

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05957

研究課題名(和文) dsRNAレオウイルスの複製機構の解明から創薬開発への基盤研究

研究課題名(英文) Studies on analysis of replication system on dsRNA virus and development of its drugs

研究代表者

岩田 祐之 (Iwata, Hiroyuki)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：40193750

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)：本研究ではdsRNAレオウイルスの複製機構を解明し、これを阻害する薬剤を探索して創薬開発の一助とすることを目的とした。オルビウイルス(イバラキウイルス)をモデルとして検討したところ、抗ウイルス剤としては細胞内侵入経路であるマクロピノサイトーシスの阻害剤、オートファジーの抑制に必要なmTORCの阻害剤、細胞質内脱出に必要なエンドソーム酸性化阻害剤が候補として上げられた。また、ミトコンドリアの酸化リン酸化阻害剤はウイルス増殖を抑制し、AMP活性化プロテインキナーゼを活性化していた。加えて、AMPK活性化剤であるAICARも候補となることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的はウイルス複製機構を解明し、診断・治療に貢献することであり、中でも研究途上にあるdsRNAウイルスについてオルビウイルスをモデルとして究明する。すなわち、ウイルス複製機構について、最新の知見に基づき、ウイルス侵入経路、エンドソームからの脱出、ウイルス粒子形成・増幅におけるアポトーシス及びオートファジーの関与、から解明することにより、各段階に有効な抗ウイルス薬を探索することを社会的意義と捉えている。ウイルス複製機構の解析には各経路のインヒビターを用いるが、ウイルス増殖抑制効果を示すものは重要な創薬候補となり、増殖促進するものはアンタゴニスト開発の基礎データとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a virus replication system and then novel anti-virus drugs for dsRNA reovirus using orbivirus (Ibarakivirus) as a model. In results, IBAV enters cells via endocytosis and subsequently escapes into the cytoplasm upon endosomal acidification. We found that IBAV replication was not suppressed by inhibitors of clathrin-mediated or caveolin-mediated endocytosis but was markedly suppressed by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) and cytochalasin D, both of which inhibit macropinocytosis. Monensin, which inhibits endosomal acidification, also suppressed IBAV replication. Furthermore, inhibitors of mitochondrial oxidative phosphorylation, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) and antimycin A suppressed IBAV propagation with reduced cellular ATP levels resulting from suppression of ATP synthesis. we identified AMP-activated protein kinase (AMPK), which is activated by CCCP or antimycin A, as a key signaling molecule in IBAV suppression.

研究分野：獣医学

キーワード：レオウイルス ウイルス複製 エンドサイトーシス AMPK 小胞体

1. 研究開始当初の背景

dsRNA レオウイルスには動物では African Horse Sickness、Blue tongue、Epizootic Haemorrhagic Disease などの重要な疾患があるが、人でも Rotavirus、Reovirus などの感染症があり、これまで解明が困難であった複製機構を解明することは本ウイルスの創薬開発にとって重要である。そこで、これまで不明であった次の事項について検討すべきであると考へた。(1)細胞内侵入経路としてどのエンドサイトーシス経路を利用しているか？(2)エンドソームからの細胞質内への脱出に酸性化が必要か？(3)ウイルス増殖にオートファジーやアポトーシス経路を利用しているか？(4)ウイルス複製は小胞体ストレスの影響を受けるのか？

これらのウイルス複製機構の各経路のインヒビターのうち、ウイルス増殖抑制効果を示すものが創薬の候補となり、増殖促進するものはアンタゴニスト開発の基礎データとなるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的はウイルス複製機構を解明し、診断・治療に貢献することであり、中でも研究途上にある dsRNA ウイルスについてオルビウイルスをモデルとして究明する。すなわち、ウイルス複製機構について、最新の知見に基づき、(1)ウイルス侵入経路、(2)エンドソームからの脱出、(3)ウイルス粒子形成・増幅におけるアポトーシス及びオートファジーの関与、(4)ウイルス放出経路の点から解明することにより、各段階に有効な抗ウイルス薬を探索することを目的としている。ウイルス複製機構の解析には各経路のインヒビターを用いるが、ウイルス増殖抑制効果を示すものは有力な創薬候補となり、増殖促進するものはアンタゴニスト開発の基礎データとなる。加えて、複製機構の解析は細胞障害活性の解明と創薬に導く。

3. 研究の方法

本研究では dsRNA レオウイルスの複製機構を解明し、これを阻害する薬剤を探索して創薬開発の一助とすることを目的として、以下の方法で研究を実施した。

(1)エンドサイトーシスによるウイルスの細胞侵入機構：エンドサイトーシスの 3 経路(マクロピノサイトーシス、カベオラ介在性、クラスリン介在性)のインヒビターを用いてウイルスの取り込み増殖量(ウイルス力価、ウイルス蛋白発現量: NS3 及び VP5)を計時的に観察した。

