

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460125

研究課題名(和文) 核外輸送系を標的とした抗ウイルス活性を持つ新規シード化合物の天然資源からの探索

研究課題名(英文) Screening for antiviral compounds targeting nuclear export system from natural resources

研究代表者

渡邊 健 (WATANABE, Ken)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00346909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗ウイルス薬、特に新たな抗インフルエンザウイルス薬開発の基となる化合物(シード化合物)を発見することを目的とした研究を行った。培養細胞と生きたウイルスを用いて様々な天然物や化合物の抗ウイルス活性を測定した。その結果核外輸送系を標的としたものに限らず、食品や植物の抽出液等、様々な天然物より様々な作用機序を持つ抗インフルエンザウイルス化合物を見出す事ができた。これらの化合物は新規抗ウイルス薬開発のシードとして今後が期待される。

研究成果の概要(英文)：Objective of this study is to find novel anti-viral drugs especially anti-influenza viral drugs. Using cell culture and live virus system, we elucidated anti-viral activity of various natural products and chemicals. As a result, we found that many natural products such as food and plant extracts have anti-influenza viral activity with various mechanisms of action. These compounds and extracts may be useful for the development of novel anti viral drugs.

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 阻害剤 抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

一般に抗ウイルス剤は開発が難しく、ウイルス感染症の治療薬として認可されているものは非常に少ない。従来の抗ウイルス剤の問題は、変異の激しいウイルス由来の酵素を作用標的としている事にある。抗インフルエンザ薬タミフルもその例の一つで、日本でも既に耐性ウイルスが広がっている。そこで新たな抗インフルエンザウイルス薬の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

抗ウイルス薬、特に新たな抗インフルエンザウイルス薬開発の基となる化合物(シード化合物)を発見することを目的とした研究を行った。培養細胞と生きたウイルスを用いて様々な天然物や化合物の抗ウイルス活性を測定した。

3. 研究の方法

様々な天然物・化合物の抗ウイルス活性測定法:以下抗ウイルス活性測定法の代表例を示す。本研究では主としてインフルエンザウイルスに感受性のイヌ腎臓由来細胞(MDCK細胞)と生きたインフルエンザウイルスを用いた。具体的には96well plateに1Well当たり 3×10^4 の4乗個で播種されたMDCK細胞を用いた。評価サンプルを希釈後、細胞を播種したプレートの培地をアスピレーターで除き、希釈したサンプル溶液を対応するwellに濃度が薄い方より100 uL/wellで加えた。つづけて非感染細胞のwellには100 uL/wellでMEM+vitaminを加え、感染細胞のwellには1000TCID₅₀/mlに希釈したインフルエンザウイルス液を100 uL/wellで加え、37℃、5%CO₂インキュベーターで2日間培養した。培地をアスピレーターで除き、70%EtOHを加え5分間室温で細胞を固定後0.5%Crystal Violet染色液を加え5分間室温。染色後水洗、マイクロプレートリーダー(TECAN,infinite M200)で560 nmの吸光度を測定した。IC₅₀値(50%阻害濃度)CC₅₀値(50%細胞毒性濃度)を求め、CC₅₀/IC₅₀でSI(Selective index, 選択性)を算出して抗ウイルス活性を評価した。

4. 研究成果

平成25(2013)年度

研究代表者の所属異動にともない、実験系を再構築する必要があった。そのため、既存の抗ウイルス剤を指標として、新たに細胞培養環境の整備、評価系の再確立を行った。

- (1) 天然資源由来の抗ウイルス活性の作用機序解明を行った。培養細胞を用い、トルコの薬用植物(*Alchemilla mollis*)水抽出液の抗インフルエンザウイルス効果を明らかにした。この抽出液はH1N1亜型、

H3N2亜型およびトリウイルス(弱毒株)のH5N2亜型にも効果を示した。作用機序はウイルス表面HA抗原の不活化または中和効果によるものと考えられた。

- (2) ライチ(*Litchi chinensis*)由来ポリフェノールの抗ベータノダウイルス効果を明らかにした。ベータノダウイルスはある魚類に神経変性を起こす致死感染性であり、このウイルス疾患の流行は養殖業において問題になっている。ライチ抽出成分オリゴノールはベータノダウイルスの増殖を抑えた結果、ウイルスによる細胞変性(CPE)の出現を効果的に抑制した。その作用機序はウイルスの増殖サイクルの前期段階すなわちウイルス粒子の細胞への結合を含んだ段階であると推測された。

