

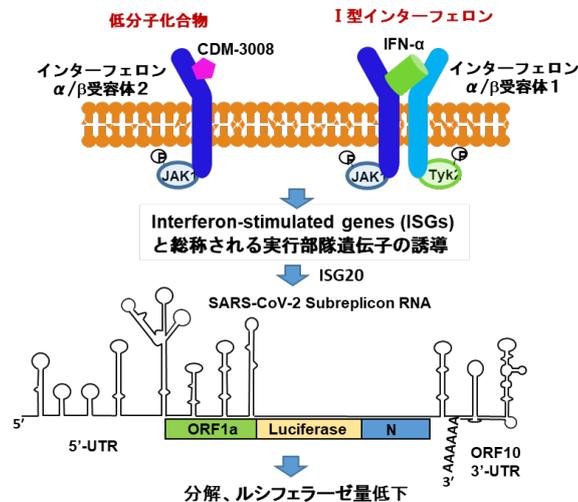
新型コロナウイルス感染症治療薬の候補物質を発見 —重症化を防ぐ経口治療薬として期待される CDM-3008—

理化学研究所（理研）開拓研究本部肝がん予防研究ユニットの古谷裕上級研究員（東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座訪問研究員）、前田瑞夫ユニットリーダー（理研研究政策審議役）、松浦知和客員主管研究員（東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座教授）らの共同研究チーム[※]は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）ゲノム RNA に対して分解作用を持つ化合物のスクリーニング系を開発し、低分子化合物 CDM^[1]-3008 が SARS-CoV-2 に対して抑制作用を持つことを発見しました。

本研究成果は、CDM-3008 を新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の新たな経口または吸入治療薬として提案するもので、特に重症化を予防する効果が期待できます。

今回、共同研究チームは、インターフェロン（IFN）^[2]により発現誘導される因子がウイルス由来ゲノム RNA の 2 本鎖ループ構造を認識し、分解を促進することに注目し、SARS-CoV-2 の部分配列を用いて 1 日（24 時間）以内で IFN の抗 SARS-CoV-2 活性を測定する実験系を構築しました。この実験系を用いて、IFN α/β ^[2]受容体 2 のアゴニスト^[3]として働く CDM-3008 が抗 SARS-CoV-2 活性を示すこと明らかにしました。さらに、IFN の活性によりエキソヌクLEASE^[4]である ISG20^[5]が発現誘導され、SARS-CoV-2 サブレプリコン^[6]RNA を分解することを明らかにしました。

本研究は、科学雑誌『*International Journal of Molecular Sciences*』に 10 月 28 日付でオンライン掲載されました。



CDM-3008 と IFN- α による SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA の分解機構

※共同研究チーム

理化学研究所 開拓研究本部 肝がん予防研究ユニット

上級研究員 古谷 裕 (ふるたに ゆたか)
(東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 訪問研究員)

客員主管研究員 松浦 知和 (まつうら ともかず)
(東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 教授)

研究員 ガイユスト・ルック (Gailhouste Luc)

研究員 秦 咸陽 (しん かんよう)

テクニカルスタッフⅠ 戸口 真理子 (とぐち まりこ)

テクニカルスタッフⅠ 樋口 祥子 (ひぐち しょうこ)

テクニカルスタッフⅠ 屋中 香織 (やなか かおり)

ユニットリーダー 前田 瑞夫 (まえだ みずお)

(理研 研究政策審議役)

東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座

准教授 政木 隆博 (まさき たかひろ)

准教授 越智 小枝 (おち さえ)

研究支援

本研究は、東京慈恵会医科大学研究費、肝炎等克服実用化研究事業「次世代抗B型肝炎ウイルス薬導出に向けた創薬研究（領域代表者：松浦知和）」による支援を受けて行われました。

1. 背景

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の治療薬の開発が待たれる中、現在、ウイルス抑制作用を持つ承認薬として、低分子化合物のレムデシビルと抗体医薬^[7]のカシリビマブ/イムデビマブ、ソトロビマブが用いられています。どちらも注射投与剤で、使用には入院・通院が必要であるため、自宅でも服用可能な経口または経肺投与できる治療薬の開発が急がれています。

