

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460559

研究課題名(和文)重症熱性血小板減少症候群(SFTS)に有効な抗ウイルス薬の探索研究

研究課題名(英文) Investigation on antiviral agents against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV)

研究代表者

馬場 昌範 (BABA, MASANORI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70181039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SFTSは新しいウイルスSFTSVによるダニ媒介性感染症である。SFTSの致死率は高齢者で極めて高く、現時点で有効な治療薬が存在しない。そこで、本研究では抗ウイルスアッセイ系の構築を行うとともに、それを用いて種々の薬剤の抗SFTSV効果について検討した。本法を用いて、既に抗SFTSV活性が報告されている、リバビリンおよびファビピラビルについて検討したところ、それらのEC50値は、それぞれ 40.1 ± 16.3 および 25.0 ± 9.3 μM であった。さらに、アモジアキンに選択的な抗SFTSV効果を認めた($\text{EC}_{50} = 19.1 \pm 5.1$ μM)。

研究成果の概要(英文)：SFTS is an emerging tick-borne infectious disease. Its fatality is quite high. However, there are no antiviral agents currently approved for clinical use. We have established a safe and rapid assay system for screening selective inhibitors of SFTSV and tested various compounds in the assay system. When ribavirin and favipiravir were examined for their anti-SFTSV activity, their EC50 values were 40.1 ± 16.3 and 25.0 ± 9.3 μM , respectively. Both compounds have already been reported as selective inhibitors of SFTSV replication in vitro. Furthermore, amodiaquine was found to be effective against SFTSV ($\text{EC}_{50} = 19.1 \pm 5.1$ μM).

研究分野：ウイルス学

キーワード：重症熱性血小板減少症候群 SFTSV 抗ウイルス薬 アッセイシステム アモジアキン

1. 研究開始当初の背景

(1) SFTS は 2011 年に中国の研究者らによって報告された、ダニによって媒介されるウイルス感染症である¹。原因ウイルスである SFTSV は、ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される。国立感染症研究所の調査によると、我が国では 2013 年 1 月に、国内で海外渡航歴のない人の感染が初めて報告され以来、研究開始当初には数十名の患者が SFTS と診断されている。患者の大部分は 60 歳以上の高齢者であり、そのうちの約 3 割が死亡するという、きわめて致死率の高い疾患である。患者の分布は中国、四国、そして九州地方に多い。主な症状は発熱と食欲低下、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛などの消化器症状で、重症化すると意識障害やけいれんなどの中枢神経症状や、血小板減少による出血傾向があらわれ、死亡することもある。これまでにウイルス遺伝子およびウイルスに対する抗体の検査法が確立され、SFTS の診断が可能となったが、治療は対症療法しかなく、有効なワクチンや抗ウイルス薬は存在しない。

(2) 研究代表者はこれまで抗ウイルス薬に関する基礎研究を続けてきた。その中でも、特に抗エイズ薬の研究に力を注ぎ、非核酸系逆転写酵素阻害薬の発見と開発²、HIV-1 のコレセプターである CCR5 の拮抗薬に関する研究³、そして毒性がきわめて低い核酸系逆転写酵素阻害薬の同定と開発を行ってきた⁴。このような実績から、研究代表者の研究室には、国内外の大学や製薬企業などにおいて、抗ウイルス試験の目的で合成された薬剤が多数集積されている。これらの薬剤については、これまで HIV-1、C 型肝炎ウイルス (HCV)、B 型肝炎ウイルス (HBV)、そして日本脳炎ウイルス (JEV) などのウイルスに対して、抗ウイルス効果が検討されている。