(2)ウイルス複製におけるオートファジー解析：アミノ酸不含培地は可逆的に mTORC 活性を抑制することにより、ウイルス増殖を促進した。そこで、mTORC 阻害剤である Torin1 及び Rapamycin を用いて、ウイルスを増殖について検討した。

(3)ウイルス感染細胞におけるアポトーシス：ウイルス感染細胞におけるアポトーシス誘導及びアポトーシス経路を利用したウイルス増幅について検討した。

(4)エンドソームの酸性化の影響：エンドソームの酸性化を阻害するバフィロマイシン A1 を用いて、ウイルス増殖が抑制されるかどうか検討した。また、ウイルス構造蛋白である VP2 と VP5 が除去することを目的に、ウイルス溶液を酸性化した後、バフィロマイシン A1 を添加してウイルス増殖の抑制について検討した。

(5)ウイルス増殖に対する ATP の影響：ウイルス増殖には ATP が必須であり、その酸化リン酸化 (OXPHOS) などのミトコンドリア代謝の変化が、ウイルスの標的となることや宿主免疫応答の一部として機能すると考えられる。そのことから、2 つの異なる阻害剤である CCCP とアンチマイシン A を用いて解析した。

4. 研究成果

本研究では dsRNA レオウイルスの複製機構を解明し、これを阻害する薬剤を探索して創薬開発の一助とすることを目的とし、オルビウイルス(イバラキウイルス、IBAV)をモデルとして供試し、以下の成果を得た。

(1)エンドサイトーシスによるウイルスの細胞侵入機構：エンドサイトーシスの 3 経路(マクロピノサイトーシス、カベオラ介在性、クラスリン介在性)のインヒビターを用いてウイルスの取り込み増殖量(ウイルス力価、ウイルス蛋白発現量: NS3 及び VP5)を計時的に観察した。その結果、クラスリン介在性及びカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤では阻害されず、マクロピノサイトーシス阻害剤である EIPA あるいは、Cytochalasin-D で顕著に阻害されたことから、オルビウイルスはマクロピノサイトーシスによって細胞内に侵入することが確認された。加えて、マクロピノサイトーシス阻害剤は CTB(カベオラ介在性)、Trf(クラスリン介在性)の取り込みを阻害しなかったが、デキストラン(マクロピノサイトーシス)の取り込みを阻害した。

(2)ウイルス複製におけるオートファジー解析：アミノ酸不含培地は可逆的に mTORC 活性を

抑制するが、ウイルス増殖を促進した。一方、mTORC 阻害剤である Torin1 及び Rapamycin はウイルスを増殖させなかった。また、これまで他のオルビウイルスで報告のあるオートファジー経路を利用した増殖については確認されなかった。

(3)ウイルス感染細胞におけるアポトーシス：ウイルス感染細胞におけるアポトーシス誘導及びアポトーシス経路を利用したウイルス増幅について検討したが、ウイルス感染細胞は弱いアポトーシス活性を示したものの、ウイルス増殖に影響を及ぼすものではなかった。

(4)エンドソームの酸性化の影響：エンドソームの酸性化を阻害するバフィロマイシン A1 を用いて、ウイルス増殖が抑制されるかどうか検討したところ、ウイルス複製は抑制された。また、ウイルス溶液を酸性にするとウイルス構造蛋白である VP2 と VP5 が除去されたが、バフィロマイシン A1 を添加してもウイルス増殖は抑制されなかったことから、エンドソーム内の酸性化がウイルス複製に重要であることが確認された。

