

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15142

研究課題名(和文) 抗マラリア活性を示す新規な環状過酸化低分子化合物の抗ウイルス作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Antiviral mechanism of new endoperoxide compounds showing antimalarial activity

研究代表者

加藤 宣之 (Kato, Nobuyuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40150883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗HCV化合物(N-89とN-251)の抗HCV作用機序の解明を目的とした。まず、N-89やN-251に抵抗性を示す細胞株の樹立を行った。得られた抵抗性細胞と元の感受性細胞を用いて、当該化合物の作用機序の解析を行い、当該化合物への抵抗性獲得には、ウイルス側と宿主側の両方の因子が同程度に関与している事を明らかにした。抵抗性細胞由来のHCVの遺伝子解析から、抵抗性獲得に関与する可能性のあるアミノ酸置換を検出した。マイクロアレイ解析により抵抗性獲得に寄与する可能性のある遺伝子候補を特定した。また、当該化合物が日本脳炎ウイルス、B型およびE型肝炎ウイルスにも増殖抑制効果があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have carried out the study to clarify the anti-hepatitis C virus (HCV) mechanism of new anti-HCV compounds (N-89 and its derivative N-251). From N-89- or N-251-sensitive HCV-RNA-replicating cells (sensitive cells), we first established the cell lines possessing a N-89- or N-251-resistant phenotype (resistant cells). Using the sensitive and resistant cells, we analyzed the action mechanism of these compounds. The results appeared that both host and viral factors contribute to almost the same degree of the resistance to these compounds. Genetic analysis of HCVs derived from the resistant cells detected amino acids substitutions, which might be involved in the acquisition of resistance against these compounds. cDNA microarray analysis selected gene candidates, which might contribute to resistant acquisition. In addition, we demonstrated that these compounds showed antiviral effects against Japanese encephalitis virus, hepatitis B virus, and hepatitis E virus.

研究分野：ウイルス学、細胞生物学、分子生物学、肝臓学

キーワード：ウイルス 感染症 微生物 抗ウイルス剤 薬理作用機序 遺伝子解析 マイクロアレイ解析

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染によるC型慢性肝炎は十数年を経て肝硬変そして肝がんを発症する。我が国でのこれら疾患による犠牲者は年間5万人ほどで、その8割はHCV感染に起因する。C型肝炎の治療は、直接作用型抗ウイルス薬(DAA)製剤の登場により最近大きく進展し、その治癒率も先進国では90%以上になると期待される。しかし、DAA製剤による死亡例、DAAに抵抗性を示すHCVの出現、高額な治療費(治療1人当たり約1000万円)等の問題がある。研究代表者は、HCV発見当初(1989)から抗HCV剤の開発を目指した基礎研究を長年展開して来た。研究の過程で、抗HCV活性を迅速にかつ定量的に評価できる複数の細胞株を用いたレポーターアッセイ系を独自に開発し(国内特許番号4009732と5535073)、安価に人工合成できる抗マalaria薬として岡山大学薬学部で開発中だった環状過酸化化合物(N-89とその誘導体N-251)に強い抗HCV活性(数十nMでHCV RNAの複製阻害を示す)を発見した(国内特許番号4931162, 2012; PLOS ONE, e72519, 2013)。N-89(N-251)は投与後、数時間以内に抗HCV効果が認められ即効性に優れた化合物であり、単剤処理でも細胞内からHCV RNAを完全に排除できることも分かっていた。また、抗HCV薬であるリバビリンとの併用で相乗効果を示すことから臨床においても有望な抗HCV剤となることが期待された。2014年、臨床研究中核拠点に選定された岡山大学病院における薬剤シーズに選定された。その後、First in manに向けての安全性試験が行われている。しかしながら、N-89(N-251)のHCVやマalaria原虫に対する作用メカニズムはほとんど何も分かっていない。抗HCV活性に関しては、それまでに見つけていた抗HCV剤の作用機序(インタフェロン系の活性化、RNA変異誘導、酸化ストレスに対する影響、遺伝子発現プロファイルへの特異的な影響など)と同じである可能性を追究したが、すべて否定的な結果しか得られなかった。そこで、研究代表者は、独自のアイデアで、これらの化合物のHCVに対する作用機序の解明を目指すこととして新たな研究計画(次項目に記載)を立案するに至った。

