

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08940

研究課題名(和文) 広域スペクトル活性を有する高病原性ウイルス感染症治療薬の開発

研究課題名(英文) Study for broad-spectrum antiviral agents against highly pathogenic viral infections

研究代表者

大黒 徹 (Daikoku, Tohru)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：80291409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイドのヒトコロナウイルス229E株(HCoV-229E)に対する増殖抑制効果を検討したところ、フラボン類、フラバノン類に比べ、イソフラボン類に高い抗コロナウイルス活性を有する物があることを明らかにした。なかでも7位のOH基を有するダイゼインやゲニステイン、フォルモノネチンが特に効果が高く、これらのHCoV-229Eに対する50%ブランク抑制濃度はファビピラビルのそれと同等かそれ以下であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファビピラビルはウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼを阻害するため、多くのRNAウイルスの増殖を阻害する。今回、新型コロナウイルスの突然の流行によりファビピラビルの治験等も行われたが承認には至らず、抗ウイルス薬の承認にも時間がかかり社会的にも大変な混乱が生じた。一方で、フラボノイドのトリシンがDNAウイルスにもRNAウイルスにも抗ウイルス活性を持つことと、それが宿主のCDK9を標的としていることを明らかにしてきた。高病原性ウイルス感染症に対する広域スペクトルを有する物質の発見が熱望されていたため、天然物由来のフラボノイドに着目し抗コロナウイルス活性を有する物質を探索することとした。

研究成果の概要(英文)：We founded that isoflavones have higher anti-coronavirus activity than flavones and flavanones, when we examined the growth inhibitory effect of flavonoids on the human coronavirus strain 229E (HCoV-229E). Among them, daidzein, genistein, and formononetin, which have an OH group at the 7-position, were particularly effective, and their 50% plaque inhibition concentrations against HCoV-229E were equal to or lower than that of favipiravir.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コロナウイルス フラボノイド 抗ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ファビピラビルは、抗インフルエンザウイルス薬として承認されたが、RNA ウイルスに広く効果を示す。そこでファビピラビルとその誘導体で、他の RNA ウイルスにどの誘導体が最も効果が高いかを検討した。実験にはポリオウイルスを使用し、薬剤はファビピラビルの6位のフッ素を水素、塩素、臭素に置換した誘導体を用いた。インフルエンザウイルスでは、ファビピラビルの6位のフッ素を水素置換した誘導体の方が効果が高いという報告があるが、ポリオウイルスでは、ファビピラビルが最も高い抗ウイルス効果を示し、塩素置換、臭素置換体は効果が低かった。ファビピラビルやその誘導体の抗ウイルス効果はウイルスの種類によって異なると思われる。

2019年に新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)による感染症(COVID-19)が発生し、世界的なパンデミックになった。当時は SARS-CoV-2 に有効な抗ウイルス剤が開発されていなかったため、広く RNA ウイルスに効果が期待できるファビピラビルや、天然物由来のフラボノイド等でヒトコロナウイルスに対する抗ウイルス効果を調べる必要があった。

2. 研究の目的

ヒトに感染するコロナウイルス(HCoV)として、通常の風邪症候群の原因となる 229E 株、OC43 株、NL63 株、HKU1 株の合計 4 株と、高病原性で知られている SARS-CoV、SMERS-CoV の計 6 種類だったところに、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 が新たに加わった。今回、大豆やクズに含まれる天然物由来のフラボノイドや、化学合成したフラボノイドの抗ウイルス効果を明らかにすることと新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) が持つプロテアーゼを阻害する効果のあるフラボノイドを見つけ出すことを目的としている。

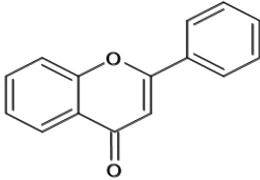
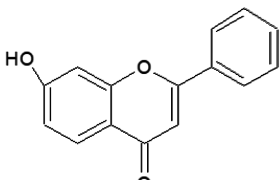
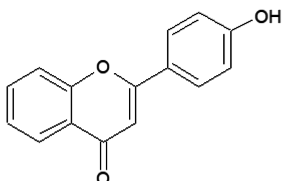
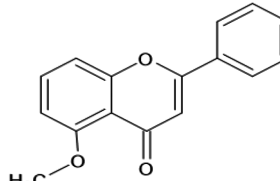
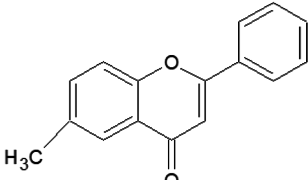
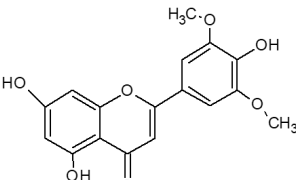
3. 研究の方法

