

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08375

研究課題名(和文) ウイルス特異的増殖プロセスの阻害を機序とする薬剤耐性回避型抗ウイルス剤の探索

研究課題名(英文) Screening of antiviral agents that avoid drug resistance by inhibiting virus-specific replication processes

研究代表者

袴田 航 (HAKAMATA, Wataru)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10333337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新興・再興ウイルス感染症に対する抗ウイルス薬の開発は大きく遅れている。本研究では、薬剤耐性ウイルスの出現回避を目指した、宿主の酵素によるウイルス特異的増殖プロセスを標的とした抗ウイルス薬の探索と開発を目指している。そこでウイルスコートタンパク質の糖鎖合成阻害がウイルスの感染性を大幅に低下させる事および糖鎖合成阻害がウイルス粒子の成熟を阻害することに着目し、これら糖鎖合成を司る酵素の阻害剤は薬剤耐性回避型抗ウイルス薬となると考えた。本研究は培養細胞内で機能する糖鎖合成酵素特異的蛍光基質を合成し、化合物ライブラリから抗ウイルス薬の候補となりうる阻害剤の探索を可能とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興・再興ウイルス感染症に対する抗ウイルス薬の開発は大きく遅れている。抗ウイルス薬はウイルス因子を直接標的とする直接作用抗ウイルス薬(Direct-acting antivirals, DAAs)と宿主因子を標的とする抗ウイルス薬(Host-targeting antivirals, HTAs)に大別される。HTAsは薬剤耐性ウイルスおよび将来的に出現が見込まれる未知のウイルスに効果が期待できる。本研究ではHTAsをターゲットとして、社会的要請の高い抗ウイルス薬に関する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The development of antiviral drugs for emerging and re-emerging viral infections has been greatly delayed. In this study, we aim to identify and develop antiviral drugs that target the virus-specific replication process by host enzymes to avoid the emergence of drug-resistant viruses. We focused on the fact that inhibition of glycan synthesis of viral coat proteins significantly reduces viral infectivity and that glycan synthesis inhibits the maturation of viral particles. We synthesized a fluorescent substrate specific for the glycosidase that works in cultured cells, which will enable us to screen for potential inhibitors of antiviral drugs from a compound library.

研究分野：創薬化学

キーワード：抗ウイルス薬 ウイルス糖タンパク質 糖鎖 阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗インフルエンザ薬のタミフルおよび抗 HIV 薬の逆転写酵素阻害剤・プロテアーゼ阻害剤は、ウイルス遺伝子にコードされているタンパク質・酵素を標的としているため、ウイルスゲノムの変異によって、薬剤耐性ウイルスの高頻度な出現が原理的に避けられない。そのため、複数の作用機序を有する阻害剤を同時に投与するカクテル療法が主流となっている。

本研究では、原理的に薬剤耐性が生じにくい有望な抗ウイルス薬の標的として、多くのウイルスの感染・増殖に必須な宿主機構である *N*-結合型糖鎖合成に着目した。*N*-結合型糖鎖合成酵素が阻害されるとウイルス糖鎖の成熟が阻害され、宿主であるヒト細胞の受容体との親和性が低下し、ウイルスの感染・増殖活性が大幅に低下する。故に、*N*-結合型糖鎖合成酵素は、薬剤耐性回避型抗ウイルス薬の標的酵素となる。

N-結合型糖鎖合成酵素阻害剤は、ウイルスの宿主受容体への結合能を低下させるだけでなく、タンパク質のフォールディングや細胞内輸送を混乱させ、様々なウイルス（インフルエンザ、B 型・C 型肝炎ウイルス、HIV、SARS 等）に抗ウイルス活性を示す事が数多く報告されている（Nature Reviews Drug Discovery, 1, 65, 2002, Nature Reviews Microbiology 14, 407, 2016）。これまで、標的とする *N*-結合型糖鎖合成酵素がウイルスの宿主であるヒトの酵素であり、抗ウイルス薬の標的酵素として適切ではないとの懸念が多く示されていた。しかし現在では、標的酵素に関わるヒト細胞内でのウイルス特異的増殖プロセスの存在が明らかとなり（Current Opinion in Pharmacology, 30, 1, 2016）多くの懸念が払拭されるとともに、新たな抗ウイルス薬の作用標的として非常に注目を集めている。このような背景から、これら標的酵素は Druggable Target として非常に有力であるが、抗ウイルス剤となる適切なリード化合物（阻害剤）が得られていない状況であると分析した。