2. 研究の目的

これまでの研究結果からN-89(N-251)の抗HCV作用における標的は既知の分子とは異なると考えた。従って、これまでのピンポイント的な解析ではうまくいかないと考え、N-89(N-251)に抵抗性を示す全長HCV-RNA複製細胞株を樹立することを考えた。そして、ウイルス側および宿主側の両面について、N-89(N-251)感受性の全長HCV-RNA複製細胞と詳細に比較検討するで、N-89(N-251)抵抗性に寄与する分子を特定することとした。このような分子を同定することが、N-89(N-251)の作用機序の解明につながると

考えた。しかし、前項の研究の背景においても述べたように、N-89(N-251)は強力な抗HCV活性を有することから、抵抗性を示す細胞株を得ることは困難ということも予想された。そのような場合における打開策として、N-89(N-251)がHCVと近縁のウイルスでも抗ウイルス作用を示すかどうかを評価することとした。その結果を知ることは、N-89(N-251)の作用機序の解明にも役立つと考えた。そこで、レプリコンシステム(RNA複製)を使用して評価が可能な日本脳炎ウイルス(JEV)やデング熱ウイルス(DENV)のアッセイ系を他大学の研究者との共同研究という形で本研究に導入して評価することとした。さらに、肝炎ウイルスの仲間として、HCVと同じRNAウイルスであるE型肝炎ウイルス(HEV)とDNAウイルスであるB型肝炎ウイルス(HBV)についても、N-89(N-251)に抗ウイルス効果が認められるかどうかを明らかにして、抗HCV作用のメカニズム解明に役立てることとした。

N-89(N-251)の作用機序解明を目的として行う研究をまとめると以下の2項目となる。

(1) N-89(N-251)に抵抗性を示す全長HCV-RNA複製細胞株を樹立して、感受性細胞との詳細な比較実験を行い、抵抗性獲得に関与する因子の特定を行う。

(2) N-89(N-251)がHCVとは異なるRNAウイルスや肝炎ウイルスに対して抗ウイルス活性を示すかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) N-89(N-251)に抵抗性を示すHCV-RNA複製細胞を用いた抵抗性獲得機序の解析

N-89(N-251)抵抗性HCV-RNA複製細胞株の樹立

N-89やN-251に感受性を示すHCV-RNA複製細胞(ヒト肝癌細胞株HuH-7由来のOR6細胞とヒト肝癌細胞株Li23由来のORL8細胞)にN-89やN-251を長期(約2ヶ月)に渡って投与し(徐々に濃度を上げていくStep-wise法や最初から高い濃度で処理するHigh-dose法を用いた)、N-89やN-251に抵抗性を示すHCV RNA複製細胞株の樹立を行った。

N-89(N-251)に対する抵抗性が宿主とウイルス側のどちらが関与するかの解析

得られた2種類のN-89 或いはN-251抵抗性HCV-RNA複製細胞にIFN- γ を連続投与することにより、HCV-RNAを排除した治療細胞を作成した。別途、N-89 或いはN-251に感受性の親細胞(OR6やORL8)と2種類の抵抗性細胞(前項で得られた)由来のTotal RNA(この中にはHCV-RNAが含まれる)を調整した。これらのTotal RNAをエレクトロポレーション法により、作成した治療細胞にそれぞれ導入して、HCV-RNAを入れ替えたそれぞれ(OR6由来とORL8由来という意味)4種類のHCV-RNA複製細胞を新たに作成した。得られたこれらの細胞におけるHCV-RNAの複製に対するN-89や

N-251 の効果を定量的 RT-PCR 法により評価した。

N-89(N-251)に抵抗性を示す HCV-RNA 複製細胞由来の HCV の遺伝子解析

N-89 或いは N-251 に抵抗性を示す 2 種類の HCV RNA 複製細胞由来の Total RNA から RT-PCR 法により HCV-RNA の NS3-NS5B までの領域 (約 6 kb で HCV-RNA の複製に必要なウイルスタンパク質: NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B がコードされている) を増幅して、遺伝子解析用のプラスミドベクターに組み込み、それぞれ 10 クローンについて塩基配列を決定した。親細胞 (OR6 と ORL8) 由来の HCV-RNA の塩基配列と比較した。

N-89(N-251)感受性細胞 (ORL8) と抵抗性細胞 (ORL8 由来) を用いた cDNA マイクロアレイ解析

親細胞の ORL8 細胞と ORL8 細胞由来の N-251 抵抗性 HCV-RNA 複製細胞由来の Total RNA を用いて、それぞれの cDNA アレイを作成して、マイクロアレイ解析を行った。

