

氏 名 ささき こうへい 佐々木 宏平

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 204 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程  
薬科学専攻

学位論文題目 インフルエンザ及び単純ヘルペスウイルス感染症の克服に寄与する  
新規候補物質の作用特性に関する研究  
(Characterization of novel therapeutic candidates in the  
infectious diseases caused by influenza virus and herpes simplex  
viruses)

論文審査委員

(主査)	教授	今中 常雄
(副査)	准教授	安東 嗣修
(副査)	教授	黒崎 文也 (指導教員)

# 論文内容の要旨

## 背景・目的

医療が発展した現在においても、依然として感染症は世界中で大きな問題となっている。感染症の中でもインフルエンザは罹患者が多く、抗ウイルス薬による治療やワクチン接種による予防が行われているものの、それぞれ耐性ウイルスの出現や感染自体を防ぐことができないなどの問題を抱えている。また、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の感染拡大の要因であるという側面が最近になって明らかにされたことから、性器ヘルペスも注意すべき感染症と言える。性器ヘルペスの原因ウイルスは単純ヘルペスウイルス 1 型及び 2 型 (HSV-1, HSV-2) である。HSV に対する抗ウイルス薬は存在するものの、耐性ウイルス出現の問題を抱えている。また、HSV に対する有効なワクチンは開発されていない。

このような状況の中、放線菌 *Streptomyces* sp. から単離されたスフィドロフラン誘導体 (1R,2R)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propane-1,2,3-triol (MFPT) の *in vitro* における抗 HSV-1 活性が報告された。また、MFPT は抗 A 型インフルエンザウイルス (IAV) 活性は強くなかったものの、予備実験の結果から MFPT で処理した IAV を経鼻吸収型の弱毒生ワクチンとして利用できる可能性が示唆された。そこで、これらのウイルス感染症に苦しむ人々の一助となることを目的として、*in vitro* 及び *in vivo* における MFPT の抗 HSV 活性の評価と、MFPT 処理による IAV の病原性低下メカニズムの解明に取り組んだ。さらに、分岐型ポリエチレンイミンの 1 つである SP-012 は、カチオン性が非常に高い水溶性ポリマーであり、複数のウイルスに対する抗ウイルス活性が報告されている。しかしながら、動物モデルを使ったポリエチレンイミンの抗 HSV 作用の報告はこれまでなかった。そこで、*in vitro* 及び *in vivo* における SP-012 の抗 HSV 作用特性についても検討した。

## 1. MFPT による IAV の病原性低下メカニズムの解明

### 実験方法

MDCK 細胞を宿主細胞として用いて、MFPT 存在下で NWS 株 [A/NWS/33(H1N1)] を 10 回継代することで、MFPT 耐性 IAV を作製し、plaque purification 法により 10 個のウイルスクローンを得た。MFPT 耐性 IAV の増殖能は、プラークの大きさや MDCK 細胞における増殖曲線により評価した。また、マウス感染モデルを用いて MFPT 耐性 IAV の病原性を評価し、初感染後に生残したマウスに致死量のウイルスを再感染させることで弱毒生ワクチンとしての可能性を追究した。MFPT 処理によって誘導された変異の特定は、ダイレクトシーケンス法を用いて行った。増殖能の低下に主に関与すると推察された変異を特定した上で、その変異による影響を Western blotting, 免疫染色及び定量 PCR によって調べた。また、野生型ウイルス (NWS 株) 感染時に MFPT を添加した時の影響を、Western blotting で調べた。

### 結果・考察

MFPT 耐性 IAV は、*in vitro* において野生型ウイルスと比較してプラークが小さく、子孫ウイルス放出量も少なかった。また、マウス感染モデルにおいて、野生型ウイルス感染時よりもマウス体内のウイルス量は有意に減少し、発症の程度を表す体重の減少が抑制され、死亡率が低下した。さらに、MFPT 耐性 IAV の感染によって十分な量の中和抗体が産生されたことで、致死量のウイルスを再感染させても、マウスは発症せずに生存した。これらの結果から、MFPT 耐性 IAV

は増殖能が低下していて、かつ中和抗体産生能を維持していることから、弱毒生ワクチンとしての条件を満たしていることが示唆された。比較的短期間で作製でき、特別な技術を必要としないで作製できる点は MFPT 耐性 IAV の利点と考えられる。

