

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05433

研究課題名(和文)食品由来成分によるウイルス感染症抑制機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on viral inhibitory effects of food ingredients.

研究代表者

矢野 明 (Yano, Akira)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究部長

研究者番号：50312286

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)：新型コロナウイルス感染症の抑制作用を有する農林水産物の探索を行い、ウイルスの受容体結合および感染を抑制する「甘茶」を見出し、イソクマリン類「hydrangenol」と「phylodulcin」を阻害成分として同定した。SARS-CoV-2のSpikeを発現させた偽レンチウイルスによる培養細胞感染実験により、50%感染阻止濃度は、hydrangenolは103、phylodulcinは147 マイクロモラーであった。感染時にみられるIL-6過剰発現をHeLa細胞モデルで評価し、「食用ほおずき」の葉に含まれる「Withanolide E」が65 nMで50%阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甘茶は和製生薬として岩手県九戸村等で生産されてきたが、生産者の高齢化により産地衰退の危機に直面している。甘茶に新型コロナウイルス感染抑制作用が見込まれることが明らかになったことで、産地活性化につながった。学術的にはイソクマリンのウイルス感染抑制作用は新規知見であり、これら天然物をシードとした新規薬剤開発の可能性が示唆される。食用ほおずきは、ゴールデンベリーとして欧米等での利用が盛んであるが、葉や茎は廃棄されており、その活用が求められている。葉抽出物にIL-6過剰発現を抑制する強い活性と有効成分withanolidesが見出されたことで、廃棄物の活用に向けた開発が可能となった。

研究成果の概要(英文)： We tried to identify the agricultural, forestry and marine products with inhibitory activity against COVID-19, and found 'Amacha = Japanese sweet tea' that inhibit virus receptor binding and infection, and identified the isocoumarins (hydrangenol and phylodulcin) as inhibitory components. In culture cell infection experiments with the SARS-CoV-2 Spike expressing lentivirus, the 50% infection-inhibitory concentration of hydrangenol was 103 micro moller and that of phylodulcin was 147 micro moller. IL-6 overexpression seen during infection was assessed by the HeLa cell model and found 'Withanolide E' from leaves of Physalis peruviana with IC50 = 65 nM.

研究分野：食品機能

キーワード：hydrangenol phylodulcin withanolide E 4b-hydroxywithanolide E SARS-CoV-2 ACE2 IL-6 amplification

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究課題を開始した2021年4月、新型コロナウイルスのパンデミックが発生して約1年が経過していた。日本では医療関係者を優先したワクチン接種が始まったばかりで、一般の人々はマスクをしてアルコール消毒を頻繁に行い、人混みを作らないように制限された社会生活を送っていた。欧米では死体処理が問題になる程感染が広がっていたが、日本では死者数が9,000人台に止まっており、同調的な社会行動による感染抑制が功を奏していると示唆されていた。

感染症に対する研究開発は、欧米や中国、ロシアまでもが独自のワクチンを開発し接種を進める中、日本では国産ワクチン開発に向け、大手製薬企業や、ベンチャー企業が名乗りをあげた段階にあった。国内の動きは鈍いものの多額の予算を投入した治療薬開発は各国で始まっており、既存の抗ウイルス剤の転用に向けた臨床試験や、ウイルスの中和抗体を製剤化する抗体医薬開発が進められていた。日本に限った事ではないが、パンデミック以前、感染症は過去の疾病と言われ非感染性疾患を対象とした研究が大半を占めており、感染症研究の脆弱性が明らかとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、新型コロナウイルス感染症を対象に、農林水産物が有する感染症抑制成分を単離・同定することを主な目的とした。20世紀前半に抗生剤やワクチンが普及する以前は、感染症は身近な疾病であり、栄養と休養などの生活習慣の調整により“強い体”を作ることが重視されていた。そこには食の機能の関与が示唆され、感冒に対抗する民間療法には、自然免疫の働きを高める工夫が見られる。体を温めるネギや生姜、滋養強壮効果を有する梅干しやニンニクなど、現在では、ショウガオール、クエン酸、アリシンなどの各機能に対応する成分をあげることが可能となっている。同様に、新型コロナウイルスの感染を阻害する素材と有効成分を、様々な農林水産物から特定することができれば、薬品ほどではないが多少は感染リスクの低減が可能であり、特に高齢者など重症化リスクの高い人にとって、有効なツールを提供できる。感染による重症化は、肺などにおける過剰な炎症反応が引き起こすことが知られており、炎症を抑制する素材と有効成分が特定できれば、感染後の発症リスク低減や、治療予後の回復期間短縮ができる可能性もある。

