

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09587

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治療薬候補の分子機構の解明

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanisms of novel therapeutic candidate for cytomegalovirus infection

研究代表者

村山 次哉 (MURAYAMA, Tsugiya)

北陸大学・薬学部・研究員

研究者番号：60159184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に対する新規治療薬候補のトリシンの分子作用機構を検討した結果、宿主ケモカイン分子を介した作用機序の存在を明らかにした。また、トリシンのHCMV遺伝子発現抑制の分子機構の検討から、トリシンがCDK9のキナーゼ活性を阻害することでRNA pol IIの活性を抑制し、その結果、HCMV遺伝子の転写活性を抑制する分子機構を明らかにした。さらにトリシンより強力な抗HCMV活性を持つ化合物の検索により、トリシンにフッ素を付加することにより、トリシンより約400倍強力な活性を持つ化合物を合成した。

研究成果の概要(英文)：As a result of examining the molecular action mechanism of a novel therapeutic candidate "tricin" against human cytomegalovirus (HCMV), it was revealed that the action mechanism through the host chemokines molecule exists (Antiviral Res. 148, 15-19). In addition, from the study of the molecular mechanism of tricin suppression of HCMV gene expression, tricin inhibits the activity of RNA pol II by inhibiting the kinase activity of CDK9, and as a result, the molecular mechanism that suppresses the transcriptional activity of HCMV gene is obvious (FEBS Open Bio. 8, 646-654). Furthermore, by searching for a compound having more potent anti-HCMV activity than tricin, a compound having about 400 times more potent activity than tricin was synthesized by adding fluorine to tricin (Antiviral Res. 154, 10-16).

研究分野：ウイルス学、免疫学

キーワード：ヒトサイトメガロウイルス トリシン ケモカイン 抗ウイルス薬

1、研究開始当初の背景

ヒトサイトメガロウイルス (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、現在わが国では主にガンシクロビル (ganciclovir: GCV) の使用が認可されている。しかしながら、既に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、種々の生薬の成分を用いて抗 HCMV 薬の探索を行ってきた。その結果、特にクマザサの含有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 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ことを明らかにしてきた。毒性に関しては、細菌を用いた試験から遺伝子突然変異誘発性を示さないこと。マウス及びラットを用いた急性毒性試験では、いずれも 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。

フラボン誘導体であるトリシンは、クマザサのみならず多くのイネ科植物に含まれており、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ことも明らかにされた。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。

2、研究の目的

(1) 新規に得られたトリシンの抗 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・翻

訳産物(発現蛋白質)解析等の実施によって、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ことであり、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ことである。

(2) この研究の予想される結果と意義は、HCMV 感染症は、骨髄・臓器移植後関連や AIDS 関連の日和見感染症として管理すべき重要な疾患の一つである。現在主に GCV が抗 HCMV 薬として用いられているが、耐性ウイルスが出現し大きな社会問題となっており、また高価な薬物であるため莫大な医療費を要する。我々が新たに見出したトリシンは、安全性も確認されており、かつ GCV 耐性 HCMV にも効果を示すことも明らかにしてきた。このトリシンについて更に抗ウイルス効果の分子基盤が実証されれば、非常に意義が深く、GCV に変わる新規 HCMV 治療薬としての科学的な根拠ともなり得るので、国際社会への大きな還元となりその意義は大きい。

3、研究方法

(1) HCMV 感染に対するトリシン作用に関わる遺伝子/転写産物の推定と検証

【共培養】ヒト胎児肺線維芽細胞(HEL)と HCMV + 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 合成を行った。【候補遺伝子の選定】これまでに、ヒトおよび HCMV 遺伝子を搭載した DNA チップを用いて、宿主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、いくつかの候補遺伝子を選定しているため、ここでは対照と比較して 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した。【候補遺伝子機能の検証】発現上昇した宿主由来遺伝子の抑制目的に、siRNA にて事前処理した細胞を用いて、HCMV 感染増殖に対するトリシン作用の減弱を確認した。さらに、発現低下した宿主由来の遺伝子をベクターにて導入した細胞を用いて、発現抑制したウイルス由来遺伝子を過剰発現させた HCMV を感染させて、トリシン作用を再検証した。これらの HCMV 増殖に対するトリシン作用は、主にブランク法により定量した。

