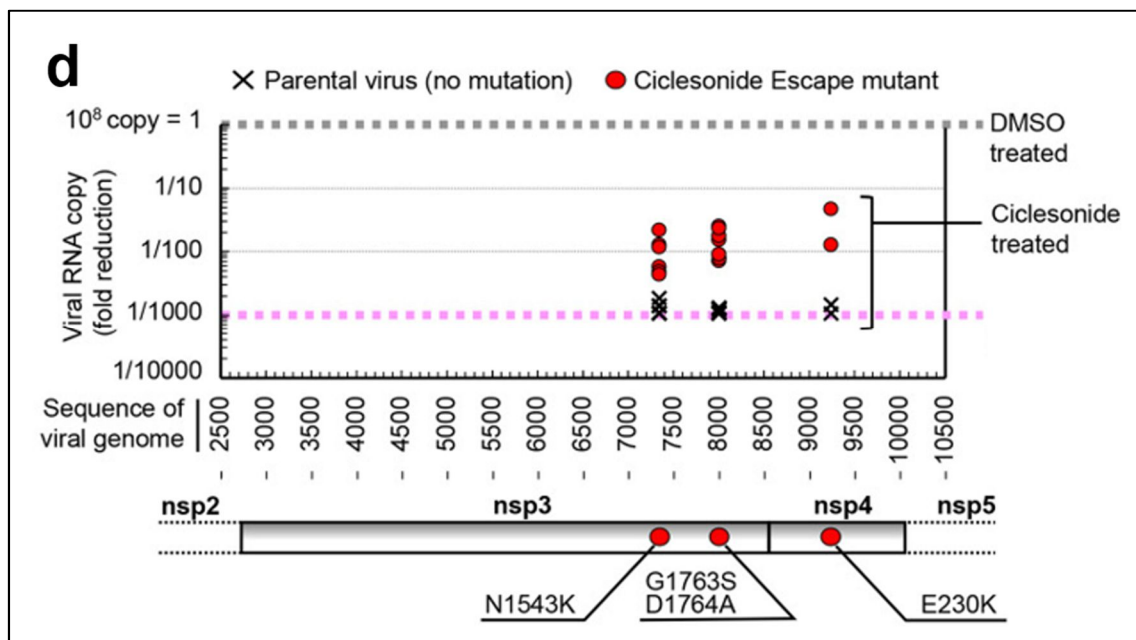


シクレソニドの抗 CoV メカニズムを解明するために、以前から解析を続けていた MERS-CoV を用いて耐性ウイルスの分離を試みた。薬剤存在下、MERS-CoV を 10 代以上盲継代し、得られた耐性ウイルスを解析した (図 c)。この耐性ウイルスは、非構造蛋白質の NSP15 の 25 番目にアミノ酸変異 (A25V) を有しており、この変異を人工的に導入した組換え MERS-CoV はシクレソニドに対して 100 倍以上の耐性を示した。このことから、シクレソニドは NSP15 に作用して抗 MERS-CoV 活性を示すことがわかった。

(3) シクレソニド存在下における SARS-CoV-2 耐性ウイルスの出現とその解析

次に、研究対象を SARS-CoV-2 に変更し、同様の実験を行った。新型 CoV 感染者から分離した 43 株の SARS-CoV-2 を用いて、シクレソニド存在下、8 代盲継代し耐性ウイルスの分離を試みた。その結果、ウイルスゲノムに単一の変異を持つ 15 株 (図 d) と複数の変異を持つ 22 株が得られた。単一の変異は、NSP3 の 3 箇所と NSP4 の 1 箇所を確認され、変異を持たない親株に比べ 6~50 倍の耐性を示した (図 d)。

NSP3 と NSP4 (さらに NSP6) は CoV の複製工場である DMVs 形成に関与することが知られている。そこで、シクレソニドが SARS-CoV-2 の DMVs 形成を阻害するか調べるために、DMVs 内部に局在する二本鎖 RNA と NSP3 の分布を特異抗体を用いて、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、シクレソニド存在下では、これらの蛍光強度は濃度依存的に低下した (データは示さず)。これらの結果から、シクレソニドは NSP3 または NSP4 に作用して DMVs 形成を阻害し、抗 SARS-CoV-2 活性を示すことが示唆された。