(5)ウイルス増殖に対する ATP の影響：ウイルス増殖には、酸化リン酸化 (OXPHOS) などのミトコンドリア代謝の変化が、ウイルスの標的となることや宿主免疫応答の一部として機能すると考えられることから、2つの異なる阻害剤である CCCP とアンチマイシン A を用いて解析した。その結果、ミトコンドリアの CCCP とアンチマイシン A は IBAV の増殖を有意に抑制した。また、これらの阻害剤は ATP 合成を抑制するため、細胞内の ATP 量を減少させ、その結果 AMPK を活性化することが確認された。そこで、AMPK の IBAV への影響を調べるため、AMPK 活性化剤の AICAR を用いたところ、AICAR は細胞内 ATP 量の変化を伴わずに、IBAV 増殖を顕著に抑制した。したがって、AMPK 活性化が IBAV の増殖を抑制するのに十分であることが明らかとなった。一方、IBAV 感染後の時系列変化を追跡したところ、IBAV 増殖に伴って ATP の減少と AMPK の活性化が認められた。これらのことから、IBAV 感染時に見られる AMPK の活性化が、IBAV を抑制する宿主防御機構として働いている可能性が示された。また、IBAV 感染に重要とされるエンドサイトーシスの活性やエンドソームの酸性化が、AMPK の活性化によって妨げられないこと、他のウイルス種で重要性が報告されている脂質代謝やオートファジーなども、AMPK 活性および IBAV 増殖と関連しないことも判明した。一方、mTORC 阻害剤である Torin1 及び Rapamycin はウイルスを増殖させなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Ohkubo Kiichi, Shibutani Shusaku, Iwata Hiroyuki	4. 巻 590
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase (AMPK) suppresses Ibaraki virus propagation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 109943 ~ 109943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2023.109943	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 Egusa Karin, Shibutani Shusaku, Iwata Hiroyuki	4. 巻 679
2. 論文標題 IgG and insulin enhance endocytosis in THP-1 cells via activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 160 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.09.008	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 SUEMURA Miki, MIYATA Haruki, KAWAMURA Rio, TAKAHASHI Sho, IGASE Masaya, MIZUNO Takuya, OHAMA Takashi, SHIBUTANI Shusaku, IWATA Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Cancer-specific apoptosis induction in canine lymphoma cell lines by the endocytosis inhibitor dynasore	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 820 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0036	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 Shibutani Shusaku, Endo Mikiko, Mizukami Keijiro, Hosoi Eiji, Sakai Yusuke, Taniguchi Masayasu, Harada Hisashi, Momozawa Yukihide, Iwata Hiroyuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Development of a high throughput screening method for the detection of 188 pathogenic variants and its application in Mishima cattle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Animal Genetics	6. 最初と最後の頁 416 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/age.13301	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 MUROKAWA Hiroka, EGUSA Karin, SHIBUTANI Shusaku, IWATA Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling is involved in phagocytosis activation during THP-1 cell differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 772 ~ 780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0504	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 Takahashi Sho, Shibutani Shusaku, Iwata Hiroyuki	4. 巻 418
2. 論文標題 Nuclear-targeted 4E-BP1 is dephosphorylated, induces nuclear translocation of eIF4E, and alters mRNA translation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113246 ~ 113246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113246	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 Suemura Miki, Shibutani Shusaku, Iwata Hiroyuki	4. 巻 645
2. 論文標題 The endocytosis inhibitor dynasore induces a DNA damage response pathway that can be manipulated for enhanced apoptosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.01.035	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 Yuki Maeda, Shusaku Shibutani, Keiko Onishi, Hiroyuki Iwata	4. 巻 302
2. 論文標題 Ibaraki virus enters host cells by macropinocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2021.198492.	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 Goto N, Shibutani S, Miura N, Watanabe R, Iwata H.	4. 巻 552
2. 論文標題 Thapsigargin suppresses alpha 1-acid glycoprotein secretion independently of N-glycosylation and ER stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 30-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.017	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 Yuki Maeda, Shusaku Shibutani, Hiroyuki Iwata	4. 巻 563
2. 論文標題 Partial glycosylation of the Ibaraki virus NS3 protein is sufficient to support virus propagation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2021.08.003	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大久保 毅一、渋谷 周作、岩田 祐之
2. 発表標題 AMPK はイバラキウイルス感染により活性化され、ウイルス増殖を抑制する
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江草 花梨、岩田 祐之、渋谷 周作
2. 発表標題 IgG および Insulin は PI3K 活性化を介して THP-1 細胞の細胞外液取り込みを増強する
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋翔、前原光主穂、西原千洸、渋谷周作、岩田祐之
2. 発表標題 ダイナミンノックアウトスクリーニングによる新規エンドサイトーシス関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 翔、渋谷 周作、岩田 祐之
2. 発表標題 mRNA翻訳の制御因子eIF4Eの人為的な局在操作とその影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渋谷 周作、遠藤 ミキ子、水上 圭二郎、細井 栄嗣、坂井 祐介、谷口 雅康、桃沢 幸秀、岩田 祐之
2. 発表標題 新規の遺伝性疾患検査法を用いた黒毛和種とホルスタイン種の解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室川 弘華、渋谷 周作、岩田 祐之
2. 発表標題 THP-1細胞のマクロファージ様分化におけるmTORC1シグナルの関与
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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	渋谷 周作 (shibutani shusaku) (20534473)	山口大学・共同獣医学部・准教授 (15501)	

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
---------	---------