MFPT 耐性 IAV のゲノムを解析した結果、解析した 10 クローン全てにおいて、NS1 (non-structural protein 1) の 164 番目の Pro が Ser に置換していて、MFPT は新規の変異を誘導することが明らかになった。NS1 の <sup>164</sup>Pro は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) と相互作用してこれを活性化するのに重要なアミノ酸残基と考えられている。Western blotting の結果、MFPT 耐性 IAV 感染細胞では Akt のリン酸化が減少し、アポトーシスの誘導に関わるタンパク質の発現が減少していた。これは、P164S 変異によって NS1 の PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化する機能が抑制されたためと考えられた。また、MFPT 耐性 IAV 感染細胞では、感染後期において NP (nucleoprotein) の核外への移行が抑制され、アポトーシスを誘導する IFN-β の mRNA の発現量が低下していた。以上の結果より、MFPT 耐性 IAV においては、NS1 の P164S 変異によって PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されたことで感染細胞のアポトーシスの進行が抑制され、その結果核内で増幅された vRNPs (viral ribonucleoproteins) の核外への移行が低下したことで子孫ウイルスの産生効率が低下し、増殖能の低下をもたらしたと考えられた。

作用機序の確認のために野生型ウイルス感染時に MFPT を添加したところ、リン酸化 Akt が減少し、アポトーシスの誘導に関わるタンパク質の発現が減少していた。したがって、MFPT は、NS1 が PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化するのを抑制することで抗 IAV 活性を示すことが示唆された。また、MFPT 処理によって誘導された NS1 の P164S 変異は、IAV が MFPT 存在下で増殖するために、すなわち MFPT が存在する環境に順応するために生じたものと推察された。

## 2. MFPT の抗 HSV 活性の評価

### 実験方法

HSV-1 として KOS 株、A4-3 株 [アシクロビル (ACV) 耐性株] 及び HF 株を、HSV-2 として UW 268 株を対象ウイルスとした。In vitro における抗ウイルス活性は、50% 細胞増殖阻止濃度 (CC<sub>50</sub>) と 50% ウイルス増殖阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) から求められる選択指数 (CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) により評価した。対照として ACV を用いた。また、マウスを用いた性器ヘルペスモデルを使って、in vivo における MFPT の抗 HSV 活性を評価した。試料は、感染日から感染 7 日後まで、1 日 2 回局所に投与した。この時、比較のため、溶媒 (phosphate-buffered saline; PBS) 投与群と ACV 投与群も同様に操作した。

### 結果・考察

In vitro における抗ウイルス活性試験の結果、ACV 耐性株を含めた 4 種のウイルス株に対する MFPT の選択指数は 310~530 であった。したがって、MFPT は強い抗 HSV 活性を有していた。また、A4-3 株に対する ACV の選択指数は相対的に低下したのに対して、同株に対する MFPT の選択指数は他の ACV 感受性株に対するものと比べて大きな差が見られなかったことから、MFPT の作用標的は少なくとも ACV とは異なることが示唆された。

性器ヘルペスモデルマウスにおいて、HSV-1 と HSV-2 のいずれに対しても MFPT は濃度依存的に局所のウイルス量を減少させた。しかしながら、HSV-1 と比べると HSV-2 に対する効果は低かった。HSV-1 接種時の発症スコアは、MFPT を 1.0 mg/day で投与した時に常にゼロであっ

たことから、MFPT は HSV-1 による炎症を強く抑制したと考えられる。一方 HSV-2 接種時は、PBS 投与群と比べて MFPT 投与群の方がわずかに発症スコアは低かったものの、全例が死亡した。*In vivo* における MFPT の作用機序は、MFPT を感染部位に投与していることから *in vitro* のそれと同様である可能性が考えられたが、*in vitro* に比べて *in vivo* における抗 HSV 活性が弱かったことから、MFPT の作用メカニズムについてさらに検討する必要がある。しかしながら、MFPT は、ACV 耐性 HSV に対しても適用可能な治療薬を開発するのに役立つと推察された。

### 3. ポリエチレンイミン SP-012 の抗 HSV 活性の評価

#### 実験方法

HSV-1 として KOS 株を、HSV-2 として UW 268 株を対象ウイルスとした。*In vitro* における抗ウイルス活性は、 $CC_{50}$  と  $IC_{50}$  から求められる選択指数により評価した。その後、time-of-addition 実験等の実験を行って SP-012 の作用標的を検討した。蛍光ラベルした SP-012 を用いて細胞内における SP-012 の挙動や、SP-012 による耐性ウイルス出現の有無も評価した。また、マウスを用いた性器ヘルペスモデルを用いて、*in vivo* における SP-012 の抗 HSV 活性を評価した。試料は、感染 1 時間後から感染 7 日後まで、または感染 24 時間後から感染 7 日後まで、1 日 2 回局所に投与した。この時、比較のため、溶媒 (生理食塩水) 投与群と ACV 投与群も同様に操作した。