国内外におけるインパクト：現在開発中の抗 SARS-CoV-2 候補薬の多くは、ウイルス複製酵素やウイルス・宿主の蛋白分解酵素などを標的とし、DMVs を標的とするものはほとんど開発されていない。本研究で見つかったシクレソニドは、in vitro で SARS-CoV-2 を含む幅広い種類の CoV に対して高い抗ウイルス活性を示した。また、SARS-CoV-2 の NSP3 または NSP4 に作用して DMV の形成を阻害することで、抗 SARS-CoV-2 活性を示すことを明らかにした。しかしながら、シクレソニドは in vitro では強い抗 SARS-CoV-2 活性を示したものの、残念ながら新型 CoV 患者を対象とした臨床試験では、有意な治療効果を示すことができなかった。

今後の展望：本報告であまり言及できなかったもう 1 種類の医薬品である AGIs は、NSP4 への糖鎖付加を阻害しその合成を抑制することで、DMVs 形成が阻害されることが示されている。本研究期間中には、さらに DMVs 形成に關与する他の非構造蛋白質である NSP3 および NSP6 への影響を調べるために、これらに対する抗体の作製を試みた。抗体の作製には、合成ペプチドや NSP の抗原部位を大腸菌で発現した組換蛋白質を用いたが、詳細な解析に必要なウエスタンブロッティングで検出可能な抗体を得ることができなかった。今後は、別の方法で抗体作製を試みながら、AGIs の DMVs 形成阻害メカニズムをさらに解析し、AGIs の臨床応用を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Ujike Makoto, Etoh Yuka, Urushiyama Naoya, Taguchi Fumihiro, Asanuma Hideki, Enjuanes Luis, Kamitani Wataru	4. 巻 96
2. 論文標題 Reverse Genetics with a Full-Length Infectious cDNA Clone of Bovine Torovirus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0156121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01561-21	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 Ujike Makoto, Taguchi Fumihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent Progress in Torovirus Molecular Biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 435 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13030435	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 Tennakoon Nipuna, Ryu Jihoon, Ujike Makoto, Taguchi Fumihiro, Shin Hyun-Jin	4. 巻 14
2. 論文標題 Reduction of Cell Fusion by Deletion in the Hypervariable Region of the Spike Protein of Mouse Hepatitis Virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 398 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v14020398	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 Ujike Makoto, Kawachi Yukako, Matsunaga Yui, Etoh Yuka, Asanuma Hideki, Kamitani Wataru, Taguchi Fumihiro	4. 巻 95
2. 論文標題 Characterization of Localization and Export Signals of Bovine Torovirus Nucleocapsid Protein Responsible for Extensive Nuclear and Nucleolar Accumulation and Their Importance for Virus Growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02111-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02111-20	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 Matsuyama Shutoku, Kawase Miyuki, Nao Naganori, Shirato Kazuya, Ujike Makoto, Kamitani Wataru, Shimojima Masayuki, Fukushi Shuetsu	4. 巻 95
2. 論文標題 The Inhaled Steroid Ciclesonide Blocks SARS-CoV-2 RNA Replication by Targeting the Viral Replication-Transcription Complex in Cultured Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01648-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01648-20	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 Imai Ryo, Nagai Makoto, Oba Mami, Sakaguchi Shoichi, Ujike Makoto, Kimura Ruka, Kida Moeko, Masuda Tsuneyuki, Kuroda Moegi, Wen Rongduo, Li Kaixin, Katayama Yukie, Naoi Yuki, Tsuchiaka Shinobu, Omatu Tsutomu, Yamazato Hiroshi, Makino Shinji, Mizutani Tetsuya	4. 巻 75
2. 論文標題 A novel defective recombinant porcine enterovirus G virus carrying a porcine torovirus papain-like cysteine protease gene and a putative anti-apoptosis gene in place of viral structural protein genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 103975 ~ 103975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2019.103975	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 Shirato Kazuya, Melaku Simenew Keskes, Kawachi Kengo, Nao Naganori, Iwata-Yoshikawa Naoko, Kawase Miyuki, Kamitani Wataru, Matsuyama Shutoku, Tessema Tesfaye Sisay, Sentsui Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Dromedaries in Ethiopia Is Antigenically Different From the Middle East Isolate EMC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.01326	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 Kawase Miyuki, Kataoka Michiyo, Shirato Kazuya, Matsuyama Shutoku	4. 巻 93
