

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16020

研究課題名（和文）脂肪酸合成経路阻害剤MK-8245による抗パラミクソウイルス戦略の開発

研究課題名（英文）Development of anti-paramyxovirus strategies using MK-8245, inhibitor for fatty acid synthesis pathway

研究代表者

加藤 文博 (Kato, Fumihiro)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：40740816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：新規パラミクソウイルス薬開発のため、広くウイルス複製に関わるとされている脂肪酸合成経路に着目し、同経路の阻害剤であるMK-8245の抗パラミクソウイルス活性を評価した。ムンプスウイルスに対し、他のウイルスに比して阻害活性は低いことが明らかになった。緑色蛍光蛋白質発現ムンプスウイルスを用いた、化合物スクリーニングを行ったところ、レチノイド受容体アゴニストであるCD437が高い抗ウイルス活性を示すことが明らかになった。またCD437は、従来考えられている経路ではない機序で抗ウイルス活性を示し、作用点としてウイルス粒子形成糖の後期過程を阻害している化合物であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広くウイルス複製に関わっているとされている脂肪酸合成経路は、パラミクソウイルスの一つであるムンプスウイルスに若干関与しているが、主たる因子ではないことが明らかになった。一方、高い抗ウイルス活性を示すCD437を見だし、将来的な抗ウイルス薬候補として評価しただけではなく、従来考えられていた機序ではない新たなメカニズムの存在を明らかにした。また、抗ウイルス活性作用点として、複製後期過程にあることを明らかにした。本研究は、将来的な抗パラミクソウイルス戦略を推進するための新たな知見を供した。

研究成果の概要（英文）：To develop a new paramyxoviral drug, we focused on the fatty acid synthesis pathway, which is widely believed to be involved in viral replication, and evaluated the anti-paramyxoviral activity of MK-8245, an inhibitor of this pathway. The inhibitory activity against mumps virus was found to be lower than that against other viruses. Compound screening using green fluorescent protein-expressing mumps virus revealed that CD437, a retinoid receptor agonist, showed high antiviral activity. CD437 was also found to exhibit antiviral activity by a mechanism other than the previously considered pathway, and to be a compound that inhibits the late-stage process of viral particle-forming sugar as its point of action.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス ムンプスウイルス 脂肪酸合成経路 CD437 レチノイド受容体 複製後期過程

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス薬の探索・開発は、感染症対策の大きなカギとなるが、パラミクソウイルスに対しては、いまだ上市された抗ウイルス薬はない。このことから、広くパラミクソウイルスに効果がある化合物の探索は重要な研究課題である。また、パラミクソウイルスの複製には他のウイルスと同様に脂肪酸やその合成経路と、深い関係があると考えられるが、その実態は明らかになっていない。

2. 研究の目的

脂肪酸合成経路を阻害することが明らかにできるとともに、他のウイルスに対し非常に強力な抗ウイルス活性を示す MK-8245 を用いて、抗ウイルス薬としての有効性を検討する。さらに、この阻害剤を用いてパラミクソウイルスの複製と脂肪酸やその合成経路との関係を明らかにし、ウイルス増殖のメカニズムを明らかにする。また、MK-8245 だけではなく、さまざまな化合物のライブラリーを用いることで、新規の抗パラミクソウイルス化合物を探索し、化合物の抗ウイルス活性を通しウイルスの複製メカニズムを明らかにする。このように、抗ウイルス薬探索と、ウイルス複製メカニズムの解明という両面から本研究を遂行することを目的とする。

3. 研究の方法

MK-8245の抗ウイルス活性の確認

MuV と MK-8245 と培養細胞で共培養し、培養後のウイルス力価をブランクアッセイ法にて測定することで、抗ウイルス活性を評価する。抗ウイルス活性は最大阻害率および 50%/90% 阻害効果濃度と 50% 細胞毒性濃度を算出し、その比をもって判断する。

パラミクソウイルスにおける作用点の同定

吸着/進入、ウイルスゲノム複製、粒子形成・放出といったウイルス生活環のどの部位に作用点があるかを Time of addition 法をもって解析し、作用点の類推を行う。類推された作用点に関して、特異的な解析法 (VSV を用いた吸着試験、ミニゲノムアッセイ等) を用いて解析し、作用点の同定を行う。

脂肪酸がウイルス複製に与える影響の解析

脂肪酸合成経路の各遺伝子のノックダウンや MK-8245 といった合成経路の阻害剤を用いて、ウイルス複製にどの脂肪酸が関与しているかを明らかにし、その脂肪酸がどのようにウイルス複製に関与しているかを生化学的に性状解析を行い、そのメカニズムを明らかにする。

化合物ライブラリーを用いた新規抗ウイルス化合物の探索。

すでに、基礎的な生理作用が明らかとなっている約 2,500 からなる化合物ライブラリーを用い、MuV に対する抗ウイルス活性を有する化合物のスクリーニングを行う。スクリーニングにおいては、高効率スクリーニングが可能である、GFP を発現する組換えムンプスウイルスを用いる。

