

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460579

研究課題名(和文) 新規エンテロウイルス複製阻害剤の探索および標的宿主因子の同定

研究課題名(英文) Exploration for novel anti-enterovirus compounds and identification of its host targets

研究代表者

有田 峰太郎 (ARITA, MINETARO)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70356244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗エンテロウイルス薬の候補化合物は、ウイルスタンパク阻害剤、宿主のPI4KB/OSBP阻害剤に分類された。PI4KB/OSBP経路は、ウイルスRNA合成過程ではなく、ウイルスの複製の場の形成に必要であり、複製の膜上にフリーのコレステロールを蓄積する役割を果たしていた。これらの結果は、抗エンテロウイルス薬の開発において宿主因子に対する阻害剤に注目する場合には、PI4KB/OSBP経路の阻害剤の有効性を検討する必要性があることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Identified anti-enterovirus compounds were classified into direct-acting compounds to viral proteins, and PI4KB/OSBP inhibitors. PI4KB/OSBP pathway is required for formation of a virus replication complex by accumulating unesterified cholesterol on virus-induced membrane structure, rather than directly involved in viral RNA synthesis. These results suggested that evaluation of the effectiveness of the PI4KB/OSBP inhibitors is essential in development of anti-enterovirus drug targeting host factor activity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エンテロウイルス 抗ウイルス薬 宿主因子 複製 PI4KB OSBP

1. 研究開始当初の背景

ヒトエンテロウイルス(HEV)がヒトに感染した場合、ほとんどの場合不顕性もしくは軽度の症状を引き起こすのみだが、稀に重度の神経症状を引き起こす場合がある。神経親和性が高いHEVとして、小児麻痺を引き起こすポリオウイルス(PV)および致死的な肺水腫を引き起こすエンテロウイルス71(EV71)が知られている。PVは、WHO主導で生ワクチンを用いた全世界的な根絶計画が進められているウイルスである。現在、神経毒力を取り戻したワクチン株由来PVによる再流行が問題になっている。また、PV持続感染患者は長期間PVを排出するため、PVの排出を止めるためにも治療の必要があるが、未だに有効な治療プロトコルは確立されていない。そのため、PV根絶後に起こりうる散発的なPV流行およびPV持続感染患者の治療において、抗ウイルス薬の重要性が指摘されている。EV71は手足口病の原因ウイルスであるが、稀に致死的な肺水腫を引き起こす。感染者に重篤な神経症状を引き起こす割合は0.3%以下であり、感染者の致死率は0.06%以下である。近年のアジアにおける手足口病の大流行の中で死亡者および後遺症を残しうる重篤な神経症状患者が発生していることと、入院してから死亡するまでの極めて時間が短いことから(24時間以内)、感染をコントロールするための抗ウイルス薬の必要性が認識されつつある状況である。

抗ウイルス活性を示す化合物は、抗ウイルス薬の候補化合物としての重要性のみでなく、ウイルスの感染過程を解析するツールとしても重要な役割を果たしてきた。HEV複製阻害剤は、ウイルスタンパクに作用するものと宿主側の因子に作用するものに分類される。宿主側の因子に作用する化合物として、brefeldin A および PI4KB 阻害剤 (enviroxime 様化合物: GW5074, PIK93, T-00127-HEV1 等) が知られており、これらは各々 GBF1 もしくは PI4KB を阻害することでウイルス複製複合体の形成に影響すると考えられている (Maynell *et al.*, 1992, JVI, Hsu *et al.*, 2010, Cell)。Enviroxime は、当初ウイルスタンパク質 3A を標的とする HEV 複製阻害剤と考えられたが、3A タンパク質と enviroxime との直接的な相互作用が検出されなかったことから宿主タンパクを阻害している可能性が高いと考えられてきた。近年、enviroxime と全く異なる構造でありながら同じ耐性変異を誘導する化合物 (enviroxime 様化合物) が相次いで報告され、PI3,4 キナーゼ阻害剤である PIK93 が enviroxime 様化合物であることが見出された (Arita *et al.*, 2011, JVI)。また、我々が同定した新規 enviroxime 様化合物 T-00127-HEV1 は、高い特異性を持つ PI4KB 特異的阻害剤であることが判明し、PI4KB がピコルナウイルスの複製に特異的な

宿主因子であることを明らかにした (Arita *et al.*, 2011, JVI)。

興味深いことに、enviroxime 様化合物は、PI4KB 阻害剤と非 PI4KB 阻害剤に分類される (Arita *et al.*, 2011, JVI)。非 PI4KB 阻害剤である enviroxime 様化合物 AN-12-H5 (Arita *et al.*, 2010, JGV) のターゲットは不明である。このことは、PI4KB が関与するウイルス複製経路に、その他の宿主遺伝子が関与していることを示唆する。PI4KB は、ピコルナウイルスのみでなく C 型感染ウイルス、SARS ウイルス、風疹ウイルスなど、幅広いウイルス科の感染に関与することが明らかにされつつある (Coller *et al.*, 2012, PLoS Pathogen, Yang *et al.*, 2012, JBC, Al-Khayat and Ahmad, 2012, Ibmossinal JMBS)。そのため、非 PI4KB 化合物の標的遺伝子の同定は、PI4KB が関与するウイルス感染を理解する上で非常に重要であると考えられる。