2. 論文標題 Biochemical Analysis of Coronavirus Spike Glycoprotein Conformational Intermediates during Membrane Fusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00785-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00785-19	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 Matsuyama Shutoku, Nao Naganori, Shirato Kazuya, Kawase Miyuki, Saito Shinji, Takayama Ikuyo, Nagata Noriyo, Sekizuka Tsuyoshi, Katoh Hiroshi, Kato Fumihiro, Sakata Masafumi, Tahara Maino, Kutsuna Satoshi, Ohmagari Norio, Kuroda Makoto, Suzuki Tadaki, Kageyama Tsutomu, Takeda Makoto	4. 巻 117
2. 論文標題 Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7001 ~ 7003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2002589117	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, 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 Yamagishi Takuya, Ohnishi Makoto, Matsunaga Nobuaki, Kakimoto Kensaku, Kamiya Hajime, Okamoto Kiyoko, Suzuki Motoi, Gu Yoshiaki, Sakaguchi Mikiyo, Tajima Taichi, Takaya Saho, Ohmagari Norio, Takeda Makoto, Matsuyama Shuyoku, 他15名	4. 巻 222
2. 論文標題 Environmental Sampling for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 During a COVID-19 Outbreak on the Diamond Princess Cruise Ship	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1098 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiaa437	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 Tomita Yuriko, Takeda Makoto, Matsuyama Shutoku	4. 巻 65
2. 論文標題 The Anti-Influenza Virus Drug Favipiravir Has Little Effect on Replication of SARS-CoV-2 in Cultured Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e00020-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00020-21	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 Tomita Yuriko, Matsuyama Shutoku, Fukuhara Hideo, Maenaka Katsumi, Kataoka Hiroaki, Hashiguchi Takao, Takeda Makoto	4. 巻 95
2. 論文標題 The Physiological TMRSS2 Inhibitor HAI-2 Alleviates SARS-CoV-2 Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00434-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00434-21	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11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 酒井悠輔、荻原里奈、漆山尚也、江藤由佳、田口文広、神谷亘、氏家誠
2. 発表標題 組換えトロウイルスの血球凝集素 エステラーゼ(HE) 遺伝子の安定性に関する研究
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅原愛里、漆山尚也、江藤由佳、田口文広、神谷亘、氏家誠
2. 発表標題 EGFP遺伝子を保持する組換えトロウイルスの特性とその遺伝子安定性に関する研究
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 コロナウイルス総論-コロナウイルス学の基礎-
2. 発表標題 氏家誠
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 牛トロウイルスにおけるリバーシ・ジェネティクス系の確立
2. 発表標題 江藤由佳、漆山尚也、田口文広、Luis Enjuanes、神谷亘、氏家誠
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 氏家誠、鈴木友美、田口文広、
2. 発表標題 牛トロウイルスのメンブレン蛋白質の細胞内蓄積に関する研究
3. 学会等名 162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木暮茉希、江藤由佳、イスラム・タイムール、田口文広、氏家誠
2. 発表標題 牛トロウイルスのHemagglutinin Esterase (HE) 遺伝子の安定性に関する研究
3. 学会等名 162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村留華、木田萌子、岩田修二、松永惟、田口文広、氏家誠
2. 発表標題 牛トロウイルスNucleocapsid(N)蛋白質のCRM1非依存的Nuclear export signal (NES)に関する研究
3. 学会等名 162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江藤由佳、漆山尚也、田口文広、神谷亘、氏家誠
2. 発表標題 牛トロウイルスにおけるReverse Genetics系の確立
3. 学会等名 第4回獣医微生物学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松山州徳
2. 発表標題 コロナウイルス膜融合蛋白の構造変化中間体の検出
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白戸憲也、Simenew Keskes Melaku、河内健吾、直亨則、岩田奈織子、川瀬みゆき、神谷亘、松山州徳、Tesfaye Sisay Tessema、泉對博
2. 発表標題 エチオピアのヒトコブラクダから分離された中東呼吸器症候群コロナウイルスの病原性は中東分離株であるEMC株と異なる
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Shirato, Naganori Nao, Shutoku Matsuyama, Tsutomu Kageyama.
2. 発表標題 An ultra-rapid real-time RT-PCR for the detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using mobile PCR device, PCR1100
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

〔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
研究 分担者	袴田 航  (Hakamata Wataru)  (10333337)	日本大学・生物資源科学部・教授   (32665)	
研究 分担者	松山 州徳  (Matsuyama Shutoku)  (90373399)	国立感染症研究所・ウイルス第三部・室長   (82603)	

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
---------	---------