

氏名	ますい しんた 増井 信太		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1706号		
学位授与の日付	平成30年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）		
学位論文題目	Maoto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, Inhibits Uncoating of Influenza Virus （漢方薬である麻黄湯はインフルエンザウイルスの脱殻を阻害する）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	藤田 昌樹
	（副査） 福岡大学	教授	今福 信一
	福岡大学	教授	高田 徹

内容の要旨

【目的】

麻黄湯のインフルエンザウイルス増殖抑制作用の機序を解明する。

【対象と方法】

細胞とウイルス：

ヒト肺胞由来細胞株である A549 を主として使用した。培養液中のウイルス力価は、犬腎臓由来細胞株である MDCK による 50% tissue culture infectious dose (TCID50) を用いた Reed and Muench 法にて行った。実験に用いたインフルエンザウイルスとして Puerto Rico/8/34 (PR8) を主に用いた。他には A/Victoria/210/2009 (H3N2), A/California/7/2009 (H1N1, pdm09), B/Brisbane/60/2008 を用いた。

免疫蛍光染色法：

インフルエンザウイルスを可視化するため、1次抗体として以下の抗体を用いた。 anti-matrix protein 2 (M2) (Thermo Scientific, Hudson, NH), anti-haemagglutinin (HA) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), or anti-nucleoprotein (NP) (ViroStat, Portland, ME) mAb

2次抗体として FITC-conjugated secondary mAb を用いた。核酸の染色には DAPI を用い、細胞器官の酸性化は LysoSensor green (ThermoFisher, Yokohama, Japan) と Acridine orange (ThermoFisher) 用いて染色した。

顕微鏡には Keyence all-in-one fluorescence microscope BZ-9000 with a 60x lens

(Osaka, Japan) と 共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM710, Oberkochen, Germany) を用いて観察を行った。

フローサイトメトリー解析：

1次抗体として anti-M2 (Thermo Scientific) mAb を用い、2次抗体として FITC-conjugated mouse mAb (Invitrogen) を用いて培養細胞を標識した。

測定機器として FACSCanto (BD, Franklin Lakes, NJ) を用い、30,000 個の細胞を分析した。

細胞毒性の評価としては 7-amino-actinomycin D と AnnexinV を用い染色を行った。

PCR analysis:

RNA 抽出は ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) と cDNA synthesis with a prime script RT reagent Kit with gDNA eraser (Takara, Tokyo, Japan) を用いて指示書に従い行った。

Real-time PCR は 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) と SYBR Green Kit (Takara) を用いて行った。

統計解析：

全てのサンプルは 3well を用いて実験し、少なくとも 2 回の実験を行い確認した。結果は平均値±標準偏差で表されており、グループ間の差の検定には unpaired Student t test を用いて、P 値<0.05 を統計学的に有意なものとした。

【結果】

麻黄湯の細胞、ウイルスに対する毒性：

0-10000 μ g/ml までの濃度の麻黄湯を A549 細胞に添加し、24 時間培養を行った。

培養後、7-amino-actinomycin D と AnnexinV を用いて細胞を染色し、フローサイトメトリーにかけて麻黄湯の細胞毒性に対する評価を行った。double negative の集団を細胞毒性を受けていない細胞としてカウントを行った。0-500 μ g/ml の濃度で 80%以上の細胞が生存していることがフローサイトメトリーにより明らかになった。またウイルス液を培養液のみ、または 400 μ g/ml の麻黄湯入りの培養液に 0.5 分、1 時間静置したものを用いて感染させ、24 時間細胞とともに培養した。3 者間に有意差は見られなかったことより麻黄湯によるウイルスの直接的障害作用はないと判断できた。

麻黄湯のウイルス力価に対する抗ウイルス作用：

麻黄湯と抗インフルエンザウイルス薬である laninamivir, amantadine との抗ウイルス作用の比較を行った。麻黄湯は容量依存的に抗ウイルス作用を有し、400、800 μ g/ml の麻黄湯は 10 μ M の laninamivir や 1,000 μ M の amantadine と同等以上の抗ウイルス作

用を持つことが分かった。

麻黄湯を構成する4つの生薬ごとの抗ウイルス作用を調べたところ麻黄、桂皮に有意差を持って抗ウイルス作用があることがわかった。

PR8 以外のインフルエンザウイルス A/California/7/2009 (H1N1, pdm09), A/Victoria/210/2009 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 に対しても麻黄湯は抗ウイルス効果があることがわかった。MEF, HeLa, Hacat 細胞を用いて感染実験を行ったが同様の結果が得られ、抗ウイルス作用の一般化が証明された。