(2) HCMV 感染に類似して活性化した細胞(インターフェロン 刺激下)および HCMV 感染細胞に対するトリシン作用に関連して発現する蛋白質の網羅的な解析と、候補分子とトリシン作用との関連性の検証

【細胞刺激と薬物介入】HEL 細胞をインターフェロン (5 unit/ml)刺激あるいは非刺激した後、トリシン (IFN- (0.1-1.0-10 μ M))へ細胞を曝露 (24-48-72 時間)後、トリシン作用として細胞内シグナル伝達分子、細胞間接着分子の発現性を確認した。

【候補蛋白質機能の検証】候補となった蛋白質をコードする遺伝子の発現抑制をするために siRNA にて事前処理した細胞を利用してトリシン効果が低下するか検証し、さらに、ウエスタンブロット法により候補蛋白質発現の有無・増減について確認と検証を行った。

(3) ウイルス感染に対するトリシン作用に関わる HCMV 遺伝子の推定と検証

HCMV 遺伝子発現に対するトリシンの影響を調べるために、HCMV の前初期 (immediate early: IE) 遺伝子、初期 (early: E) 遺伝子、および後期 (late: L) 遺伝子の各数種類の遺伝子をクローニングし、各転写調節領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し検討した。これらのプラスミドを一時的に HEL 細胞に導入し、3 時間後にトリシン (0.1-1.0-10 μ M) を加え、さらに 72 時間培養後の細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。また、レポータープラスミドを安定に導入した OUMS-36T-3 細胞を準備し、トリシン処理後同様に行った。

4、研究成果

(1) HCMV 感染・増殖に影響するトリシン作用に関わる宿主分子(ケモカイン)・CCL2 および CCL5 の存在を明らかにした。

HCMV 感染により発現増強する CCL2 と CCR2 の遺伝子とタンパク質は、トリシン処理により有意に抑制され、同時に HCMV の増殖も抑制された。さらに、CCL2 siRNA の細胞内導入により CCL2 をノックダウンさせ

た細胞では、HCMV IE1 および HCMV UL54 (DNA ポリメラーゼ) 遺伝子発現および HCMV の複製が対照に比較して有意に抑制されること、ここに CCL2 リガンドを添加する事によりこれらの抑制が対照群のレベルまで回復することを明らかにし、報告した。このことから、CCL2 は抗 HCMV 薬の良き標的分子の可能性があり、トリシンはその有力な候補化合物である事が示された。また最近になり、CCL5 の mRNA およびタンパク質発現の両者共に CCL2 と同様の挙動を示す事が明らかにされた。以上のことより、HCMV 感染刺激により増強されたこれらのケモカインは、HCMV 複製の調節に関与している事が明らかになった。CCL2 や CCL5 は、急性・慢性炎症反応誘導に関与していることから、炎症局所での潜伏 HCMV の再燃や増殖にも関与している可能性がある。

(2) HCMV 感染細胞での MxA 遺伝子(抗ウイルス活性分子の1つ) 発現に対してトリシンが影響を及ぼす事を明らかにした。

始めに、HCMV 感染細胞内の JAK/STAT シグナル伝達経路のうち、STAT タンパク質のリン酸化に対するトリシンの影響を調べたところ、HCMV 感染により、STAT1 と STAT3 のリン酸化が影響を受けることが明らかとなった。そこで、STAT タンパク質が発現調節している MxA 遺伝子の発現について検索した。IFN- 処理し HCMV を感染させる事により、MxA の mRNA は HCMV 感染後一過性に増加し、感染 72 時間後では著しく減少したのに対し、IFN- 処理だけの細胞では一過性の MxA の mRNA の増加は見られるが、72 時間処理後の減少は見られなかった。次に、これらの細胞をトリシンで処理すると、HCMV 感染細胞および IFN- 処理細胞共に MxA 遺伝子の一過性の発現増加は抑制されたが、感染細胞で 72 時間後に見られた MxA 遺伝子発現の著しい減少は、見られなくなった。以上のことから、HCMV 感染細胞での MxA 遺伝子の発現に対して、トリシンが何らかの影響を及ぼす事が明らかとなった。そこで次に、トリシンが MxA 遺伝子発現を誘導することができるのか否かについて検討した。細胞をトリシンで処理すると、処理後 24 時間で MxA の mRNA およびタンパク質両者が誘導され

