

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590724

研究課題名（和文）微小管構造の C 型肝炎ウイルス増殖における役割とその抗 HCV 薬ターゲットの可能性

研究課題名（英文）The role of microtubules structure in hepatitis C virus replication and the possibility of its target molecule for anti-HCV agent

研究代表者

山下 篤哉（YAMASHITA ATSUYA）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：00334871

研究成果の概要（和文）：我々は、これまでに、抗真菌剤 Griseofulvin が C 型肝炎ウイルス（HCV）増殖抑制効果を有することを見出した。そこで、その研究成果を新規抗 HCV 剤開発に繋げるため、本研究では、Griseofulvin の抗 HCV 剤のための構造最適化および HCV 増殖抑制機序の解明の検討を行った。その結果、抑制効果の高い 2 種の Griseofulvin 誘導体を見出すことが出来た。しかし、HCV 増殖抑制の機序解明には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We previously found that the antifungal agent, Griseofulvin, has a suppressive effect on HCV replication. On the basis of this result, we optimized the structure of Griseofulvin for searching a new candidate compound of an anti-HCV agent among Griseofulvin analogues, and analyzed molecular mode of action of Griseofulvin against HCV replication. Consequently, we found two Griseofulvin analogues were more effective in suppressing HCV replication than Griseofulvin. However, we were unable to clarify molecular mode of action of Griseofulvin against HCV replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus: HCV）の感染者は、世界で約 2 億人、日本国内で約 200 万人存在する。近年の interferon 治療の進歩により HCV 完全駆除が可能となってきたが、依然として約半数の感染者については、

ウイルス駆除は不可能であり、新たな抗 HCV 薬の開発が急務となっている。このような難治性 C 型肝炎に対して、HCV 構成タンパクである NS3 protease や NS5B RNA polymerase 等の機能を阻害する薬剤の開発が、世界の大手製薬メーカーを中心に行われている。しか

し、臨床治験中の薬剤では既に薬剤耐性ウイルスの報告もあり、今後も更なる新薬開発は必要である。このような背景の下、研究代表者は抗 HCV 薬剤の効率的なスクリーニングシステムのひとつである HCV サブゲノムレプリコンシステムを用い、様々な化合物について抗 HCV 抑制効果を有するかについて検討を行った。その結果、抗真菌剤 Griseofulvin (Hepatol Res. 2008 Vol.38, p909-18) および抗癌剤 Taxol/Paclitaxel が C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖抑制効果を有することを見出した。

2. 研究の目的

研究代表者は、抗真菌剤 Griseofulvin および抗癌剤 Taxol/Paclitaxel に共通する抗 HCV 効果の作用機序は、細胞内に存在する微小管の構造変化であると推定し、以下のような目的で研究を行った。

・ Griseofulvin やその誘導体、あるいは、Taxol/Paclitaxel をバイオブローブとして用い、細胞内の微小管の構造が HCV のウイルス増殖にどのような役割を果たすかを、ケミカルバイオロジー的なアプローチで解明する。

3. 研究の方法

(1) 化合物

Griseofulvin 誘導体は、Mads Clausen 博士 (デンマーク国 Technical University of Denmark) から供与された。

(2) 細胞

化合物の評価は、HCV 遺伝子型 1b のサブゲノムレプリコン細胞 Huh7 Rep Feo 細胞を用いた。

(3) 化合物の抗 HCV 効果

抗 HCV 効果は、検討サンプルをレプリコン細胞の培養液中に添加後、72 時間培養しルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。

(4) 化合物の細胞毒性試験

細胞毒性試験は、検討サンプルをレプリコン細胞の培養液中に添加し、72 時間後に Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega 社) を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) Griseofulvin 誘導体の抗 HCV 活性の検討

まず、既に合成済みの Griseofulvin 誘導体 14 種について、HCV サブゲノムレプリコン細胞を用いて抗 HCV 活性の評価を行った。その結果、3 種の化合物で Griseofulvin と同程度の抗 HCV 活性が見られた。

抗 HCV 活性が見られた 3 種の Griseofulvin

誘導体には、共通な化学構造が見られた。そこで、この化学構造を基に、更に、新規の Griseofulvin 誘導体 11 種を合成し、それら化合物の抗 HCV 活性の評価を行った。その結果、基になった 3 種の Griseofulvin 誘導体より抗 HCV 活性が強い誘導体 2 種を見出した。更に、興味深いことに高い抑制活性が見られた誘導体の一部の官能基の位置を変えるだけで、極端な抗 HCV 活性の減弱が見られた。

現在、この結果を下に、更に Griseofulvin 誘導体の構造最適化を行っている。

(2) Griseofulvin の抗 HCV 活性に関する標的タンパクの同定

Griseofulvin の抗 HCV 活性に関するタンパクを同定するための Griseofulvin 結合アフィニティービーズを作製するため、まず、ビーズに結合させるためのリンカー配列の検討を行った。具体的には、幾つか異なったリンカーを結合させた Griseofulvin を作製し、それら化合物の抗 HCV 活性について、HCV サブゲノムレプリコン細胞を用いて評価した。抑制活性に影響しないものがアフィニティービーズ精製に最適なリンカーとなるが、これまで合成したリンカーを有する Griseofulvin のいずれもが、リンカーを付けることにより、抗 HCV 活性が Griseofulvin に比べ著しく低下した。従って、これまでのところ、アフィニティービーズに抗 HCV 活性を有するまま Griseofulvin を結合させる最適なリンカーを見出すことが出来ていない。そのため、現在、リンカーの種類、挿入部位について引き続き検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Furuta A, Yamashita A, et al. Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase.

