

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08962

研究課題名（和文）シクロスポリン誘導体を基盤とした新規インフルエンザウイルス増殖関連因子の解明

研究課題名（英文）Investigation of the host factors associated with influenza virus replication based on the cyclosporine derivatives

研究代表者

山本 典生 (Yamamoto, Norio)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：40323703

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）：我々は、従来薬とは異なる作用点を持った抗ウイルス薬候補としてシクロスポリン（CsA）とその誘導体を同定した。siRNAを用いた実験により、既知のCsA標的分子はウイルス増殖過程に関与していないことが明らかとなったため、CsA固定化ビーズを用いたプルダウン法によってCsA結合タンパク質を精製・解析した。その結果、複数のCsA結合タンパク質を同定した。同定した遺伝子をノックアウトした細胞を用いた解析により、ウイルス増殖に関連する宿主因子の候補を絞り込むことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、新たな機序による抗インフルエンザウイルス薬の出発点としてCsAが同定された。また、ウイルスの増殖に関与する新たな細胞側の因子の候補を同定することができた。本研究の成果は、薬剤耐性ウイルスに対応可能な新しい抗インフルエンザウイルス薬の開発につながる可能性があり、大きな社会的意義がある。また、新たな宿主因子の発見からウイルスタンパク質や細胞側タンパク質の新たな機能が明らかになることが期待され、学術的にも大きな意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：We identified cyclosporin A (CsA) and its derivatives as the candidates of the anti-influenza virus drugs with novel molecular targets. The infection experiments using siRNAs revealed that the known molecular targets of CsA were not involved in the viral replication process. Therefore, we purified and analyzed CsA-binding proteins by the chemical pull-down method using CsA-immobilized beads. As a result, some CsA-binding proteins were identified by MS analysis. Analysis using cells in which the identified genes were knocked out allowed us to narrow down candidate host factors associated with viral propagation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス シクロスポリン

1. 研究開始当初の背景

我々が警戒しなければならない感染症の1つとして、インフルエンザがある。季節性インフルエンザは毎年世界的な流行を起こしている。さらに、高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスや鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス等のヒトへの感染が報告されており、これらから新型インフルエンザウイルスが出現することが危惧されている。インフルエンザウイルスは変異しやすく、薬剤耐性ウイルスが容易に出現するという問題があるため、新たな機序によるウイルス増殖阻害剤の開発が求められている。

2. 研究の目的

上記のような状況の中で我々は、従来薬とは異なる作用点を持った抗ウイルス薬候補の同定を目的として、化合物セットのスクリーニングを行ったところ、シクロスポリン (CsA) がヒットした。

RNAi による予備実験を行なったところ、既知の CsA 結合タンパク質はいずれも、ウイルス増殖抑制には関与していないことが明らかとなった。この結果から、未知の CsA 結合タンパク質がウイルス増殖抑制機構に関与している可能性が考えられた。

そこで本研究では、CsA によるインフルエンザウイルス増殖抑制機構の解明するため、「未知の CsA 結合タンパク質がウイルス増殖抑制機構に関与している」との仮説の検証を目的として研究を行なった。

また同時に、標的が宿主因子であるため薬剤耐性が生じにくく、従来薬剤への耐性ウイルスにも対応可能な、新たな抗ウイルス薬の開発を目指して研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) CsA の分子標的として、カルシニューリン、シクロフィリン A、シクロフィリン B、P グリコプロテインが報告されている。そこで、カルシニューリンの阻害がウイルス増殖阻害に関連するかを確認するため、CsA とは別のカルシニューリン阻害剤である FK506 の抗インフルエンザウイルス活性について、細胞感染実験系 (A549 細胞と A/PuertoRico/8/1934 (PR8) ウイルス) により調べた。ウイルスを薬剤存在下 (10 μ M) で感染させ、24 時間後に培養上清を回収し、そこから RNA を抽出した。続いて、定量 RT-PCR 法によってウイルス RNA 量を測定した。

また、シクロフィリン A、シクロフィリン B、P グリコプロテインのウイルス増殖過程への関与を再度確認するため、siRNA によりこれらをノックダウンした細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、コントロール細胞と増殖効率を比較した。