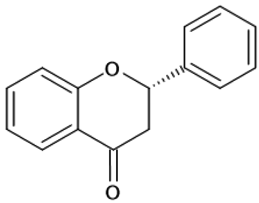
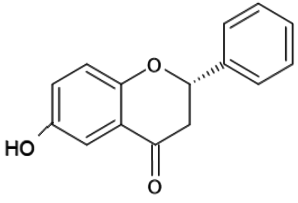
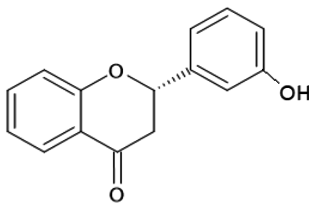
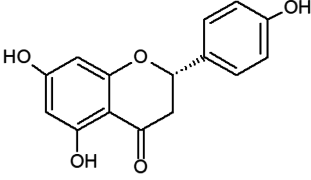
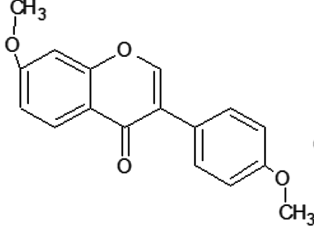
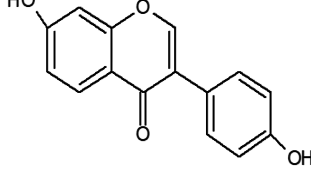
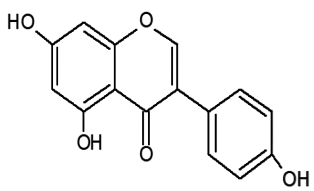
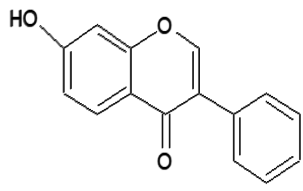
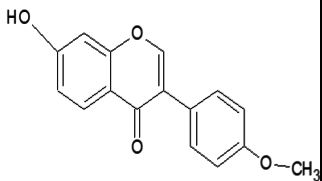
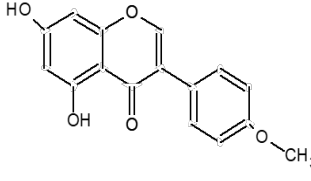
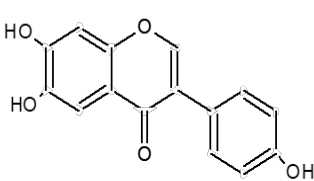
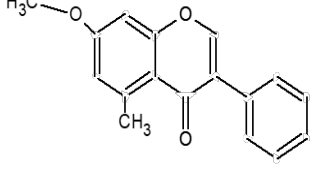
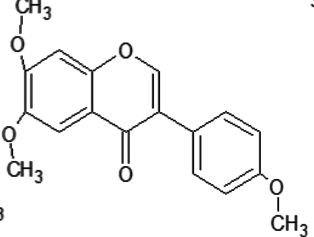
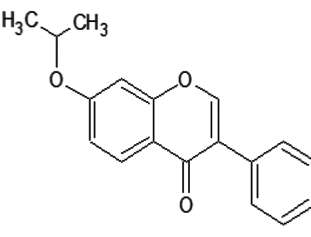
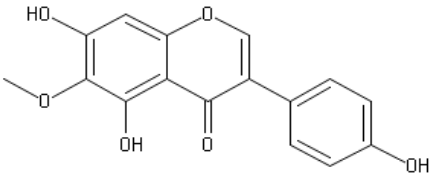
【材料】ウイルスは HCoV-229E 株 (ATCC VR740)、細胞は高分化型ヒト肝癌由来 (Huh-7) 細胞株、培地はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ウシ胎児血清 (FBS)、メチルセルロース (MC) を用いた。本研究では、細胞培養用の 10%量の FBS を添加した DMEM 培地を用いた。また、プラーク減少法では MC を添加した DMEM 培地を用いた。

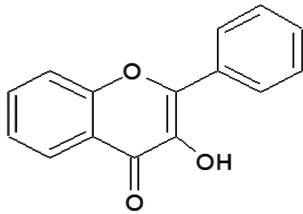
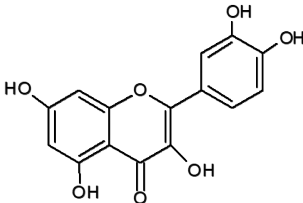
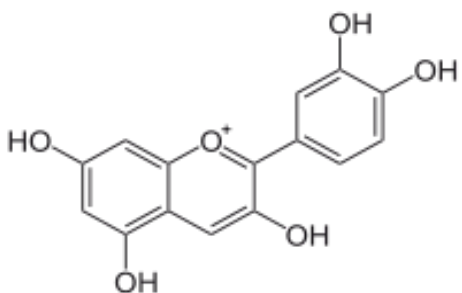
【試薬】

