

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591492

研究課題名(和文) サイトメガロウイルス感染症に対する新規抗ウイルス剤の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of new anti-virus drug against human cytomegalovirus infectious diseases

研究代表者

村山 次哉 (Murayama, Tsugiya)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：60159184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにクマザサ等のイネ科植物に多く含まれる物質トリシンが、強い抗ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)活性を示す事を明らかにしてきた。ここではこの分子機構について検討し、宿主因子のケモカインCXCL11やCCL2が、HCMVの感染・増殖に関与していることを見出した。さらにこれら分子の発現が、トリシンにより抑制され、抗HCMV効果と相関性を示すことから、トリシンの抗HCMV効果はこれらのケモカインに依存していることを初めて明らかにした。この事から、CXCL11やCCL2はトリシンの新たな標的の1つになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that treatment with tricin (4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone), a material in the rice family plants, after human cytomegalovirus (HCMV) infection significantly suppressed infectious virus production in the human embryonic fibroblast cell line (HEL). In this paper, we examined the mechanisms for the anti-HCMV activities of tricin in HEL cells. Exposure of fibroblasts to tricin inhibited infectious HCMV production, with concomitant decreases in levels of transcripts of the CXC chemokine (CXCL11) and CC chemokine (CCL2) genes. We also found that the transcripts of the HCMV immediate early (IE) gene and replication of HCMV were lower in CXCL11 and/or CCL2 gene-knockdown cells. These results suggest that tricin is a novel compound with potential anti-HCMV activity and that CXCL11 and/or CCL2 are one of the chemokines involved in HCMV replication. In addition, it is possible that CXCL11 and/or CCL2 are one of the targets of tricin.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス トリシン 抗ウイルス薬 ケモカイン STAT3

1. 研究開始当初の背景

(1) ヘルペスウイルスβ亜科に属するヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus: HCMV) は、7-8割の人が幼少期に感染するが通常は不顕性感染として経過し、生涯を通じて身体に潜伏し続ける。しかし臓器移植患者や AIDS 患者などのような免疫能抑制下では、潜伏 HCMV が再燃し間質性肺炎、網膜炎、脳炎、大腸炎などの重篤な日和見感染症を引き起こし、拒絶反応、ひいては失明や死亡の原因となることから、医療の大きな障害となっている。このような HCMV 日和見感染症に対する治療薬として、現在わが国ではガンシクロビル (GCV) とホスカルネット (PFA) の使用が認可されている。しかしながら、既にこれら治療薬に対する耐性ウイルスが出現しており、作用点の異なる新規治療薬の出現が切望されている。そこで我々は、種々の生薬や漢方薬中の成分による抗 HCMV 薬の探索を行ってきた。その中で特にクマザサ中の成分のひとつであるトリシン(4', 5, 7-trihydroxy- 3', 5'-dimethoxyflavone)が濃度に依存して強い抗 HCMV 活性を持つ事、さらにその作用点は、GCV や PFA とは異なり HCMV の複製初期の転写調節を司る前初期(immediate early: IE)遺伝子の抑制である事を明らかにしてきた (①)。毒性に関しては、*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験から遺伝子突然変異誘発性を示さないこと。マウスを用いた急性毒性試験では、2000 mg/kg の投与でも体重減少や死亡例は認められないことを明らかにしてきた (②)。またトリシンは、抗炎症作用や免疫調節機構といった副次的効果も報告されており、様々な分野への応用が期待されている。

(2) フラボン誘導体であるトリシンは、クマザサのみならず米、大麦、トウモロコシな

どのイネ科植物に多く含まれており、抗炎症、抗腫瘍、抗酸化作用などがある事が報告されている。さらに、HCMV の他にも B 型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス等の複製を抑制するという報告もある (②, ③)。したがって、抗 HCMV 効果を持つトリシンの分子基盤の解明は、感染症治療学の分野でも非常に期待されている分野であると考えられる。

(3) 我々はこれまでに、クマザサの熱水抽出物 (TWEBS) および TWEBS から精製したトリシンが HCMV に対して、GCV と同様に濃度に依存して抗ウイルス効果を示す事