2. 研究の目的

最近、西條らは抗インフルエンザウイルス薬として開発されたファビピラビルが、培養細胞およびマウスモデルにおいて、選択的な抗 SFTSV 効果を示すことを明らかにしている。しかし、ファビピラビルの臨床的な効果の証明はこれからであり、SFTS の治療法確立のためには、ファビピラビルとは異なった作用機序を有する薬剤の同定と開発が必須である。そこで本研究の目的として、1) 急性期の SFTS 患者の臨床検体よりウイルスを分離し、培養細胞を用いた抗ウイルスアッセイ系を確立する。2) 確立した抗ウイルスアッセイ系を用いて、研究代表者の研究室に保管されている薬剤を中心に、それらの抗 SFTSV 効果を調べ、選択的に SFTSV の増殖を阻害する薬剤 (リード化合物) を同定する。3) さらに可能ならば、リード化合物を出発点として、その誘導体を探索もしくは合成し、それらの抗 SFTSV 効果を調べることで、薬剤の最適化を行う。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体からの SFTSV の分離と培養
当研究施設に保存されている SFTS 患者からの臨床検体 (血液など) から、SFTSV に感受性のある Vero 細胞などを用いて、ウイルスの分離と培養を行う⁵。培養細胞におけるウイルス増殖の確認と同定は逆転写 PCR (RT-PCR) 法を用いる。また、免疫血清を用いた蛍光抗体法や酵素抗体法により、感染細胞におけるウイルス抗原の発現を確認するとともに、培養上清中のウイルス感染価を定量する。

(2) 薬剤の抗 SFTSV アッセイ法の確立
ウイルスの分離と増殖が確認されたら、培養系をマイクロプレートに移し、抗ウイルスアッセイに適した条件を検討する。具体的には、初期細胞濃度、感染ウイルス量、そして培養期間を変えることで、培養上清中のウイルス感染価の変移や感染細胞に見られる細胞変性効果 (CPE) に与える影響を記録する。これらの結果により、抗ウイルスアッセイに適した条件を決定する。Multiplicity of infection (MOI) が 0.1 以下、培養期間が 6 日以内であれば理想的である。上清中もしくは細胞内のウイルス RNA 量を real-time RT-PCR 法により定量することで、薬剤の抗 SFTSV 効果の指標とする。一方、薬剤の宿主細胞に対する毒性は、非感染細胞の生細胞数について、テトラゾリウムを用いた色素法にて測定する。なお、培養上清中および細胞内のウイルス RNA の定量に際しては、検体から RNA を抽出せずに RT-PCR 法を行うことにより、RNA 定量による実験誤差を回避する。研究代表者は既にこの方法を、HCV レプリコン細胞を用いた抗 HCV アッセイに応用しており、再現性が高く、抗ウイルスアッセイのように一度に多くの検体を扱う実験を適していることを明らかにしている。

4. 研究成果

(1) SFTS 患者からウイルスの分離・同定
鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て、異なる 2 名の SFTSV 患者血清から RNA を分離し、SFTSV を特異的に検出する primer を用いて、RT-PCR を行った。その結果、採取された血清中に、SFTSV の RNA を検出することに成功した (図 1)。

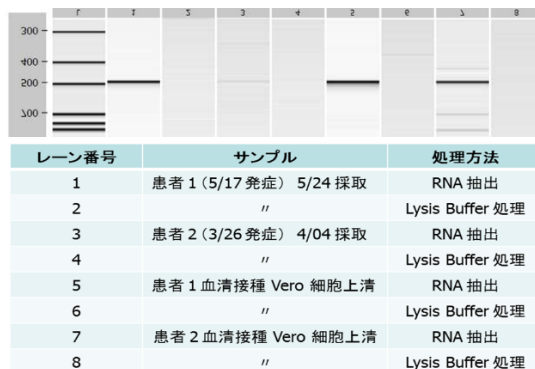


図1. SFTS 患者血清からのウイルス RNA の検出 2 名の SFTS 患者より採取した血清について、QIAmp Viral RNA Mini キットを用い、RNA を抽出 (1, 3), もしくは上清を Sidestep Lysis and Stabilization Buffer (2, 4) で処理した。さらに血清を Vero 細胞に接種し、培養 3 日後の培養上清について、同様に、RNA を抽出 (5, 7) もしくは Sidestep Lysis and Stabilization Buffer にて処理 (6, 8) した。抽出した RNA もしくは処理したサンプルについて、SFTSV 特異的 primer を用いた RT-PCR 法により増幅し、マイクロチップ電気泳動装置 (バイオアナライザー) を用いて、目的の増幅産物 (461 bp) を確認した。

患者血清を接種した Vero 細胞は、顕微鏡を用いてその形態を観察するとともに、細胞をパラホルムアルデヒド/メタノールで固定後、SFTSV 特異的免疫血清を用いて免疫染色を行い、感染細胞を同定した。