(2) CsA にビーズ結合のための官能基を導入した誘導体を新たに合成し、適切な CsA 誘導体を選択してビーズの表面に結合させ、「CsA 固定化ビーズ」を作製した。続いて CsA 固定化ビーズと細胞タンパク質抽出液を混合し、CsA 固定化ビーズに結合する細胞タンパク質 (CsA 結合タンパク質) を精製した。CsA 結合タンパク質液を SDS-PAGE により分離し、染色後に得られたバンドを質量分析装置で解析した。

質量分析実験の結果が正しいことを確認するため、同定されたタンパク質に対する抗体を用いて、コントロールビーズ抽出液と CsA 固定化ビーズ抽出液に対してウエスタンブロット解析を行った。また、再現性を確認するために繰り返し実験を行なった。

(3) ゲノム編集法により、同定されたタンパク質を発現しないノックアウト細胞を作製した。ノックアウト細胞とコントロール細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス増殖量を比較した。また、ノックアウト細胞に遺伝子を再導入して発現を戻し、ノックアウト細胞とウイルス増殖量を比較した。

4. 研究成果

(1) CsA とは別のカルシニューリン阻害剤である FK506 を用いて、カルシニューリン・NF-AT 経路の阻害が PR8 ウイルスの増殖阻害に関連するかを検証した。その結果、FK506 は、PR8 ウイルスの増殖を抑制しなかった (Fig. 1)。このことから、CsA によるインフルエンザウイルスの増殖抑制活性は、CsA の持つカルシニューリン阻害活性とは無関係であることが考えられた。

また、シクロフィリン A、シクロフィリン B、P グリコプロテインに対する siRNA を用いて

これらのノックダウン細胞を作成し、PR8 ウイルスの増殖を解析したところ、コントロール細胞に対してウイルス増殖効率の低下は認められなかった (Fig. 2)。このことから、シクロフィリン A、シクロフィリン B、P グリコプロテインは、PR8 ウイルスの増殖過程において、必須の役割を果たしているわけではないことが明らかとなった。

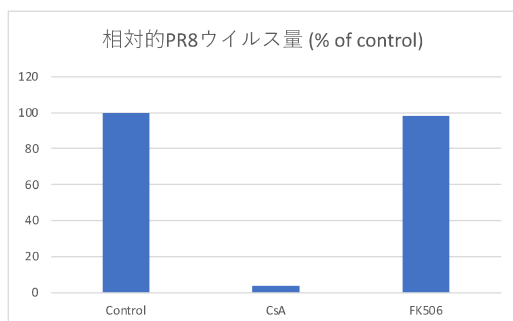


Fig. 1 CsA と FK506 のインフルエンザウイルス増殖抑制効果の比較

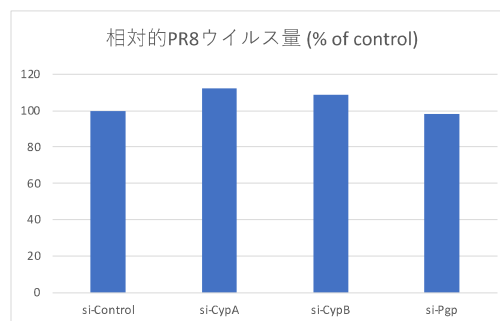


Fig. 2 シクロフィリン A(CypA)、シクロフィリン B(CypB)、P グリコプロテイン(Pgp)のノックダウンがインフルエンザウイルスの増殖に与える影響

(2) 質量分析実験の結果により推定された CsA 結合タンパク質について、同定されたタンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行なった。いくつかのタンパク質について、CsA 固定化ビーズ抽出液においてのみバンドが検出された (Fig. 3)。これらについては、新たな CsA 結合タンパク質であると考えられた。

- ① : コントロールビーズ
- ② : CsAビーズ

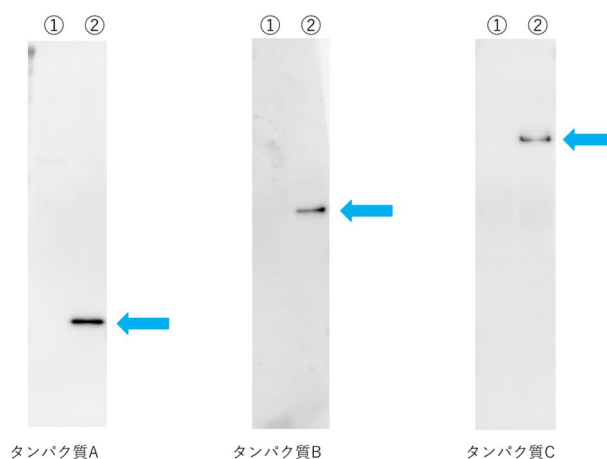


Fig. 3 CsA 固定化ビーズ抽出物とコントロールビーズ抽出物のウエスタンブロット解析

それぞれタンパク質 A、タンパク質 B、タンパク質 C に対する抗体を用いて実験を行なった。コントロールビーズと CsA 固定化ビーズにおいて、いずれも のみでバンドが見られた。

