

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07881

研究課題名(和文) 漢方薬麻黄湯による抗RSウイルス作用機序とその有効成分の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of anti-RS virus by maotp, the Kampo medicine, and its active ingredients

研究代表者

鍋島 茂樹 (Nabeshima, Shigeki)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50304796

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)：RSウイルス感染症は小児の呼吸器感染症であるが、しばしば重篤化することが知られている。しかし、有効な治療薬はまだない状況である。我々は、本研究において、漢方薬麻黄湯の構成生薬である麻黄と桂皮が、RSウイルスの外被タンパク質であるGタンパク質に結合することを見出した。しかも、Gタンパク質の受容体結合部位であるCCD(Central Conserved Domain)のCX3Cモチーフに結合することで、宿主細胞レセプターへの感染性を阻害することがわかった。マウスRSウイルス感染症においても、麻黄湯を投与すると肺のウイルス量が著明に低下することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の呼吸器感染症であるRSウイルス感染症は、しばしば重篤化することが知られているが、特異的な治療薬はまだない。本研究において、漢方薬の麻黄湯がRSウイルスの感染性を阻害すること、およびそのメカニズムを解明することができた。漢方生薬の麻黄と桂皮に、その成分が含まれていることが確かめられた。麻黄湯が、臨床的にRSウイルス感染症に有効かどうかを今後臨床試験にて確かめることが大切である。さらに、今後その化合物を同定し、非臨床試験に移行することも可能となる。麻黄湯は世界初のRSウイルス治療薬として再評価することも可能である。

研究成果の概要(英文)：RS virus infection is a respiratory infection of children that often causes severe severe illness. However, there is still no effective treatment for RS virus infection now. In the present study, we found that the herbal medicines, Ephedra Herba and Cinnamomi Bark, which are constituents of the Kampo medicine maoto bind to the G protein, which is the outer spike protein of RS virus. Moreover, We found that binding to the CX3C motif of the Central Conserved Domain (CCD), the receptor binding site of the G protein, inhibited the infectivity to the receptor of host cells. In mouse RS virus infection, we have also proved that the viral load in the lungs was markedly reduced after administration of maoto.

研究分野：感染症

キーワード：RSウイルス 漢方薬 麻黄湯 Gタンパク質 麻黄 桂皮

## 1. 研究開始当初の背景

Respiratory syncytial virus (RS ウイルス) 感染症は、インフルエンザとともに小児の呼吸器疾患による入院あるいは死亡の原因となるため、全世界的に問題となっている。しかし、有効なワクチンや特異的治療薬はなく、保存的治療が主体である。生涯にわたって感染を繰り返すが、特に乳児の初感染、あるいは早産児や免疫不全児、ダウン症児では重症化しやすいといわれている。従来秋から冬にかけて流行が認められていた RS ウイルス感染症であるが、近年通年性に流行を繰り返しているため、ハイリスク患者に対する重症化予防薬(パリピズマブ)投与時期の判断が難しくなっている。したがって実臨床でも医療経済上も早急な治療薬の開発が求められている。一方、申請者らは、麻黄湯がインフルエンザに対してノイラミニダーゼ阻害薬と同等の臨床効果があることを報告し(J Trad Med 27:148,2010、J Infect Chemother 18:534, 2012)、さらに、in vitro においてその機序を解明してきた(Evidence-based Complementary Altern Med doi.org/10.1155/2017/1062065, 2017)。インフルエンザウイルスは、宿主エンドゾーム内に取り込まれた後、エンドゾームが酸性化することにより細胞質内に脱核し「感染」が成立する。この際、麻黄湯はエンドゾーム膜に存在する v-ATPase に作用し、エンドゾーム内の酸性化をおさえることで、インフルエンザウイルスの脱核を阻害すると考えられる。また、過剰な炎症性サイトカインやプロスタグランジン E の産生を低下させ、宿主細胞のオートファジーを活性化し、アポトーシスを抑制する、といった複数の作用機序があることもわかってきた。以上の点を踏まえ、申請者らはインフルエンザと同様に麻黄湯が RS ウイルス感染を阻害する可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

in vivo および in vitro の感染実験において、漢方薬麻黄湯による抗 RS ウイルス作用のメカニズムを解明すると同時に、その有効成分を同定する。また、抗 RS ウイルス感染時の、麻黄湯による抗炎症作用についても解析を行う。

## 3. 研究の方法

1) 培養細胞 (A549) に RS ウイルス (A 株) を感染させ、同時に麻黄湯を添加してウイルス感染が抑制されるかどうかを解析する。ウイルスの定量は、感染性ウイルス量(プラーク法)、ウイルス RNA 量 (PCR)、ウイルス蛋白量 (ウェスタンブロッティング) で測定し、ウイルス粒子の細胞内動向については蛍光免疫染色を用いた共焦点蛍光顕微鏡にて観察する。

麻黄湯による RS ウイルスの吸着または融合の阻害に関しては、ウイルスが細胞に接着した時点で細胞膜を回収し、ウェスタンブロッティングおよび PCR 法を用いて、細胞膜上にウイルスが存在するかどうかを解析する。さらにウイルス懸濁液に麻黄湯を添加したのちに、細胞に感染させることで、麻黄湯がウイルスに対して直接の抗ウイルス作用を有するかどうかを解析する。また、麻黄湯がどのような分子に結合しているかを Biacore を用いて解析する。

