

AFOWOWE TOSIN OLADIPO 論文内容の要旨

主 論 文

Topoisomerase II as a Novel Antiviral Target against Panarenaviral Diseases

トポイソメラーゼ II は汎アレナウイルス病に対する新規抗ウイルス薬の標的となり得る

Afowowe Tosin Oladipo、櫻井 康晃、浦田 秀造、Rajabali Zadeh Vahid、
安田 二郎

Viruses, 15 巻, 1 号, 105, <https://doi.org/10.3390/v15010105>, 2023 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：安田 二郎 教授)

緒 言

一部のアレナウイルスは、ヒトに感染することで重篤なウイルス性出血熱を引き起こす。中でも、ラッサウイルス (LASV) が引き起こすラッサ熱は、ナイジェリアを中心に西アフリカで蔓延しており、毎年約 30 万人が発症し、約 5000 人が死亡していると言われている。また、フニンウイルス (JUNV) は、南米出血熱の一つであるアルゼンチン出血熱の原因ウイルスであり、毎年 100~1000 人程度がアルゼンチン出血熱を発症し、適切な治療を受けなければ 15%程度が死亡する。現在アレナウイルス病に対する治療薬としてリバビリンが適応外使用されているが、効果が限定的である上に重篤な副作用も伴うため、より安全で効果的な治療薬の開発が望まれている。更に、病原性アレナウイルスの多くは BSL-4 に分類されるため、本研究では BSL-2 実験室で使用可能な代替系を確立し、それらを用いて抗ウイルス化合物の探索を実施した。

対象と方法

LASV Lineage II、JUNV Candid #1 株 (弱毒生ワクチン株)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) Armstrong 株のそれぞれのゲノム S 分節をもとに各アレナウイルスのミニゲノム発現細胞系を作製した。LASV 及び JUNV のミニゲノム発現系としては、ヒト肝臓由来 Huh-7 細胞に各ウイルス由来のミニゲノム、L 遺伝子、NP 遺伝子をそれぞれ発現するプラスミドを導入し、薬剤で処理後、Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega 社) を用いてミニゲノムの発現量を定量し、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability (Promega 社) を用いて細胞生存率を測定した。LCMV のミニゲノム発現系としては、ハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞に同様にプラスミドを導入し、赤色蛍光タンパク質 (RFP) 発現細胞をイメージングにより検出することでミニゲノムの

発現を測定した。ウイルス感染実験では、ヒト肺由来 A549 細胞に JUNV Candid #1 株を感染させ、培養上清中のウイルスゲノム RNA をリアルタイム PCR 法により定量した。また、A549 細胞に LCMV を感染させ、免疫染色法とイメージングにより感染細胞を検出した。発現抑制実験では、特異的 siRNA をそれぞれ A549 細胞に導入し、JUNV Candid #1 株を感染させ、培養上清中及び感染細胞内のウイルス RNA を定量した。

結 果

作製した LASV 由来ミニゲノムを用いたアッセイの最適化を実施した結果、Z-factor が 0.74 であったため、本アッセイは化合物スクリーニングに適していることが分かった。そこで、LASV ミニゲノムアッセイにより 2595 種類の FDA 承認薬 (Selleck Chemicals 社) をスクリーニングした結果、39 化合物がミニゲノムの発現を 90%以上抑制した。更にその中から細胞毒性が低い化合物として、Pixantrone Maleate、Proflavine、Quinacrine Dihydrochloride、Quinacrine Dihydrochloride Dihydrate の 4 種類を同定した。それらは全て LASV 及び JUNV ミニゲノムの発現を濃度依存的に抑制した。Pixantrone Maleate はトポイソメラーゼ II の阻害剤であることが知られているため、他のトポイソメラーゼ II 阻害剤についても検討した。その結果、Idarubicin HCl、Ellipticine HCl、Voreloxin HCl、Amonafide も、LASV、JUNV、LCMV のミニゲノム発現を濃度依存的に抑制することを確認した。更に、トポイソメラーゼ II 阻害剤は、JUNV Candid #1 株と LCMV の感染も濃度依存的に阻害した。siRNA を用いた発現抑制実験を実施した結果、トポイソメラーゼ II α 或いは β に特異的な siRNA を導入した細胞に JUNV を感染させた場合、コントロール細胞と比較して培養上清中のウイルス RNA 量が大幅に減少した。一方、感染細胞内のウイルス RNA 量、及び細胞生存率には大きな変化が認められなかった。

考 察

本研究において、複数のアレナウイルスの複製・転写・翻訳過程をハイスループットに評価可能な系を確立した。それらを用いて薬剤スクリーニングを実施した結果、一連のトポイソメラーゼ II 阻害剤が複数のアレナウイルス感染を阻害することが認められ、それらの汎アレナウイルス病治療薬候補としての可能性が見出された。しかしながら、それら阻害剤の抗ウイルス活性と細胞毒性効果は大きく乖離していないため、今後より強力な阻害剤の探索や、他の抗ウイルス薬との併用等を検討すべきと考えられる。また、阻害剤と siRNA を用いた実験から、トポイソメラーゼ II α 及び β がアレナウイルス感染を制御していることも明らかとなった。これまでに主に DNA ウイルスについてトポイソメラーゼ II のウイルス複製への関与が報告されているが、今回新たに RNA ウイルスであるアレナウイルスについてもその関与が認められた。siRNA によるトポイソメラーゼ II α 或いは β の発現抑制下では、培養上清中のウイルス RNA 量が極端に減少していた一方、細胞内ウイルス RNA 量は大きく変化していなかったことから、トポイソメラーゼ II α 及び β はウイルスゲノムの複製・転写ではなく、ウイルスタンパク質の翻訳過程を制御している可能性が示唆される。その詳細な分子機序は現時点では不明であり、今後検討していく必要があると考えられる。