

論 文 要 旨

Studies on novel antiviral agents against bovine viral diarrhea virus (BVDV) and hepatitis C virus (HCV)

新規抗ウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 薬
および抗C型肝炎ウイルス (HCV) 薬に関する研究

Mohammed Taha Ahmed Salim

Introduction and Objectives

Hepatitis C virus (HCV) infection represents a major public health problem. Nearly 3% of the population is chronically infected with this virus worldwide. The HCV vaccine is not available so far, and current available treatments are unsatisfactory. These facts mandate the urgent need for novel anti-HCV agents. Due to several characteristics shared between bovine viral diarrhea virus (BVDV) and HCV with respect to virion structure, genome organization, and replication cycle, BVDV is considered as a good surrogate model for HCV and has been used for investigating anti-HCV agents. In addition, the establishment of subgenomic and full-genomic HCV replicon cells as well as the infectious strain JFH1 is also accelerates the discovery of novel anti-HCV agents. The objectives of our study are 1) to find selective inhibitors of BVDV and/or HCV, 2) to examine a variety of compounds for their inhibitory effect on HCV replication in replicon cells, and 3) to elucidate the mechanism of action of the active compounds.

Materials and Methods

1. Anti-BVDV study

Anti-BVDV activity and cytotoxicity of test compounds were examined in MDBK cells by LDH and MTT colorimetric assays, respectively. The activity was confirmed by real-time reverse transcription (RT)-PCR and virus yield reduction assay. The time of drug-addition experiment and docking study for active compounds were also performed.

2. Anti-HCV study

Anti-HCV activity and cytotoxicity of test compounds were examined in subgenomic replicon cells by luciferase-based reporter assay and MTT assays, respectively. The activity was confirmed in different subgenomic and full-genomic replicon cells by real-time RT-PCR. The active compounds were also examined for their inhibitory effects on NS3 protease and NS5B RNA polymerase activity by biochemical assays.

Results

Some of the γ -carboline derivatives were found to be potent and selective inhibitors of BVDV replication. Among the compounds, 3,4,5-trimethyl- γ -carboline was found to be the most active against BVDV (Nose strain) in MDBK cells, with a 50% effective concentration (EC_{50}) of $0.017 \pm 0.005 \mu\text{M}$ and 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) of $7.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$. The compound inhibited viral RNA synthesis in a dose-dependent fashion. A time of drug-addition experiment and antiviral assay of the γ -carboline derivatives against the mutant strains resistant to some classes of BVDV RNA-dependent RNA polymerase inhibitors suggest that the compounds may target the RNA-dependent RNA polymerase.

A number of compounds were examined for their inhibitory effect on HCV replication in Huh-7 cells harboring subgenomic viral RNA replicons with a luciferase reporter (LucNeo#2). Among the compounds, some phenanthridinone derivatives were found to be active. The EC_{50} of the most active derivative was $0.063 \pm 0.010 \mu\text{M}$. This compound did not show apparent cytotoxicity to the host cells at concentrations up to $40 \mu\text{M}$. Its potent and selective anti-HCV activity was confirmed by real-time RT-PCR in different replicon cells. Interestingly, the phenanthridinone derivatives were less potent inhibitors of genotype 2a than genotype 1b of HCV. Since the phenanthridinone derivatives did not inhibit NS3 protease or NS5B RNA polymerase activity in biochemical assays, their molecular target (mechanism of inhibition) remains unknown

Discussion and Conclusion

In initial studies, we used BVDV as a surrogate model to HCV and tested compounds for their anti-BVDV activity. Although some compounds including the γ -carboline derivatives were potent and selective inhibitors of BVDV, they could not inhibit HCV replication. Therefore, we also examined directly the anti-HCV activity of compounds in HCV replicon cells. After screening a number of compounds, we could identify novel phenanthridinone derivatives as highly potent and selective inhibitors of HCV. The compounds were unique in their mechanism of action, since they did not inhibit HCV polymerase or protease, both of which are major targets for inhibition of HCV replication by antiviral agents currently under development.

In conclusion, compounds active against BVDV are not always good inhibitors of HCV due to the genomic variability between the two viruses. However, these compounds may be useful in the field of veterinary medicine and/or should be subjected to chemical modification to confer anti-HCV activity.

論文審査の要旨

報告番号	総研第 166 号	学位申請者	Mohammed Taha Ahmed Salim
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査 武田 泰生
	副査	吉家 清貴	副査 宇都 浩文

Studies on novel antiviral agents against Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Hepatitis C Virus (HCV)

新規抗ウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 薬および抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 薬に関する研究

世界の全人口の 3% が C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染している。HCV に対するワクチンはなく、現在は主にペグ・インターフェロン α (PEG-IFN α) とリバビリンで治療されているが不十分であり、新たな抗 HCV 薬の開発が求められている。ウシウイルス下痢症ウイルス (bovine viral diarrhea virus: BVDV) は HCV と同じフラビウイルス科に属し、ビリオン構造、ゲノム構成、および、複製過程が共通である。申請者は、HCV の代替としての BVDV システムと HCV システムを用いて、抗 HCV 剤の探索を行い、以下の知見を得た。

1. BVDV のウイルス増殖を指標とした抗 BVDV 剤の探索

- (1) γ -carboline 誘導体について抗 BVDV 活性をスクリーニングしたところ、trimethyl- γ -carboline SK3M4M5M が最も強い活性を示し、EC₅₀ 0.017 μ M、CC₅₀ 7.4 μ M で、Selective Index (SI) は 435 であった。
- (2) SK3M4M5M をウイルス接種 8 時間以降に培養系に添加しても抗ウイルス作用を示さず、この時期はウイルス RNA 合成開始時期と一致していた。
- (3) BVDV の RNA ポリメラーゼ finger domain を標的とする他の薬剤 3 種に対する耐性株は、SK3M4M5M に対しいずれも交叉耐性を示し、SK3M4M5M は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを標的とすると考えられる。
- (4) しかし、 γ -carboline 誘導体は HCV の replicon 細胞では抗 HCV 活性を示さなかった。

2. HCV の replicon およびウイルス増殖を指標とした抗 HCV 剤の探索

- (1) phenanthridinone 誘導体について subgenomic replicon システムで抗 HCV 活性をスクリーニングしたところ、HA-719 が最も活性が高く、EC₅₀ は 0.063 μ M であった。
- (2) HA-719 は、subtype 2a の JFH-1 株に対しては、subtype 1b よりも抗ウイルス活性が弱かった。
- (3) HA-719 は、replicon 細胞で濃度依存性に NS3 と NS5A の発現を抑制した。しかしながら、生化学的には HA-719 はウイルスの NS3 のプロテアーゼ活性や NS5B の RNA ポリメラーゼ活性を抑制しなかった。

本研究は、BVDV システムおよび HCV システムを用いて、新たな抗 HCV 剤の探索を試み新規の抗 BVDV 剤及び抗 HCV 剤を見出し、今後ウシの下痢症やヒトの HCV 感染症への応用の可能性を示したもので、興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 166号		学位申請者	Mohammed Taha Ahmed Salim
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	武田 泰生
	副査	吉家 清貴	副査	宇都 浩文
<p>主査および副査の5名は、平成24年2月3日、学位申請者 Mohammed Taha Ahmed Salim 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>(問1) BVDV と HCV の遺伝子間のホモロジーはどれくらいか？ (回答) 全般的なホモロジーは 21% 程度しかない。しかし、それは遺伝子部分によって異なる。NS3 プロテアーゼの例では、N 末端から 1/3 の部分では 17.2% であるが、残り 2/3 の部分では 47% である。</p> <p>(問2) BVDV が HCV の代替モデルとして以前に応用された例があるか？ (回答) いくつかの研究グループが、2006 年から 2009 年にかけて、抗 HCV 薬の探索研究に用いている。ただし、見つかった薬剤は BVDV に強い活性があっても、HCV には効果が弱いので、構造の化学修飾が必要であったと報告されている。</p> <p>(問3) 培養液にウマ血清を用いているが、濃度が 3% と 10% の2種類あるのは何故か？ (回答) 通常、細胞の増殖・維持には 10% を使い、抗ウイルスアッセイには 3% を用いた。</p> <p>(問4) ドッキングスタディにおいて、薬剤の疎水性が重要に思える。γ-カルボリンのメチル基の数を増やすと薬剤と酵素の相互作用はどのようになるのか？ (回答) ドッキングスタディは共同研究者によって実施されたため、メチル基の数を増やして、試したことはない。</p> <p>(問5) HCV の増殖では、まず HCV の RNA が翻訳されて、その結果 RNA ポリメラーゼが産生されるのか？ (回答) HCV の RNA は mRNA として機能し、翻訳されて HCV ポリ蛋白が作られる。ポリ蛋白は宿主細胞とウイルス由来のプロテアーゼにより切断され、NS5B RNA ポリメラーゼが産生される。</p> <p>(問6) 実験結果をみると、HA-719 はルシフェラーゼを指標とした HCV の増殖抑制と、HCV RNA の産生抑制がパラレルであるのに対して、どうして HA-718 と KZ16 はそうでないのか？ (回答) この2つはアッセイ方法が異なるので、若干の結果が異なっても不思議ではない。また、薬剤の高濃度ではルシフェラーゼ活性が完全に抑制されるのに対して、RNA は完全に抑制されないこともある。</p> <p>(問7) 抗 BVDV 薬のレファレンスとして BPIP を用いているが、この薬剤の抗 HCV 効果を調べたことがあるか？ (回答) BPIP を発見したグループが抗 HCV 効果を調べ、効果がなかったと報告している。</p> <p>(問8) 薬剤耐性 BVDV に対する結果から、γ-カルボリン誘導体の3位のメチル基が重要だと思うのだが、SK3M の薬剤耐性 BVDV に対する効果は調べなかったのか？ (回答) 今回は調べなかったが、我々が得た結果を総合すると、確かに3位のメチル基の存在が活性に重要だと思われる。今後、検討したい。</p> <p>(問9) 薬剤耐性 HCV レプリコン細胞の誘導に、(HA-719 以外の) 他の薬剤は用いなかったのか？ (回答) 薬剤耐性の誘導には、最も活性の強い薬剤を用いる必要があるので、HA-719 を用いた</p>				

(問10) 薬剤耐性 HCV レプリコン細胞に対する、NS3 プロテアーゼ阻害薬の効果を調べたか？

(回答) NS3 プロテアーゼ阻害薬は入手が困難なため、調べることが出来なかった。

(問11) エジプトでは遺伝子型4の HCV が蔓延しているようだが、この型のレプリコン細胞はあるのか？

(回答) 現時点では存在しないが、近い将来、使えるようになるとのことである。

(問12) 日本では肝細胞癌が多いが、エジプトではどうか？

(回答) エジプトでも同様である。エジプトでは7人に1人が抗 HCV 抗体陽性であり、肝細胞癌に移行する割合も高いと思われるが、正確な発症率は覚えていない。

(問13) エジプトにおける HCV 感染者の中で、HIV にも感染している割合はどれくらいか？

(回答) エジプトでは習慣や宗教的な違いから、HIV の感染率はきわめて低いので、HCV との共感染率もきわめて低いと思われる。

(問14) γ -カルボリンと BPIP の化学構造は似ていないが、time of addition 実験の結果が似ていることから、両者が同じ作用機序 (RNA ポリメラーゼ阻害) と結論しているようだが。

(回答) 確かに化学構造は全く異なるが、両者ともに感染後8時間を過ぎて薬剤を添加しても、抗ウイルス効果を示さないことで一致している。この時間はウイルスの増殖に RNA ポリメラーゼが関与する時間であることが分かっている。

(問15) ドッキングスタディにおいて、 γ -カルボリンと BPIP は RNA ポリメラーゼの同じポケットに結合するのか？

(回答) 同じポケットかどうかはチェックしていない。

(問16) HA-719 は HCV の RNA 合成を抑えるのか？

(回答) HA-719 はウイルスの増殖を選択的に抑えるので、ウイルス RNA 量は低下する。しかし、これは HA-719 が HCV の RNA ポリメラーゼ活性を直接阻害するからではない。事実、生化学的な試験では、HA-719 は HCV のプロテアーゼやポリメラーゼの活性を阻害しないことが分かっている。

(問17) HCV 感染の治療におけるインターフェロンの副作用にはどのようなものがあるか？

(回答) インターフェロンは免疫機構を修飾するので、それによる種々の副作用がある。一般的な副作用としては、感冒様症状や脱毛などが報告されている。副作用が強い場合には、治療を中止しなければならないこともある。

(問18) 新しい抗 HCV 薬はインターフェロン治療に追加で用いられるが、何故インターフェロンに置き換わることができないのか？

(回答) 新しい HCV プロテアーゼ阻害薬単独による臨床試験では、効果が不十分であるという結果になった。一方、インターフェロンとリバビリンによる標準治療にプロテアーゼ阻害薬を加えると、sustained virological response が飛躍的に向上することが分かっており、現時点では併用することになっている。

(問19) HCV の構造蛋白と非構造蛋白の一部は宿主細胞由来のプロテアーゼで、一方、MS3 から NS5B の非構造蛋白はウイルス由来のプロテアーゼで切断されるのか？また、宿主細胞由来のプロテアーゼは肝細胞に存在するのか。

(回答) その通りである。

(問20) HCV 感染のレセプターである LDL と CD81 の関係について説明して下さい。

(回答) HCV は体内でリポ蛋白と結合しているので、最初に肝細胞表面に存在する LDL と相互作用する。その後、E1/E2 のヘテロダイマーが CD81 および SCB1 分子に作用して、複合体を形成する。さらに、細胞内に侵入するためには claudine 分子を必要とすることが分かっている。

(問21) HCV 遺伝子型 1b と 2a に対する薬剤効果の違いについて説明して下さい。

(回答) この両者間では 70% のホモロジーがあるが、薬剤の場合には 1b に効果を示すが、2a に向こうであることも珍しくない。この現象は臨床試験においても報告されている。

(問22) HA-719 はウエスタンブロットでは NS3 と NS5A のレベルを減少させている。これは HA-719 が HCV ポリ蛋白への翻訳を阻害することを意味しているのか？

(回答) この場合も、HA-719 はウイルスの増殖を抑えたために、このような結果となったのであって、ウイルス RNA の翻訳が薬剤の直接の標的と言える訳ではない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。