(3) ウエスタンブロットで確認された CsA 結合タンパク質について、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集法によりノックアウト細胞を作成した。遺伝子ノックアウトがウイルスの増殖効率に与える影響について検討を行ったところ、ウイルス増殖がコントロール細胞より低下する遺伝子を見出すことができた (Fig. 4)。一方、遺伝子ノックアウトによってウイルス増殖がコントロール細胞より高まるものも存在した。ノックアウトした遺伝子を導入し直し、発現レベルを戻す実験を行ったところ、ウイルス増殖効率が遺伝子の再発現により元に戻る傾向を示したものとそうでないものが存在した。現段階では、これらの宿主因子が CsA の真の標的であるかの結論はまだ出ていないため、再現性を確認するとともに、検討する遺伝子の範囲を広げる予定である。

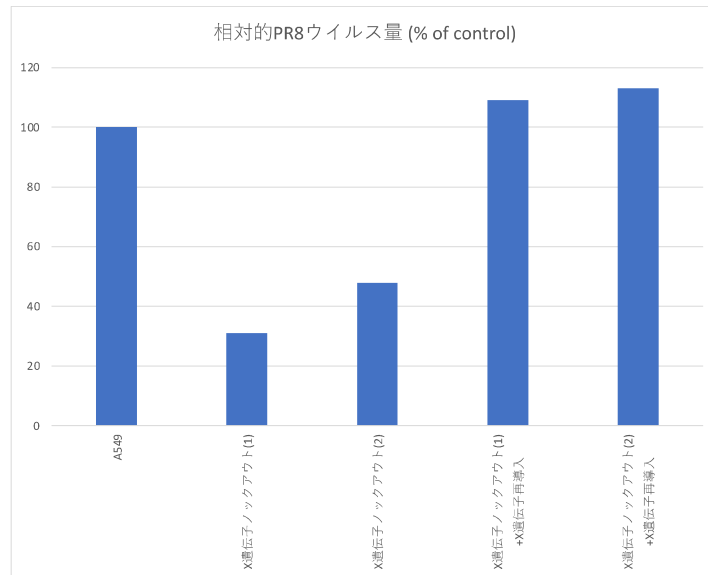


Fig. 4 CsA 結合タンパク質の遺伝子 (X 遺伝子) をノックアウトした細胞、およびノックアウト後に遺伝子再導入を行なった細胞における、インフルエンザウイルスの増殖