パンデミック下において、(ワクチン接種は最善の能動的予防手段であるが)マスクと消毒などウイルスを寄せ付けないための受動的な対処法に頼る状況下から、食による積極的なリスク低減手法の提供につながる基礎研究成果の提示も目的の一つであった。

3. 研究の方法

我々は、主に北東北から収集した農林水産物を対象に、メタノールおよびヘキサンで抽出したエキスを集めたライブラリーを構築していた。研究開始当初は300種程度であったが、2024年3月時点では、農林水産物500種以上から抽出物1,000種以上を有する抽出物ライブラリーに拡充している。この抽出物ライブラリーをシーズとして、ウイルス感染を阻害する素材および有効成分、感染の重症化を抑制する素材および有効成分の探索を行った。SARS に対する基礎知見の蓄積から、SARS-CoV-2 は、ウイルス表面を覆う Spike タンパク質が受容体 ACE2 と結合し、細胞表面に露出するプロテアーゼ TMPRSS2 による分解を経て膜融合を起こして細胞内に侵入することが明らかとなっていた (doi: 10.1038/s41586-020-2368-8 等)。そこで、1) Spike と ACE2 のタンパク質間結合を ELISA 法により評価する系を用いて、ライブラリーの農産物を中心とした抽出物 100 以上を対象にスクリーニングを実施した。その際、主に2つのタイプの ELISA、Spike 側への作用を評価可能な Type 1、ACE2 側への作用を評価可能な Type 2 の2種の試験系を構築して使用した。ポジティブコントロールとして、既に一部の研究室からウイルス感染抑制活性が報告されていた緑茶カテキン EGCg を用いた。EGCg はウイルスの中和活性が報告されており、Spike への結合が示唆されている (doi:10.3390/molecules26123572)。本研究では、EGCg を上回る阻害成分の探索を目指した。さらに単離した成分については、SARS-CoV-2 Spike を発現させたシュードレンチウイルスを用い、培養細胞への感染阻害効果を評価した。

次に、ウイルスの感染(細胞内侵入)に関わる2) TMPRSS2 活性阻害成分の探索を行った。当初 TMPRSS2 を大腸菌で生産した既報に従い評価系構築を試みたが、最終的にメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* により生産した TMPRSS2 を用いた評価を行った。

また感染による重症化の原因として過剰な免疫応答(サイトカインストーム)が肺等の組織において発生していることが報告されていた。サイトカインストームは、主に炎症性サイトカイン IL-6 の過剰分泌により起こり、抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブの臨床効果が高いことも明らかとなっていた (doi: 10.1073/pnas.2010229117 等)。炎症組織から分泌された IL-6 は、オートクリンに自身の発現を促すことから、炎症アンブとも表現される。新型コロナウイルス感染症の重症化以外にも、自己免疫疾患等における炎症アンブが報告されており、メカニズムとして IL-17

と他の炎症性サイトカイン (TNF- α 等) が組織から IL-6 を自己増幅的に分泌させることが示唆されていた。我々は、上皮様細胞の HeLa 細胞を用い、IL-17 と TNF- α で刺激することにより、3) IL-6 の過剰発現を誘発する系を構築し、これを抑制する素材と成分の同定を試みた。