図2. SFTSV による細胞変性効果 患者1の血清を Vero 細胞に接種し、3 日間培養後、顕微鏡 (×100) にて観察した。

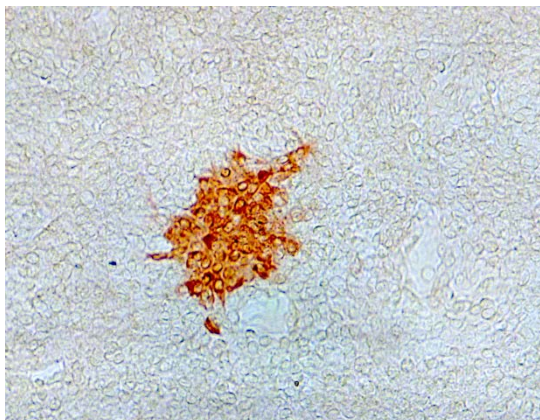


図3. SFTSV 特異的抗体を用いた免疫組織染色 患者1の血清を Vero 細胞に接種し、3 日間培養後、SFTSV 特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った。

感染 Vero 細胞を顕微鏡にて観察した結果、SFTSV による細胞変性効果 (CPE) はほとん

ど観察されなかったが、わずかに細胞の形態が変化している部分が認められた (図2)。また、Vero 細胞と同様に、SFTSV に対して高い感受性を有する、ヒト肝細胞由来の Huh-7 細胞においても、SFTSV は明らかな細胞の形態変化を引き起こさなかった (data not shown)。一方、SFTSV 特異的抗体を用いた免疫組織染色では、抗原陽性の感染細胞が観察された (図3)。なお、患者血清中に SFTSV の存在を同定した後は、鹿児島大学の病原体等安全管理規則に基づき病原体等取扱承認の申請を行うとともに、SFTSV を不活化するまでの全ての実験については、研究室に設置されているバイオセーフティレベル 3 (BSL3) 室において実施した。

(2) 抗 SFTSV アッセイ系の確立

先に述べたように、SFTSV は感染しても培養細胞に CPE などの顕著な形態的变化を引き起こさないため、抗ウイルスアッセイにおいて良く行われている「色素を用いた生細胞の定量」による方法は適用できない。一般的には細胞を固定し、免疫組織染色を行った上で、感染フォーカス数をカウントする方法が実施されている。しかしながら、マイクロプレートを用いた免疫組織染色は操作がやや煩雑であり、SFTSV 感染細胞の場合には培養上清中に高感染価のウイルスが産生されることから、多くの薬剤のスクリーニングにおいては安全性に問題がある。また、感染細胞のフォーカスを顕微鏡下でカウントすることから、客観性および再現性についても改善の余地がある。そこで我々は、マイクロプレート上の感染細胞を直接 lysis buffer で融解することで SFTSV を不活化して感染性をなくした。さらにそれらにサンプルに対して直接 real-time RT-PCR を行うことにより、細胞内のウイルス RNA 量を定量することで、薬剤の抗ウイルス効果を評価することにした (図4)。

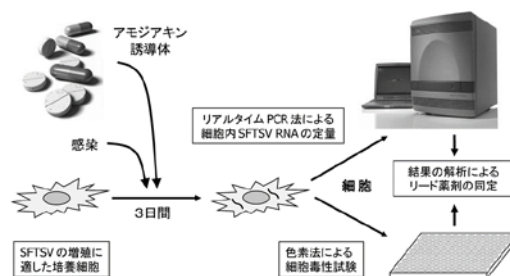


図4. 抗 SFTSV アッセイ法 患者血清より Vero 細胞にて分離した SFTSV を Huh-7 細胞にて継代し、その培養上清をアッセイ用のウイルス液とした。ウイルスの感染価は Vero 細胞を用いた免疫組織染色により、感染細胞のフォーカスを数えることにより定量した。アッセイは Vero 細胞 (2×10^4 cells/well) をマイクロプレートに播種し、24 時間培養後、種々の濃度の薬剤とウイルスを MOI = 0.01 にて添

加後, 37°Cで3日間培養した。薬剤の抗 SFTSV 効果は, 細胞を PBS にて1回洗浄後, TaqMan Gene Expression Cells-to-CT™ Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて real-time RT-PCR を行い, 各ウェルのウイルス RNA 量を定量した。薬剤の細胞毒性は, 種々の濃度の薬剤を非感染 Vero 細胞に添加し, 3日間培養後に色素法を用いて, 生細胞数を定量した。

