

氏名	もりもと りょうすけ 森本 亮祐
学位の種類	博士（食物栄養学）
学位記の番号	乙第100号
学位授与年月日	2023年7月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文の題目	カラハリスイカ果汁の抗インフルエンザ ウイルス作用と有効成分に関する研究
論文審査委員	主査 倭 英司 副査 伊勢川 裕二 副査 義澤 克彦

## 論文内容の要旨

### 【研究背景】

*Orthomyxoviridae* 科に属するインフルエンザウイルスは、エンベロープを有する一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスである。インフルエンザウイルスは、ウイルスタンパク質の抗原変異により長期的な流行を引き起こし、ウイルスに対する免疫感受性、薬剤感受性に変化をもたらすことで新興および再興感染症を引き起こす。主に A 型と B 型が数年～数十年単位で世界的流行を引き起こしている。現在、インフルエンザに対する対処法として予防にはワクチン、治療には抗ウイルス薬が汎用されているが、既存の対処法にも副作用や薬剤耐性株の出現など問題点を有する。その問題点を改善しうる代替法として身近な食品が目されている。食品抽出物の生体への様々な生理機能が知られており、インフルエンザウイルスを含む RNA ウイルスの増殖を阻害する報告がある。更に、食品に含まれるポリフェノールやフラボノイドなどのファイトケミカル（Phytochemical）は、その増殖阻害の作用点は様々であり、我々の身近にある食品は既存の予防・治療法に代わる新しい抗ウイルス戦略につながると考える。本研究では、新たな抗ウイルス戦略につながる食品としてウリ科食品（カラハリスイカ）を研究テーマとして、インフルエンザウイルスに対する有効性や機能性成分に関して検討する事とした。

### 【第1章】

ウリ科の植物抽出物のスクリーニングにより、強い抗ウイルス活性を有するウリ科食品を見出した。カラハリ砂漠を原産とする *Citrullus lanatus* var. *citroides* (Wild watermelon juice, 以下 WWMJ) は、MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖を強く阻害することが判明し、他のウリ科抽出物と比較して、 $IC_{50}$  値は低濃度（0.11mg/ml）で阻害効果を示し

た。さらに臨床分離株を含む複数の A 型・B 型ウイルス株に対して幅広い阻害効果や、オセルタミビル耐性株にも増殖阻害効果を示した。この結果から WWM の阻害機構はオセルタミビルと異なる可能性が示唆された。更に WWMJ は、ウイルス吸着期 (-1-0h) と感染後期 (4-8h, 特に 6-8h) を阻害している事が確認された。この結果は、抗ウイルス物質が WWMJ に複数含まれていることを示唆していた。ウイルス吸着期の阻害機構を詳細に検討した Binding inhibition assay や他試験の結果から、37° C 条件下における宿主細胞へのウイルス侵入 (エンドサイトーシス) を阻害している可能性が示唆された。 *In vivo* では A/PR/8/34 adaptation 株を感染させたマウスに対して、鼻粘膜への WWMJ の投与を行った。その結果、投与群の生存率が有意に延長することが確認された。

## 【第 2 章】

WWMJ に含まれる抗ウイルス物質の検討を行うためにメタボローム解析を実施した。WWMJ には多くのポリフェノールが、グリコシル化されたフラボノイドやアグリコンフラボノイドが含まれていた事に加え、8-prenylnaringenin および 8-prenyldaidzein, Daidzein, Genistein, Biochanin, Kaempferol 誘導体等も検出された。食品抽出物由来の二次植物代謝物、すなわち Daidzein, Quercetin, Luteolin は強い抗ウイルス効果を示し、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 143.6, 274.8, 8.0 μM であった。これらの化合物の抗ウイルス活性は分子構造内の官能基によって異なっていた。そこで本研究では、食品中に含有している一般的なフラボノイド類に焦点を当て、フラボノイドクラス (フラボン、イソフラボン、フラボノール、フラバノン、およびフラバン-3-オール) の抗ウイルス効果を分子構造の観点から議論した。IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 4.9 ~ 82.8 μM, 143.6 μM, 62.9 ~ 477.8 μM, 290.4 ~ 881.1 μM, および 22.9 ~ 6717.2 μM であり、抗ウイルス活性が確認された。フラボノイド骨格の修飾群因子 (数, 位置, 種類) は、抗ウイルス活性に大きく関係している可能性が示唆された。さらに、Time-of addition assay により、阻害機構がフラボノイド骨格構造によって異なることを見出した。興味深いことに、調査したすべてのフラボノイドがウイルス増殖の後期段階を共通して阻害していた。これはフラボノイドがウイルス粒子放出前のウイルス増殖事象を主に阻害していることを示唆している。オセルタミビル耐性株への有効性や細胞毒性 (CC<sub>50</sub> 値) の観点からも、フラボン類であるアピゲニンが優れた抗ウイルス物質であると評価した。