麻黄湯のウイルス蛋白産生に対する作用：

インフルエンザウイルス蛋白産生に対する麻黄湯の効果を調べるため、ウイルスと麻黄湯を24時間細胞に作用させ、ウイルスのM2、NP蛋白に対する免疫蛍光染色を行い観察を行ったところ麻黄湯を作用させたものでNP、M2蛋白陽性細胞の比率が低下していた。フローサイトメトリー及び、ウェスタンブロット法にても麻黄湯を処理した細胞ではM2蛋白の減少が見られ、蛋白レベルでもウイルスの複製が阻害されていることが示唆された。

麻黄湯のインターフェロンに対する作用：

抗ウイルス作用を持つ細胞内蛋白であるMxA、PKRとそれを誘導するインターフェロンのmRNAを調べたところ麻黄湯を作用させたもので有意に減少していることがわかり、麻黄湯の抗ウイルス作用は抗ウイルス蛋白を介するものではないことがわかった。

麻黄湯によるウイルスの細胞へのエントリー阻害作用：

麻黄湯がウイルス複製のどの段階で作用しているのかをみるため、感染後時間を追ってウイルスmRNAをリアルタイムPCRにて評価した。麻黄湯を感染後0-2時間で作用させることが最も効果であることが分かった。さらに0-2時間を30分毎に分けて調べたところ感染後0-30分で麻黄湯を作用させることが最も効果的であることがわかった。このことよりウイルスの脱殻がおこる感染後0-30分において、麻黄湯は脱殻を阻害していることが示唆された。

麻黄湯はエンドソームの酸性化を阻害しインフルエンザウイルスの脱殻を阻害する：

インフルエンザウイルスの脱殻にはエンドソームの酸性化が必要である。生きている細胞に選択的に取り込まれ、酸性化したエンドソームやリソソームに集積する試薬であるLysoSensor greenとAcridine orangeを用いてエンドソームの酸性化に変化があるかを調べた。麻黄湯を作用させると培養液のみのものと比べ、両試薬の集積が見られなくなりエンドソームの酸性化が抑制されていることが示唆された。

また、ウイルスのエンベロープ上に存在するHA蛋白に対する抗体を用いて免疫蛍光染色法を行ったところ麻黄湯を作用させた細胞ではエンドソームにおいてインフルエンザウイルス粒子が脱殻をせず多く残存していることが観察された。

これらのことより麻黄湯はウイルスの脱殻を阻害し抗ウイルス作用を発揮することがわかった。

【結論】

麻黄湯は現在、インフルエンザウイルス感染症に対して保険適応のある薬剤で安価である。インフルエンザウイルスの複製を mRNA レベル、蛋白レベルで検討したところ、麻黄湯の作用はインフルエンザウイルスの型、細胞種に関わらず普遍的であり、既存の laninamivir, amantadine とほぼ同等である。麻黄湯は既存の抗インフルエンザウイルス薬の作用機序と異なり、エンドソームの酸性化を阻害することでウイルスの脱殻を阻害し、抗ウイルス作用を発揮することがわかった。

審査の結果の要旨

麻黄湯は古来より急性熱性疾患に使用されている。現在、麻黄湯の保険適応疾患に初期のインフルエンザが含まれ使用されているが、その効果、作用についての科学的根拠は乏しいものとなっている。本論文は、インフルエンザに対する麻黄湯のウイルス増殖抑制効果は、エンドソームの酸性化を阻害し、インフルエンザウイルスの脱殻を阻害するという機序を提示し得た。本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、審査委員との質疑応答は以下の通りである。

1. 斬新さ

古来より急性熱性疾患に用いられている漢方薬麻黄湯の抗インフルエンザウイルス作用を現代医学的に解明することができたことにある。

2. 重要性

麻黄湯はエンドソームの酸性化を抑制することでインフルエンザウイルスの脱殻を抑制する。現在インフルエンザの治療に用いられているノイラミニダーゼ阻害薬とは異なる機序であり、今後の抗ウイルス薬の開発に応用が可能である。また、エンドソームを介して感染する他のウイルスにも効果を発揮する可能性がある。

3. 方法の正確性

実験に用いたそれぞれの方法は現在、世界的に用いられている実験方法であり確立されていると言える。また各実験の検体は 3well を用い、グループ間の比較には unpaired Student t-test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差のあるものとしている。各実験は

少なくとも 2 回は同様の結果が得られることを確認し再現性を確保している。この評価方法は世界的に用いられており、正確性を有していると思われる。

4. 表現の明確さ

本研究は Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Volume 2017, Article ID 1062065, 12pages) にすでに掲載されており、その内容は国際的に認知されるものと思われる。目的、方法について明確かつ詳細に表現されている。結論も結果から直接的に導き出され、また結果に基づいた考察についても表現は明確である。