(①) および宿主細胞機能の調節作用を持つことを明らかにし、トリシンは宿主応答の調節作用と抗ウイルス効果の両面を有することが判明した。しかし、なぜトリシンがそのような効果を発揮するのか不明であり、その作用機序を分子レベルで解明したいとの着想から本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

潜伏感染している HCMV は、臓器移植や AIDS などの免疫能抑制下では再燃し種々の重篤な日和見感染症を引き起こし、医療の大きな障害となっている。治療薬として、主に GCV が使用されているが、既に耐性ウイルスが出現し、作用点の異なる新規治療薬の出現が切望されている。そこで我々は、新規に得たトリシンの抗 HCMV 活性の分子機構基盤を解明するために、宿主細胞由来および HCMV 由来の二方向からの遺伝子/転写産物解析・マイクロ RNA 解析・翻訳産物(発現タンパク質)解析の実施によって、HCMV 感染に特異的なトリシン作用に関わる分子を明らかにする。さらに、HCMV 感染の危険因子となる宿主因子を明確にして、トリシンの臨床応用への効果的な介入の至適条件を設定する。

3. 研究の方法

(1) HCMV感染細胞に対するトリシン作用に関連する遺伝子・転写産物を網羅的に解析して、その候補分子とトリシン作用との関連性を検証する。

【共培養】ヒト胎児肺線維芽細胞 (HEL) と HCMV (Towne 株) + トリシン濃度 (0.1-1.0-10 μM) との共培養を行い、経時的 (感染後 4-8-24-48-72 時間) に細胞 RNA を抽出し、cDNA 合成を行う。【候補遺伝子の選定】ヒトおよび HCMV 遺伝子を搭載した DNA チップを用いて、感染初期から後期における宿主細胞由来およびウイルス由来の遺伝子の発現変動を網羅的に解析し、宿主およびウイルス別に抽出してクラスター分析を細胞毎に行う。対照と比較して 10 倍以上に発現上昇や低下した遺伝子を選定し、RT-PCR 法にて選定遺伝子を定量する。【候補遺伝子機能の検証】発現上昇および低下した宿主細胞由来遺伝子の抑制目的で、アンチセンス法や siRNA にて事前処理した細胞を用いてトリシン作用が低下するか確認と検証を行う。

(2) (1) の結果より、HCMV 感染に対するトリシン作用に関わる分子として、ケモカインが候補の 1 つであることことを明らかにしたので、HCMV 感染細胞に対するトリシン作用に関連して発現するケモカインのタンパク質を解析して、その分子とトリシン作用との関連性を検証する。

【細胞刺激と薬物介入】HEL 細胞へ HCMV 感染後、トリシンを濃度 (0.1-1.0-10 μM) で細胞へ曝露 (24-48-72 時間) させる。トリシン作用として細胞変性効果や表面抗原の発現性および細胞内発現タンパク質を確認する。

【タンパク質の解析】(1) の実験で明らかになった候補遺伝子産物を参考にして、各段階での培養細胞懸濁液を用いてウェスタンブロット解析を行い、トリシン作用に関わる発現タンパク質を明らかにする。【候補タン

パク質機能の検証】候補となったケモカインタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制するために、アンチセンス法や siRNA にて事前処理した細胞を利用して、ウェスタンブロット法によりトリシン効果が低下するか検証する。

(3) HCMV 感染細胞に対するトリシン作用に関連するケモカインの細胞内シグナル伝達分子を網羅的に解析して、その候補分子とトリシン作用との関連性を再現する。

【共培養】(1) と同様に HEL と HCMV + トリシンとの共培養を実施し、経時的に細胞懸濁液および RNA を調整する。【候補シグナル伝達分子の選定】ケモカインの細胞内シグナル伝達分子として知られている JAK/STAT 経路に関連する分子に対して、経時的にこれらの分子の発現変動をウェスタンブロット法により網羅的に解析する。発現が上昇あるいは低下した分子を選び、RT-PCR 法にて選定分子の遺伝子発現量を定量する。【候補分子機能の検証】宿主細胞由来の候補ケモカインシグナル伝達分子の siRNA あるいはアンタゴニストを導入した細胞に対して、HCMV 感染およびトリシンを作用させた時のケモカイン発現能および抗 HCMV 効果の減弱を検証する。