このような研究の動向をふまえ、これまでの *N*-型糖鎖合成酵素阻害剤の抗ウイルス薬への応用を総説にまとめて報告した（申請者ら, Current Topics in Medicinal Chemistry, 9, 3, 2009）。本総説において、標的酵素阻害剤を抗ウイルス薬へ応用するならば、阻害剤の構造展開・膜透過性等の制御・代謝変換の制御等を行うために、既知の基質ミミックな阻害剤だけではなく、ドラックライクな構造を有する阻害剤を見いだす必要性があることを強く指摘した。

2. 研究の目的

新興・再興ウイルス感染症が毎年のように報告されているが、細菌感染症に対する抗生物質に比べ、抗ウイルス薬の開発は大きく遅れており、新規な抗ウイルス薬の開発が喫緊の課題となっている。本研究では、薬剤耐性ウイルスの出現回避を目指した、宿主の酵素によるウイルス特異的増殖プロセスを標的とした抗ウイルス薬の探索と開発を目指す。

ウイルスコートタンパク質の糖鎖合成阻害がウイルスの感染性を大幅に低下させる事に着目し、これら糖鎖合成を司る酵素の阻害剤は薬剤耐性回避型抗ウイルス薬となると考えた。本研究では、培養細胞内で機能する糖鎖合成酵素特異的蛍光基質を合成し、化合物ライブラリから阻害剤スクリーニングを行い、抗ウイルス薬のリード化合物を得る事を目的とした。

本研究では、*N*-結合型糖鎖合成の最初の段階に関与する小胞体グルコシダーゼを標的酵素とした。研究を始めた当初は、単に抗ウイルス薬の標的として報告例が最も多かったために標的酵素として選択したが、後の研究の発展により小胞体グルコシダーゼがヒト細胞内でのウイルス特異的増殖プロセスに関わる酵素であることが明らかとなった。

これまでに、小胞体グルコシダーゼを標的酵素とした阻害剤の *in silico* スクリーニングを行い、これまでに報告例のない骨格・阻害機構を有する 2 つの阻害剤母核を見出し報告した。1 つは非基質ミミックなマイケル付加型不可逆的阻害剤（申請者ら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 62, 2012）であり、1 つは抗ウイルス薬のリード化合物として優れた性質を有する新規インドール系可逆的阻害剤を見だし特許を取得した（申請者ら、特開 2011-072427）。

しかし、これら小胞体グルコシダーゼ阻害剤の研究において、*in vitro* 阻害活性と細胞レベル阻害活性の不一致が研究の進展を阻んでいた。前述のマイケル付加型阻害剤は、*in vitro* で高い阻害活性を示したが細胞レベルでは阻害活性を示さなかった。更に、細胞レベルでの小胞体グルコシダーゼ阻害のアッセイは、ウイルスまたはラジオアイソトープを用いるため（申請者ら, J. Carbohydr., Chem., 23, 27, 2004）、大量の化合物からなる化合物ライブラリからの阻害剤スクリーニングには適していない。

そこで、ヒト培養細胞において小胞体グルコシダーゼの活性測定を可能とすれば、化合物ライブラリからの阻害剤スクリーニングの効率化が可能となるため、標的酵素活性を細胞レベルで可視化する蛍光基質を開発に着手した。開発には多くの解決すべき課題があったが、培養細胞で小胞体グルコシダーゼ活性のみを特異的に検出可能な、阻害剤スクリーニングに適した励起波長を有する 3 色（赤・青・緑）の蛍光基質を開発した（申請者ら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 21, 3206, 2011, ACS Med. Chem. Lett., 5, 321, 2014, Bioorg. Med. Chem. 23, 73, 2015, Bioorg. Med. Chem., 24, 1369, 2016）。

本研究では、開発した蛍光基質と培養細胞を用い、ハイスループットな阻害剤スクリーニング系の構築を行い、それを用いて化合物ライブラリから小胞体グルコシダーゼ阻害剤のスクリー

ニングを行う。本方法は、これまでの細胞レベルアッセイと比較して非常に効率的よく細胞内で阻害活性を示す小胞体グルコシダーゼ阻害剤を見いだすことができる。このようにして得られた阻害剤は、コートタンパク質を有する広範なウイルスに対して、ウイルス特異的増殖プロセスを阻害する薬剤耐性回避型抗ウイルス薬になると期待される。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞と開発した小胞体グルコシダーゼ特異的蛍光基質を用いて、化合物ライブラリから阻害剤探索を行う。これまでの研究に基づき、(1) 特異的な蛍光基質を合成し標的酵素阻害剤の 96 穴フォーマットによるスクリーニング系を構築・最適化、(2) 化合物ライブラリからの阻害剤スクリーニング、(3) 各種生物活性に基づく最終ヒット化合物を選抜、(4) 最終ヒット化合物の合成と誘導化。以上により、効率的に得られた阻害剤は、これまででない新規な構造を有しかつ、ヒト細胞内で作用するウイルス特異的増殖プロセスを標的とした薬剤耐性獲得を回避可能な抗ウイルス薬のリード化合物となりうる。

(1) 小胞体グルコシダーゼ阻害剤のスクリーニング系の構築と最適化: これまでに *N*-結合型糖鎖合成の初期段階に関与し抗ウイルス薬の標的として報告例が最も多い小胞体グルコシダーゼに着目し、詳細な基質特異性解析を行った。その結果、標的酵素は基質の誘導化が容易な単糖誘導体を基質とし、本酵素に特徴的な酵素活性としてアティフィシャルな酵素活性: 2-deoxy-glucosidase 活性を見いだした (W. Hakamata et al, J. Carbohydr. Chem. 23, 27, 2004)。これらの結果から、小胞体グルコシダーゼの 2-deoxy-glucosidase 活性阻害を指標とすることにより、標的酵素特異的な阻害剤探索が可能となった。

(2) 化合物ライブラリからの阻害剤スクリーニング: 小胞体グルコシダーゼ阻害剤の研究において、『*in vitro* 阻害活性と細胞レベル阻害活性が一致しない』および『ウイルスとラジオアイソトープを用いる細胞レベル活性評価系』が問題であった。そこで、この2つの大きな問題を解決するため、前述蛍光基質を用いて標的酵素阻害剤のセルベーススクリーニング法の開発を行う。

(3) 各種生物活性に基づく最終ヒット化合物を選抜: In house ライブラリおよび公的ライブラリから目的化合物の探索を行う。公的化合物ライブラリとして、理化学研究所 ケミカルバイオロジー研究基盤施設 創薬ケミカルバンク基盤ユニット 天然化合物バンク「NPDepo」ライブラリ (MTA 契約済) および富山大学 和漢医薬総合研究所 生薬由来化合物ライブラリ (H28 年度共同研究契約締結) の利用を予定している。両ライブラリは、微生物および植物の二次代謝産物から構成されており多様な分子骨格を有している。このような幅広い化合物空間を持つ多様性のある化合物ライブラリを用いることで新規阻害剤のヒット率が大きく向上すると考えられる。

(4) 最終ヒット化合物の合成と誘導化: (1)~(3) にて得られた阻害剤の合成法を確立し誘導体の合成を実施する。

4. 研究成果

(1) 小胞体グルコシダーゼ阻害剤のスクリーニング系の構築と最適化: 標的酵素の基質特性解析・酵素とのドッキングシミュレーションの結果、基質の分子設計にキノンメチド開裂反応 (1,6-脱離反応) を利用した蛍光基質を設計した。本基質と標的酵素のドッキングモデルを構築した結果、酵素に認識されやすい蛍光基質の分子設計であることを確認した。次に、本蛍光基質が、細胞内で効率よくかつ擬 1 次反応 (酵素による加水分解後直ちにキノンメチド開裂が生じる) に従い蛍光団を遊離することを実証し、蛍光団の構造に依存せずヒト細胞内で機能することを報告した。これらの結果に基づき、小胞体に局在する標的酵素活性のみを特異的に検出可能な 3 色 (赤・青・緑) の蛍光基質を合成しその活性を評価した。次にヒト細胞で小胞体グルコシダーゼ活性のみを特異的に検出可能な 3 色 (赤・青・緑) の蛍光基質を用いて、細胞レベル阻害剤探索系の構築を行った。細胞培養および蛍光測定可能な 96 穴プレートに細胞を培養し、阻害剤または阻害剤候補化合物と本蛍光基質を加えインキュベーションを行い、各ウェルの蛍光強度を蛍光プレートリーダーによって測定したところ、阻害活性を効率的に評価可能であった。そこで、96 穴プレートに培養した細胞を用い既知阻害剤の阻害活性を指標として、最適基質の決定・基質濃度・インキュベーション時間・細胞種・培養培地組成等の条件を詳細に検討し、大量の化合物からなる化合物ライブラリからの阻害剤探索を可能とする阻害剤スクリーニング系を確立したと確信した。

(2)・(3) 化合物ライブラリからの阻害剤スクリーニングおよび各種生物活性に基づく最終ヒット化合物を選抜: 構築したスクリーニング系を活用しライブラリの化合物に対して一次スクリーニングを実施した。得られたヒット化合物は偽陽性ヒットも含まれるため、それらを排除するため濃度依存性が認められかつ系の標準偏差の 3 倍以上の阻害活性が認められた化合物をヒット化合物として選抜した。次に、抗ウイルス薬には低毒性の化合物が求められるため、前述のヒット化合物に対して細胞毒性評価を行った。その結果に基づいて低細胞毒性化合物を選抜した。さらなる選抜として、二次スクリーニングを実施した。これまでに選抜した化合物について、EC₅₀ を算出し、既知阻害剤と同程度またはそれ以上の高い阻害活性を示した化合物をヒット化合物とした。

(4) 最終ヒット化合物の合成と誘導化: 生物活性の評価に必要な阻害剤量を確保し、誘導化による高活性化を目指し、最終ヒット化合物であるカルボリンおよびその誘導体の合成法を確立した。これらにより得られた化合物は、ウイルス特異的増殖プロセスに関わる小胞体グルコシダー

ゼを阻害する新規な母核を有し、社会的要請が強い新規な抗ウイルス薬のリード化合物になることを強く確信している。今後の研究において、最終ヒット化合物が医薬品リード化合物として必要な水準まで阻害活性をもつよう研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Momoko Onda and Wataru Hakamata	4. 巻 30
2. 論文標題 Antiviral Activity and Mechanism of Action of Endoplasmic Reticulum Glucosidase Inhibitors: A Mini Review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E139-E145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.1753.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村啓喜、井上拓哉、恩田桃子、平野 貴子、袴田 航、西尾 俊幸
2. 発表標題 既報小腸グルコシダーゼ阻害剤をライブラリとして用いる小胞体グルコシダーゼII阻害剤の探索手法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恩田 桃子、石渡 明弘、袴田 航、平野 貴子、伊藤 幸成、遠矢 幸伸、西尾 俊幸
2. 発表標題 カルボリン誘導体の小胞体グルコシダーゼ II 阻害による抗ウイルス活性
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷理、飯泉寛、石井栄二郎、袴田航、平野貴子、西尾俊幸
2. 発表標題 小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤探索に適した蛍光基質の開発
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷 理, 袴田 航, 平野貴子, 西尾俊幸
2. 発表標題 小胞体グルコシダーゼII 特異的蛍光基質の合成とヒト培養細胞での評価
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊谷 理, 袴田 航, 平野貴子, 西尾俊幸
2. 発表標題 小胞体グルコシダーゼ II への特異性の向上を指向した蛍光基質の設計と合成
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wataru Hakamata, Kazuki Miura, Ryosuke Koyama, Shun Uema, Takako Hirano, and Toshiyuki Nishio
2. 発表標題 Cell-based Assay of ER glucosidase II inhibitor using its Novel Fluorescent Substrate.
3. 学会等名 International Chemical Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	氏家 誠 (UJIKE Makoto) (50415478)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------