(2) HCV 近縁 RNA ウイルスや肝炎ウイルスに対する N-89 (N-251) の抗ウイルス活性評価
デング熱ウイルス (DENV)

DENV については、京都大学ウイルス研究所の日紫喜博士より DENV レプリコン RNA をコードするプラスミドの供与を受けた。プラスミドをトランスフェクションし、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定することにより一過性に増殖した DENV の RNA 量を定量できるシステムである (Kato F et al, Jpn. J. Infect. Dis., 67:209-212, 2014)。このアッセイ系を利用して、N-89 と N-251 の効果を測定した。DENV レプリコン プラスミドをハムスター腎臓由来の BHK-21 細胞にトランスフェクションにより導入し、同時に N-89 などの薬剤も添加した。3 日後に上清中の Gaussia ルシフェラーゼ活性を NEB 社の BioLux Gaussia ルシフェラーゼ アッセイキットにて測定し、N-89 などの抗 DENV 活性を評価した。細胞毒性については、抗 DENV 活性のアッセイスケジュールと同じ期間 N-89 等を添加して、WST-1 アッセイにより測定した。

日本脳炎ウイルス (JEV)

JEV については、獨協医科大学の石川、増田両博士より BHK-21 細胞由来の JEV レプリコン複製細胞 (Ishikawa T et al, Virus Res, 195:153-161, 2015) の供与を受けた。この細胞内の Firefly ルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼアッセイキット (Promega) で測定することにより細胞内で増殖している JEV レプリコン RNA の定量ができるシステムである。このアッセイシステムを利用して、N-89 と N-251 の抗 JEV 活性を測定した。細胞に N-89 等を添加して 3 日後にルシフェラー

ゼ活性を測定した。細胞毒性については、抗 DENV 活性のアッセイスケジュールと同じ期間 N-89 等を添加して、WST-1 アッセイにより測定した。

E 型肝炎ウイルス (HEV)

HEV については、国立感染研究所の石井博士が HEV レプリコン複製細胞を開発していたので、石井博士に N-89 と N-251 の抗 HEV 活性についてアッセイを依頼した。

B 型肝炎ウイルス (HBV)

HBV については、HepG.2.2.15 細胞の培養上清を濃縮して感染性 HBV 粒子を調整し、HBV 受容体である NTCP を発現させた HepG2 細胞 (HepG2/NTCP 細胞) に感染させ、1 日後に培地を交換してその後 8 日間培養して HBV を増殖させた。培養上清中の HBV の DNA レベルを PCR 法により定量することにより HBV の増殖レベルを評価した。N-89 等の薬剤は、感染 1 日後に加えて、感染 9 日目の培養上清中の HBV の DNA レベルの定量により抗 HBV 活性を評価した。HBV の感染から初期の転写までを評価するシステムとして、国立国際医療研究センター研究所の下遠野博士より供与された HBV/NL (HBV 感染後に起こる HBV の RNA の転写量をナノルシフェラーゼ活性を測定することで定量できるレポーターアッセイ) を用いて、N-89 等の抗 HBV 活性を評価した。HBV/NL 感染後の N-89 等の阻害活性を調べるためには、感染 1 日後に N-89 等を培地に添加し、感染 10 日目にナノルシフェラーゼ活性を測定した。N-89 等が HBV/NL 感染を阻害するかどうかを調べるためには、N-89 等を感染前日に添加して、感染 1 日後に除き、感染 4 日後にナノルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) N-89 (N-251) に抵抗性を示す HCV-RNA 複製細胞を用いた抵抗性獲得機序の解析

N-89 (N-251) 抵抗性 HCV-RNA 複製細胞株の樹立

OR6 や ORL8 細胞に N-89 や N-251 を連続的に投与する Step-wise 法により、N-89 に抵抗性を示す OR6 細胞由来の細胞株と N-251 に抵抗性を示す ORL8 細胞由来の細胞株の樹立に成功した。どちらの細胞でも N-89 あるいは N-251 の EC₅₀ 値が 10 倍ほど高くなっていた。また、N-89 に抵抗性を示す細胞は N-251 にも抵抗性を示し、N-251 に抵抗性を示す細胞は N-89 にも抵抗性を示したことから、両化合物の抗 HCV 標的は同じであることが示唆された。

