

財団使用欄

令和6年6月26日 受理
No. 4

完了報告書

(兼 会計報告書)

2024年 6月 25日

公益財団法人 BOMU健康財団

理事長 塩野谷 貫一 殿

個人の方

氏名

印

団体の方

団体名 北里大学 感染制御研究センター

代表者 花木 秀明



印

貴財団より助成いただいた活動が完了いたしましたので、下記のとおり報告します。

活動内容	シークワサー由来ノピレチンおよびその類縁体(タンゲレチン)による SARS-CoV2 に対する抗ウイルス活性評価
------	---

※今後の連絡に必要となりますので、全ての項目にご記入ください。

提出者に関する事項	(フリガナ) 氏名又は団体名	キタサトダイガクカンセンセイギョケンキュウ 北里大学 感染制御研究センター	生年月日 又は設立年月日	
	(フリガナ) 提出担当者			
	住 所	〒108-8641 東京都港区白金 5-9-1 (TEL) 03-5791-6122 (FAX) 03-5791-6116 (E-mail) matsui-h@insti.kitasato-u.ac.jp		
	連絡先 ・ 郵送先	〒 同上 (TEL) (FAX) (E-mail)		

※提出後の住所・連絡先変更の際は、速やかに事務局までご連絡ください。

I. 活動成果及び今後の課題

(注) 各項目の記述には必要な分量のスペースを使ってください。

(1) 活動成果
(目的) これまでに Nobiletin は血糖値の上昇抑制、抗癌活性、神経変性疾患の改善、アレルギー抑制や抗炎症性作用を有することが報告されている。また、SARS-CoV-2 に対する抑制活性を示したことから、その再現性と類似誘導体による SARS-CoV-2 抑制活性の確認と抑制機序の解析を行った。
(方法) Vero 細胞に SARS-CoV-2 (WK-521 株) を 50pfu/ml で感染させ 37℃1 時間インキュベートした。ウイルス液を除いた後に細胞を洗浄し、Nobiletin や誘導体 100µg/ml から二倍階段希釈した培地を添加した。培養から二日後の培養上清を回収し上清中のウイルス RNA 量を qPCR 法で定量した。また、qPCR 法で抑制効果を認めた培養上清についてはプラーク法も実施した。上清を回収した細胞は固定した後に細胞溶解液として回収し、細胞内リン酸化タンパク質との関連を調べるためにウェスタンブロット法を行った。
(検討した Nobiletin とその類似誘導体)
1. Nobiletin 2. Tangeretin 3. Eupatilin 4. Scuellarein Tetramethyl Ether 5. Flavone
6. 3',4'-Dimethoxyflavone 7. 4'-Methoxyflavone 8. 4'-Hydroxyflavone 9. 5-Methoxyflavone
10. 6-Methoxyflavone 11. 3',4'-Dihydroxyflavone
1a. 5-Demethylnobiletin 2a. 4',7-Dimethylnobiletin 3a. 4',7-Diacetoxynobiletin
4a. 5-Demethyl-4'-7-diacetoxynobiletin 5a. Sudachitin 6a. 7-Demethylnobiletin
7a. 7-Acetoxynobiletin 8a. 7-Acetoxy-5-demethylnobiletin 10a. 4'-Benzyloxynobiletin
11a. 4',5-Dimethylnobiletin 12a. 4'-Demethylnobiletin 13. 7-Methoxyflavone
(結果) ウイルス感染細胞を Nobiletin とその他 22 の類似誘導体で処理した培養上清中の RNA 量を測定した結果、濃度依存的に SARS-CoV-2 抑制効果を認めたのは Nobiletin と 7-Methoxyflavone の 2 種類のみであった。この二物質に関してプラーク法でウイルス抑制効果を確認したところ、qPCR の結果と同様に SARS-CoV-2 抑制効果を認めた。そこで、Nobiletin と 7-Methoxyflavone で処理したウイルス感染細胞のリン酸化タンパク質を検討したところ、ウイルス抑制効果を認めない 5-Demethylnobiletin と比較して、リン酸化 STAT-3 の明らかな低下を示した。
(考察) これまでにも抑制効果を示していた Nobiletin による SARS-CoV-2 抑制効果の再現性を確認し、Nobiletin は SARS-CoV-2 に対して明らかに抑制効果を有すると考えられた。また今回、新たに 7-Methoxyflavone によるウイルス抑制効果を見出し、Nobiletin 以外にも抑制効果を有する化合物の存在が示唆された。これらの物質によるウイルス抑制機序については不明であるが、ウイルス抑制効果を認めた感染細胞ではリン酸化 STAT-3 の低下が確認され、この低下が直接あるいは間接的にウイルス抑制に寄与している可能性が考えられた。
(2) 今後の課題
Nobiletin による抗 SARS-CoV-2 効果は確認できたが、7-Methoxyflavone も含めて詳細なウイルス抑制機序は不明である。また、リン酸化 STAT-3 低下についてもウイルス抑制と直接的に関連性が有るのか、現時点では全く不明である。Nobiletin や 7-Methoxyflavone がウイルスタンパク質と直接結合してウイルス複製過程を直接阻害しているのか、それとも細胞内タンパク質と相互作用す

ることで、ウイルス抑制に関与しているのか明らかにする必要がある。リン酸化 STAT-3 の低下についても SARS-CoV-2 を直接抑制するという報告はまだ無いようである。STAT-3 は IL-6 など炎症性サイトカイン産生に関わる転写因子であり、この低下は抗炎症性に働く Nobiletin の作用と合致するようにも考えられる。この現象はウイルス抑制とは直接関係がない可能性も示唆されるため、リン酸化 STAT-3 低下とウイルス抑制との関連性を明らかにする必要がある。また、炎症性サイトカイン産生に対して抑制的に働くリン酸化 STAT-3 の低下は Nobiletin や類似誘導体がサイトカインストーム発生を抑制できる可能性も示唆しており、これらが炎症性サイトカイン産生を抑制できるか検証する必要がある。