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に感染し、重症化した患者を調べた研究により、患者にはインターフェロン (IFN) に対する自己抗体^[8]ができており、その自己抗体が体内で産生される IFN の作用を阻害していることが報告されました^{注1)}。さらに、重症化した患者には IFN 受容体とシグナル伝達分子に変異が見られ、インターフェロン誘導性遺伝子 (ISGs)^[9]の発現誘導が阻害されていることが示されました^{注2)}。このように、新型コロナウイルス感染症患者の重症化と IFN シグナルの関連性が明らかになっています。

低分子化合物 CDM は、インターフェロン α/β (IFN α/β) 受容体 2 のアゴニストとして働き、JAK/STAT 経路^[10]を活性化し、ISGs の発現を誘導します。IFN α/β を吸入投与する臨床試験により、新型コロナウイルス感染症患者の回復が早くなることが分かっていますが、IFN と比較すると、CDM は低分子化合物であるため、自己抗体による阻害を受ける可能性が低いという利点があります。そこで、共同研究チームは、CDM を経口または吸入投与による COVID-19 の治療薬として使えないか検討しました。

注 1) Paul Bastard et. al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020, 370(6515):eabd4585. doi: 10.1126/science.abd4585.

注 2) Qian Zhang et. al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020 370(6515):eabd4570. doi: 10.1126/science.abd4570.

2. 研究手法と成果

SARS-CoV-2 はバイオセーフティーレベル^[11]3 (BSL3) で扱う必要があることから、大規模スクリーニングには不向きです。そのため、感染に重要な部位をルシフェラーゼや蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子に置換した「レプリコンシステム」を用いてスクリーニングを行います。しかし、SARS-CoV-2 ゲノム RNA は約 30kb もあり、全長を用いてレプリコンを作製することは容易ではありません。

そこで共同研究チームは、IFN によるウイルス RNA の分解作用に注目し、作用部位である 5'非翻訳領域 (5'-UTR)^[12]、ORF (open reading frame)^[13]1a、ヌクレオカプシド^[14]、ORF10、3'非翻訳領域 (3'-UTR)^[12]にルシフェラーゼを挿入した「SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA 発現ベクター^[15]」を作製しました(図 1A)。SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA は CMV プロモーター^[16]により転写され mRNA となり、翻訳され ORF1a の部分配列とルシフェラーゼとヌクレオカプシドからなる融合タンパク質が産生されます (図 1B)。

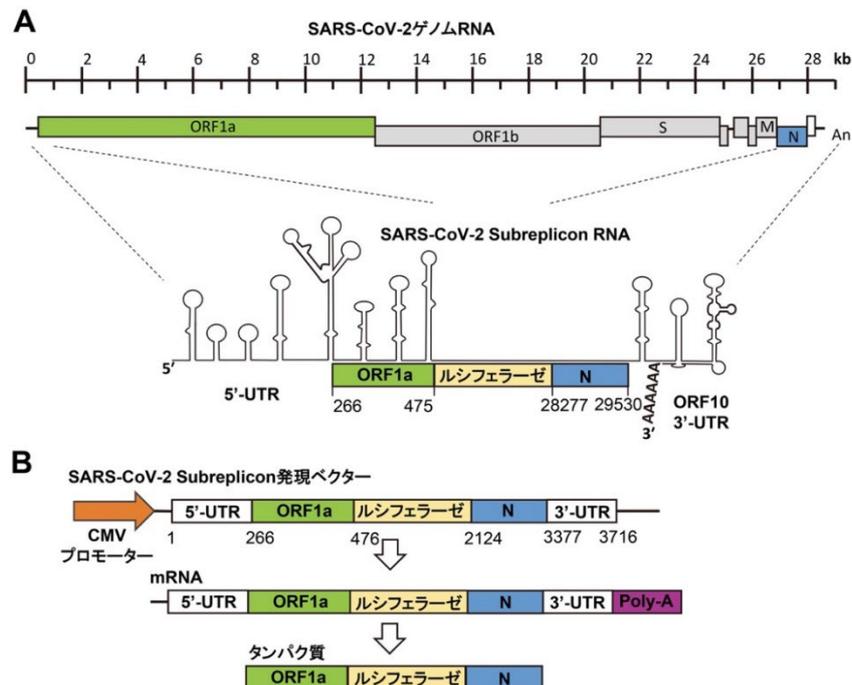


図 1 SARS-CoV-2 ゲノム RNA と SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA 発現ベクターの作製

(A) SARS-CoV-2 ゲノム RNA と SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA の構造模式図。SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA の 5'-UTR と 3'-UTR は、ウイルス由来 RNA 特有の 2 本鎖 RNA からなるループ構造をとる。

(B) SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA 発現ベクターは、5'-UTR、ORF1a 部分配列、ルシフェラーゼ、ヌクレオカプシド(N)、3'-UTR、polyA からなる mRNA を CMV プロモーター下で発現する。この mRNA から翻訳され、ORF1a の部分配列とルシフェラーゼとヌクレオカプシドからなる融合タンパク質が発現する。

次に、SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA 発現ベクターを SARS-CoV-2 が感染・増殖可能な Calu-3 細胞（肺がん由来ヒト気管支腺培養細胞株）に発現させ、IFN- α と CDM-3008 で 3 日間（72 時間）処理したところ、50% 阻害濃度^[17] はそれぞれ 193 IU/ml と 2.54 μ M でした（図 2）。この結果から、Calu-3 細胞において、IFN- α と CDM-3008 は SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA の発現を抑制する作用を持つことが示されました。

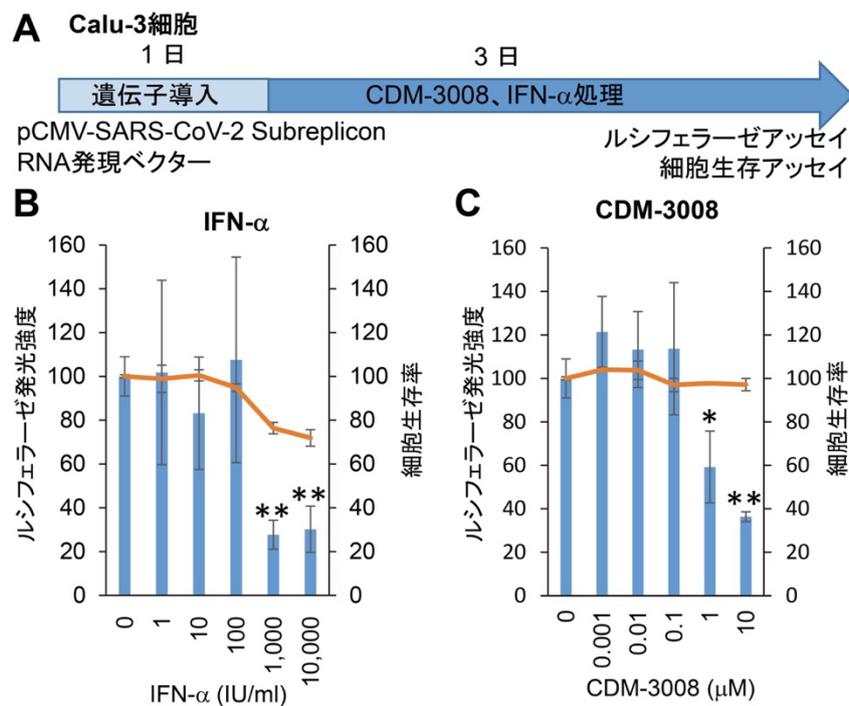


図 2 Calu-3 細胞での IFN- α と CDM-3008 の SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA 抑制作用

(A) Calu-3 細胞（肺がん由来ヒト気管支腺培養細胞株）を用いた実験工程。Calu-3 細胞に SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA 発現ベクターを導入し、72 時間 IFN- α と CDM-3008 で処理し、ルシフェラーゼアッセイと細胞生存アッセイを行った。

(B,C) IFN- α と CDM-3008 はルシフェラーゼの発光強度を有意に抑制したことから、SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA を分解したことが示された。