2) マウス (Balb/c) に経鼻的に RS ウイルス ( $2 \times 10^5$ ) を感染させ、毎日水 (対照) または麻黄湯を経口的に投与し、5 日間マウスの直腸温と体重を測定する。感染 5 日目にサクリファイスし、肺の重量、ウイルス量を RT-PCR で測定、また、肺胞洗浄液と肺の組織像における炎症細胞浸潤を検討する。さらに、PCR にて肺における炎症性サイトカイン mRNA の発現量に関して解析を行う。

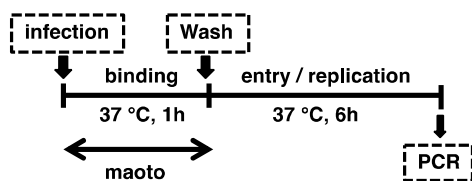
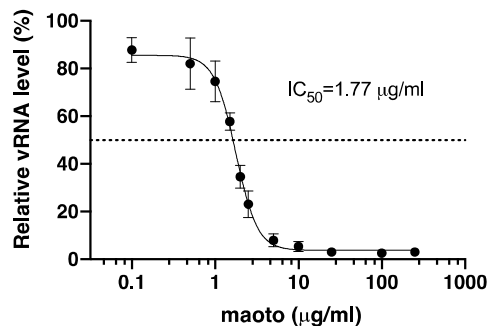
## 4. 研究成果

RS ウイルス感染培養細胞を急性熱性疾患の伝統的な漢方薬である麻黄で処理すると、ウイルス RNA および感染性ウイルス量 (プラーク法) は有意に低下した (図 1)。RS ウイルスの細胞表面への付着は、麻黄湯の存在下および麻黄湯で前処理した場合の両方で阻害された。また我々は、麻黄湯の成分である Ephedrae Herba (EH) と Cinnamomi Cortex (CC) が G タンパク質の中央保存ドメイン (CCD) と特異的に相互作用 (結合) することを明らかにし (図 2)、この相互作用によって細胞内受容体 CX3CR1 へのウイルス吸着が阻害されることも明らかにした。CX3CR1 のエピトープである CCD 上の CX3C モチーフの遺伝子変異は、EH および CC との結合能を低下させたことから、CX3C モチーフが EH および CC のターゲットであることが示唆された。最後に、RSV 感染マウスに麻黄湯を 5 日間経口投与すると、肺のウイルス力価を有意に低下させた (図 3)。また、肺の炎症性サイトカインの発現量も減少していることがわかった。これらの実験から、麻黄湯に含まれる EH と CC の混合物が抗 RSV 活性を持つことが明らかになった。以上のことから、本研究は、RS ウイルス感染に対する治療法の合理的な設計のための新しい知見を提供するものである。

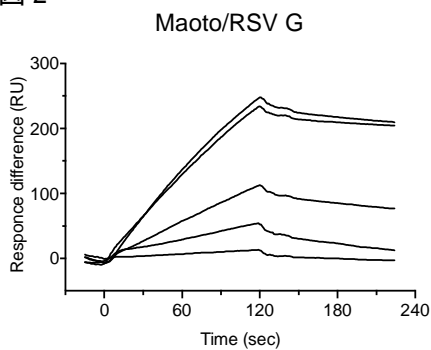
以上の研究成果は以下の研究雑誌に掲載された。

Ephedrae Herba and Cinnamomi Cortex interactions with G glycoprotein inhibit respiratory syncytial virus infectivity/ Fujikane A, Sakamoto A, Fujikane R, Nishi A, Ishino Y, Hiromatsu K & Nabeshima S. *Commun Biol* (2022), <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03046-z>

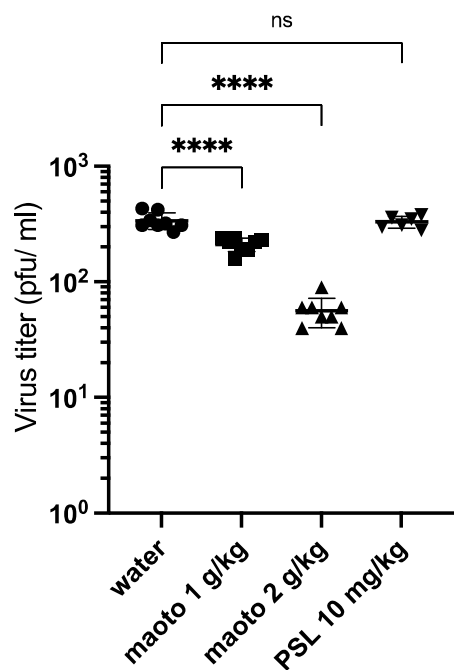
1



2



3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aya Fujikane, Atsuhiko Sakamoto, Ryosuke Fujikane, Akinori Nishi, Yoshizumi Ishino, Kenji Hiromatsu, Shigeki Nabeshima	4. 巻 5:94
2. 論文標題 Ephedrae Herba and Cinnamomi Cortex interactions with G glycoprotein inhibit respiratory syncytial virus infectivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1, 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03046-z   www.nature.com/commsbio	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤兼 亜耶、坂本 篤彦、廣松 賢治、鍋島 茂樹
2. 発表標題 麻黄湯によるRSウイルス感染阻害とそのメカニズム
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤兼亜耶、坂本篤彦、廣松賢治、鍋島茂樹
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanism of the anti-Respiratory Syncytial virus (RSV) activity by Maoto
3. 学会等名 第68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
---------------------------	-----------------------	----

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