5. 主な質疑応答

Q: 麻黄湯を 400 μ g/ml の濃度に決定した理由は？

A: 麻黄湯の細胞毒性をみる実験で 500 μ g/ml までは麻黄湯を添加していない検体とほぼ同様の 80%以上の細胞生存率であり細胞毒性はないと考えられた。また、抗ウイルス作用をみる実験では 500 μ g/ml 以下の濃度では 400 μ g/ml が最も優れていたため 400 μ g/ml の濃度とした。

Q: ノイラミニダーゼ阻害薬との比較で麻黄湯は早く解熱効果が表れるのはなぜか？

A: 本研究には示していないが、麻黄湯は炎症性サイトカインを抑える効果があり、このことが関与していると考えられる。

Q: 脱殻を阻害するものは構成生薬の中のどれか？

A: 構成生薬のうち、麻黄と桂皮にウイルスの力価を抑える作用があるが、構成生薬それぞれの脱殻阻害作用の評価は行っていない。しかし、1999 年に Mantani らが麻黄湯の構成生薬の一つである麻黄にエンドソーム、リソソームの酸性化抑制作用があるとの報告をしており少なくとも麻黄には脱殻を抑制する作用があるのではないかと考える。

Q: 麻黄湯を処理すると 1 型、3 型インターフェロンの抑制はなぜ起こるのか？

A: インフルエンザウイルス感染症において 1 型、3 型インターフェロンは細胞内のウイルス RNA を RIG-I や TLR が認識することでシグナルが伝達され産生されるようになるが、麻黄湯はウイルスの脱殻を阻害するため、ウイルス RNA が細胞内に放出されず 1 型、3 型インターフェロン産生のシグナルが入らないためと思われる。

Q: 吸着阻害による抗ウイルス作用の可能性はないのか？

A: 本研究では 4°C で細胞によるウイルスのエンドサイトーシスを止めた状態で 1 時間ウイルスを細胞表面に吸着させた後に麻黄湯を添加し評価している。このようにウイルス吸着後の麻黄湯の処理ため、麻黄湯の抗ウイルス作用は吸着阻害によるものではないと思われる。

Q: 今後の研究の方向性は？

A: エンドソームを生活環に利用する他のウイルス疾患への効果を調べたい。また、本研究では示していないが麻黄湯を処理すると炎症性サイトカインの産生が抑制されるという実験結果を得ており、これらの機序解明や炎症性サイトカインが関与する疾患に麻黄湯が効くのかなどを調べていきたい。

Q: エンドソームの酸性化を抑えるという研究をさらに掘り下げる研究はしないのか？

A: エンドソームの酸性化を抑える化合物の特定ができればよいと思うが、麻黄湯の質量分析では 552 種類の化合物が検出され、ラットへ経口投与した場合、血液中には 208 種類の化合物が検出される。化学組成も分かっていない化合物も多く、その化合物の特定は困難であると思われる。V-ATPase はエンドソームやリソソームの膜に存在するプロトンポンプであり、インフルエンザウイルスの脱殻に必要とされる。麻黄湯もこの V-ATPase に作用していると思われ、エンドソームの酸性化を掘り下げる実験に挑戦しているが現時点では評価が難しい状況となっている。

Q: 構成生薬を違う配合で混ぜると効果が変わるのか？

A: 構成生薬毎に抗ウイルス作用の程度に違いが見られる。そのため、構成生薬の配合の違いで効果が変わることは予想される。しかし、製剤化されている麻黄湯に関しては製造する各メーカー毎の構成生薬の比率の違いはあるものの大きくはなく、メーカー間での効果の違いは大きくないと思われる。

Q: 1999 年に麻黄での研究があるが今回の研究の斬新なところは？

A: 本研究は 1999 年に Mantani らが行った研究を支持するものとなっている。前研究は麻黄単独の研究である。麻黄単独のエキス製剤はなく、通常インフルエンザウイルス感染症に使用されることはないが、本研究はインフルエンザウイルス感染症を保険適応に持つ麻黄湯のインフルエンザウイルス感染症に対する効果を科学的に証明しており、そこに斬新さがあると考えられる。また、本研究では前研究で行われていなかった感染早期の細胞内ウイルス RNA の評価、細胞内ウイルス蛋白についての評価、細胞内抗ウイルス分子についての評価、麻黄湯のウイルスへの直接作用についての評価、免疫蛍光染色法を用いたウイルスの脱殻阻害の評価を行い、多面的に効果を実証している。また、他のサブタイプのインフルエンザウイルス、A549 細胞以外の細胞への効果の確認も行っている。

以上の質疑を中心に活発な討議が行われ、申請者は適切に回答した。

以上の審査の結果、本論文は、今後のインフルエンザの治療に影響を及ぼす研究であり、内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、および質疑応答の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、学位論文に値すると評価された。