#### 結果・考察

*In vitro* における抗ウイルス活性試験の結果、HSV-1 及び HSV-2 に対する SP-012 の選択指数はそれぞれ 119 及び 107 であった。したがって、SP-012 は強い抗 HSV 活性を有していた。また、SP-012 は吸着阻害活性、殺ウイルス活性及び cell-to-cell spread 抑制効果を有することが明らかとなった。これらの活性は、カチオン性の SP-012 が、細胞表面やウイルス粒子の表面に存在する糖タンパク質と相互作用した結果もたらされたものと推察された。蛍光ラベルした SP-012 の細胞内における挙動を調べた結果から、SP-012 は迅速に細胞内に取り込まれて核内に移動し、時間の経過とともに核外へ移動していくことが示唆された。また、SP-012 存在下で HSV を 10 回継代しても SP-012 に対する感受性が低下しなかったことから、SP-012 は耐性ウイルスを生じにくいことが明らかになった。

性器ヘルペスモデルマウスにおいて、HSV-1 と HSV-2 のいずれに対しても SP-012 は局所におけるウイルス量を低下させ、発症スコアの上昇を抑制し、その治療効果は ACV に匹敵するものであった。しかしながら、感染 24 時間後から投与した時は、感染 1 時間後から投与した時よりも治療効果が低かったことから、ウイルスの感染後できる限り早期に投与する必要があることがわかった。これは、ウイルス感染の初期段階、すなわち局所粘膜にウイルスが結合するのを防ぐには、感染 24 時間後からでは投与するタイミングが遅すぎたことが原因と考えられる。耐性が生じにくく、ACV と作用機序が異なることから、SP-012 は有用な HSV 治療薬の候補と考えられた。

## 学位論文審査の要旨

申請者である佐々木宏平氏の研究は、罹患者数が極めて多い感染症であるインフルエンザ、並びに ヒト免疫不全ウイルスの感染拡大の要因の一つともされる性器ヘルペス に対して、感染予防あるいは感染後の治療に奏功する新規な薬物候補物質を見出すことを目的としたものである。本研究ではまず放線菌 *Streptomyces* sp. から単離されたスフィドロフラン誘導体 (1*R*,2*R*)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propane-1,2,3-triol (MFPT) に着目し、MFPT 耐性 A 型インフルエンザウイルス (IAV) の病原性が著しく低下することを見出した上で、この変異株が弱毒生ワクチンとして利用できる可能性を指摘している。更に、MFPT に加えて分岐型ポリエチレンイミンの一つである SP-012 を抗ウイルス薬剤候補物質とし、*in vitro* 並びに感染動物を使った *in vivo* 実験系で、抗単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型 (HSV-1、HSV-2) 活性を検討し興味深い知見を得ている。研究内容と審査結果は以下のとおりである。

### 1. MFPT による IAV の病原性低下メカニズムの解明

MFPT 存在下で IAV を継代培養することで MFPT 耐性 IAV を作製したところ、この変異株は増殖能が顕著に低下しているにもかかわらず中和抗体産生誘導能を維持していることを見出した。佐々木氏は、この観察から、特別な技術を必要とせず比較的短期間で作製が可能な MFPT 耐性 IAV を弱毒生ワクチンとして利用するという着想を得ている。この可能性について検討するために、まず弱毒化のメカニズムの解明に着手し、MFPT 処理によって誘導された IAV 変異株クローンにおいては non-structural protein 1 (NS1) の 164 番目の Pro が Ser に置換していることを見出し、この変異が増殖能の低下に関与する大きな因子の一つであると考えた。NS1 の 164<sup>Pro</sup> は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) と相互作用してこれを活性化するための重要なアミノ酸残基とされていることから、佐々木氏は MFPT 処理によって誘導される P164S 変異が PI3K/Akt シグナル伝達系になんらかの影響を与えているものと推測した。これを証明するために PI3K/Akt 経路とアポトーシス誘導に関わるタンパク群の量的変化を Western blotting によって解析した結果、MFPT 耐性 IAV 感染細胞では Akt のリン酸化、並びにアポトーシス誘導関連タンパクの発現が減少することを見出している。同時に、この細胞では感染後期において nucleoprotein の核外への移行が抑制され、アポトーシスを誘導する IFN- $\beta$  の mRNA 量が低下することも併せて確認している。以上の実験結果を総合して、佐々木氏は、MFPT 耐性 IAV においては NS1 の P164S 変異が起こっており、これによって感染宿主細胞の