天然物に含まれるフラボノイドにおいて薬理作用が挙げられたものを数種類選び、東京化成工業株式会社 (東京都) から購入した。また、SARS-CoV がもつ 3CL プロテアーゼをフラボノイドが阻害するという論文から比較のためにプロテアーゼ阻害薬のカルパインインヒビター II を用いた。

Table 1 使用したフラボノイドの一覧

フラボ ノ ン	Flavone		7-Hydroxy flavone	
	4'-Hydroxy flavone		5-Methoxy flavone	
	6-Methyl flavone		Tricin	

フラバノン	Flavanone		6-Hydroxy flavanone	
	3'-Hydroxy flavanone		Naringenin	
イソフラボン	4',7-Dimethoxy isoflavone		4',7-Dihydroxy isoflavone	
	4',5,7-Trihydroxy isoflavone		7-Hydroxy Isoflavone	
イソフラボン	Formononetin		BiochaninA	
	4',6,7-Trihydroxy Isoflavone		7-Methoxy-5-methylisoflavone	
	4',6,7-Trimethoxy isoflavone		Ipriflavone	
	Tectorigenin			

フラボノール	3-Hydroxy flavone		Quercetin	
アントシアニン	Cyanidin			

上記の使用したフラボノイドを DMSO に溶かし、96 well プレートを使用したスクリーニングでは DMEM に溶かし濃度を 100 μM とし抗ウイルス効果かどうかを検討した後、効果が認められたものに関しては MC を添加した DMEM に濃度を变化させたフラボノイドを加え、プラーク減少法において抗ウイルス効果の判定を行った。

【実験方法】スクリーニングでは、96 well plate に Huh-7 細胞を撒き、10% FBS 含有 DMEM 培地を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 の条件下でコンフルエントになるまで培養したものをを用いた。また、プラーク減少法では 6 well plate に Huh-7 細胞を撒き、10% FBS 含有 DMEM 培地を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 の条件下でコンフルエントになるまで培養したものをを用いた。

細胞変性効果による抗コロナウイルス効果のスクリーニング

96 well plate に Huh-7 細胞を撒き、単層培養できていることを確認後、ウイルスを 10 倍ずつ希釈して細胞に感染させた。その後、フラボノイド (100 μM) を混ぜた培地を加えた。7 日間培養し、細胞変性効果 (CPE) が十分に確認出来たら、ホルマリンで 1 日間固定し、メチレンブルーで染色した後乾燥させた。CPE を起こしている well を数えた。

プラーク減少法による 50% 阻害濃度の算出

6well plate に Huh-7 細胞を撒き、単層培養できていることを確認し、ウイルスを 1000 倍希釈し細胞に感染させ、低濃度から高濃度までフラボノイドの濃度を变化させたメチルセルロースを加えた。5 日後、細胞をホルマリンで 1 日間固定し、メチレンブルーで染色、乾燥させた後、プラーク数の計測を行った。このプラーク法により得られた値からそれぞれのフラボノイドに対する IC_{50} を計測した。

4. 研究成果

細胞変性効果による抗ヒトコロナウイルス効果のスクリーニング

フラボノイドにおけるウイルス効果のスクリーニングの結果を示す。6 回ずつ結果を求めて CPE を数値で表したものである。抗ウイルス効果が強いものは++、弱い抗ウイルス効果があるものは+、抗ウイルス効果が見られなかったものは-、細胞毒性が見られたものは*とした。

Table 2 フラボノイドの抗ウイルス効果のスクリーニングの結果

フラボノイド名	抗ウイルス効果
Flavone	+
3-Hydroxyflavone	-
7-Hydroxyflavone	+
4-Hydroxyflavone	+
5-Methoxyflavone	+
6-Methylflavone	+
Flavanone	+
6-Hydroxyflavanone	+
3'-Hydroxyflavanone	+
4',5,7-Trihydroxyisoflavanone (Naringenin)	+
4',7-Dimethoxyisoflavone	++
4',7-Dihydroxyisoflavone (Daidzein)	++
4',5,7-Trihydroxyisoflavone (Genistein)	++
Tricin	±
Cyanidin	-
7-Hydroxyisoflavone	++
7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone (Formononetin)	+
BiochaninA	-*
7-Methoxy-5-methylisoflavone	±
4',6,7-Trihydroxyisoflavone	-*
4',6,7-Trimethylisoflavone	-
Ipriflavone	±
3-Phenylumbelliferone	-*
Tectorigenin	-*
Quercetin	-*

抗ヒトコロナウイルス効果が見られたフラボノイドについてプラーク減少法により IC₅₀ を求めた。プラーク減少法を行った 11 個のフラボノイドのうち、IC₅₀ の値が低い順に 3 個のフラボノイドについての IC₅₀ を求めた。Table3 ではその他の 8 個のフラボノイドの IC₅₀ を求めた。

