

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 森田 武志

横浜市立大学 大学院医学研究科 分子生体防御学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 薬理学	教授 五嶋 良郎
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学	准教授 西山 晃
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学	講師 吉見 竜介

博士の学位論文審査結果の要旨

SARS-CoV-2 3C 様プロテアーゼ阻害活性による 抗ウイルス活性をもつ化合物の探索と検討

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は新型コロナウイルス感染症(COVID-19)を引き起こすウイルスであり、その感染は世界中に広がっている。現在もなお感染者、死亡者数は増加しており、公衆衛生上、最も大きな課題となっている。COVID-19 の予防・治療として大きな問題となっているのが、ワクチンや既存の治療薬に耐性のある変異株の出現である。そのため、変異の影響の受けにくい抗ウイルス薬の開発が求められている。そこで、私達は変異が生じにくく、ウイルスの複製において必須な酵素である SARS-CoV-2 のもつ3C 様プロテアーゼ(3CLpro)に着目をし、その阻害作用を検出するアッセイ系の構築を行い、候補化合物の探索を行うことで、ビタミン A の活性代謝物であり、急性前骨髄性白血病の治療薬として承認されている化合物である All-trans-retinoic acid (ATRA)を見出し、その阻害様式と SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス作用について検討を行い、ATRA が SARS-CoV-2 の複製を強く阻害することが示唆される結果を得た。

審査に当たり、以上の論文要旨の説明の後に以下の質疑応答が行われた。

まず吉見副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 3CLpro を阻害する候補化合物として ATRA 以外の他の候補化合物も見つかったと思うのだが、それらについて評価などは行っているのか。
- 2) 3CLpro は変異が少なく、コロナウイルスに共通であるため、SARS-CoV-2 変異株だけでなく、同じ様なプロテアーゼをもつ他のウイルス感染症にも応用できる可能性があるが、そのようなウイルスは存在しているのか。
- 3) ATRA の類縁化合物についても評価を行っており、阻害活性を持つ化合物で共通する構造などにも注目しているが、今後の展望はどうか。

これらの質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) ATRA 以外の候補化合物においても抗ウイルス作用を検討しており、それらでも抗ウイルス作用を示すものもあるが、抗ウイルス作用を示す濃度が ATRA ほど低くなく、25 μ M 以上などの高濃度で示すデータを得ている。
- 2) SARS-CoV の 3CLpro を阻害すると報告のある化合物が SARS-CoV-2 においても阻害作用を示すことが報告されており、かぜコロナウイルス(E229 や OC43, HKU1)においても活性部位は保存されているため、効果を示す可能性があるが、検討はしていないため、ATRA を用いて検討をする必要がある。
- 3) 阻害活性の示された化合物に共通性のある構造が確認されたため、今後、側鎖を変更した

化合物などを用いて阻害作用、抗ウイルス作用が強く、副作用の少ない薬剤の開発へと発展をさせていく。

次に西山副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) ATRA は **post-entry** の過程を阻害すると結果から示している, その後の抗ウイルス作用の検討では ATRA はどの段階から細胞に加えて前処理を行っているのか.
- 2) ウェスタンブロットにて **RIG-I** 非依存的であるということを示しているが, **RIG-I** の下流の遺伝子の発現などについては調べているのか.
- 3) レチノイン酸受容体は **VeroE6/TMPRSS2** 細胞, **Calu-3** 細胞に発現しているのか.

これらの質問に対して, 以下の回答を得た。

- 1) ATRA の作用する過程の検討においては **full-time, entry, post-entry** において細胞へと ATRA を加えるタイミングを変えているが, その他の実験系では **full-time** と同じ条件で検討を行っていた. **Post-entry** で示すのであれば, その後の検討も **post-entry** で細胞を処理しても良かった.
- 2) **RIG-I** の発現のみをウェスタンブロットにて調べており, その下流である **IRF3** や **IRF7** のリン酸化などは検討していない. 確かに, **IFN** 産生までの下流タンパク質の発現は調べる必要があった. 改めて今後検討する.
- 3) **VeroE6/TMPRSS2** 細胞, **Calu-3** 細胞共に **RAR** を発現しているという報告はあるが, その量などは比較しておらず, 本研究でも示してはいない. これらの確認は ATRA の作用に係るため, 確認はすべきであった. 今後の課題とする.

最後に, 五嶋主査より以下の論評と質問がなされた。

- 1) 変異株に対して広く治療効果を示すターゲットとして **3CLpro** に着目しているが, ウイルスの持っているプロテアーゼと宿主の持っているプロテアーゼに, 有効濃度の上である程度の違いがないとその働きを阻害したときに副作用が出現してきてしまうが, どのくらい違いがあるのか.
- 2) ATRA による抗 **SARS-CoV-2** 作用について, 他にどのようなメカニズムが考えられるか.
- 3) ドッキングシミュレーションにて結合した部位が活性部位であったことから, 競合的な阻害が予測されたが, **Lineweaver-Burk** プロットの結果では非競合的な阻害の結果を示し, そのことが矛盾であると報告していたが, そうとは言い切れないのではないか. 例えばインバーシアゴニストのように結合した部位で構造の変化が起き, 非競合的に阻害する場合も考えられるのではないか.
- 4) 天然化合物ライブラリーの選択はどのような考えに基づいて行われたのか.

これらの質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) 3CLpro の切断する配列を同じように切断する宿主のプロテアーゼの報告はないため、3CLpro の切断のみを阻害できるのであれば、副作用は少ないと予想される。しかし、ATRA による宿主のプロテアーゼの阻害は確認をしていない。
- 2) ATRA による抗 SARS-CoV-2 作用は 3CLpro の阻害作用だけでなく、RIG-I や IFN の発現上昇、Pin1 の阻害といった、マルチな作用によって結果的に生じているものだと考えており、その中の一つに 3CLpro の阻害があると考えている。
- 3) ドッキングシミュレーションでは結合を起こった後の構造変化による活性の有無は判断できないため、ATRA との結合とその阻害様式を明らかにするためには、実際に結合している構造を解析する必要がある。
- 4) 使用した天然由来化合物ライブラリーは企業との共同研究で提供されたものである。その際の選択は、ウイルスもしくはヒトのプロテアーゼなどの酵素に対し生理作用を示すものが SARS-CoV-2 に対しても有効性を示すとの考えのもとに行われた。

以上のような質疑応答がなされた。本学位論文は、SARS-CoV-2 に対する治療薬が少ない中、3CLpro を標的とした抗ウイルス薬の候補の探索としてスクリーニングを行い、ATRA を見出した。さらに、ATRA による抗 SARS-CoV-2 作用を検討し、変異が懸念される変異株(α , β , γ , δ 株)においても、その抗ウイルス作用を示した、重要な報告である。審査員による協議の結果、本研究は博士(医学)の学位に値するものと判定された。