PI3K/Akt 経路の活性化レベルが下がることでアポトーシスの進行が抑制され、その結果、核内で増幅された viral ribonucleoproteins の核外への移行が阻害されて子孫ウイルスの産生・増殖能が低下する との結論を導いている。

## 2. MFPT の抗 HSV 活性の評価

次に佐々木氏は、HSV-1 として KOS 株、アシクロビル (ACV) に耐性を示す A4-3 株 及び HF 株を、また HSV-2 として UW 268 株を対象ウイルスとして選択し、MFPT の抗 HSV 活性の評価を試みている。*In vitro* における抗ウイルス活性試験の結果、ACV 耐性の A4-3 株を含めた 4 種のウイルス株に対する MFPT の選択指数 (50% 細胞増殖阻止濃度/ 50% ウイルス増殖阻止濃度) は 310 ~ 530 であり、MFPT が強い抗 HSV 活性を有することを見出した。また、A4-3 株に対する ACV の選択指数は相対的に低下したのに対して、同株に対する MFPT の選択指数は他の ACV 感受性株に対するものと比べて大きな差が見られなかったことから、MFPT の作用標的は ACV とは異なるものであると考えている。これらの *in vitro* 実験に加えて、佐々木氏は性器ヘルペスモデルマウスを用いて、HSV-1 と HSV-2 のいずれに対しても MFPT が濃度依存的に局所のウイルス量を減少させることを明らかにした。MFPT が他の HSV 株と同様に A4-3 株に対しても顕著な増殖阻止活性を有することを示した佐々木氏の研究成果は、ACV 耐性 HSV に適用可能な治療薬を開発するにあたって、本化合物が重要なシーズの一つとなることを提案するものである。

## 3. ポリエチレンイミン SP-012 の抗 HSV 活性の評価

続いて HSV-1 及び HSV-2 に対する SP-012 の抗ウイルス活性試験を行い、選択指数がそれぞれ 119 及び 107 であって、吸着阻害活性、殺ウイルス活性及び cell-to-cell spread 抑制効果を有することを示している。更に、蛍光ラベルした SP-012 の細胞内における挙動を調べた結果から、SP-012 が迅速に細胞内に取り込まれて核内に移動し、その後再び核外へと拡散するという現象を観察している。また、HSV を長期間継代しても SP-012 に対する感受性が低下しなかったことから、本化合物は耐性ウイルスを生じにくい特性を有することを示した上で、性器ヘルペスモデルマウスにおいて SP-012 が HSV-1 と HSV-2 の両者に対して ACV に匹敵する治療効果があることを明らかにしている。

佐々木氏によるこれら一連の研究成果は、新規な抗ウイルス治療薬の開発にとどまらず、ウイルス感染症に対する弱毒生ワクチンの開発にも大きく寄与しうるもので、国際学術誌

に掲載され国内外で高い評価を受けている。主査及び副査は、佐々木氏に口頭試問を行うとともに論文内容について審査し、博士（薬科学）を授与するに値すると判断した。

1. Kohei Sasaki, Kyoko Hayashi, Jung-Bum Lee, Fumiya Kurosaki, Toshimitsu Hayashi. Characterization of a novel mutation in NS1 protein of influenza A virus induced by a chemical substance for the attenuation of pathogenicity. *PLoS One*, **10**, e0121205, 2015.
2. Kohei Sasaki, Kyoko Hayashi, Yuji Matsuya, Kenji Sugimoto, Jung-Bum Lee, Fumiya Kurosaki, Toshimitsu Hayashi. *In vitro* and *in vivo* antiherpetic effects of (1*R*,2*R*)-1-(5'-methylful-3'-yl) propane-1,2,3-triol. *J. Nat. Med.*, **70**, 217-224, 2016.
3. Kyoko Hayashi, Hiroki Onoue, Kohei Sasaki, Jung-Bum Lee, Penmetcha K.R. Kumar, Subash C. B. Gopinath, Yoshie Maitani, Takashi Kai, Toshimitsu Hayashi. Topical application of polyethylenimine as a candidate for novel prophylactic therapeutics against genital herpes caused by herpes simplex virus. *Arch. Virol.*, **159**, 425-435, 2014.