(3) 抗 SFTSV 効果を有する薬剤の同定

確立した抗 SFTSV アッセイ系を用いて, 種々の薬剤のスクリーニング試験を実施したところ, 抗マラリア薬として臨床的に用いられているアモジアキンが選択的に SFTSV の増殖を抑制することを見出した (図5)。その際に, 既に抗 SFTSV 効果が報告されているリバビリンとファビピラビルについても, 同時に試験を行ったところ, アモジアキンの抗 SFTSV 効果はこれらの薬剤とほぼ同等かそれ以上の抗ウイルス効果を示すことが分かった (表1)。

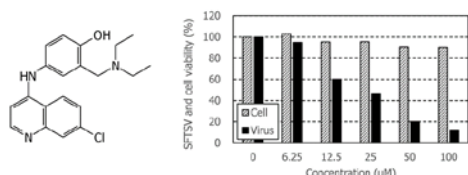


図5. アモジアキンの化学構造および抗 SFTSV 効果 Vero 細胞に SFTSV を感染させ, 種々の濃度の薬剤とともに3日間培養した。薬剤の抗ウイルス効果は細胞内のウイルス RNA を real-time RT-PCR 法で, 細胞毒性は生細胞数を色素法で定量した。

表1. 主な薬剤の抗 SFTSV 効果

薬剤	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
リバビリン	40.1 ± 16.3	> 100
ファビピラビル	25.0 ± 9.3	> 100
アモジアキン	19.1 ± 5.1	> 100

EC₅₀: 50% 有効濃度.

CC₅₀: 50% 毒性濃度.

データは3回の実験の平均値と SD 値.

表2. アモジアキン誘導体の抗 SFTSV 効果

薬剤	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
誘導体 1	36.6 ± 9.3	> 100
誘導体 2	31.1 ± 16.8	> 100
誘導体 3	15.6 ± 4.9	> 100

EC₅₀: 50% 有効濃度.

CC₅₀: 50% 毒性濃度.

データは3回の実験の平均値と SD 値

さらに, いくつかのアモジアキン誘導体について, それらの抗 SFTSV 効果を検討したところ, その中にはアモジアキンよりもやや高い活性を有する薬剤が存在した (表2)。なお, 誘導体については, 現在, 特許出願中であるため, それらの化学構造は開示しない。

<引用文献>

1. Yu X-J, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *New Engl. J. Med.* 364: 1523-1532, 2011.
2. Baba M, et al. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by 5-ethyl-6-phenylthiouracil derivatives through their interaction with the HIV-1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2356-2360, 1991.
3. Baba M, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5698-5703, 1999.
4. Nitanda T, et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3355-3360, 2005.
5. Xu B, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leucopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: Discovery of a new bunyavirus. *PLoS Pathogens* 7: e1002369, 2011.

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1件)

1. 馬場昌範. 抗ウイルス薬開発の歴史. 特集「飛躍的に発展を見せる抗ウイルス薬」. 化学療法の領域 33:22-24 (2017). 査読無

[学会発表] (計3件)

1. 馬場昌範. 抗ウイルス薬研究の歩みと最近の話題. 第57回日本臨床ウイルス学会, 2016年6月18日, ホテル華の湯 (福島県郡山市)
2. 馬場昌範. 抗ウイルス薬の研究と最近の進歩. 第40回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2016年8月27日, 指宿バイテラス (鹿児島県指宿市)
3. 馬場昌範, 外山政明, 岡本実佳, 西條政幸. 抗 SFTSV 薬スクリーニングアッセイ系の構築. 第53回日本ウイルス学会九州支部総会, 2016年9月2日, 宮崎市民プラザ・オルブライトホール (宮崎県宮崎市)

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗重症熱性血小板減少症候群ウイルス
薬

発明者：馬場昌範, 外山政明, 榊原紀和

権利者：国立大学法人鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2017-007507

出願年月日：平成 29 年 1 月 19 日

国内外の別：国内

○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

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ccvd/retro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 昌範 (BABA, Masanori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70181039

(2) 研究分担者

有馬 直道 (ARIMA, Naomichi)

平成 27 年 3 月 13 日まで

鹿児島大学・医歯学総合研究科・

客員研究員

研究者番号：30175997

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし