

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08037

研究課題名(和文) ハイリスク群患者のヒト病原パラインフルエンザウイルスの診断法と治療薬の開発研究

研究課題名(英文) Development of Inhibitors of Human Parainfluenza Virus for Prevention of Multi-infectious Diseases

研究代表者

池田 潔 (Ikeda, Kiyoshi)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40168125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：1. hPIVのHN糖蛋白質シアリダーゼに適用できる定着性を改善した高感度・高輝度の新規蛍光顔料色素基質の合成(特願2016-141652)に成功した。  
2. hPIV シアリダーゼ特異的な阻害剤の合成を目的として、シアル酸の4位にグアニジル基を持つリレンザ型のシアル酸誘導体と蛍光剤BTP-3のハイブリッド型シアリダーゼプローブと、シアル酸の4位に種々のアシル置換基を持つシアル誘導体の合成を行い、それらの抗ウイルス活性を調べた。グアニジル型の化合物にはほとんど阻害活性は認められなかったが、アセトアミド型には弱いながら阻害活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Human parainfluenza virus type 1 (hPIV-1) is a serious pathogen causing upper and lower respiratory disease in infants and young children; however, there are no known effective inhibitors of hPIV-1 infection. We developed a novel fluorescent sialidase substrate, BTP3-Neu5Ac derivatives, which have imaging of sialidase activity by a highly sensitive fluorescent histochemical method. 2. For the synthesis of the potent and selective inhibitors of human parainfluenza virus, we synthesized compounds having guanidyl group and several acyl functions at C-4 position of sialic acid. Compound bearing guanidyl group showed no effect against hPIV, But, compound bearing Ac group showed inhibitory activity against hPIV.

研究分野：医薬品科学、創薬化学

キーワード：シアリダーゼ阻害剤 蛍光イメージングプローブ パラインフルエンザウイルス シアル酸

### 1. 研究開始当初の背景

世界的な温暖化は感染症のリスクを高めている。病原性ウイルスの一つであるヒト病原パラインフルエンザ(hPIV)は1型から4型が知られており、特に3型ウイルス(hPIV-3)は免疫力の弱い小児の初期感染において気管支炎や肺炎などの重篤な症状を引き起こす呼吸器系病原ウイルスであり臨床的に重要である。最近、hPIVが高齢者、妊婦、慢性肺疾患、心疾患、腎疾患、免疫不全症などの免疫力の低下したハイリスク群患者への日和見感染から多重感染を引き起こす危険性が指摘されている。しかしhPIVの感染機構や病原性の原因は解明されておらず、hPIV感染症の診断法、予防するワクチンや治療薬も皆無である。申請者は、すでにhPIVシアリダーゼ検出用の新規蛍光イメージングプローブの開発に成功している。さらに申請者が開発しリード化合物としているシアリダーゼ阻害剤は、現在、世界で最も活性が高く、実用的なhPIV-1型治療薬への最短距離に位置すると考えられる。

### 2. 研究の目的

世界的な温暖化は感染症のリスクを高めている。病原性ウイルスの一つであるヒト病原パラインフルエンザ(hPIV)は1型から4型が知られており、特に3型ウイルス(hPIV-3)は免疫力の弱い小児の初期感染において気管支炎や肺炎などの重篤な症状を引き起こす呼吸器系病原ウイルスであり臨床的に重要である。しかしhPIVの感染機構や病原性の原因は解明されておらず、hPIV感染症の診断法、予防するワクチンや治療薬も皆無である。申請者は、すでにhPIVシアリダーゼ検出用の新規蛍光イメージングプローブの開発に成功している。本研究は、これまでのhPIV-1および3型阻害剤の合成実績を背景に理論的分子設計と合成化学、生物活性評価を組み合わせた実践的創薬プロセスによりヒト病原パラインフルエンザウイルスの診断法の確立と治療薬の創出を目指している。本研究はシアル酸誘導体を用いた化学的アプローチによるウイルス受容体の解明により、これを模擬した分子をデザイン、構築するものであり、オーファン薬の開発として学術的に極めて意義高く、社会的、経済的効果を期待できるものである。

### 3. 研究の方法

(1) hPIV診断法の確立：すでにパラインフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性を高感度、迅速、簡便に局所染色できる新規蛍光イメージングプローブを開発し、シアリダーゼの視覚化に成功しており、さらにインフルエンザウイルスとの識別も可能である。申請年度内で新規蛍光イメージングプローブとLEDランプを組み合わせることにより診断キット化を検討する。