4. 研究成果

1) Spike-ACE2 結合阻害成分の探索

主に農産物を中心に 100 素材以上を評価し、Spike-ACE2 結合を阻害する食品として「甘茶」を特定した。甘茶は和製生薬として日本薬局法に記載されており、強い甘味を示す口腔清涼成分として、あるいは糖尿病改善などの効果が期待される飲料向け素材として知られる。甘茶の含水メタノール抽出物から、各種クロマトグラフィーにより複数の活性画分を見出し、そのうちの一つの有効成分を naringenin と同定した。Naringenin は感染阻害成分として既報があり、本スクリーニングの有効性が示された。さらに分画を行い、甘茶特有の Spike-ACE2 結合阻害成分として、イソクマリン (hydrangenol および phyllodulcin) を同定した (図 1)。結合阻害活性について、Spike 側への作用を評価する Type 1 の ELISA では、緑茶カテキン EGCg の 50%阻害濃度 (IC_{50}) が 397 μ M であったのに対し、naringenin 1,180 μ M、phyllodulcin 785 μ M を示した。hydrangenol は沈殿を生じたため、測定できなかった。ACE2 側への作用を評価する Type 2 の ELISA では、EGCg では効果は見られず、それ以外の成分の IC_{50} 値は、naringenin 774 μ M、hydrangenol 226 μ M、phyllodulcin 612 μ M となった (表 1)。このことから、EGCg がウイルス側に作用して ACE2 への感染を阻害するのに対し、甘茶成分は、特に hydrangenol は EGCg よりも低濃度で ACE2 に作用することで、Spike-ACE2 結合を阻害することが示唆された。ウイルスの Spike 配列は変異することが明らかとなっており、ウイルス側の抑制成分は無効になる可能性があるが、ACE2 側に作用する成分はウイルスの変異にも対応可能であると考えられる。厚労省は飲料用甘茶を「茶葉 0.2~0.3%(w/v)をお湯で 3 分抽出する」淹れ方を推奨しており、この手順で作製した熱水抽出物の結合阻害活性を ELISA で評価した。すると、Type 1 で 41%、Type 2 で 57%結合を阻害することが示された (表 2)。これらの成果は、2023 年に論文化している (Yano et al. Biosci Biotechnol Biochem 2023;87:1045-1055.)。

Hydrangenol と phyllodulcin をサブグラムスケールで精製し、偽レンチウイルス系を用いて感染阻害活性を評価した。武漢型と omicron 型の Spike を発現したウイルスを用い、 IC_{50} を算出したところ、武漢型では hydrangenol 103 μ M、phyllodulcin 147 μ M、omicron 型では hydrangenol 144 μ M、phyllodulcin 192 μ M であった。ともに飲料用甘茶に含有される濃度と同等の数値であり、甘茶飲料を適宜飲む、あるいは甘茶飲料でうがいを等により、感染のリスクを低減できる可能性が示唆された。

2) TMPRSS2 活性阻害成分の探索

100 種以上の素材について、TMPRSS2 活性の阻害効果の評価し、多数の素材に阻害効果が確認された。各素材のポリフェノール量を測定した結果、概ね TMPRSS2 の阻害活性と相関が得られたことから、ポリフェノールによる非特異的な酵素活性の阻害と判断し、個々の有効成分探索は実施しなかった。

3) IL-6 過剰発現の阻害成分探索

1)2)と同様に 100 種以上の素材を評価した結果、オカワカメ、ノカンゾウ、ハリギリなど特徴的な素材に阻害活性を見出した。中でも特に強力な IL-6 発現抑制効果を示したのが食用ほおずき (Golden berry = *Physalis peruviana*) の葉であった。食用ほおずきは、栄養価の高いスーパーフードとして近年欧米で人気が高く、日本でも栽培が増えつつある。しかし、バイオマスの大半を占める葉や茎は廃棄され、有効活用が望まれていた。原産地の南米等では、葉は生薬として用いられていることから、何らかの薬効が示唆されていた。

メタノール抽出物を各種クロマトグラフィーにより分画し、活性画分を精製・分析し、有効成分として 4 β -hydroxywithanolide E (4 β -WE) および withanolide E (WE) を同定した (図 2)。IL-

