



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on development of novel therapeutic agent against RNA virus infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	登, 治謙
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	乙第7179号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89970">https://hdl.handle.net/2115/89970</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Haruaki_Nobori_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨  
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学） 氏名：登 治謙  
Name

学位論文題名  
The title of the doctoral dissertation

**Studies on development of novel therapeutic agent  
against RNA virus infection**

**(RNA ウイルス感染症に対する新規治療薬の開発に関する研究)**

これまで様々なウイルス感染症が世界中で発生、流行している。感染や重症化を抑制するためのワクチン開発も実施されているが、感染症のコントロールには治療薬の開発も必須である。デングウイルス (DENV) は熱帯及び亜熱帯地域における最も深刻な感染症の1つであるデング熱及びデング出血熱の原因ウイルスであるが、DENV 感染症に対する抗ウイルス薬は存在していない。また、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の病原体であり、2019 年 11 月に中国で確認されて以降、世界的な流行が国際社会の公衆衛生において非常に深刻な問題となっている。抗 SARS-CoV-2 作用を有する治療薬は存在しているものの、薬効が不十分あるいは安全性、薬物相互作用などに懸念があり、新規抗ウイルス薬の開発が望まれている。

抗ウイルス薬は多くのプロセスを経て開発される。創薬初期段階では、*in vitro* において、ウイルスが保有する酵素活性やウイルス感染細胞におけるウイルス増殖などを指標としたアッセイ法などを用いて、化合物スクリーニングを行い、抗ウイルス薬候補のシーズを得ることが必要である。このシーズは、化合物の官能基等を変換して構造を最適化し、*in vitro* における薬効を高めるとともに、代謝安定性、経口吸収性などの薬物動態も考慮して抗ウイルス薬候補となる。創薬後期段階では、*in vitro* における薬効のみならず、マウス感染モデル等の *in vivo* における薬効を示す化合物の中から、臨床で治療効果を示す可能性を有する抗ウイルス薬候補が選択される。

本研究は DENV 及び SARS-CoV-2 を対象として、新規抗ウイルス薬の開発に寄与する知見を獲得することを目的として、第 I 章では DENV を対象とした創薬初期段階である抗ウイルス薬候補のシーズの探索を実施した。また、第 II 章では SARS-CoV-2 を対象として、COVID-19 治療薬候補のエンシトレルビルについて、創薬後期段階であるマウス感染モデルを用いた *in vivo* での薬効評価を実施した。

第 I 章では、培養細胞感染系を用いた化合物スクリーニングにより新規抗 DENV 化合物を選抜し、更にその作用メカニズムを明らかにした。化合物スクリーニング方法として、DENV 2 型 (DENV2) の接種により細胞死を引き起こすハムスター由来の BHK-21 細胞に約 7,000 個の化合物を作用させて、各化合物による細胞死の抑制を判定する方法を用いた。その結果、抗 DENV2 活性を持つ新規化合物として、ベンズイミダゾール骨格を有する化合物 B 及び、キノロン骨格を有する化合物 X 並びに化合物 Y を見出した。化合物 B、化合物 X、化合物 Y は DENV2 に対して薬剤の有効性の指標である 50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) が 1.32、3.88、9.19  $\mu\text{M}$  の抗ウイルス活性を示した。次に、本化合物の標的部位を同定することを目的として、化合物存在下で DENV2 を継代し、化合物耐性ウイルス分離を試みたところ、ウイルスゲノムに数ヶ所のアミノ酸変異が確認された。認められた変異と化合物の作用の関係を確認するために、リバーシジェネティクス法を用いて、アミノ酸置換ウイルスを作製し、化合物に対する感受性の変化を評価した結果、DENV2 の膜タンパク質である非構造タンパク質 4A (NS4A) の C87S の変異が化合物 B に対する感受性低下に寄与することが明らかになった。また化合物 X 並びに化合物 Y は、NS5 のメルトランスフェラーゼドメインの V130A の変異が当該化合物に対する感受性低下に寄与することを明らかにした。

第 II 章では、北海道大学と塩野義製薬の共同研究において、SARS-CoV-2 の 3C 様プロテアーゼを標的とした化合物スクリーニングから得られた化合物の構造を最適化することにより得られたエンシトレルビルを対象として、SARS-CoV-2 の *in vivo* 感染モデルを用いて薬効を評価した。本化合物は、第 I 章で記載した化合物評価技術の活用により抗ウイルス活性が見出され、これまでにオミクロン株を含む様々な SARS-CoV-2 変異株に対して *in vitro* での有効性が示されている。また、代謝安定性、経口吸収性などの薬物動態プロファイルが優れており、マウス感染モデルにおいて感染直後に投与することにより、用量依存的な抗ウイルス効果が認められていた。しかし、臨床現場では、抗ウイルス薬投与は感染直後ではなく、感染から一定時間後に投与が開始される。そこで本研究では、SARS-CoV-2 の経鼻接種から一定時間後にエンシトレルビル投与を開始した際の *in vivo* での薬効を評価した。具体的には SARS-CoV-2 ガンマ株をマウスに経鼻接種後 24 時間でエンシトレルビル投与を開始し、肺内ウイルス量の減少及び体重減少抑制効果を評価した。更に、マウスに対して高病原性を示す SARS-CoV-2 マウス馴化株 (MA-P10) を用いて、エンシトレルビル投与により、MA-P10 株感染によって生じる、致死、体重減少、肺の炎症等の所見に対する影響を評価した。その結果、エンシトレルビルは感染マウスの肺内ウイルス力価、ウイルス RNA 量共に、用量依存的に減少させ、本効果が、生存率の改善、体重減少の抑制、肺病変の減少、及び炎症性サイトカイン/ケモカインの産生抑制と相関していることを明らかにした。

以上より、第 I 章では DENV2 感染細胞の細胞生存率を指標とした化合物スクリーニングにより抗 DENV 活性を有する新規化合物及びその標的部位を同定し、複数の新規メカニズムを有する抗ウイルス薬候補のシーズを見出した。今回見出された抗 DENV 活性を有する新規化合物の抗ウイルス活性は  $\mu\text{M}$  レベルであり、更なる抗ウイルス活性の向上が必要と考えられるが、今後、当該候補化合物の構造を最適化し、第 II 章で実施したマウス感染モデルで得られた知識・技術を活用して *in vivo*

感染モデルを構築し、*in vivo*での薬効を示す抗ウイルス薬候補を選抜することが期待される。

第II章ではCOVID-19治療薬候補として開発されたエンシトレルビルを対象として、SARS-CoV-2感染24時間後からの投与における*in vivo*での抗ウイルス活性及び症状改善効果を確認した。本研究で得られた結果により、エンシトレルビルが臨床においても抗ウイルス活性を示し、かつCOVID-19症状を改善する治療効果を発揮することが期待され、COVID-19治療薬として臨床開発のステージに進むことが可能になった。更にエンシトレルビルは2022年11月22日、日本においてCOVID-19に係る治療薬として緊急承認を得られており、本研究成果はCOVID-19治療薬の創製に大きく貢献したと思われる。今後、非臨床の*in vivo*感染モデルで感染予防効果、伝播抑制効果等の効果を確認することにより、臨床現場におけるCOVID-19の予防、伝播抑制効果に対するエンシトレルビルの有効性の検証に繋げることを目指す。

本研究で示した抗ウイルス薬候補のシーズ探索手法や*in vivo*における薬効評価方法を他のウイルスに応用することで、様々なウイルスに対する抗ウイルス薬の開発も期待される。