## 【第 3 章】

天然化合物は、将来の抗ウイルス薬開発の重要な情報源である。WWMJ には多くのポリフェノールが含まれており、含有しているフラボノイド類ならびにそのプレニル化化合物の抗インフルエンザ効果に注目した。ナリンゲニンはフラバノンに分類され、柑橘類などの食品に含まれているフラボノイドである。フラバノン化合物およびその誘導体は、幅広い生理活性を有し、抗ウイルス剤としても注目されている。さらに WWMJ から同定された 8-prenylnaringenin (8-PN) を含むプレニル化化合物の生物学的・薬理学的効果が数多く報告されており、抗ウイルス薬開発戦略の重要な情報源になると考えた。そこで本研究では、

プレニル化化合物を含むナリンゲニン誘導体の抗ウイルス効果を評価した。ナリンゲニン骨格 A 環 8 位・6 位における修飾基の立体因子はウイルスの活性に深く関与しており、プレニル基が最も望ましい事を見出した。また、活性評価と同時に蛍光顕微鏡を用いてプレニル化化合物の細胞内取り込み量を評価した。8-PN と 6-prenylnaringenin は強力な抗インフルエンザウイルス効果を示すと同時に、細胞内取り込み量が多い事を細胞内蛍光によって明らかにした。また、prenyl 基の位置によって細胞内分布や細胞外への流出速度が異なる結果を得た。

本研究では、WWMJ の成分やプレニル化化合物を含むフラボノイド類の抗ウイルス活性に重要な分子構造を細胞内取り込み量と共に証明した。

現在の治療薬はウイルスの複数ある増殖過程の一部を阻害するが、WWMJ のように宿主細胞へのウイルスのエンドサイトーシスとウイルス感染後期（ウイルス出芽前）を強く阻害する食品は新たな阻害剤として有用であると考えられる。従って、本研究で得られた知見は新たな創薬ターゲットにつながるアイデアを生み出す可能性がある。

## 論文審査並びに最終試験の要旨

本研究では、インフルエンザウイルスの複製抑制に関与する WWMJ 成分の分析を行い、果汁に含まれる様々なポリフェノールやフィトエストロゲンが抗ウイルス活性を示す中で、ポリフェノールに着目し、その中でも 8-PN に非常に高い活性を示すことを見出した。また、8-PN によるウイルス抑制機構としてウイルスのエンドサイトーシスの阻害であること、さらに活性の強さが細胞内への浸透性の速さと細胞内での保持能力の高さに関連していることを解明した。現在のインフルエンザウイルス治療薬は、ウイルス酵素を阻害するが、8-PN は宿主の生理活性を阻害することにより、インフルエンザウイルスの増殖を抑制することが示された。インフルエンザウイルスは、ノイラミニダーゼ阻害剤やエンドヌクレアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得するが、宿主のエンドサイトーシスを変異させることはできないため、8-PN に対しては耐性獲得が困難であると考えられる。従って、本研究で得られた知見は、新たな創薬ターゲットにつながるアイデアを生み出す可能性があり、8-PN の新たな機能を見出すための一連の研究は新規性のある重要な科学的根拠と考えられ、評価できる。ヒトの臨床応用や予防効果に関してはデータも不足し未知なところも多いが、今後の研究課題も提言し、発展性の期待できる研究と考えられる。本研究は新規性及び発展性を有する内容であり、博士学位論文に十分に値するものと判断した。

なお、令和 5 年 4 月 19 日に実施された公聴会においては、多くの質疑に対して、科学的根拠をもとに適切に答弁し、しっかりと自分の考えや今後の研究指針も述べ、本申請者の研究者としての能力は博士学位取得レベルに達したものであると判断された。以上の結果から、論

文審査員3名は全員一致で、当該博士学位申請者に対する博士の学位授与は十分にふさわしいと認めるものである。