

氏名	渡邊 靖夫
(ふりがな)	(わたなべ やすお)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第62号
学位審査年月日	令和5年2月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Identification of the corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonists as inhibitors of Chikungunya virus replication using a <i>Gaussia</i> luciferase-expressing subgenomic replicon (ガウシアルシフェラーゼ発現サブゲノミックレプリコンを用いたチクングニアウイルス複製阻害剤としての副腎皮質刺激ホルモン放出因子1受容体拮抗薬の同定)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 朝日 通雄 教授 近藤 洋一

学位論文内容の要旨

《目的》

チクングニアウイルス (CHIKV) は、トガウイルス科アルファウイルス属に分類されるエンベロープをもつプラス鎖 RNA ウイルスである。感染したヤブカ属の蚊に刺されることでヒトに感染し、発熱、筋肉痛、そして関節痛を特徴とするチクングニア熱 (CHIKF) を引き起こす。CHIKF は、アフリカやアジアの熱帯地域の風土病と考えられていたが、2004年にケニア沿岸部で始まった大流行がインドや東南アジアにまで達し、現在では世界的な公衆衛生上の脅威となっている。しかし、承認されたワクチンや特異的な抗ウイルス

薬は存在せず、CHIKV 感染症の治療は主に、解熱薬、鎮痛薬、また輸液を使用した関節痛などの症状緩和のみである。CHIKV の媒介蚊は我が国にも生息するため、CHIKV 感染の国内流行が絶えず懸念されており、その治療薬の開発は急務である。そこで、本研究では抗 CHIKV 薬の開発につながるウイルス阻害剤の新規同定を目的とした。

《方法》

ウイルスゲノムの構造タンパク質遺伝子をレポーター遺伝子に置き換えるサブゲノミックレプリコンシステムは、多くの RNA ウイルスの創薬研究に広く使用されている。レプリコン RNA は感染性ウイルスを産生しないため、高いバイオセーフティレベルが必要な BSL-3 病原体である CHIKV の研究においては特に有用である。本研究では分泌型ルシフェラーゼであるガウシアルシフェラーゼを発現する CHIKV レプリコンシステムを樹立した。次に、このレプリコンシステムを市販の細胞シグナル伝達経路関連アゴニスト/アンタゴニストライブラリー（80 種類）を用いたスクリーニング解析に供することで、レプリコン活性を阻害する化合物の同定を行った。同定された候補化合物の抗 CHIKV 活性と作用メカニズムの解析は、感染性 CHIKV と培養細胞を用いた感染実験系にて評価した。

《結果》

樹立したガウシアルシフェラーゼ発現 CHIKV レプリコン RNA を用いた化合物スクリーニングを行った結果、ガウシアルシフェラーゼ活性を 50%以上低下させ、90%以上の細胞生存率が認められた化合物を合計 6 種類（ピリラミンマレイン酸塩、CP-154,526 塩酸塩、ベラトリジン、トルカポン、プロトリプチリン塩酸塩、イミプラミン塩酸塩）同定した。これらの化合物のうち、イミプラミンは抗 CHIKV 活性を有することがすでに報告されている（Wichit ら、Sci. Rep、7:3145, 2017）。そこで、残り 5 種類の候補化合物について、培養細胞を用いた CHIKV 感染実験系にて抗ウイルス活性を評価した結果、全ての化合物が CHIKV 増殖への抑制活性を有することが明らかとなった。そのうち副腎皮質刺激ホルモン放出因子 1 受容体(CRF-R1)アンタゴニストである CP-154,526 は最も強い抗 CHIKV

活性を示し、50%ウイルス抑制濃度 (IC₅₀) は 0.39±0.20 μM であった。次に、他の CRF-R1 アンタゴニストの抗 CHIKV 活性を検討したところ、CP-154,526 とは化学構造の異なる NGD98-2、及び化学構造が類似した R121919 は、いずれも CP-154,526 と同等の抗 CHIKV 活性を示した。最後に、CP-154,526 の抗 CHIKV 活性がウイルス侵入時または侵入後のどちらのステップに対する作用であるのかを調べた。ウイルス感染前またはウイルス感染後に細胞を CP-154,526 で処理したところ、CP-154,526 は感染後処理においても CHIKV 感染を阻害し、感染前後の処理による抗 CHIKV 活性の有意な差は認められなかった。さらに、細胞に CHIKV を 2 時間暴露して細胞内に侵入したウイルス量を CP-154,526 存在下と非存在下で比較したが、RT-qPCR 法で検出した細胞内ウイルス RNA 量に差は認められなかったことから、CP-154,526 は CHIKV の細胞への結合及び侵入段階に影響を与えないことが示された。

《 考 察 》

レプリコンアッセイによって抗 CHIKV 活性を示す化合物として同定された CP-154,526 はウイルス侵入の後でも抗 CHIKV 活性を維持したこと、またウイルスの細胞への結合や侵入段階を阻害しなかったことから、細胞内でのウイルス複製過程に作用することが示唆された。この作用機序はレポーターCHIKV レプリコンを用いた化合物スクリーニングによって CP-154,526 が同定された結果とも一致している。一方、ヒト由来 Huh7 細胞における CHIKV の増殖効率は、CRF-R1 特異的 siRNA のトランスフェクションによって変化しなかったことから、CP-154,526 のような CRF-R1 アンタゴニストは CRF-R1 以外の細胞性またはウイルス性分子を標的として CHIKV の増殖を抑えている可能性が考えられた。今後は、CRF-R1 アンタゴニストが CHIKV を阻害する分子メカニズムを明らかにすることが必要である。

《 結 論 》

新規に樹立したガウシアルシフェラーゼ発現 CHIKV レプリコンを用いた化合物スク

リーニングシステムにより、これまでに報告されていない CHIKV 複製を阻害する複数の化合物を同定した。これらの中で CRF-R1 アンタゴニスト活性をもつ薬剤は最も強い抗 CHIKV 活性を示した。よって、本研究で確立した RNA レプリコンは CHIKV の細胞内複製過程を反映したシステムであり、CHIKV の抑制因子の同定だけでなく、感染細胞内における宿主-ウイルス相互作用の研究へも幅広く利用できる有益なツールである。

論文審査結果の要旨

申請者らは、国内流行が懸念されるチクングニアウイルス (CHIKV) に対する抗ウイルス薬の開発を目的とし、新たに樹立した分泌型ガウシアルシフェラーゼ発現 RNA レプリコンシステムを用いた化合物スクリーニングを行った。その結果、CHIKV の増殖を阻害する新規の化合物 5 種類を同定した。そのうち、最も強い抗 CHIKV 活性を示した副腎皮質刺激ホルモン放出因子 1 受容体 (CRF-R1) アンタゴニストはウイルスの細胞侵入以降のステップを阻害することが分かった。一方、RNA 干渉法を使ってヒト細胞の CRF-R1 を特異的にノックダウンしても CHIKV の増殖効率には変化が見られなかったことから、CRF-R1 アンタゴニストは感染細胞内で CRF-R1 とは異なる別の分子を認識している可能性が示唆された。

本研究で樹立した RNA レプリコンシステムは CHIKV の細胞内複製過程を反映しており、抗ウイルス薬の同定や、細胞とウイルスとの相互作用を調べる研究へも幅広く応用できる有益な分子ツールであると考えられる。したがって本研究は、CHIKV 感染症に対する治療法の確立を目的とした新たな薬剤の創出に繋がり、医学の発展にも大きく寄与することが期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Biochemical and Biophysical Research Communications 2022 in press

doi: 10.1016/j.bbrc.2022.11.013