パラミクソウイルスにおける抗ウイルス活性の解析

MK-8245 および、MuV において抗ウイルス活性を示した化合物について、同じパラミクソウイルスである RS ウイルスおよびニパウイルスに対しても、抗ウイルス活性を

示すかどうかを解析する。

MuV感染実験動物モデルを用いたIn vivoの抗ウイルス活性の解析

多くの抗ウイルス化合物は In vitro での実験をもとに見いだされているが、In vivo では様々な理由で効果が発揮されないことがある。MK-8245 は既に DENV 研究において In vivo でも効果を発揮することが示されているが、MuV においても In vivo で効果が発揮するかどうかを確認する。MuV においては、新生ラットやコモンマーモセットを用いた有用な動物モデルが開発されており、本研究では主に新生ラットを用いて評価を行う。

4. 研究成果

脂肪酸合成経路がムンプスウイルスの複製に関与しているかを明らかにするとともに、抗ウイルス活性を有し、将来的な抗ウイルス薬候補となりうるかを明らかにするために、MK-8245 の抗ムンプスウイルス活性を評価したところ、若干ながら抗ウイルス活性を発揮することが明らかになった。一方、脂肪酸合成経路がウイルス複製に与える影響が強い他のウイルス(デングウイルスやC型肝炎ウイルス等)と比較して、抗ウイルス活性は低かったことから、ムンプスウイルスにおいて、脂肪酸合成経路は複製に決定的な影響を与えるものではないと考えられる。

また、ミニゲノムアッセイを用いて MK-8245 の作用点の同定を試みた結果、MK-8245 有意にミニゲノムの複製を阻害していたことから、同化合物はウイルス RNA 複製過程を阻害していることが明らかになった。さらに、MK-8245 添加後に脂肪酸を外部から供給することで、若干発揮されていた抗ウイルス活性が消失したことが明らかになった。これらのことから、ムンプスウイルスにおいて脂肪酸合成経路はゲノム複製に関与する可能性が示唆された。

GFP 発現組換えムンプスウイルスを用いて、化合物ライブラリーから新規抗ウイルス薬候補のスクリーニングを行ったところ、複数のヒット化合物が同定された。この中の CD437 は特に高い抗ウイルス活性を示していたことから、より詳細な解析を行った。半数阻害濃度および半数細胞毒性濃度を調べたところ、半数阻害濃度は $0.79\mu\text{M}$ であり、半数細胞毒性濃度は $34.9\mu\text{M}$ であり、将来的な抗ウイルス薬候補として十分な活性を有していることが明らかになった。CD437 は既存の薬理活性として、レチノイド受容体作動薬であることが報告されている。このことから本研究では、構造的な類似性が低い、他のレチノイド受容体作動薬について抗ウイルス活性を評価したところ、全く抗ウイルス活性を示さなかったことから、既存の薬理活性とは異なる作用機序が CD437 において抗ウイルス活性に関与している可能性が示唆された。また、レチノイド受容体作動後の下流因子である RIG-I をロックアウトさせた細胞において、CD437 の抗ウイルス活性を調べたところ、抗ウイルス活性の減弱等が見られなかったことから、CD437 の抗ウイルス活性はレチノイド受容体やその下流経路に関係しないことが明らかになった。次に、CD437 の抗ウイルス活性作用点を明らかにするために、Time of addition 法とミニゲノム法にて評価したところ、ミニゲノム法ではほとんど阻害活性が見られず、Time of addition 法では、後期過程において作用点があることが推定された。このことから、一回感染時における抗ウイルス活性を調べたところ、細胞内での RNA 量にはほとんど影響を与えず、一方で、細胞外への感染性ウイルス粒子数が有意に減少していたことから、CD437 はウイルス粒子形成や放出といった感染後期過程に作用点があることが明らかに

なった。

本研究により、ムンプスウイルスにおいて、脂肪酸合成経路が若干ながらウイルスゲノム複製に関与する可能性があることが明らかになった他、従来のレチノイド受容体関連因子によらない新たなウイルス粒子形成や放出に関わる機構の存在があることが示された。また、この機構を用いた高い抗ウイルス活性を有する阻害剤が同定されたことから、将来的な創薬にもつながる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kato Fumihito, Nakatsu Yuichiro, Murano Keiko, Wakata Aika, Kubota Toru, Hishiki Takayuki, Yamaji Toshiyuki, Kidokoro Minoru, Katoh Hiroshi, Takeda Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Antiviral Activity of CD437 Against Mumps Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 751909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.751909	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 Kato Fumihito, Matsuyama Shutoku, Kawase Miyuki, Hishiki Takayuki, Katoh Hiroshi, Takeda Makoto	4. 巻 64
2. 論文標題 Antiviral activities of mycophenolic acid and IMD 0354 against SARS CoV 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12828	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0件

〔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
---------	---------