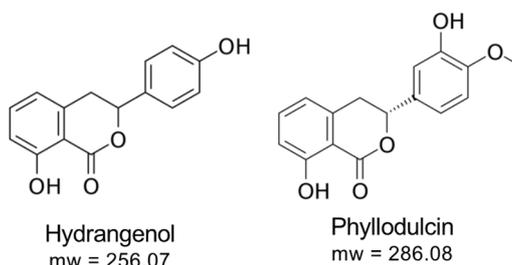


図1 甘茶イソクマリン

表1 甘茶成分の50%Spike-ACE2結合阻害濃度

IC_{50} (μ g/mL)	Hydrangenol	Phyllodulcin	Naringenin
Type 1	> 350	225	321
(μ M)	(>1,500)	(785)	(1,180)
Type 2	57.9	181	211
(μ M)	(226)	(631)	(774)

表2 飲料用甘茶 (0.3%(w/v)熱水抽出物) のSpike-ACE2結合阻害活性

	ELISA法	結合阻害率 (%)
Type 1		41
Type 2		57

6の発現抑制活性(IC_{50})は、4 β -WE 183 nM、WE 65.1 nMで(表3)それぞれ転写レベルで発現を抑制していることが明らかとなった(Yano et al. Biosci Biotechnol Biochem 2023;87:972-980.)

IL-6 過剰発現は、リウマチや炎症性大腸炎などの自己免疫疾患をはじめ、様々な炎症性疾患において報告されている。Withanolide 類はアーユルヴェーダに用いられている植物アシュワガンダの有効成分としても知られており、その炎症抑制機構を明らかにすることで、食用ほおずきの葉を生薬原料として活用することが期待されることから、今後の研究課題としたい。

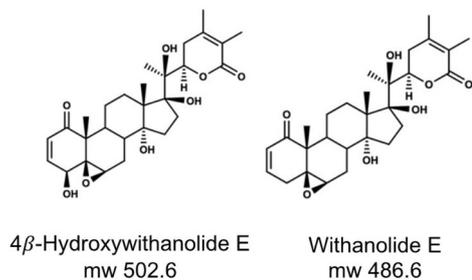


図2 食用ほおずきの抗炎症成分

表3 IL-6発現誘導50%阻害濃度

Sample	IC_{50}
MeOH extract of <i>P. peruviana</i> leaves	4.97 μ g/mL
4 β -Hydroxywithanolide E	0.092 μ g/mL (183 nM)
Withanolide E	0.032 μ g/mL (65.1 nM)
Dexamethasone	2.73 nM

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 0件）

1. 著者名 Yano Akira, Yuki Sayaka, Kanno Yuko, Shiraishi Akiko, Onuma Hiroki, Uesugi Shota	4. 巻 87
2. 論文標題 Dihydroisocoumarins of <i>Hydrangea macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> inhibit binding of the SARS-CoV-2 spike protein to ACE2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad078	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 Yano Akira, Yuki Sayaka, Shiraishi Akiko, Hakozaki Mayuka, Kanno Yuko, Kimura Ken-ichi, Uesugi Shota	4. 巻 87
2. 論文標題 Golden berry leaf extract containing withanolides suppresses TNF- and IL-17 induced IL-6 expression in HeLa Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 972 ~ 980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad070	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 矢野明、結城彩花、菅野裕子、白石朗子、上杉祥太
2. 発表標題 甘茶に含まれるウイルス-受容体結合阻害成分
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野明、結城彩花、上杉祥太、菅野裕子、箱崎真友佳
2. 発表標題 新型コロナウイルススパイクタンパク質と受容体の結合を阻害する食品成分の探索
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野明、上杉祥太、結城彩花、箱崎真友佳、菅野裕子、白石朗子
2. 発表標題 Identification of a cytokine storm inhibitor from a golden berry leaf.
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition in Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野明、結城彩花
2. 発表標題 甘茶飲料が示す新型コロナウイルス抑制活性について
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会東北支部第57回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野明、大石智一、結城彩花
2. 発表標題 甘茶イソクマリン類のウイルス感染阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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
研究 分担者	上杉 祥太 (Uesugi Shota) (30795901)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員 (81202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	福原 和哉 (Fukuhara Kazuya) (70881514)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教 (21401)	
研究分担者	大沼 広宣 (Onuma Hiroki) (90891028)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・研究員 (81202)	

	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
研究協力者	大石 智一 (Ohishi Tomokazu)	公益財団法人微生物化学研究会・第1生物活性研究部・主任研究員 (72801)	

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