Table 3 プラーク減少法を行ったフラボノイドの IC₅₀ 値

骨格	フラボノイド名	IC ₅₀ (μM)
フラボン骨格	Flavone	17.0 ± 1.34
	5-Methoxyflavone	13.2 ± 2.16
	7-Hydroxyflavone	17.4 ± 10.15
フラバノン骨格	Flavanone	37.3 ± 6.03
	4',5,7-Trihydroxyflavanone (Naringenin)	34.5 ± 0.58
イソフラボン骨格	4',7-Dimethoxyisoflavone	2.6 ± 0.2
	7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavone (Formononetin)	6.6 ± 0.55
	4',5,7-Trihydroxyisoflavone (Genistein)	10.7 ± 5.91
	7-Hydroxyisoflavone	17.3 ± 8.08
	4',7-Dihydroxyisoflavone	13.6 ± 5.72
	7-Methoxy-5-methylisoflavone	17.9 ± 1.62

Table3 より、フラボノイドのそれぞれの骨格においてフラボン骨格は IC₅₀ が 10 μM 台に対しフラバノン骨格は 30 μM 台であった。また、イソフラボン骨格は 2 μM~10 μM 台であった。上記の結果より、4',7-Dimethoxyisoflavone が 2.6 ± 0.2 μM と今回最も抗ヒトコロナウイルス効果が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kimiyasu Shiraki, Masaya Takemoto, Tohru Daikoku	4. 巻 19
2. 論文標題 Emergence of varicella-zoster virus resistance to acyclovir: epidemiology, prevention, and treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Expert Review of Anti-infective Therapy	6. 最初と最後の頁 1415-1425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14787210.2021.1917992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiraki Kimiyasu, Tan Long, Daikoku Tohru, Takemoto Masaya, Sato Noriaki, Yoshida Yoshihiro	4. 巻 180
2. 論文標題 Viral ribonucleotide reductase attenuates the anti-herpes activity of acyclovir in contrast to amenamevir	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 104829 ~ 104829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2020.104829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohmoto Masanori, Shibuya Yukina, Taniguchi Shihori, Nakade Tomoki, Nomura Masaaki, Ikeda-Matsuo Yuri, Daikoku Tohru	4. 巻 8
2. 論文標題 Protective effects of butein on corticosterone-induced cytotoxicity in Neuro2A cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 82 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibror.2020.02.002	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 -
1. 著者名 Shiraki Kimiyasu, Daikoku Tohru	4. 巻 209
2. 論文標題 Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107512 ~ 107512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2020.107512	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 -

1. 著者名 T Daikoku, T Okuda, M Kawai, N Morita, T Tanaka, M Takemoto, Y Fukuda, K Takahashi, N Nomura, K Shiraki	4. 巻 63
2. 論文標題 Growth Activation of Influenza Virus by Trypsin and Effect of T-705 (Favipiravir) on Trypsin-Optimized Growth Condition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Virology	6. 最初と最後の頁 309-315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4149/av_2019_311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅田実希、酒井隆季、南有紗、南志帆、鈴木史奈子、石田ゆかり、武本眞清、大黒徹
2. 発表標題 ヒトコロナウイルスに対するファビピラビル誘導体とフラボノイドによる抗ウイルス効果
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 ゆかり、酒井 隆季、梅田 実希、武 本 眞清、大黒 徹
2. 発表標題 ヒトコロナウイルスに対する抗ウイルス 効果を持つフラボノイドの探索
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 史奈子、南 志帆、梅田 実希、武本 眞清、大黒 徹
2. 発表標題 ヒトコロナウイルスに対する種々の薬剤 による抗ウイルス効果
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大黒 徹、南 有紗、梅田 実希、武本 眞清、尾形 篤太郎
2. 発表標題 ファビピラビルの構造を基にした抗ヒトコロナウイルス活性を有する化合物の探索
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 興村桂子、白鳥汰麻子、沢田敦也、勝井智菜実、大黒 徹
2. 発表標題 Myticalin A6(3-23)-OHのC-末端アミド化誘導体類の抗菌活性検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田実希、藤本和宏、亀井 敬、鎌田一希、前崎将人、野田佳加、武本眞清、定成秀貴、村山次哉、大黒 徹
2. 発表標題 ポリオウイルスに対するファビピラビルとその誘導体の効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田実希、佐藤好隆、木村 宏、大黒 徹
2. 発表標題 EBウイルスの後期遺伝子の転写を抑制するCDK阻害剤はHCMVの転写も抑制する
3. 学会等名 第59回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大黒 徹
2. 発表標題 抗ウイルス薬の研究と薬剤耐性ウイルスの遺伝子解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部131回例会（招待講演）
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