近年、我々は HEV の複製に関与する新規宿主因子として、Valosin-containing protein (VCP/p97) を同定した (Arita *et al.*, 2012, JVI)。VCP は、class I AAA+ファミリーに属する ATPase であり、様々な機能 (ユビキチンを介したタンパク質分解、膜融合、およびエンドサイトーシス) に関与していることが知られている。これまでの研究で、1) ウイルスタンパク質 2BC および 3AB に結合すること、2) ウイルス感染細胞におけるタンパク輸送経路に関与すること、が明らかにされている。しかし、ウイルス複製における機能は全くわかっていない。VCP のノックダウンによる PV 感染阻害効果はこれまでに報告されている遺伝子の中で最も強い (PV 感染が 1/1,000 程度に抑制される) ことから、VCP は未知の HEV 複製阻害剤の標的である可能性がある。

本研究では、大規模化合物スクリーニングを行い、新規 HEV 複製阻害剤を同定する。同定された化合物および AN-12-H5 について標的宿主因子の同定を行う。同定された標的宿主因子および VCP のウイルス複製における機能の解析と創薬ターゲットとしての有用性の検討を行う。

2. 研究の目的

以下の2点を本研究の目的とした。

- 1) 新規 HEV 複製阻害剤の同定およびその標的遺伝子の探索
- 2) 新規宿主因子 VCP/p97 のウイルス複製過程における機能の解析

3. 研究の方法

- 1) 5 万程度の化合物を用いてスクリーニングを行い、新規 HEV 複製阻害剤を同定す

- る。また、既知の抗エンテロウイルス化合物の標的の解析を行う。
- 2) VCP のウイルス複製複合体への関与を解析するために、相互作用することが示唆されたウイルスタンパク質 2BC および 3AB との結合様式に関する解析を行う。
 - 3) VCP 阻害剤を同定し、細胞毒性と抗ウイルス効果を評価し、VCP の創薬ターゲットとしての有用性を検討する。

4 . 研究成果

抗 PV 活性を示す化合物を同定するために、6 万化合物のスクリーニングを行い、360 個程度のヒット化合物が得られた。同定したヒット化合物を解析した結果、低い細胞毒性を示した化合物は、カプシド阻害剤、2C 阻害剤、PI4KB 阻害剤もしくは OSBP 阻害剤であることが判明した。

PI4KB/OSBP 経路阻害剤の抗 PV 活性の阻害機構の解析を行った。その結果、PI4KB は OSBP をウイルス感染で誘導される膜上に誘導するための PI4P を産生していること、OSBP がこの膜上にコレステロールを蓄積すること、PI4KB/ OSBP 経路はウイルスの RNA 合成そのものではなくウイルスの複製複合体の形成に関与していることが示唆された。

標的が未知であるピコルナウイルス複製阻害剤である oxoglucine および pachypodol (Ro 09-0179 としても知られる)の解析を行った。これらは、標的が不明な植物由来のピコルナウイルス複製阻害剤の代表的なものである。解析の結果、驚いたことにどちらも PI4KB 阻害剤であることが示された。これらの結果から、我々は以下の仮説を提唱した。

“培養細胞に対して毒性を示さずに宿主活性を阻害する抗エンテロウイルス化合物は、全て PI4KB/OSBP 経路を標的とする (エンピロキシム仮説)”

多くの抗ピコルナウイルス化合物は、その標的が未知のまま報告されている。今回の発見は、これらの化合物が PI4KB/OSBP 阻害剤であることを示唆する。これらの化合物は、抗ピコルナウイルス活性以外に種々の生物学的活性を示すことが報告されている場合がある。例えば、oxoglucine は、抗血小板凝集作用、リンパ球減少作用、Toll-like-receptor (TLR) を介する免疫反応の抑制作用、抗マラリア活性を示すことが報告されている。リンパ球減少作用と抗マラリア活性は PI4KB 阻害活性で説明できるが、その他の活性については今後の解析が必要である。また、pachypodol は、ブレフェルジン A で誘導されるゴルジ分解に拮抗作用を示すことが知られているが、今回の研究でこの拮抗作用が PI4KB 阻害活性によ

るものであり、また OSBP の阻害もこの拮抗作用を生じることが明らかになった。今回の発見により、標的が未知と報告されている抗ピコルナウイルス化合物の示す生物学的活性を再解析することにより、PI4KB もしくは OSBP の未知の機能を効率よく探索することが可能になった。