J Enzyme Inhib Med Chem. 査読有, 2013 in press.

② Salam KA, Yamashita A, et al. Psammalin A inhibits hepatitis C virus NS3 helicase.

J Nat Med. 査読有, 2013 in press.

③ Komase K, Yamashita A, Enomoto N, et al. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.

Hepatol Res. 査読有, 2013 in press.

④ Shindo H, Yamashita A, Enomoto N, et al. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit Shindo H HCV replication. J Viral Hepat. 査読有, 2013 Vol. 20, No. 4, 281-9. 10.1111/j.1365-2893.2012.01649.x

⑤ Ogawa Y, Yamashita A, et al. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. Cell Host Microbe. 査読有, 2013 Vol. 13, No. 1, 77-86. 10.1016/j.chom.2012.12.002

⑥ Fujimoto Y, Yamashita A, Enomoto N, et al. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge Amphimedon sp. PLoS One. 査読有, 2012 Vol. 7 e48685. 10.1371/journal.pone.0048685.

⑦ Yamashita A, Enomoto N, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. Mar Drugs. 査読有, 2012 Vol. 10, No. 4, 744-61. 10.3390/md10040744.

⑧ Salam KA, Yamashita A, et al. Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by manoalide. J Nat Prod. 2012 Vol. 75, No. 4, 650-4. 10.1021/np200883s.

⑨ Takaya D, Yamashita A, Enomoto N, et al. A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. Bioorg Med Chem. 査読有, 2011 Vol. 19, No. 22, 6892-905. 10.1016/j.bmc.2011.09.023.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 葛西 宏威
HCV 複製増殖に関わる新規宿主因子 FKBP6:FKBP6 は NS5A と結合し HCV 複製を制御する
第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 13 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市)
- ② 後藤 才郎

メキシコ先住民における HBV 感染および遺伝子型の分析 (第 2 報)
第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 12 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市)

③ 山下 篤哉
Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討
第 60 回日本ウイルス学会 2012 年 11 月 14 日 グランキューブ大阪 (大阪市)

④ 藤本 雄介
海綿動物 Amphimedon sp. 抽出画分による HCV NS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析
第 60 回日本ウイルス学会 2012 年 11 月 14 日 グランキューブ大阪 (大阪市)

⑤ 葛西 宏威
新規宿主因子 FKBP6 による HCV 複製制御機構の解析
第 60 回日本ウイルス学会 2012 年 11 月 13 日 グランキューブ大阪 (大阪市)

⑥ 古田 篤史
海洋生物抽出物より取得した複数種の硫酸化合物による C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 阻害作用
第 64 回日本生物工学会大会 2012 年 10 月 25 日 神戸国際会議場 (神戸市)

⑦ Atsuya Yamashita
Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*.
25th International Conference on Antiviral Research 16 April 2012 Royton Sapporo (Sapporo, Japan)

⑧ 照沼 修
メキシコ先住民における HBV 感染および遺伝子型の分析
第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

⑨ Kunihiro Kawakami
Regulation of HCV replication by FKBP8-dependent or -independent Hsp90 activity.
第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

⑩ 古田 篤史
海洋生物抽出物より取得した cholesterol sulfate による C 型肝炎ウイルス NS3

helicase 阻害作用
第 63 回日本生物工学会大会 2011 年 9 月 27
日 東京農工大 (東京都)

⑪ Atsuya Yamashita

Marine natural products as a source of the novel antiviral agent targeting to HCV NS3 helicase.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 15 September 2011 Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)

⑫ Yuusuke Fujimoto

Inhibitory effect of marine natural products on the replication of hepatitis C virus.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress 15 September 2011 Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)

⑬ 古田 篤史

海洋生物抽出物より取得した cholesterol sulfate による C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 阻害作用

第 63 回日本生物工学会大会 2011 年 9 月 27 日 東京農工大 (東京都)

⑭ 山下 篤哉

In silico 分子設計手法による HCV NS3 protease 活性阻害化合物の創製

第 21 回抗ウイルス療法研究会 2011 年 5 月 29 日 金沢市文化ホール (金沢市)

⑮ 山下 篤哉

海洋生物をライブラリーソースとした HCV NS3 Helicase 活性阻害化合物の検索

第 21 回抗ウイルス療法研究会 2011 年 5 月 29 日 金沢市文化ホール (金沢市)

[その他]

ホームページ等

山梨大学研究者総覧

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar/0/E88A6696C4043E75.html

山梨大学大学院・医学工学総合研究部・医学学域・微生物学講座

http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/microbio/Microbiology_Yamanashi_Uni_Japanese/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 篤哉 (YAMASHITA ATSUYA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号 : 00334871

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

榎本 信幸 (ENOMOTO NOBUYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号 : 20251530