た。さらに、STAT タンパク質のリン酸化も処理後 8 時間で誘導された。これらの事から、トリシンは抗ウイルス活性分子として知られている MxA 遺伝子の発現を誘導する機構を有しており、このことがトリシンの抗 HCMV 活性機構に関係している可能性もある。

(3) トリシンが、HCMV の IE 遺伝子、E 遺伝子および L 遺伝子の各遺伝子発現を抑制することを明らかにした。

HCMV 遺伝子発現に対するトリシンの影響を調べるために、HCMV の IE 遺伝子 (UL122/123)、E 遺伝子 (UL46, UL54)、および L 遺伝子 (UL52, UL99) の各転写調節領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを一時的に HEL 細胞に導入後、トリシンを作用させると各プラスミドのルシフェラーゼ活性は、トリシン濃度に依存して抑制された。この効果は、レポータープラスミドを安定に導入した細胞を用いた場合でも、同様の結果を示した。以上のことから、トリシンは HCMV 遺伝子発現も抑制する事が示された。この事をさらに詳細に検討するために、RNA polymerase II (RNA pol II) の活性化に重要な C-terminal domain (CTD) のリン酸化に対するトリシンの効果について検討した結果、HCMV 感染細胞での RNA pol II の CTD の 2 カ所のリン酸化 (Ser-2, Ser-5) が、トリシンにより抑制されることが明らかにされた。さらに、CTD のリン酸化には cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) が重要であることから、そのキナーゼ活性に対するトリシンの酵素活性阻害作用について、CDK9/cyclin K 複合体を用いて調べたところ、CDK9 活性はトリシンにより濃度依存的に阻害されることを明らかにし報告した。これらのことから、トリシンの HCMV 遺伝子発現抑制機構は、CDK9 のキナーゼ活性を阻害することにより RNA pol II の活性を抑制し、その結果、HCMV 遺伝子の転写活性を抑制する分子機構が存在する可能性を示す事ができた。

(4) これまでトリシンの抗 HCMV 作用の分子機構について解明し、創薬の可能性について種々検討して

きた。しかしながら、トリシンの抗 HCMV 活性は、GCV に比較して少し弱いことが大きなネックであった。そこで GCV やトリシン以上に強い活性を持ち、かつ安全な新たな化合物の探索について検討した結果、有望で安全な新薬候補を見いだす事ができた。

自然界に存在し安全性も確認されているトリシンをキードラッグとして、ハロゲン化合物を付加したものと CDK9 とのドッキングシミュレーションにより検索し、フッ素を付加したいくつかの候補化合物を見いだした。これらの抗 HCMV 効果の検討および細胞毒性の検討から、GCV に比較して約 200 倍強力な抗 HCMV 活性 (EC50 値: 0.13 nM) を持ち、かつ細胞毒性の認められないトリシンにフッ素を付加した新たな化合物を見いだした。今後は、GCV に変わる新薬候補として、創薬の可能性を目指していく。

以上 3 年間の研究成果として、当初の目的をある程度達成することが出来たと思うと同時に、トリシンや GCV よりも優れた効果を持ち、かつ安全な新規化合物を見いだしたことは、次世代に繋がる研究成果であると思われる。

5、主な発表論文等

〔雑誌論分〕(計 7 件)

K. J. Fujimoto, D. Nema, M. Ninomiya, M. Koketsu, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama: An *in silico*-designed flavone derivative, 6-fluoro-4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyflavone, has a greater anti-human cytomegalovirus effect than ganciclovir in infected cells. *Antiviral Res.*, 査読有, 154, 10-16, 2018

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.03.006>
6. H. Sadanari, K. J. Fujimoto, Y. Sugihara, T. Ishida, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama; The anti-human cytomegalovirus drug triclin inhibits cyclin-dependent kinase 9. *FEBS Open Bio*, 査読有, 8, 646-654, 2018
DOI: 10.1002/2211-5463.12398

A. Itho, H. Sadanari, M. Takemoto, K. Matsubara, T. Daikoku, T. Murayama: Triclin

inhibits CCL5 induction required for the efficient growth of human cytomegalovirus. *Microbiol. Immunol.* 査読有, 62, 341-347, 2018