N-89(N-251) に対する抵抗性が宿主とウイルス側のどちらが関与するかの解析

2 種類の HCV-RNA 複製細胞 (親細胞) とそれらの親細胞から得られた N-89 或いは N-251 に抵抗性を示す 2 種類の細胞 (抵抗性細胞) 由来の HCV-RNA を入れ替えた計 8 種類の HCV-RNA 複製細胞を用いて、N-89 や N-251 に対す

る感受性のレベルを定量的に評価した。その結果、抵抗性の細胞由来の治癒細胞を用いて新たに HCV-RNA 複製細胞を作成した場合と抵抗性の細胞由来の Total RNA (HCV-RNA を含む) を用いて新たに HCV RNA 複製細胞を作成した場合で、抵抗性細胞と比較して、N-89 或いは N-251 に対する抵抗性度合いは、いずれも半分ほどになることが分かった。これらの結果から、N-89 や N-251 に対する抵抗性の獲得には、ウイルス側と宿主側の両方の因子が同程度に関与しているという結論が得られた。

N-89(N-251)に抵抗性を示す HCV RNA 複製細胞由来の HCV の遺伝子解析

N-89 や N-251 に抵抗性を示す細胞由来の HCV RNA の塩基配列を感受性の細胞(親細胞)由来のものと比較した。解析した 10 クローン中 2 クローン以上で検出された場合(親細胞からは検出されず)を抵抗性獲得に関与する可能性があるとして判断する基準にした。その結果、抵抗性獲得に関与する可能性のあるアミノ酸置換は 10 カ所(NS3 領域に 1 カ所、NS4A 領域に 1 カ所、NS4B 領域に 2 カ所、NS5A 領域に 4 カ所、NS5B 領域に 2 カ所)となった。今後、これらのアミノ酸置換が N-89 や N-251 抵抗性の獲得に寄与するかどうかを point mutagenesis 法を用いて 1 つ 1 つ検討して行く予定である。

N-89(N-251)感受性細胞(ORL8)と抵抗性細胞(ORL8 由来)を用いた cDNA マイクロアレイ解析

親細胞と抵抗性細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析により抵抗性の獲得に寄与する可能性のある遺伝子候補(抵抗性細胞において 2 倍以上発現が上昇する 22 種類と 1/2 以下に発現が低下する 17 種類)を特定した。これらの遺伝子についても、過剰発現させた場合や siRNA を用いて特異的に発現を抑制させた場合に、N-89(N-251)に対する抵抗性がどう変化するかを、それぞれの遺伝子について今後検討して行く予定である。

(2)HCV 近縁 RNA ウイルスや肝炎ウイルスに対する N-89 (N-251) の抗ウイルス活性評価

HCV 近縁のフラビウイルスであるデング熱ウイルス(DENV)と日本脳炎ウイルス(JEV)、肝炎ウイルスで HCV 同様 RNA ウイルスである E 型肝炎ウイルス(HEV)と DNA ウイルスである B 型肝炎ウイルス(HBV)の 4 種類のウイルスに対する N-89 と N-251 の抗ウイルス活性を評価した。その結果を以下に示す。

デング熱ウイルス(DENV)

N-89(細胞毒性が認められる 2.5 μ M まで)と N-251(細胞毒性が認められる 5 μ M まで)には、抗 DENV 活性はまったく観察されなかった。N-89 と N-251 は DENV のゲノム複製を阻害しないことが分かった。

日本脳炎ウイルス(JEV)

N-89 と N-251 について、それぞれ 20 μ M 細胞増殖が 50%程度抑制かかる濃度)までの濃度範囲で抗 JEV 活性を評価した。その結果、N-89 と N-251 に弱いながらも抗 JEV 活性を有することが分かった。50%阻害濃度(EC50 値)は N-89 で 14 μ M、N-251 で 15 μ M であった。但し、HCV に対する N-89 や N-251 の EC50 値は 50 nM~1 μ M の間であることから、HCV と比較すると、1 桁以上弱い抗ウイルス活性であることが分かった。

E 型肝炎ウイルス(HEV)

N-89 と N-251 について、それぞれ 4, 20, 100 μ M の濃度で抗 HEV 活性を評価した。その結果、N-89 では 20 μ M 程度で 50%阻害されること、N-251 では 4 μ M ではほとんど阻害されないが、20 μ M 程度でほぼ 100%阻害されることが分かった。20 μ M までの濃度での細胞毒性はほとんど認められなかった。これらの結果から、N-89 の EC₅₀ 値は 20 μ M 程度で、N-251 については、4~20 μ M 程度となり、やはり HEV についても、抗 HCV 活性に比較すると、1 桁以上弱い抗ウイルス活性であることが分かった。

B 型肝炎ウイルス(HBV)

HBV を感染させた HepG2/NTCP 細胞を用いて、HBV の増殖に対する N-89 と N-251 の効果を調べた。その結果、N-89 と N-251 に抗 HBV 活性が検出され、EC₅₀ 値は、それぞれ 3.2 μ M と 1.9 μ M であった。これらの値は、抗 HCV 活性の EC₅₀ 値よりは高いものの、HBV の DNA ゲノムの複製を阻害する可能性が高いことが分かった。この実験と並行して、HBV/NL を用いて、HBV 感染に対する阻害効果についても検討した。その結果、N-89 は 10 μ M 程度で、そして N-251 は 20 μ M 程度で HBV の感染も 50%ほど阻害することが分かった。しかし、HBV 感染後起こる初期の転写による HBV の RNA 産生についてはまったく阻害しなかった。以上の結果、N-89 や N-251 は 10 μ M 以上の高濃度になると HBV の感染を阻害するが、主な抗 HBV 活性は感染後に起こる HBV の DNA ゲノムの複製以降の段階に作用するためであることが示唆された。HBV の生活環のどの段階かを特定するためには、更なる解析が必要である。

以上の結果から、N-89 と N-251 の抗ウイルス活性は、HCV に対して最も強く、HBV、HEV あるいは JEV の順番で DENV にはまったく効果がないことが分かった。このように、N-89 や N-251 が HCV にだけ効果があるという結果ではなかったことは、それぞれのウイルスの増殖に利用されている宿主因子に一部共通性があるのではないかと予想される。この点については、更なる解析が必要である。一方、N-89 や N-251 抵抗性獲得に必要な因子が同定されれば、その答えが導き出される可能性もある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ueda Y, Dansako H, Sato S, Kim HS, Wataya Y, Doi H, Ikeda M, Kato N、Evaluation of preclinical antimalarial drugs, which can overcome direct-acting antivirals-resistant hepatitis C viruses, using the viral reporter assay systems、Virus Res、査読有、235 巻、2017、37-48
DOI: 10.1016/j.virusres.2017.03.015.

Nitta S, Asahina Y, Matsuda M, Yamada N, Sugiyama R, Masaki T, Suzuki R, Kato N, Watanabe M, Wakita T, Kato T、Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents、Sci Rep、査読有、6 巻、2016、34652
DOI: 10.1038/srep34652.

Sejima H, Satoh S, Dansako H, Honda M, Kaneko S, Ikeda M, Kato N、Molecular mechanism underlying the suppression of CPB2 expression caused by persistent hepatitis C virus RNA replication、Acta Med Okayama、査読有、70 巻、2016、75-88
http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/70_2_75.pdf

〔学会発表〕(計 5 件)

Gu W, Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Kato N、Both host and viral factors contribute to the resistance to preclinical anti-HCV drugs, N-89 and N-251、The 64th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology、2016 年 10 月 23-25 日、札幌コンベンションセンター (札幌)

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Kato N、Genetic characterization of HCVs obtained from HCV-RNA-replicating cells possessing a DAA-, N-89-, or N-251-resistant phenotype. The 64th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology、2016 年 10 月 23-25 日、札幌コンベンションセンター (札幌)

上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之、DAA 製剤による HCV 治療における N-89/N-251 の有用性とそれらの作用機序の解析、第 26 回抗ウイルス療法学会総会、2016 年 5 月 13-15 日、名古屋市立大学 (名古屋)

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Kim HS, Doi

H, Wataya Y, Ikeda M, Kato N、Antimalarial preclinical drugs, N-89 and N-251, overcome various DAAs-resistant HCVs、The 63th Annual Meeting of The Japanese Society for Virology、2015 年 11 月 22-24 日、福岡国際会議場 (福岡)

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Kim H-S, Doi H, Wataya Y, Ikeda M, Kato N、Antimalarial preclinical drugs, N-89 and N-251, overcome various DAAs-resistant HCVs、22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses、2015 年 10 月 9-13 日、Strasbourg (France)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/research-HCV.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 宣之 (KATO Nobuyuki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40150883

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし