

厚生労働科学研究費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

分担研究報告書

細胞内脂質合成を標的とした抗高病原性ウイルス療法の分子基盤

分担研究課題：細胞内脂質合成を標的とした

抗クリミア・コンゴ出血熱ウイルス療法の分子基盤

研究分担者：黒崎 陽平 (長崎大学熱帯医学研究所 助教)

研究要旨：本研究は未だ有効な抗ウイルス療法が確立されておらず、そのヒトへの病原性の高さから人類への脅威となっているクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対して **S1P/SKI-1** が有効な標的となり得るか検討・評価するものである。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス表面糖タンパク質 **G** の開裂に **S1P/SKI-1** が必須であることが示されているが、**G** の開裂機構を含め未だ解明されていない点が多い。本年度は **BSL-4** でのみ使用が可能である感染性クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの **BSL-2** で解析可能なモデルウイルスであるハザラウイルスを使用してクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対して **S1P/SKI-1** が有効な抗ウイルス標的となり得ることを示した。昨年度構築したクリミア・コンゴ出血熱ウイルス前駆タンパク質 **G** の開裂評価系を用い、**G** が **S1P/SKI-1** により開裂反応を受けること、また **G** の開裂が **PF-429242** により阻害されることを示した。

A. 研究目的・意義：クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV)はブニヤウイルス科ナイロウイルス属に属する三分節マイナス鎖 RNA ウイルスである。CCHFV はダニ媒介性のウイルスで、感染域はアフリカ・ヨーロッパ・アジアと広く、更に致死率は10%前後と考えられており高い。現在有効なワクチン・治療法はない。CCHFV の細胞内での生活環は不明な点が多く残るが、感染性粒子産生のために 2 つのエンベロープタンパク質 Gn/Gc の前駆タンパク質 G の開裂が必要であることが示されている (図 1)。CCHFV の G は 1684 アミノ酸と大きく細胞膜貫通領域を6か所保有する (図 1)。G の細胞内における開裂についても不明な点が多くあるが、Pre-Gn の開裂は細胞内酵素 S1P/SKI-1によることが報告されており (RRLL 配列)、本研究において Pre-Gn の開裂を担う S1P/SKI-1 が CCHFV の有効な抗ウイルス薬となり得るか評価することを目的としてい

る。感染性 CCHFV はバイオセーフティレベル(BSL)-4 においてのみ使用可能であるため、本年度は、CCHFV と同じ血清型に分類されるナイロウイルスでヒト病原性のないハザラウイルス (HAZV) を CCHFV のモデルに用い、PF-429242 の抗ウイルス効果を検証した。更に CCHFV 前駆タンパク質 G の開裂評価系を構築し、G の開裂反応が PF-429242 により阻害されるか調べた。

B. 研究方法：

1. プラスミド

CCHFV G の S1P/SKI-1 による開裂反応の評価用に構築した G 変異体 G803 が S1P/SKI-1 特異的に開裂を受けるか確かめるため、S1P/SKI-1 開裂部位 RRLL の 516 番目のアルギニンをイソロイシンに置換した変異体 (IRLL) G803/R516I の発現プラスミドを作製した(図 2)。

2. PF-429242 による CCHFV G 開裂反応阻害

ヒト腎由来 293T 細胞またはチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞およびその S1P/SKI-1 欠損株 (SRD12B)、細胞内プロテアーゼ furin 欠損株 (F11) に G 変異体発現プラスミドを導入した。293T 細胞においてはプラスミド導入 6 時間後に PF-429242 を添加した。遺伝子導入 48 時間後に細胞溶解液を回収し、細胞内で生成された Gn を抗 V5 タグ抗体を用いたウェスタンブロット法にて検出した。

3. PF-429242 による HAZV 増殖への影響

ヒト副腎皮質由来 SW13 細胞に HAZV を moi=0.01 で感染させ、DMSO をコントロールとし、終濃度 0.1-100 μ M の PF-429242 存在下で感染細胞を培養し、HAZV 感染後 48 時間後の培養上清中のウイルス力価を SW13 細胞によるプラークアッセイ法にて定量した。

4. 細胞毒性試験

PF-429242 の SW13 細胞に対する

毒性を評価するため、PF-429242 添加時の細胞内 ATP の定量を行った。0.3-100 μ M の PF-429242 を含む培養上清にて SW13 細胞を培養し、PF-429242 適用 42 時間後、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)にてプロトコールに従い細胞内 ATP 量をルミノメータにて定量し、細胞生存率を算出した。

C. 研究結果：

1. HAZV はコントロールの DMSO 処理と比較し、PF-429242 存在下では濃度依存的にウイルス力価が減少し、終濃度 1 μ M で約 2 log、10 μ M では約 4 log ウイルス増殖が低下した(図 3A)。この薬剤濃度において SW13 細胞に顕著な細胞生存率の低下がないことを確認した (図 3B)。

2. G803 変異体が S1P/SKI-1 による開裂を受けるか確かめるため、S1P/SKI-1 欠損 CHO-K1 細胞株 SRD12B を用いて調べた。CHO-K1 細胞および furin 欠損 CHO-K1 細胞株

F11 では Gn の生成が検出されたが、SRD12B 細胞では検出されなかった(図 4A)。また、293T 細胞において S1P/SKI-1 の開裂部位の変異体 G803/R571I では Gn が生成されなかった。このことから、G の開裂反応評価系として用いる変異体 G803 は野生型同様 S1P/SKI-1 認識部位で開裂を受けることが確認された。そこで、この系を用い、PF-429242 による開裂阻害を 293T 細胞を用いて調べたところ、PF-429242 の濃度依存的に Gn の生成が抑制された(図 4B)。このことから、PF-429242 は CCHFV G の開裂反応を阻害することが明らかになった。

D. 考察

CCHFV のモデルとして用いた HAZV は、CCHFV と同じく S1P/SKI-1 認識配列 RRLL を持つ。HAZV は PF-429242 によってウイルス増殖が阻害されたこと、PF-429242 による CCHFV G の開裂阻害とそれによる Gn の生成阻害を観察したことから、

S1P/SKI-1 による開裂とそれによる Gn の生成が CCHFV および HAZV に共通する重要な増殖機構であり、更にそれを標的とした薬剤が抗ウイルス剤として有用であることを示唆する。実際に CCHFV の感染性ウイルスを用いて PF-429242 による抗ウイルス効果の実証が必要である。

PF-429242 は培養細胞レベルで HAZV の増殖を顕著に抑制し、抗ウイルス剤としての応用が期待される成績を得た。I 型 IFN 受容体欠損マウスが CCHFV および HAZV の感染動物モデルとして有用であることが報告されている。このマウスモデルにて、HAZV に対する *in vivo* での PF-429242 の効果を検討し、抗ウイルス剤としての有用性を検証することを予定している。

E. 結論

1. CCHFV G 変異体による S1P/SKI-1 開裂反応の評価系を用い、

PF-429242 が CCHFV の開裂反応を阻害することを明らかにした。

2. PF-429242 はヒト培養細胞において HAZV の増殖を顕著に抑制した。

I. 健康危険情報
特になし

J. 研究発表
論文発表

なし

学会発表

なし

K. 知的財産権の出願・登録状況
なし

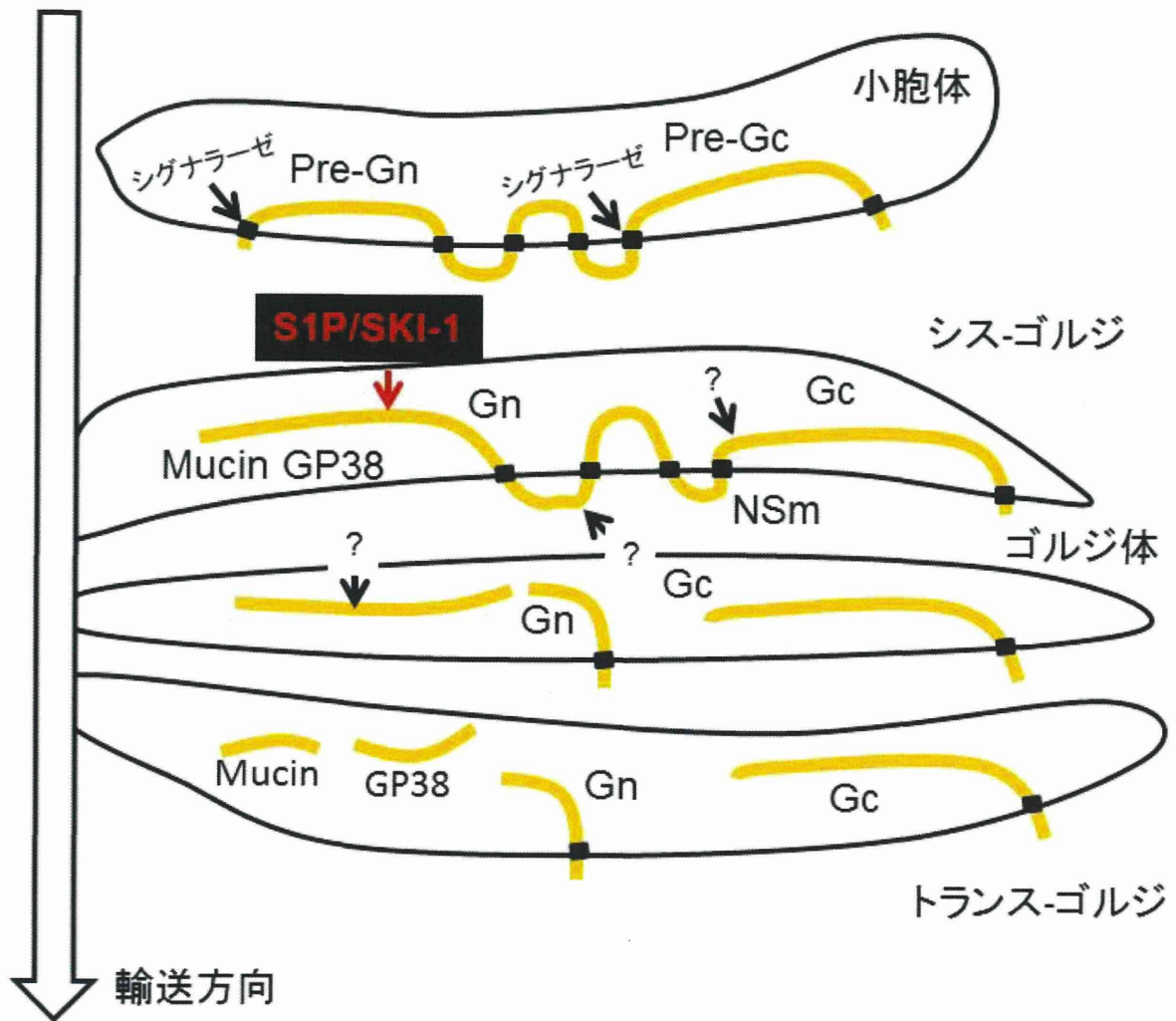


図1 クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) 表面糖タンパク質Gの細胞内輸送図

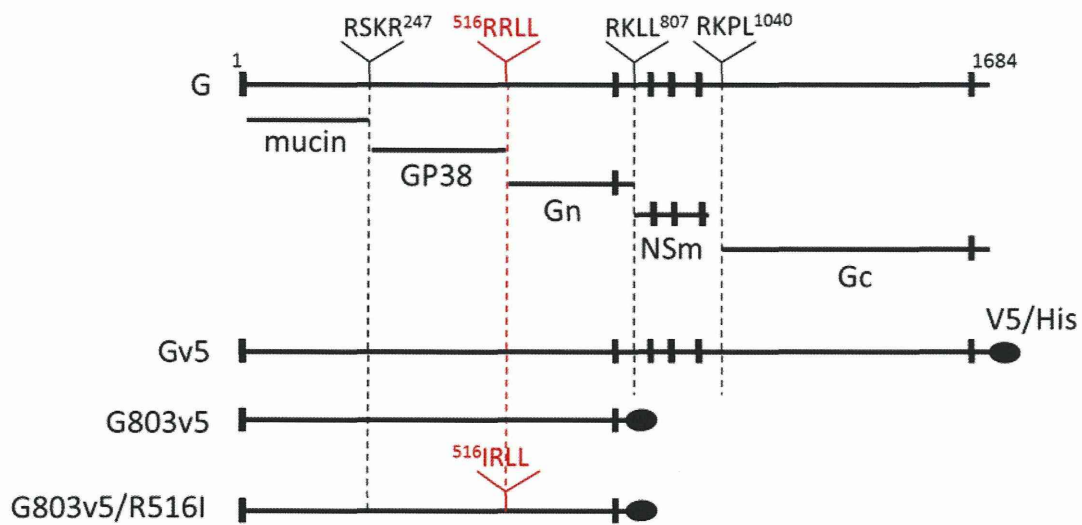


図2 CCHFV Gタンパク質およびその変異体の模式図
赤字はS1P/SKI-1認識配列を示す。

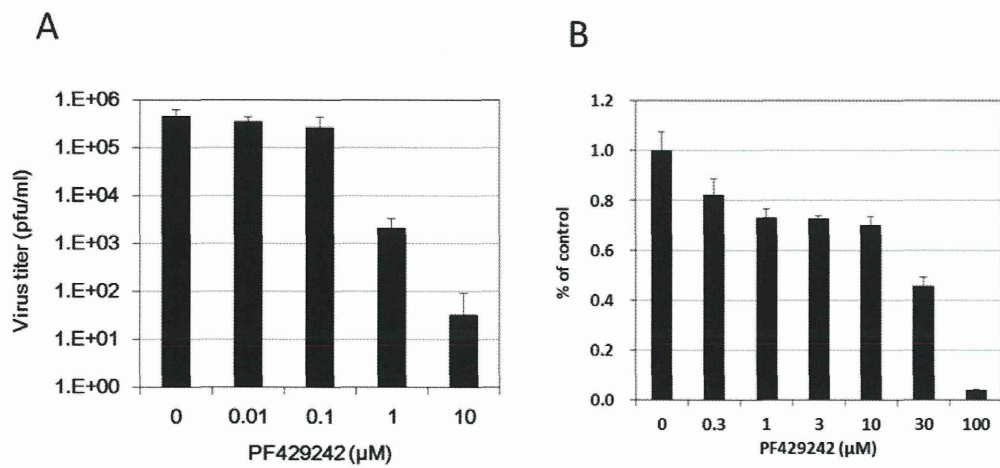


図3 S1P/SKI-1阻害剤PF-429242によるHAZV増殖への影響
(A) PF-429242によるHAZV増殖への影響. (B) PF-429242のSW13細胞に対する細胞毒性.

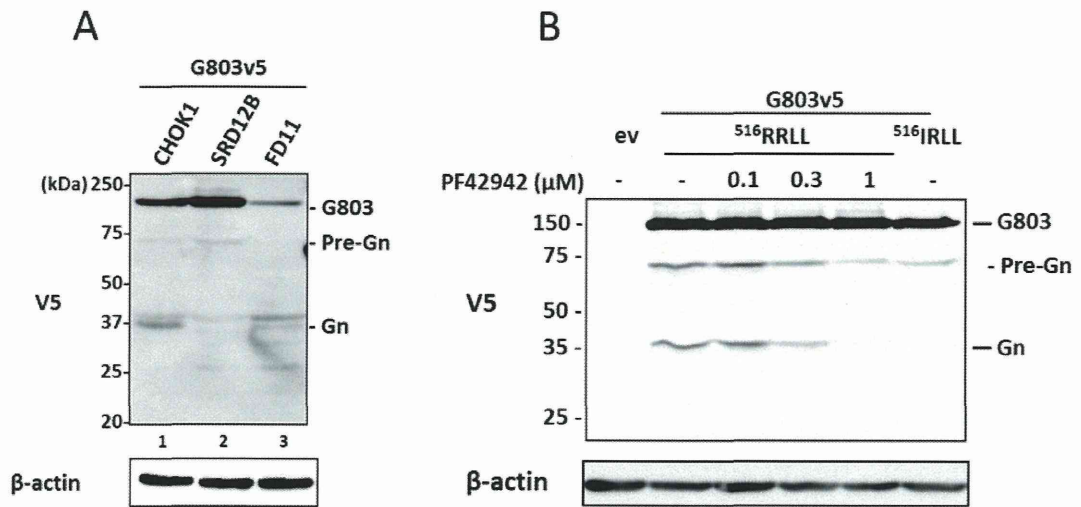


図4. CCHFV G変異体(G803)のS1P/SKI-1による開裂
 (A) S1P/SKI-1欠損細胞株におけるG803の開裂への影響. (B) PF-429242によるG803の開裂への影響

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Uchida L., Espada-Murao L.A., Takamatsu Y., Okamoto K., Hayasaka D., Yu F., Nabeshima T., Buerano C.C., Morita K.: The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Sci. Rep.* 4:7395, 2014
2. Tun M.M., Aoki K., Senba M., Buerano C.C., Shirai K., Suzuki R., Morita K., Hayasaka D.: Protective role of TNF- α , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci. Rep.* 4:5344, 2014.
3. Aoki K., Shimada S., Simantini D.S., Tun M.M., Buerano C.C., Morita K., Hayasaka D.: Type-I interferon response affects an inoculation dose-independent mortality in mice following Japanese encephalitis virus infection. *Virology* 511:105, 2014.

