

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460985

研究課題名(和文) 海洋生物を創薬ソースとしたC型慢性肝炎治療薬候補化合物の探索

研究課題名(英文) Discovery and development of agents for chronic hepatitis C from marine natural products

研究代表者

山下 篤哉 (YAMASHITA, Atsuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：00334871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに、新規C型慢性肝炎治療薬の候補化合物を見出すための創薬ソースとして海洋生物抽出物に着目し、C型肝炎ウイルス(HCV)増殖抑制活性を有するものを探索してきた。その結果、海綿Amphimedonの抽出物にHCVヘリカーゼ及びNS34Aプロテアーゼの阻害活性があり、レプリコン細胞においてもHCV増殖阻害活性があることを見出した。そこで、その活性成分の同定を試みたが見出すことは出来なかった。更に、HCV NS2/3プロテアーゼの阻害剤スクリーニングシステムを構築し、海洋生物抽出物よりその探索を試みたが、NS2/3プロテアーゼ阻害活性を有するものを見出すことが出来なかった。

研究成果の概要(英文)：We focused on pharmacologically active component from marine organisms for the development of novel anti hepatitis C virus agent. Thus, we screened extracts of marine organisms by using HCV replicon system and showed that the extract from Amphimedon sp. inhibits HCV replication by suppressing viral helicase and protease activities. In this study, we attempted to purify and identify the active component of Amphimedon sp., but not purify and identify it. Additionally, we established a cell-based screening system in order to identify compounds inhibiting the HCV NS2/3 protease activity. We screened extracts of marine organisms by using this system, but not identify extracts of marine organisms inhibiting the HCV NS2/3 protease activity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス 治療薬 海洋生物

## 1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎の治療は、インターフェロン療法の進歩や Direct Acting Antivirals(DAA)と呼ばれる HCV タンパクを標的とした薬剤の登場により、著効率が飛躍的に向上している。しかし、薬剤耐性ウイルスの出現、遺伝子型による感受性の違い、あるいは、副作用等の問題があり新規治療薬の開発は今後も必要である。そこで、研究代表者らは、海洋生物抽出物を創薬ソースとした新規C型慢性肝炎治療薬の開発を目指し研究を行ってきた。海洋生物抽出物を創薬ソースとして選択したのは、次のような理由からである。(1)海洋生物は、地上の生物とは全く異なる生活環を有していることから、海洋生物由来の化合物は、地上の生物から得ることが出来ないユニークな構造を持つとされている。(2)近年、海洋生物から創薬開発研究も盛んに行われており、Halavenなどの海洋生物由来の抗癌剤も臨床の場で使われている。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに、新規C型慢性肝炎治療薬の候補化合物を見出すため、創薬ソースとして海洋生物の抽出物ライブラリー(500種)を用いて、C型肝炎ウイルス(HCV)増殖抑制活性を有するものを探索してきた。その結果、ウミシダ *Alloeoamatella polycladia* や海綿 *Amphimedon* の抽出物に強い抗HCV活性があることを見出した。そこで、上記の研究結果を基に本研究では以下のような目的で研究を行う。(1)ウミシダ *Alloeoamatella polycladia* や海綿 *Amphimedon* の抽出物からHCV増殖抑制化合物の分離・同定を行う。(2)治療薬開発がなされていないHCV NS2/3 プロテアーゼ化合物について、その候補化合物を海洋生物抽出物からの検索し、分離・同定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 海洋生物の抽出物および海洋生物由来精製化合物

琉球大学 理学部 田中淳一先生より供与された。

(2) 細胞

海洋生物の抽出物および海洋生物由来化合物の評価は、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。

(5) NS2-NS5B サブゲノムレプリコン細胞の作製

NS3-NS5B HCV サブゲノムレプリコンプラスミドのNS3の上流にNS2を挿入し、NS2-NS5B HCV サブゲノムレプリコンプラスミドを作製した。T7 polymerase in vitro transcription システムを用いて、RNAを合成後、RNA transfectionによりNS2-NS5B HCV サブゲノムレプリコン細胞を樹立した。

(6) Cell based NS2/3 プロテアーゼアッセイシステムの構築

NS2-3-4A のタンパクを発現し、NS3・4A protease の切断部位配列の下流にGal4-VP16を挿入、NS3・4A protease の切断によりGal4-VP16が活性化され、Luciferase 遺伝子を発現するレポーター細胞を樹立した。

## 4. 研究成果

(1) 海綿 *Amphimedon* の抽出物からHCV増殖抑制化合物の分離・同定

海綿 *Amphimedon* の酢酸エチル抽出物が抗HCV活性を持つことを見出し、この抽出物について分画精製を繰り返した結果、カロチノイドの1種である化合物の分離・同定出来た。しかし、この精製化合物の抗HCV活性を検討した結果、抗HCV活性は全く無かった。この理由として、検討した精製化合物が精製途中で失活している可能性もあると考え、天然物よりカロチノイドを専門に精製し、ライブラリー化しておられる別の研究者の方から、同定したものと同一化合物を分与頂き、再度、抗HCV活性について検討を行った。しかし、抑制活性は見られなかった。

(2) HCV NS2/3 プロテアーゼ阻害化合物の探索

NS2/3 プロテアーゼ阻害化合物の探索のため、NS2-NS5B サブゲノムレプリコン細胞及びCell based NS2/3 プロテアーゼアッセイシステムは構築出来た。これらを使って、100種の海洋生物抽出物についてスクリーニングを行ったが、抑制活性を示すものを見出すことは出来なかった。今後は、幾つか採取地域の異なる海洋生物抽出物ライブラリーをスクリーニングソースとして抑制活性化化合物の探索を行いたい。

## 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)

Okuyama-Dobashi K, Yamashita A, Enomoto N, Moriishi K. et al.

Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide.

Sci Rep. 査読有, 2015 Vol.5, 17047.

10.1038/srep17047.

Kasai H, Yamashita A, Enomoto N, Moriishi K. et al.  
Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication.  
Sci Rep. 査読有, 2015 Vol.5, 16699.  
10.1038/srep16699

Yamashita A, Enomoto N, Moriishi K. et al.  
Identification of Antiviral Agents Targeting Hepatitis B Virus Promoter from Extracts of Indonesian Marine Organisms by a Novel Cell-Based Screening Assay.  
Mar Drugs. 査読有, 2015 Vol.13 6759-73.  
10.3390/md13116759.

Furuta A, Yamashita A, Moriishi K. et al.  
Identification of Hydroxyanthraquinones as Novel Inhibitors of Hepatitis C Virus NS3 Helicase.  
Int J Mol Sci. 査読有, 2015 Vol.16 18439-53.  
10.3390/ijms160818439.

Sato M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. et al.  
Deep sequencing and phylogenetic analysis of variants resistant to interferon-based protease inhibitor therapy in chronic hepatitis induced by genotype 1b hepatitis C virus.  
J Virol. 査読有, 2015 vol.89 6105-16.  
10.1128/JVI.03127-14. Epub 2015 Mar 25.

Tanaka T, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. et al.  
Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus.  
J Virol. 査読有, 2014 Vol.88 13352-66.  
10.1128/JVI.02280-14. Epub 2014 Sep 10.

Furuta A, Yamashita A, Moriishi K. et al.  
Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase.  
J Enzyme Inhib Med Chem. 査読有, 2014 Vol. 29 223-9.  
10.3109/14756366.2013.766607. Epub 2013 Feb 25.

Miura M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. et al.  
Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression.  
J Virol. 査読有, 2013 Vol.87 12541-51.  
10.1128/JVI.00826-13. Epub 2013 Aug 14.

Shen H, Yamashita A, Enomoto N, Moriishi K. et al.  
Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus.  
PLoS One. 査読有, 2013 Vol.8 e82299.

〔学会発表〕(計 20 件)

山下篤哉  
海綿由来セキステルペン系化合物 metachromin A の B 型肝炎ウイルスコアプロモーター抑制活性を介した抗ウイルス活性  
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会  
2015年12月1日  
神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Atsuya Yamashita  
Metachromin A, sesquiterpene from marine sponge Dactylospongia metachromia, exerts anti-HBV activity via inhibition of HBV core promoter.  
第63回日本ウイルス学会学術集会  
2015年11月24日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Teruhime Otoguro  
Screening of presenilin inhibitors for identification of anti-HCV compound.  
第63回日本ウイルス学会学術集会  
2015年11月24日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Tomohisa Tanaka  
Characterization of the IRES activity in equine hepacivirus 5' UTR.  
第63回日本ウイルス学会学術集会  
2015年11月23日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Ryota Amano  
Inhibitory effect of tyrphostin derivative HD-31 on hepatitis C virus replication via regulation of reactive oxygen species production.  
第63回日本ウイルス学会学術集会  
2015年11月23日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Jun Yasumoto  
Hepatitis B virus downregulates expression of CIDE-B and CIDE-C and impairs lipid droplet growth.  
第63回日本ウイルス学会学術集会  
2015年11月22日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

山下篤哉  
カイメン由来化合物 metachromin A 及びそ

の類縁化合物の抗 HBV 活性の検討  
第 25 回抗ウイルス療法学会  
2015 年 5 月 24 日  
国立感染症研究所 (東京都新宿区)

山下篤哉

海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会  
2014 年 11 月 10 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

天野稜大

Tyrphostin とその類縁化合物による C 型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会  
2014 年 11 月 10 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

安本順

HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会  
2014 年 11 月 10 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

田中智久

日本在来馬におけるウマヘパシウイルス感染  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会  
2014 年 11 月 10 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

土橋香織

トリプシン-EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会  
2014 年 11 月 12 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

山下篤哉

カフェ酸類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害  
第 24 回抗ウイルス療法学会  
2014 年 5 月 7 日  
ハイランドリゾートホテル (山梨県富士吉田市)

山下篤哉

海洋生物抽出物ライブラリーソースとした B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索  
第 24 回抗ウイルス療法学会  
2014 年 5 月 9 日  
ハイランドリゾートホテル (山梨県富士吉田市)

葛西宏威

HCV 複製に関わる新規宿主因子 FKBP6 の同定と抗 HCV 剤標的としての検討  
第 24 回抗ウイルス療法学会

2014 年 5 月 7 日  
ハイランドリゾートホテル (山梨県富士吉田市)

天野稜大

Tyrphostin とその類縁化合物による C 型肝炎ウイルス複製阻害  
第 36 回日本分子生物学会年会  
2013 年 12 月 4 日  
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

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 61 回日本ウイルス学会学術集会  
2013 年 11 月 12 日  
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

葛西宏威

Probe Electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いた HCV 感染細胞内脂質組成の解析  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会  
2013 年 11 月 12 日  
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

安本順

B 型肝炎ウイルス感染における宿主細胞の超微形態変化の解析  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会  
2013 年 11 月 11 日  
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

田中智久

日本産馬の血清から分離した non-primate hepatitis virus の性状解析  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会  
2013 年 11 月 11 日  
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

〔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\\_DispInfo.Scholar/0/E88A6696C4043E75.html](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DispInfo.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](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・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・総合研究部・教授

研究者番号：20251530

森石 恆司 (MORIISHI Koji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：90260273