ゲノム改変をおこなっていない A549 細胞でのウイルス量を基準として、構築した細胞における相対ウイルス量を qRT-PCR により求めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Miwa Kazunori, Guo Yan, Hata Masayuki, Yamamoto Norio, Hoshino Tyuji	4. 巻 71
2. 論文標題 Computational Screening of Inhibitory Compounds for SARS-Cov-2 3CL Protease with a Database Consisting of Approved and Investigational Chemicals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 360 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c23-00035	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 Hosaka Yoshie, Yan Yan, Naito Toshio, Oyama Rieko, Tsuchiya Koji, Yamamoto Norio, Nojiri Shuko, Horii Satoshi, Takahashi Kazuhiko, Tabe Yoko	4. 巻 14
2. 論文標題 SARS-CoV-2 evolution among patients with immunosuppression in a nosocomial cluster of a Japanese medical center during the Delta (AY.29 sublineage) surge	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.944369	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 Takiguchi Shinya, Tomita Yusuke, Uehara Saeko, Tateishi Koichiro, Yamamoto Norio, Nakamura Michio	4. 巻 9
2. 論文標題 Immunological imprint on peripheral blood in kidney transplant recipients after two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccination in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.999374	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 Tsuchiya Koji, Yamamoto Norio, Hosaka Yoshie, Wakita Mitsuru, Hiki Makoto, Matsushita Yasushi, Mori Hirotake, Horii Satoshi, Misawa Shigeki, Miida Takashi, Nojiri Shuko, Takahashi Kazuhisa, Naito Toshio, Tabe Yoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular characterization of SARS-CoV-2 detected in Tokyo, Japan during five waves: Identification of the amino acid substitutions associated with transmissibility and severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.912061	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 Hamamoto Itsuki, Takahashi Hitoshi, Shimasaki Noriko, Nakamura Kazuya, Mizuta Katsumi, Sato Ko, Nishimura Hidekazu, Yamamoto Norio, Hasegawa Hideki, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Nobusawa Eri	4. 巻 66
2. 論文標題 Suitability of NIID MDCK cells as a substrate for cell based influenza vaccine development from the perspective of adventitious virus susceptibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 361 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12985	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 Herlah Barbara, Hoivik Andrej, Jamsek Luka, Valjavec Katja, Yamamoto Norio, Hoshino Tyuji, Kranjc Krištof, Perdih Andrej	4. 巻 15
2. 論文標題 Design, Synthesis and Evaluation of Fused Bicyclo[2.2.2]octene as a Potential Core Scaffold for the Non-Covalent Inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro Main Protease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 539 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph15050539	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 Eto Akiko, Yamamoto Norio, Kanatani Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Serial Passage on the Pathogenicity and Immunogenicity of Vaccinia Virus LC16m8 Strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1158 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10111158	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 Singh M, Matsuo M, Sasaki T, Hishinuma T, Yamamoto N, Morimoto Y, Kirikae T, Hiramatsu K	4. 巻 64
2. 論文標題 RNA Sequencing Identifies a Common Physiology in Vancomycin- and Ciprofloxacin-Tolerant Staphylococcus aureus Induced by ileS Mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	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) 10.1128/AAC.00827-20	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 該当する

1. 著者名 Yamauchi Y, Uehara Y, Boutin S, Yamamoto N, Kuwahara-Arai K, Kirikae T, Hiramatsu K, Zimmermann S	4. 巻 66
2. 論文標題 Detection of Arcobacter Species in Human Stool Samples by Culture and Real-time PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 431-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.2020.66.JMJ19-OA05	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 Yamamoto N, Matsuyama S, Hoshino T, and Yamamoto N	4. 巻 1
2. 論文標題 Nelfinavir inhibits replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.04.06.026476	査読の有無 無
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 Harada Yuichi, Takahashi Hitoshi, Trusheim Heidi, Roth Bernhard, Mizuta Katsumi, Hirata Saito Asumi, Ogane Teruko, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Yamamoto Norio	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC MK2 cells for selective isolation of influenza viruses to be used as vaccine seeds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Influenza and Other Respiratory Viruses	6. 最初と最後の頁 204 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/irv.12694	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 Nakamura Kazuya, Harada Yuichi, Takahashi Hitoshi, Trusheim Heidi, Bernhard Roth, Hamamoto Itsuki, Hirata-Saito Asumi, Ogane Teruko, Mizuta Katsumi, Konomi Nami, Konomi Yasushi, Asanuma Hideki, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Yamamoto Norio	4. 巻 37
2. 論文標題 Systematic evaluation of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for preparing influenza vaccine seed virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6526 ~ 6534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2019.08.064	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 Tateishi Koichiro, Fujihashi Kohtaro, Yamamoto Norio, Hasegawa Hideki, Ainai Akira, Sato Kayoko, Iho Sumiko, Yamamoto Saburo, Maeyama Jun-ichi, Odagiri Takato, Asanuma Hideki	4. 巻 37
2. 論文標題 CpG ODN G9.1 as a novel nasal ODN adjuvant elicits complete protection from influenza virus infection without causing inflammatory immune responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5382 ~ 5389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2019.07.032	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本典生
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症の予防・治療について
3. 学会等名 第 29 回日本臨床環境医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 御子神拓樹、臼井麻琴、阿部史弥、渡辺マコ、築地 信、山本典生、東 伸昭
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染における細胞表層ヘパラン硫酸の関与
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 韓賢東、国崎信江、山本典生	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝日新聞出版	5. 総ページ数 160
3. 書名 防災のサバイバル クイズでわかる生き残り大作戦!	

〔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
---------	---------