

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07036

研究課題名（和文）ケミカルバイオロジーによるCOVID-19の重症化率における性差の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of sex difference in pathogenicity of COVID-19

研究代表者

福田 美香子（広浜美香子）（Fukuda, Mikako）

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60814655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、エストラムスチンリン酸エステルナトリウム（EMP）によるSARS-CoV-2の増殖抑制機構を解明する。EMPは、ナイトロゲンマスタード基が女性ホルモンに付加された化合物である。そこで、EMPをプローブとしたケミカルバイオロジー的なアプローチにより、女性ホルモンで制御されるSARS-CoV-2の増殖機構を明らかにする。EMPはDMV形成を抑制することでウイルスゲノムの遺伝子発現を抑制していることを明らかにした。一方、女性ホルモンの主要な結合分子であるESR1はEMPによる抗ウイルス活性には不要であり、核内受容体であるESR1非依存的なシグナル伝達経路を介した作用機構が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスのアウトブレイク以降、急速にその感染は拡大し、全世界で100万人を超える死亡者と、甚大な社会的・経済的な被害をもたらしている。新型コロナウイルス感染者の男女別統計によると、男性の重症化率および死亡率は高く、他の感染症よりも男女差が顕著であることが報告されている。本研究により、新型コロナウイルス感染症における性差の分子基盤を明らかにすることで、新たな抗ウイルス薬や治療法の開発に貢献することが可能である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we will elucidate the mechanism of SARS-CoV-2 replication inhibition by sodium estramustine phosphate (EMP), a compound in which a nitrogen mustard group is added to a female hormone. We will elucidate the mechanism of SARS-CoV-2 proliferation regulated by female hormones using a chemical biology approach with EMP as a probe. We found that EMP suppresses gene expression in the viral genome by inhibiting DMV formation. On the other hand, ESR1, a major binding molecule of female hormones, was not required for antiviral activity by EMP, suggesting a mechanism of action via ESR1-independent signaling pathway.

研究分野：ウイルス学

キーワード：新型コロナウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) において、重症化する患者の背景として、下記の因子が挙げられている。

- ・ 65 歳以上の高齢者

- ・ 下記の持病を有するもの

心血管疾患 (脳梗塞、狭心症、心筋梗塞、心不全など)

慢性呼吸器疾患 (喘息、慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患など)

喫煙、糖尿病、高血圧、BMI40 以上の肥満者、肝臓疾患、がん治療中

上記に加えて、感染率はほぼ同等であるのに重症化率には明らかな性差があり、男性で高い死亡率が報告されている (ハザード比で 1.59。Nature, Williamson EJ *et al.*, 2020 より)。男性で重症化率が高い要因として、生活習慣病や CTL 応答において性差がある可能性が報告されているが詳細は不明である。一方、in vitro では女性ホルモンであるエストラジオール処理により、新型コロナウイルスの増殖が抑制されることが多数報告されており、その作用機構の解明が性差の理解や抗ウイルス薬開発に向けて期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) エストラジオール誘導体による新型コロナウイルス阻害機構の解明、(2) 性差による重症化リスクの評価、(3) エストラジオール誘導体による新規抗コロナウイルス薬の開発を行う。これまでに、既承認薬ライブラリーを用いた新型コロナ治療薬の探索を行い、約 1,100 種類の既承認薬からエストラジオール誘導体であるエストラムスチンリン酸エステルナトリウム (エストラサイト: EMP) を同定した (図 1)。エストラサイトは、女性ホルモン (エストロゲン) であるエストラジオールにアルキル化剤であるナイトロゲンマスタードを付加した低分子化合物 (図 2) であり、エストロゲン受容体と不可逆的に結合することが報告されている。そのため、男性ホルモンと競合し、テストステロンの生合成などを抑える抗アンドロゲン作用をもつため、前立腺がんの治療薬として用いられている。また、エストラサイトは、Estramustine binding protein (EMBP) というタンパク質にも結合し、前立腺がん組織に集積することも報告されている。本研究では、我々が新規に同定したエストラサイトによる新型コロナウイルス阻害機構を理解することにより、COVID-19 の重症化における性差の解明、および新型コロナ治療薬の開発をめざす。