4. 研究成果

(1) DNA チップによる網羅的な解析: HEL と HCMV + トリシンとの共培養後、経時的に RNA を抽出し、cDNA を合成し材料とした。DNA チップを用いて、宿主およびウイルス由来遺伝子の発現変動を網羅的に解析し、各細胞毎にクラスター分析を行い、候補遺伝子を選定した。これらの候補遺伝子を RT-PCR 法にて定量した結果、興味あるいくつかのケモカイン遺伝子が有意な変動を示す事が確認され、その中から特に CXC ケモカインの CXCL11、および CC ケモカインの CCL2 を選定し、次の解析を行った。

(2) HCMV感染に対するトリシン作用に関わるケモカイン分子について： HCMV 感染細胞中のCXCL11およびCCL2 mRNA の発現は、トリシン 処理により感染後時間依存的におよび 0.1 ~ 10 μ M の範囲で濃度依存的に抑制された。この傾向は、マイクロアレイでの結果と同様であった。HCMV 感染細胞中のケモカインタンパク質発現は、ウイルス感染価に依存して増加しMOI=1 で最大となり、また感染後の時間にも依存し、CXCL11では感染 48 時間後でピークとなり 72 時間後には減少し、CCL2では感染 72 時間後にピークとなることが示された。これらの、タンパク質発現の増強も、トリシン処理により有意に抑制された。

(3) CXCL11またはCCL2 siRNA導入細胞での遺伝子発現およびHCMV増殖能について： CXCL11またはCCL2両ケモカインsiRNA 導入細胞のいずれも、HCMV前初期遺伝子 (IE1) およびHCMV DNAポリメラーゼ遺伝子 (UL54) 両者の発現を有意に抑制した。このことから、これらのノックダウン細胞では、HCMV の複製が抑制される可能性が示唆されたことから、ノックダウン細胞でのウイルス増殖能について検討した。最初に、CXCL11 ノックダウン細胞でのHCMV 増殖能を検索した。HCMV 増殖は、CXCL11 siRNA導入細胞 の1 ~ 25 nMの範囲で濃度依存的な抑制効果が観察された (図1参照)。また、対象 HEL 細胞では、HCMV感染後 7 日目まで対数的な増加が見られたが、CXCL11 ノックダウン細胞でのウイルス増殖は、完全に抑制された。これらの事から、HCMV の増殖には CXCL11 が強く関与している事が示唆された。また、この実験系に、CXCL11リガンドを加えて検討を行ったところ、CXCL11リガンドの 1.0 μ g/ml の添加により、HCMV増殖抑制は対象と同じレベルまで回復した。次に、CCL2 siRNA導入細胞についても検討したところ、CXCL11ノックダウン細胞を用いた

時の結果と類似の傾向が示された。これらの事より、HCMV の増殖にはCXCL11やCCL2の発現の有無が大きく関与している事が確認された。

以上のことから、トリシンによる抗HCMV効果とケモカイン CXCL11やCCL2の発現抑制効果には相関性が認められ、トリシンはケモカインを介して抗HCMV効果を発揮している可能性が示唆された。さらに、CXCL11やCCL2が抗HCMV薬探索のための良き標的になる可能性がある。

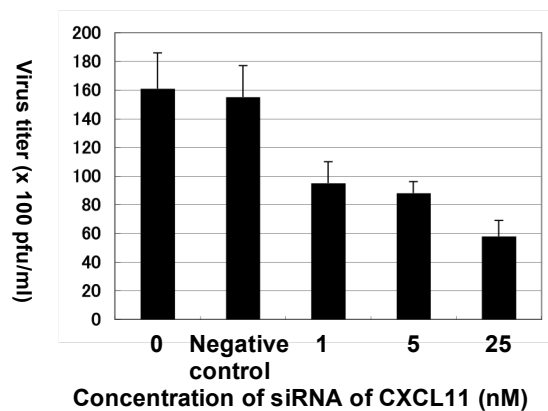


図1、CXCL11ノックダウン細胞によるHCMV増殖抑制

(4) HCMV感染に対するトリシン作用に関わる細胞内シグナル伝達分子について： トリシンのHCMV感染細胞に対するケモカイン発現抑制作用を明らかにするために、細胞内シグナル伝達分子の推定とその挙動をウエスタンブロット法により検討した。HCMV感染細胞内のケモカインシグナル伝達分子として知られているJAK/STAT経路に関連する種々のシグナル分子を検索したところ、特にSTAT3のリン酸化タンパク質が誘導されることを明らかにした。ここにトリシンを作用させると、STAT3のリン酸化が更に強く持続されるようになることが示された。さらに興味深いことは、正常細胞をトリシンだけで処理した場合でも、STAT3のリン酸化タンパク質を誘導すること