(2) hPIV-3治療薬の開発：申請者はhPIVのHN糖蛋白質シアリダーゼに対する特異的な蛍光プローブの開発に成功している。HN蛋白

質に対して高い親和性を示した特異的な蛍光基質の構造からhPIVのHN糖蛋白質のシアリダーゼの活性中心との親和性の予想が可能である。申請者はhPIVのHN糖蛋白質のシアリダーゼに対する特異的な顔料系色素蛍光基質の開発に成功していることから、hPIV診断法の開発の可能性は極めて高い。さらに特異的な蛍光基質の構造からhPIVのHN糖蛋白質のシアリダーゼの活性中心との親和性が予測できることから、本研究では分子モデリングにより、これまでの実績を基盤に新規ヒト病原パラインフルエンザウイルスの診断法の確立と治療薬の創出を行う。さらに有望な化合物については大量合成を行い臨床応用への可能性を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 申請者は、インフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性を高感度、迅速、簡便に局所染色でき、hPIVのHN糖蛋白質のシアリダーゼにも適用できる新規蛍光イメージングプローブ(BTP3-Neu5Ac)を開発している。さらに今回、定着性を改善した高感度・高輝度の新規蛍光顔料色素基質の合成(特願2016-141652)に成功した。この方法によりウイルス感染細胞を蛍光可視化し、蛍光により感染細胞数や感染拡大を簡便に定量化できる。さらに本試薬は、プラークフォーミング試験に適用でき、リアルタイムで耐性ウイルスの生け捕りが可能であり、耐性株、新型コロナウイルスに対応できる新薬の開発にもつながることが期待される。

(2) 申請者は、hPIV特異的な蛍光検出薬の合成を目的として、hPIVのHN糖蛋白質のシアリダーゼの活性中心との親和性を期待できることから、シアル酸の4位にグアニジル基を持つリレンザ型のシアル酸誘導体と蛍光剤BTP-3のハイブリッド型シアリダーゼプローブの合成を行った。シアル酸を出発原料として4工程で得られるデオキシ体を塩素化し鍵化合物(2)とした。鍵化合物2と蛍光剤BTP-3(3)を縮合させ4を収率27%で得た。4のアジド基を還元およびグアニジル化し5とし、5を脱保護し1aを収率12%で得ることに成功した。次にHN糖蛋白質のシアリダーゼの活性中心に対するシアル酸の4位の置換基効果を調べるために、シアル酸の4位に種々のアシル置換基を持つシアル誘導体の合成を行った。すなわち4のアジド基を還元した後、アミノ基に種々のアシル基の導入を行い、脱保護を行ってBTP-3を含む4-アシル-シアル酸誘導体1(Me, Et, iPr, N3, Bz, tBu, etc)を合成した。HPIVに対する抗ウイルス活性を測定した結果、1aは、ほとんど活性を示さなかった。ウイルスのシアリダーゼ中心へのグアニジル基の親和性が非常に高いために、シアリダーゼが機能せずシアル酸と蛍光剤とのグリコシド結合を加水分解できなかったと推定される。さらに酵素と基質との親和性を調整するために、シアル酸の4位にアシルアミド基を持つ1b-c誘導体の抗シ

アリダーゼ活性を測定した。その結果、抗シアリダーゼ活性の強さはアセトアミド基 > プロパンアミド基 > 2-プロパンアミド基の順であったが、いずれも蛍光も阻害反応もほとんど見られなかった。今後、分子モデリングにより置換基の大きさを調整し、hPIV 糖タンパク質シアリダーゼに対する特異性と高い抗ウイルス活性を持ったハイブリッド型 hPIV の治療薬の開発を行う。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus, Akira Minami, Yuko Meguro, Sayaka Ishibashi, Ami Ishii, Mako Shiratori, Saki Sai, Yuuki Horii, Hirotaka Shimizu, Hokuto Fukumoto, Sumika Shimba, Risa Taguchi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki, *J. Biol. Chem.* **292**, 5645-5654 (2017). (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M116.764357

Chemoenzymatic synthesis and characterization of *N*-glycolylneuraminic acid-carrying sialoglycopolypeptides as effective inhibitors against equine influenza virus hemagglutination, Makoto Ogata, Ami Koizumi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Mao Sakamoto, Rena Aita, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Takashi Yamanaka, Kazuya I. P. J. Hidari, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**:8, 1520-1528 (2017). (査読有) DOI.org/10.1080/09168451.2017.1325315

Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent spatial memory, Akira Minami, Masakazu Saito, Shou Mamada, Daisuke Ieno, Tomoya Hikita, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda and Takashi Suzuki, *PLoS One* **11**(10): e0165257 (2016). (査読有) Doi: 10.1371/journal.pone.0165257

Substrate specificity of equine and human influenza A virus sialidase to molecular species of sialic acid□, Tadanobu Takahashi, Saori Unuma, Sawako Kawagishi, Yuuki Kurebayashi, Maiko Takano, Hiroki Yoshino, Akira Minami, Takashi Yamanaka, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki, *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1728-1733 (2016). (査読有) DOI:10.1248/bpb.b16-00345

High-efficiency capture of drug resistant-influenza virus by live imaging of sialidase activity

Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Chihiro Tamoto, Keiji Sahara, Tadamune Otsubo, Tatsuya Yokozawa, Nona Shibahara, Hirohisa Wada, Akira Minami, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki, *PLoS One* **11**(5): e0156400 (2016). (査読有) Doi:10.1371/journal.pone.0156400

Preventive effect of 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA) and zinc, components of the pacific oyster *Crassostrea gigas*, on glutamatergic neuron activity in the hippocampusH. Tamano, Y. Shakushi, M. Watanabe, K. Ohashi, C. Uematsu, T. Otsubo, K. Ikeda, A. Takeda, *Biol. Pharm. Bull.*, **229**, 282-288 (2015). (査読有)

Preferential accumulation of 14C-N-glycolylneuraminic acid over 14C-N-acetylneuraminic acid in the rat brain after tail vein injection, Risa Taguchi, Akira Minami, Yukino Matsuda, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda and Takashi Suzuki, *PLoS One*, **2015**, *10*, e0131061 (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0131061

Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses, Tadanobu Takahashi, Maiko Takano, Yuuki Kurebayashi, Takashi Agarikuchi, Chihiro Suzuki, Keijo Fukushima, Shunsaku Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki, *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 1214-1219. (査読有)

### 〔学会発表〕(計 17 件)

池田潔他、蛍光官能基を持つ牡蠣由来新規抗酸化物質 E6 誘導体の合成研究、第 56 回日本薬学会・中国四国支部学術大会(徳島) 2017 年 10 月 21 日。

石井亜美他、神経興奮と連動したシアリダーゼ活性の増加は神経伝達物質の放出制御に関わる、第 36 回日本糖質学会年会(旭川) 2017 年 7 月 20 日。

尾形慎他、N-グリコシルノイラミン酸含有人工糖鎖ポリペプチドの化学酵素合成、第 36 回日本糖質学会年会(旭川) 2017 年 7 月 21 日。

紅林佑希他、シアリダーゼ蛍光プローブを用いた薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出・分離法の開発、第 36 回日本糖質学会年会(旭川) 2017 年 7 月 21 日。

三柘ゆか他、新規 Dengue ウイルス感染阻害剤の合成( ) 日本薬学会第 137 年会

(仙台) 2017年3月25日.  
大坪忠宗他、定着性を向上させたシアリダーゼプローブの合成、日本薬学会第137年会(仙台) 2017年3月25日.  
福間彩加他、ヒトパラインフルエンザウイルス検出のための新規蛍光イメージング剤の開発研究、日本薬学会第137年会(仙台) 2017年3月25日.  
池田潔他、組織染色可能な蛍光シアリダーゼ基質のライブイメージングへの応用、第29回微生物シンポジウム(広島) 2017年8月30日.  
大坪忠宗他、組織染色可能な蛍光シアリダーゼ基質の合成と応用、第35回日本糖質学会年会(高知) 2017年9月3日.  
池田潔他、炭素鎖長の異なるフルオラス・タグを用いたシアリル化反応の研究(4)、第55回日本薬学会・中国四国支部学術大会(徳島) 2016年11月6日.  
池田潔他、フルオラス・タグを利用したシアル酸誘導体の合成、日本薬学会第136年会(横浜) 2016年3月28日.  
藤原欄紫他、新規CMP-シアル酸誘導体の合成とシアル酸転移効率の検討、日本薬学会第136年会(横浜) 2016年3月28日.  
川上智恵子他、新規 Dengue ウイルス感染阻害剤の合成( )、日本薬学会第136年会(横浜) 2016年3月28日.  
大坪忠宗他、高感度な グルコシダーゼイメージング剤の合成と蛍光組織染色への応用、日本薬学会第136年会(横浜) 2016年3月28日.  
大坪忠宗他、異なる起源を持つグルコシダーゼの特異性定量化法の開発、日本薬学会第135年会(神戸) 2015年3月27日.  
寺岡文照他、新規 Dengue ウイルス感染阻害剤の合成( )、日本薬学会第135年会(神戸) 2015年3月27日.  
松本莉穂他、炭素鎖長の異なるフルオラス・タグを用いたシアリル化反応の研究(4)、日本薬学会第135年会(神戸) 2015年3月27日.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：新規化合物及び該化合物を含む蛍光組成物

発明者：鈴木隆、高橋忠伸、南彰、池田潔、大坪忠宗

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-018871 号

出願年月日：2015年2月2日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 潔 (IKEDA, KIYOSHI)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40168125

(2)連携研究者

鈴木 隆 (SUZUKI, TAKASHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：20240947

高橋 忠伸 (TAKAHASHI, TADANOBU)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：20405145

常盤 広明 (TOKIWA, HIROAKI)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：10221433