平成26(2014)年度

- (3) インフルエンザウイルスの核外輸送機構について解析を行った。研究代表者はこれまでにインフルエンザウイルス遺伝子本体(vRNP)の核から細胞質への輸送に必要な宿主因子(Hsc70)を見出している(FEBS Lett 2006)。このHsc70以外に、vRNP核外輸送因子としてウイルス蛋白質であるNS2が知られている。Hsc70とNS2の共通点は、核外輸送シグナル(NES)を持つことである。NESを持つ蛋白質は、細胞内の機構(CRM1依存的核外輸送機構)により核外輸送される。しかしながら、NS2とHsc70がウイルスvRNPの核外輸送にそれぞれどのように関与しているかの定量的解析はこれまで報告されていない。vRNPはウイルスタンパク質M1を介してHsc70またはNS2と結合し、vRNP-M1-Hsc70、vRNP-M1-NS2複合体としてHsc70またはNS2のNES依存的に核外輸送されると考えられる。そこで大腸菌組換え蛋白質を作成し、M1-Hsc70複合体、M1-NS2複合体の解析を行った。まずHsc70のM1結合領域を同定するためにGST融合Hsc70の欠損変異体を各種作成、ヒスチジンタグ融合M1蛋白質との結合解析を行った。その結果Hsc70のNESを含む領域でM1との結合が強くみられることがわかった。さらに、M1欠損変異体を用いてHsc70との結合を解析したところ、M1蛋白質のC末端側がHsc70との結合に必要なことがわかった。Hsc70-M1、NS2-M1間の解離定数を測定したところ、それぞれ 1×10^{-7} M、 6×10^{-6} Mと算出された。Hsc70とNS2は、M1への結合において競合的に作用した。以上のことから、ウイルスの生存サイクルにおいては、Hsc70とNS2は同程度の強さでM1-vRNP複合体と結合し、その役割を補完しているものと考えられた。

- (4) 天然資源由来の抗ウイルス活性の作用機序解明として、これまでに抗菌活性が幅広く知られている蜂蜜に着目し、様々な蜂蜜の抗インフルエンザウイルス活性を測定した。マヌカ、そば、甘露、れんげ蜂蜜は、3.6-11.3mg/mLのIC50値を示した。もっとも活性の高いマヌカ蜂蜜についてその作用機序を調べたところ、殺ウイルス活性によるものと推測された。また、マヌカ蜂蜜はザナミビル(リレンザ)またはオセルタミビル(タミフル)とともに培養細胞に加えることで、相乗効果を示した。マヌカ蜂蜜を加えない場合に比べてオセルタミビルの効果を1,000倍に増強することが分かった。
- (5) マヌカ蜂蜜の抗菌活性成分メチルグリオキサールに着目しその抗インフルエンザウイルス作用機序の解析を行った。メチルグリオキサールは殺ウイルス作用をもつ化合物であった。メチルグリオキサールはH1N1, H3N2, H5N2 亜型いずれのインフルエンザウイルスにも効果を示した。オセルタミビル、ザナミビル、ラニナミビル、ペラミビルといったノイラミニダーゼ阻害剤とともに用いることで相乗効果を示し、ノイラミニダーゼ阻害剤IC50値が大幅に下がることにより選択性は飛躍的に向上した。

平成27~28(2016~17)年度前年度までに様々な天然資源より抗インフルエンザウイルス活性を見出しその作用機序解明を進めてきたが、当初の3年計画を1年延長することとした。

- (6) 落花生薄皮にはこれまで様々な生理活性が知られていた。抗ウイルス活性では抗HIV-1活性が報告されている。数種類の由来の異なる落花生薄皮より抽出液を作成した。抽出液重量比の約3割は、ポリフェノール成分であることがわかった。その抽出液の抗インフルエンザウイルス活性を測定したところ、落花生の品種によらずほぼ一定であった。培養上清中のウイルス量も1/100以下となった。IC50値はどの抽出液も2ug/mL以下となり、かなり強い活性を持つことが判明した。
- (7) 近年になり、vRNPの核外輸送にはNS2, Hsc70のもつNESだけでなくvRNPを構成するNP蛋白質にもNESが存在することが論文で報告されている。そこで、NPに対する阻害により抗インフルエンザウイルス効果を探索することとした。多数の候補化合物より効率よく阻害剤を見出すために、コンピュータ計算(インシリコ)による化合物の選択を試みた。選出された候補物質を購入し、実際に抗インフ

ルエンザウイルス活性を測定したところ、キノリノン化合物がIC50値1.8uMと強い活性を持つことを見出した。この化合物が直接NP蛋白質に結合すること、ウイルス粒子産生を抑制していることを確認した。キノリノン骨格を持つ化合物はこれまでに医薬品として多数認可されており、見出した化合物も今後類似の構造をもつ化合物の合成展開を行うことで、より強い活性をもつものを開発することが期待される。