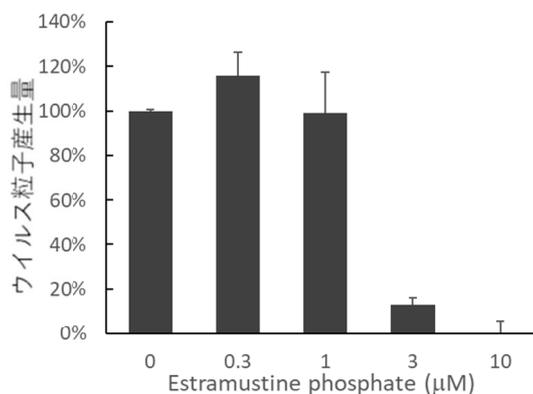
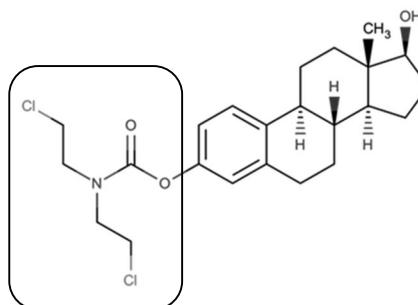


図 1 エストラサイトによる抗新型コロナウイルス活性



ナイトロゲンマスタード基

図 2 エストラサイト (EMP) の構造

## 3. 研究の方法

#### (1) エストラジオール誘導体による新型コロナウイルス阻害機構の解明

コロナウイルスは、プラス鎖の RNA ウィルスであり、ACE2 をウィルスレセプターとして、細胞に吸着し侵入後、ウィルスゲノムを mRNA として、ウィルスポリメラーゼ等の初期遺伝子を発現する。発現したウィルスポリメラーゼにより、サブゲノム mRNA が転写されることで、スパイクタンパク質等の後期遺伝子が合成される。エストラサイトによって阻害されるコロナウイルスの複製機構を解明する。

#### (2) 性差による重症化リスクの評価

エストラジオールと比較し、エストラサイトはナイトロゲンマスタード基をもつため、標的タンパク質と不可逆的に結合することができ、より強い抗ウィルス活性をもつことが期待される。そこで、エストラサイトをプローブとして、新型コロナウイルスの複製に必要な宿主因子を同定することで、病態の性差を決定するメカニズムの解明を進める。

#### (3) エストラジオール誘導体による新規抗コロナウイルス薬の開発

エストラサイトは血漿中で代謝され、脱リン酸化されたエストラムスチン、さらに酸化されることでエストロムスチンに変換される。また、加水分解によりナイトロゲンマスタード基が脱離することで、エストラムスチンはエストラジオールに、エストロムスチンは、エストロンに変換される。各代謝物についても抗ウィルス活性を評価する。加えて、エストラジオール部分に修飾を導入した化合物、およびナイトロゲンマスタード基を他の官能基に置換した化合物を合成し、構造活性相関を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) エストラジオール誘導体による新型コロナウイルス阻害機構の解明

エストラサイトの抗 SARS-CoV-2 活性は  $IC_{50} = 1 \mu M$  以下であり、強い抗ウィルス活性が観察された。エストラサイトを添加することで、後期ウィルス遺伝子であるスパイクタンパク質の発現が強く抑制されるのに対し、初期ウィルス遺伝子である Nsp8 タンパク質の発現は観察された。よって、エストラサイトは初期以降のウィルス複製過程を阻害していると考えられる。そこで、ウィルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼのサブユニットである Nsp8 の細胞内局在を観察した。エストラサイト非添加時では、感染初期に Nsp8 は細胞質で複製産物である dsRNA と点状に共局在し、感染後期では核近傍に蓄積して複製コンパートメントはミトコンドリアと近接する。一方、エストラサイト処理により、Nsp8 のミトコンドリアへの近接が観察されず、複製コンパートメントのリモデリングが阻害されていることが示唆された。今後、複製コンパートメントとミトコンドリア間のクロストーク機構を解析予定である。