DOI: 10.1111/1348-0421.12590

Y. Akai, H. Sadanari, M. Takemoto, N. Uchide, T. Daikoku, N. Mukaida, T. Murayama: Inhibition of human cytomegalovirus replication by triclin is associated with depressed CCL2 expression. *Antiviral Res.*, 査読有, 148, 15-19, 2017

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.09.018>

T. Murayama, D. Nema, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daikoku, N. Mukaida; CCL2/CCR2-dependent replication of human cytomegalovirus is inhibited by anti-inflammatory compound triclin. *Cytokines*, 査読有, 100, 80, 2017

赤井佑三子、茂木香保里、定成秀貴、武本眞清、松原京子、大黒 徹、土田裕三、桜井大輔、村山次哉: クマザサ含有成分による CCL2 依存性のヒトサイトメガロウイルス増殖抑制効果。日本補完代替医療学会誌、査読有、14、83-93、2017

<http://www.jcam-net.jp/>

R. Yamada, H. Suda, H. Sadanari, K. Matsubara, Y. Tuchida, T. Murayama: Synergistic effects of combination treatment with ganciclovir and triclin on human cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Research.* 125, 79-83, 2016

<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.11.008>

[学会発表](計8件)

T. Murayama, K. J. Fujimoto, M. Koketsu, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daitoku; The novel compound shows potent anti-human cytomegalovirus activity. 5th ICONTES, 2/01-02/2018, Kuala Lumpur, Malaysia

定成秀貴、杉原雄斗、藤本和宏、武本眞清、大黒 徹、村山次哉: 抗ヒトサイトメガロウイルス活性のある triclin が RNA polymerase II C-terminal domain のリン酸化を阻害する。日本薬学会第138回年会、金沢、3/25-28/2018

根間大貴、藤本和宏、瀧澤 守、二ノ宮真之、定成秀貴、武本眞清、大黒 徹、村山次哉: 超強力な抗ヒトサイトメガロウイルス活性を有する新規化合物について。日本薬学会第138回年会、金沢、3/25-28/2018

T. Murayama, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daikoku; CCL5-dependent replication of human cytomegalovirus is inhibited by triclin *in vitro*. 18th International Congress on Infectious Diseases, 3/1-4/2018, Buenos Aires, Argentina

T. Murayama, H. Sadanari, M. Takemoto, K. Matsubara, T. Daikoku; Inhibitory effect of triclin on CCL2-CCR2 dependent human cytomegalovirus replication. 16th international CMV/betaherpesvirus workshop, 4/30-5/4/2017, Noordwijkerhout, The Netherlands

定成秀貴、杉原雄斗、藤本和宏、武本眞清、大黒 徹、村山次哉: 抗ヒトサイトメガロウイルス活性のある triclin は cyclin-dependent kinase 9 を阻害する。第26回抗ウイルス療法学会総会、熊本、5/18~20/2017

根間大貴、藤本和宏、瀧澤 守、杉原雄斗、定成秀貴、武本眞清、大黒 徹、村山次哉: 超強力な抗ヒトサイトメガロウイルス活性を有する新規化合物。第26回抗ウイルス療法学会総会、熊本、5/18~20/2017

茂木香保里、定成秀貴、杉原雄斗、武本眞清、大黒 徹、村山次哉: トサイトメガロウイルス感染細胞でのインターフェロン誘導性遺伝子 MxA 発現に対する triclin の影響。第137回日本薬学会、仙台、3/24-27/2017

[図書](計1件)

村山次哉、医薬ジャーナル社、抗ヘルペスウイルス薬、In “化学療法の領域、特集・飛躍的に発展を見せる抗ウイルス薬” 33、33-38、2017

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：化合物又はその塩、抗ウイルス剤、医薬組成物

発明者：村山次哉 他

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2017-084293

出願年月日：平成 29 年 4 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

新聞報道（計1件）

新薬候補発見の報道がなされた。

掲載新聞：北國新聞、一面

タイトル：クマザサ成分で薬効200倍 肺炎、
大腸炎原因ウイルス撃退

掲載年月日：平成 30 年 4 月 21 日

6、研究組織

（1）研究代表者

村山 次哉（MURAYAMA, Tsugiyu）

北陸大学・薬学部・研究員

研究者番号：60159184

（2）研究分担者

定成 秀貴（SADANARI, Hidetaka）

北陸大学・薬学部・講師

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