VCP/p97 が結合するウイルスタンパク質 2C 上の領域はアミノ酸 75-329 の領域であり、一部 PI4KB の結合領域 (2C 上のアミノ酸 1-74 および 276-329) と重なっていた。興味深いことに、VCP/p97 とウイルスタンパク 2C との相互作用が、グアニジン塩酸塩処理で上昇することを見出した。グアニジン塩酸塩は PI4KB-2C の相互作用にはほとんど影響しなかったことから、グアニジン塩酸塩の作用は VCP/p97-2C の相互作用に特異的であることが示唆された。グアニジン塩酸塩は 2C の ATPase 活性を阻害することが報告されているが、2C の ATPase 活性の阻害とウイルス複製阻害の直接の関係については結論が出ていない。今回見つけた現象は、グアニジン塩酸塩による 2C の阻害に VCP/p97 が関与している可能性を示唆する。

VCP/p97 を含む宿主因子の阻害とウイルスタンパクの関係解析のために、ウイルスタンパク質を過剰に発現させた細胞を用いた trans-complementation アッセイの開発を行った。予備的な実験として、PI4KB 阻害剤を用いた予備実験を行ったところ、ウイルスタンパクの 3A, 3AB の過剰発現により PI4KB 阻害剤に対する耐性を示すことが見出された。このことは、特定の宿主因子の阻害によりもたらされるウイルス複製過程の抑制が、特定のウイルスタンパク質の過剰発現により、特異的に解除されうること示唆する。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Minetaro Arita, Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure, *Microbiology and Immunology*, 査読有り、2014, **58**: 239-256

有田 峰太郎, 抗エンテロウイルス化合物群の探索とそのウイルス感染阻害機構の解析、*ウイルス*、査読なし、2013, 63: 93-102

Jeroen R.P.M. Strating, Lonneke van der Linden, Lucian Albuлесcu, Joe"lle Bigay, Minetaro Arita, Leen Delang, Pieter Leyssen, Hilde M. van der Schaar, Kjerstin H.W. Lanke, Hendrik Jan Thibaut,

Rachel Ulferts, Guillaume Drin, Nina Schlinck, Richard W. Wubbolts, Navdar Sever, Sarah A. Head, Jun O. Liu, Philip A. Beachy, Maria A. De Matteis, Matthew D. Shair, Vesa M. Olkkonen, Johan Neyts, and Frank J.M. van Kuppeveld. Itraconazole Inhibits Enterovirus Replication by Targeting the Oxysterol-Binding Protein. Cell Reports, 査読有り、2015, **10**: 600-615

Minetaro Arita, Stefan Philipov and Angel S. Galabov. Phosphatidylinositol-4 kinase III beta is the target of oxoglucine and pachypodol (Ro 09-0179) for their anti-poliovirus activities, and locates at upstream of the target step of brefeldin A. Microbiology and Immunology, 査読有り、2015, **59**: 338-347

Minetaro Arita. Mechanism of poliovirus resistance to host phosphatidylinositol-4 kinase III beta inhibitor. ACS Infectious Diseases, 査読有り、2016, **2**: 140-148

〔学会発表〕(計5件)

有田 峰太郎、OSBP ファミリーI は minor enviroxime 様化合物の標的である、第61回 日本ウイルス学会総会、神戸、2013.11.12

Minetaro Arita, PI4KB and OSBP accumulate unesterified cholesterol on virus-induced membrane structure during poliovirus replication, EUROPIIC 2014: XVIIIth Meeting, in Blankenberge, Belgium, 9-14 March, 2014

有田 峰太郎、フェノタイプスクリーニング 古くて新しい創薬手法、CBI 学会研究講演会、東京、2014.9.12.

有田 峰太郎、PI4KB/OSBP 経路はポリオウイルス感染で誘導される膜構造にコレステロールを蓄積する、第62回 日本ウイルス学会総会(横浜)、2014.11.10.

有田 峰太郎、PI4KB は、抗ピコルナウイルス化合物 oxoglucine および pachypodol (Ro 09-0179)の直接の標的である、第25回抗ウイルス療法学会総会、東京、2015.5.24.

〔図書〕(計2件)

有田 峰太郎、感染症の治療に向けて - ポリオ根絶計画におけるアカデミア創薬の試み、実験医学、増刊号、第32巻、第2号、研究成果を薬につなげるアカデミア創薬の戦略と実例、2014、P205-209

有田 峰太郎、抗エンテロウイルス化合物群の探索研究、ファルマシア、2013、第49巻、第11号、P1095-1100:

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

有田 峰太郎 (ARITA, Minetaro)

国立感染症研究所・ウイルス第二部第二室・主任研究官

研究者番号：70356244

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：