



Title	新興・再興ウイルス感染症に対する広域的治療薬の創製研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	上村, 健太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14836号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85676
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Uemura_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏名 上村 健太郎

審査担当者	主査	教授	前 仲 勝 実
	副査	教授	中 川 真 一
	副査	講師	米 田 宏
	副査	准教授	黒 木 喜 美 子

学位論文題名

新興・再興ウイルス感染症に対する広域的治療薬の創製研究

博士学位論文審査等の結果について（報告）

最初に、本研究の研究背景および概要を述べた後、化合物スクリーニングに向けた評価系の構築とその結果について述べられている。近年、世界では様々な新興・再興ウイルス感染症が流行しており、2019年11月に発生し、パンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症（COVID-19）は、人々の健康のみならず、経済活動にも多大な影響を及ぼしている。また、デング熱を引き起こすデングウイルス（DENV、1型～4型の血清型が存在）は、フラビウイルス属のウイルスであり、蚊等の節足動物に媒介されるため、地球温暖化による流行地域の拡大が懸念されている。世界中で治療薬の研究開発が遂行されているが、現在までに完全に有効な治療法は確立されていないことから、治療薬の開発が望まれている。

SARS-CoV-2 や DENV 等の RNA ウイルスは、自身のゲノムを複製する際に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）を介した核酸合成を行う。RdRp の RNA 合成機能はウイルス間で共通しているため、RdRp に作用する化合物は、様々なウイルスに対して有効にはたらくことが期待される。RNA ウイルスに対するものとして、COVID-19 治療薬として開発されたレムデシビルや、C 型肝炎治療薬のソホスブビル等が知られており、これらはウイルスの RdRp に作用し、ウイルス RNA の合成伸長を阻害することで、ウイルスの増殖を抑制する。実際に、レムデシビルはコロナウイルスだけでなく、エボラウイルス等、様々な RNA ウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが知られている。著者は、創薬科学研究教育センターが保有する化合物ライブラリーから、DENV をはじめとするフラビウイルスやコロナウイルス等に対して、広域的に抗ウイルス活性を示す化合物を探索・開発することを目的とした。

著者は、まず、化合物スクリーニングを実施するために、DENV2 を用いた *in vitro* 薬効評価系を構築した。同時に、DENV と同じフラビウイルス属に属し、ヒトに重篤な疾患を引き起こすジカウイルス（ZIKV）、黄熱ウイルス（YFV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、ウエストナイルウイルス（WNV）についても、*in vitro* 薬効評価系の構築を進めた。初期スクリーニングとして、ウイルス増殖に伴い出現する培養細胞の細胞変性効果（CPE）をウイルス感染の指標とし、CPE の抑制を測定することで化合物によるウイルス増殖阻害活性を調べた。薬効評価系構築後、創薬科学研究教育センターの化合物ライブラリーの 753 個の化合物について抗 DENV2 活性を調べた結果、53 化合物が強い抗 DENV2 活性を示した。次に、DENV の他の血清型を含む上記のフラビウイルスに対する薬効評価を実施したところ、全てのウイルスに対して強い抗ウイルス活性を示す化合物が確認できた。これらの中から、2種類の化合物 A 及び化合物 B を Hit 化合物に選抜し、詳細な解析を実施することとした。

フラビウイルスは、一本鎖プラス鎖 RNA [ssRNA(+)] をゲノムに持つウイルスであることから、同じく ssRNA(+) をゲノムに持つコロナウイルス（HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、SARS-CoV-2）に対する化合物 A の抗ウイルス活性を調べた。ウイルス RNA の複製を調べる qRT-PCR assay、子孫ウイルスの感染力価を調べる TCID₅₀ assay、ウイルスタンパク質発現を調

べる免疫蛍光染色法を構築し、抗ウイルス活性を評価したところ、化合物 A はコロナウイルスの RNA 複製、タンパク質産生、子孫ウイルス産生を阻害することがわかった。続いて、どのステップで SARS CoV 2 の増殖を抑制しているのかを調べるために、化合物 A の添加タイミングを変えた Time of Addition 試験を実施した。その結果、化合物 A はウイルス感染過程の後期に作用し、ウイルスの複製を阻害することが明らかとなった。

一方、化合物 B についても、フラビウイルスをはじめ、同じく ssRNA(+)をゲノムに持つチクングニヤウイルス (CHIKV) 及びコロナウイルスに対する抗ウイルス活性を調べた。その結果、コロナウイルスに対する抗ウイルス活性を調べた。その結果、化合物 B はフラビウイルス、CHIKV 及びコロナウイルスの及びコロナウイルスの RNA 複製を阻害し、ウイルスタンパク質産生も阻害した。次に、ssRNA(+)ウイルス以外のウイルスに対する抗ウイルス活性を調べた。その結果、化合物 B は評価した全てのマイナス鎖は評価した全てのマイナス鎖 RNA ウイルス及びウイルス及び DNA ウイルスに対して抗ウイルス活性を示さなかった。これらの結果から、化合物 B は ssRNA(+)ウイルスに対して特異的かつ広域的に抗ウイルス活性を示す化合物化合物であることが示唆された。であることが示唆された。続いて、続いて、化合物 B の作用点を調べるために、DENV2 を用いた薬剤耐性ウイルス分離試験を実施し、化合物 B を高濃度で添加しても CPE を示すようなウイルスの遺伝子を解析したところ、RdRp 領域にアミノ酸置換が認められた。その耐性寄与度を確認するために、変異を有する組換え DENV2 を作製し、抗ウイルス活性を調べたところ、野生型の組換え DENV2 に対しては抗ウイルス活性を示したが、変異組換えウイルスに対しては抗ウイルス活性を示さなかった。これらの結果から、上記の変異が耐性獲得責任部位であり、化合物 B の標的部位は RdRp であることが示唆された。

化合物 A 及び化合物 B の in vivo 薬効を確認するために、SARS-CoV-2 感染マウスモデル及び感染マウスモデル及び DENV2 感染マウスモデルを構築した。マウスにウイルスを感染させ、化合物 A 及び化合物 B を投与した結果、対照投与群に対して、化合物投与群でマウス体内におけるウイルス増殖抑制が認められた。また、化合物投与群において、ウイルス感染マウスの致死抑制効果が認められた。この結果から、化合物 A 及び化合物 B は in vivo においても抗ウイルス活性を示すことが示唆された。

本論文によって、ssRNA(+)ウイルスに対して広域的に強い抗ウイルス活性を示す化合物 A 及び化合物 B を見出すことに成功した。DENV や SARS-CoV-2 をはじめ、新興・再興ウイルス感染症に対する完全に有効かつ安全な治療法は確立されていないため、この成果は新たな治療薬の研究開発に大いに貢献できると考えられる。

よって著者は、北海道大学博士 (薬科学) の学位を授与される資格あるものと認める。