が示された。このことは、トリシンはHCMV感染に対してのみならず、STAT3のリン酸化を中心に種々のシグナル分子の細胞内活性化に関与している可能性が示唆された。

以上のことから、HCMV感染症に対する新規抗ウイルス剤トリシンの分子基盤の一端を明らかにすることができた。

<引用文献>

① Sakai A. et al., Anti-human cytomegalovirus activity by constituents from *Sasa albo-marginata* (Kumazasa in Japan). *Antivir Chem Chemother*, 19: 125-132, 2008

② Yazawa K. et al., Anti-influenza virus activity of tricetin, 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone. *Antivir Chem Chemother*, 22: 1-11, 2011

③ Li H. et al., Evaluation of antiviral activity of compounds isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus*. *Planta Med*, 71: 1128-1133, 2005

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 10 件)

① T. Murayama, M. Kikuchi, T. Miita, R. Yamada, K. Matsubara, H. Sadanari, N. Mukaida: Human cytomegalovirus replication supported by virus-induced activation of CCL2-CCR2 interactions. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 453: 321-325, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.071>

② Y. Ogo, K. Ozawa, T. Ishimaru, T. Murayama, F. Takaiwa: Transgenic rice seed synthesizing diverse flavonoids at high levels: a new platform for flavonoid production with associated health benefits. *Plant Biotechnol J*, 査読有, 11: 734-746, 2013.

DOI: 10.1111/pbi.12064

③ T. Murayama, Y. Li, T. Takahashi, R. Yamada, K. Matsubara, Y. Tsuchida, X. Zheng, H. Sadanari: Anti-cytomegalovirus effects of tricetin are dependent on CXCL11. *Microbes Infection*, 査読有, 14: 1086-1092, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.017>

[学会発表] (計 18 件)

①山田理恵、村山次哉: TricetinのCXCL11存在性抗ヒトサイトメガロウイルス作用。日本薬学会第135年会、2015年3月25日～28日、神戸

② T. Murayama, H. Sadanari: CXC chemokine-dependent cytomegalovirus replication. The 39th Annual international herpesvirus workshop, July 19-23, 2014, Kobe, Japan

③村山次哉、定成秀貴: CXC ケモカインに依存したヒトサイトメガロウイルス増殖能の検討。第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、パシフィコ横浜会議センター

④三井田隆貴、定成秀貴、村山次哉: イネ科植物含有成分“Tricetin”による抗ヒトサイトメガロウイルス作用機序の解明。第17回日本補完代替医療学会学術集会、2014年11月

1日～2日、東京

⑤ T. Murayama, H. Sadanari; CXCL11-dependent anti-cytomegalovirus effects of triclin. 14th International CMV/Betaherpesvirus workshop, October 29-November 2, 2012, San Francisco, CA, USA

[図書] (計 2 件)

① 村山次哉、大学教育出版、応用細胞補完代替医療学、2012、pp. 67-75

② 村山次哉、食品資材研究会、New Food Industry、2015、pp. 24-34

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

名称：抗ウイルス剤

発明者：村山次哉 他

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 OP08015-3-2

出願年月日：2012年9月16日

取得年月日：2013年1月18日

国内外の別：国外

名称：トリシンアミノ酸誘導体並びにそれを含む抗ウイルス剤及び抗癌剤

発明者：村山次哉 他

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 5476321

出願年月日：2012年5月31日

取得年月日：2014年2月14日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 次哉 (MURAYAMA, Tsugiya)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：60159184

(2) 研究分担者

定成 秀貴 (SADARARI, Hidetaka)

北陸大学・教育能力開発センター・助教

研究者番号：60121274

(3) 連携研究者

榮鶴 義人 (EIZURU, Yoshito)

鹿児島大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00041351

(4) 協力研究者

山田 理恵 (YAMADA, Rie)

北陸大学・薬学部・助手