#### (2) 性差による重症化リスクの評価

エストラジオールの細胞内レセプターとして、エストロゲン受容体 (ESR1、ESR2) と GPER が同定されている。そこで、ESR1 のノックアウト細胞株を構築し、エストラサイトによる抗ウィルス活性を評価したところ、ESR1 ノックアウト細胞株でも SARS-CoV-2 の複製を阻害することができた。したがって、ESR1 以外の因子がエストラサイトの標的として、SARS-CoV-2 の複製に関与していると考えられる。現在、他の遺伝子についてもノックアウト細胞株の構築を進めているところである。

### (3) エストラジオール誘導体による新規抗コロナウイルス薬の開発

ヒト ACE2 トランスジェニックマウスで抗ウイルス活性を評価したところ、in vivo でも顕著にマウスの生存率を改善することができた。一方、エストラジオールやその代謝物であるエストロンには抗ウイルス活性は観察されなかった。エストラジオールの類縁化合物を中心に構造活性相関を評価したところ、いずれの置換基の導入により抗ウイルス活性が消失しており、誘導体展開の可能性は極めて困難であることが推測された。現在、さらに合成展開可能な部位の探索を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 Sekiya Takeshi, Ogura Yukino, Kai Hirayasu, Kawaguchi Atsushi, Okawa Shino, Hirohama Mikako, Kuroki Takahiro, Morii Wataru, Hara Akira, Hiramatsu Yuji, Hitomi Shigemi, Kawakami Yasushi, Arakawa Yoshihiro, Maruo Kazushi, Chiba Shigeru, Suzuki Hiromichi, Kojima Hiroshi, Tachikawa Hirokazu, Yamagata Kunihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 TMPRSS2 gene polymorphism common in East Asians confers decreased COVID-19 susceptibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 943877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.943877	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 -

1. 著者名 Guo Youjia, Kawaguchi Atsushi, Takeshita Masaru, Sekiya Takeshi, Hirohama Mikako, Yamashita Akio, Siomi Haruhiko, Murano Kensaku	4. 巻 296
2. 論文標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100346 ~ 100346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Kohsuke, Kawaguchi Atsushi, Nagata Kyosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Template activating factor-1 epigenetically regulates the TERT transcription in human cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97009-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee SangJoon, Ishitsuka Akari, Kuroki Takahiro, Lin Yu-Hsien, Shibuya Akira, Hongu Tsunaki, Funakoshi Yuji, Kanaho Yasunori, Nagata Kyosuke, Kawaguchi Atsushi	4. 巻 6
2. 論文標題 Arf6 exacerbates allergic asthma through cell-to-cell transmission of ASC inflammasomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e139190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.139190	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konno S, Kobayashi K, Senda M, Funai Y, Seki Y, Tamai I, Schukel L, Sakata K, Pillaiyar T, Taguchi A, Taniguchi A, Gutschow M, Muller CE., Takeuchi K, Hirohama M, Kawaguchi A, Kojima M, Senda T, Shirasaka Y, Kamitani W, Hayashi Y	4. 巻 65
2. 論文標題 3CL Protease Inhibitors with an Electrophilic Arylketone Moiety as Anti-SARS-CoV-2 Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2926 ~ 2939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c00665	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 詹暁月; 原田沙織; 広浜美香子; 川口 敦史
2. 発表標題 MxAによって決定される鳥インフルエンザウイルスのヒト感染を規定する分子機構
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関屋健史, 甲斐平康, 山縣邦弘, 広浜美香子, 大川詩乃, 川口敦史
2. 発表標題 濃厚接触者を対象にしたSARS-CoV-2の感染性を決定するSNP変異の探索
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大川詩乃, Mojica Aileen, 川口敦史
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染における性差の化学遺伝学的な解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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	川口 敦史  (Kawaguchi Atsushi)  (90532060)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

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
---------	---------