今後の研究展開であるが、平成29年4月より富山大学和漢医薬学研究所の探索研究プロジェクトに採択された。多数の生薬由来化合物、生薬エキス及び漢方方剤の提供をうけ、抗インフルエンザウイルス活性探索研究を開始している。さらに平成29年4月より公益財団法人日本豆類協会 豆類振興事業「ササゲ属雑豆の抗ウイルス活性に関する調査研究」を開始している。本研究で確立した実験系をこれらの研究で発展させることで今後さらに有用な抗ウイルス活性をもった天然物資源が見出されることが期待される。

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6件)

1. Makau JN, Watanabe K, Ishikawa T, Mizuta S, Hamada T, Kobayashi N and Nishida N. Identification of small molecule inhibitors for influenza A virus using in silico and in vitro approaches. PLoS ONE. 12(3): e0173582 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0173582 (査読有り)
2. Charyasriwong S, Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. In vitro evaluation of synergistic inhibitory effects of neuraminidase inhibitors and methylglyoxal against influenza virus infection Archives of Medical Research 2015 46: 8-16 (査読有り)
3. Watanabe K, Shimizu T, Noda S, Tsukahara F, Maru Y, Kobayashi N. Nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex: Interaction of Hsc70 with viral

proteins M1 and NS2 FEBS Open Bio 2014
4: 683-688. (査読有り)

4. **Watanabe K**, Rahmasari R, Matsunaga, A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-Influenza viral effects of honey *in vitro*: potent high activity of manuka honey. Archives of Medical Research. 2014 45: 359-365(査読有り)
5. Makau JN, **Watanabe K**, Kobayashi N. Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. Drug Discoveries & Therapeutics 2013 7: 189-195 (査読有り)
6. Ichinose T, Musyoka TM, **Watanabe K**, Kobayashi N. Evaluation of antiviral activity of Oligonol, an extract of *Litchi chinensis*, against betanodavirus. Drug Discoveries & Therapeutics 2013 6: 254-260 (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

1. **渡辺 (渡邊) 健**、石川岳志、水田賢志、中垣岳大、大滝大樹、濱田剛、田中義正、西田教行 新たな作用機序をもつ抗インフルエンザウイルス薬の開発 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27 日 東北大学 (宮城県仙台市)
2. Juliann Nzembi Makau, **Ken Watanabe**, Takeshi Ishikawa, Tsuyoshi Hamada, Nobuyuki Kobayashi, Noriyuki Nishida. Discovery of influenza virus inhibitors using in silico and in vitro approaches. 第 5 回感染症若手フォーラム 2016 年 9 月 4-6 日 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)
3. Juliann Nzembi Makau, **Ken Watanabe**,

Takeshi Ishikawa, Satoshi Mizuta, Tsuyoshi Hamada, Nobuyuki Kobayashi, Noriyuki Nishida. Drug discovery for influenza virus using in silico and in vitro approaches. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市) 2016 年 9 月 8 日-11 日

4. Juliann Nzembi Makau, **Ken Watanabe**, Takeshi Ishikawa, Tsuyoshi Hamada, Nobuyuki Kobayashi, Noriyuki Nishida. Drug discovery for influenza virus. The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan 2016 年 7 月 13 日 JICA 市ヶ谷ビル (東京都新宿区)
5. **渡辺 (渡邊) 健**、石川岳志、水田賢志、大滝大樹、濱田剛、田中義正、西田教行 In silico スクリーニングによる抗インフルエンザ化合物の探索 日本薬学会第 136 年会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016 年 3 月 29 日
6. Juliann Nzembi Makau, **渡辺 (渡邊) 健**、小林信之 トルコ民族薬用植物の抗インフルエンザ活性: *Alchemilla mollis* 抽出物のインフルエンザウイルスに対する殺ウイルス活性の可能性 第 54 回日本熱帯医学会大会 長崎ブリックホール (長崎県長崎市) 2013 年 10 月 4 日
7. チャリヤシリワン シリワン、松永 彩香、**渡辺 (渡邊) 健**、小林 信之 インフルエンザウイルス感染に対する Methylglyoxal と Neuraminidase 阻害薬の併用による相乗的阻害効果についての検討 第 50 回日本ウイルス学会九州支

部総会, 2013年9月7日 長崎大学(長
崎県長崎市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:キノリノン化合物および抗RNAウイルス
治療薬

発明者:水田賢志、渡邊健、西田教行、濱田

剛、石川岳志、田中義正、大滝大樹

権利者:長崎大学

種類:特許

番号:特願2017-72230

出願年月日:29年3月31日

国内外の別:国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 健 (WATANABE, Ken)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助
教

研究者番号:00346909