

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業
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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases
- 研究開発課題名：(日本語) 抗ニパウイルス感染症薬の開発
(英語) Development of a drug for Nipah virus infection.
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学医科学研究所 准教授 米田 美佐子
所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, The University of Tokyo. Associate Professor, Misako Yoneda
- 実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 候補化合物の in vitro での活性および毒性の検討
開発課題名：(英語) Examination of activity and toxicity of candidate compounds
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学医科学研究所 特任研究員 堀江 亮
所属 役職 氏名：(英語) Institute of Medical Science, The University of Tokyo. Project researcher, Ryo Horie

II. 成果の概要（総括研究報告）

これまでに得ていたリード化合物の類似化合物について、ニパウイルス増殖抑制活性を検討した。東京大学創薬機構から分与を受けた類似化合物 137 種について感染性ニパウイルスの増殖抑制活性を検討し、その結果から阻害効果の強さにより化合物を分類した。Vero 細胞にルシフェラーゼ発現ニパウイルスを moi 0.5 で感染させ、45 分後に終濃度 5 μM となるよう化合物を含む培地を加え、48 時間培養した。培養終了後、感染細胞を溶解しルシフェラーゼ活性を測定することにより、化合物のウイルス増殖阻害効果を測定した。化合物非添加サンプルと比較しルシフェラーゼ活性を 95% 以上阻害した非常に高い阻害活性を持つ化合物が 16 個、逆にルシフェラーゼ活性の阻害率が 20% 以下のもの 6 個が見出された。非常に高い阻害活性をもつ化合物についてはさらに mini-genome アッセイを行い活性の順位付けを行った。BHK-T7 細胞に mini-genome アッセイ用プラスミドをトランスフェクションしたのち、終濃度が 5 μM ~ 100nM の 6 段階となるよう化合物を添加し 24 時間培養した。培養終了後、細胞を溶解しルシフェラーゼ活性を測定し、50% 有効濃度 (IC50) を算出した。その結果、これまでに検討した類似化合物の中で、リード化合物より IC50 値が低い、すなわち高いウイルス増殖抑制活性を有するものはなかった。これらのデータを AMED 創薬支援戦略部に開示し、今後の研究方針について助言を得た。

本研究においては、ウイルス複製効率の解析のための Mini-genome アッセイでhamster由来の BHK-T7 細胞を用いていた。しかし、最終的にはヒト用抗ウイルス薬の開発を目指しているため、ヒト細胞で同様の検討が必要となると考え、T7 RNA polymerase を発現する HeLa 細胞の作出を行った。Puromycin 耐性遺伝子を含むベクターに T7 RNA polymerase 遺伝子を組み込んだものを HeLa 細胞にトランスフェクションし、薬剤スクリーニング、クローニングを行って作出に成功した。

また、ニパウイルス増殖抑制活性を示す化合物のターゲットを探索することを目的とし、ウイルスゲノム複製に必須の Nucleocapsid protein (N)、Phosphoprotein (P)、Polymerase protein (L) の 3 つのウイルスタンパクの大量発現系の作製を開始した。バキュロウイルス発現系の作製を試みた結果、P タンパクについては十分量のタンパクが得られた。

The inhibitory activity of 137 analogs of our lead compounds were analyzed. Vero cells were infected with Luciferase-expressing Nipah virus (NiV-Luc) at an moi of 0.5 for 45 min, followed by addition of analog compounds at a final concentration of 5 μM . After 48 hpi, the inhibitory activities of the analog compounds on virus growth were measured by luciferase assay. In the 137 compounds, 16 compounds had extremely high activity to suppress viral growth (>95%) and 6 compounds showed low activity (<20%). The 16 compounds were further examined by mini-genome replication assay to determine their IC50. The results showed that no compounds were found which had higher activity than the original lead compounds. We had discussed about all data with members of Division of Drug Research AMED, and obtained some suggestion for future plan.

Our mini-genome assay has been performed using BHK-T7 cells, which derived hamster kidney cells. The aim of this project is development of a drug for nipah infected human, therefore, the system using human cells is thought to be necessary. HeLa cells expressing T7

RNA polymerase were successfully produced.

To study if any of nipah viral protein would be target proteins of the lead compounds, we tried to establish the expression system of viral proteins Nucleocapsid protein (N), Phosphoprotein (P) and Polymerase protein (L), which were required in viral replication. In last year, the expression system and purification method of P protein had been established using recombinant baculovirus.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 2 件）

1. Uchida, S., Sato, H., Yoneda, M. and Kai, C. Eukaryotic elongation factor 1-beta interacts with the 5' untranslated region of M in Nipah virus to promote mRNA translation. *Arch. Virol.*, 2016, 161 (9), 2361-2368.
2. Horie R., Yoneda M*, Uchida S., Sato H., and Kai C. Region of Nipah virus C protein responsible for shuttling between the cytoplasm and nucleus. *Virology*, 2016, 497, 294-304.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Regulatory activities of Nipah virus 5' untranslated regions on viral gene expression. 口頭、Uchida S., Sato H., Yoneda M. and Kai C. 第 64 回日本ウイルス学会、2016 年 10 月 23-25 日、国内.
2. Efficacy of recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein in hamsters previously vaccinated with measles vaccine. ポスター、Lin C., Yoneda M. and Kai C. 第 64 回日本ウイルス学会、2016 年 10 月 23-25 日、国内
3. BSL-4 施設におけるニパウイルス感染症研究。招待講演、米田美佐子、第 16 回日本バイオセーフティ学会、2016 年 11 月 30 日-12 月 1 日、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願