また、Calu-3 細胞は、増殖スピードが遅く化合物スクリーニングには不向きなため、増殖スピードが速く、遺伝子操作も容易な HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん由来培養細胞）を用いて活性を測定しました。HeLa 細胞に SARS-CoV-2 サプレプリコン RNA 発現ベクターをエレクトロポレーション^[18]により導入し、同時に IFN- α と CDM-3008 で 24 時間処理しました。その結果、50% 阻害濃度はそれぞれ 667 IU/ml と 0.78 μ M でした（図 3）。このようにして、Calu-3 細胞を用

いた測定結果と同等の結果を、HeLa 細胞を用いて 24 時間以内に得ることができました。

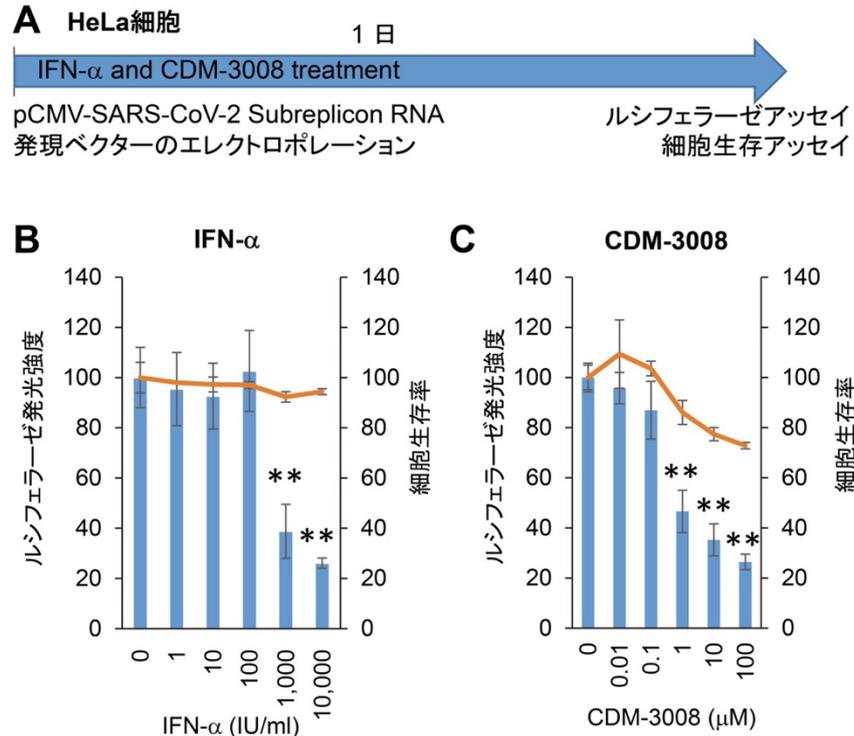
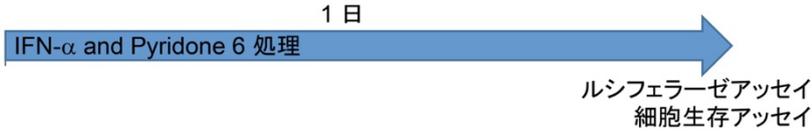


図 3 HeLa 細胞での IFN- α と CDM-3008 の SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA 抑制作用

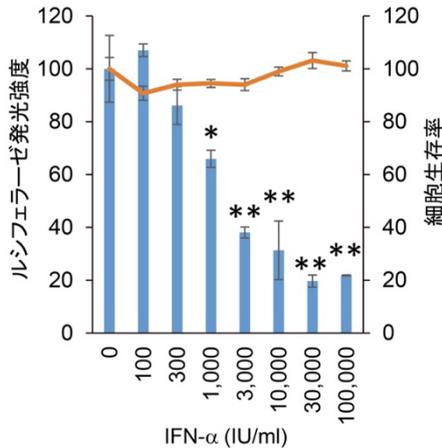
- (A) HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん由来培養細胞）を用いた実験工程図。HeLa 細胞に SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA 発現ベクターを電圧導入により導入し、24 時間 IFN- α と CDM-3008 で処理し、ルシフェラーゼアッセイと細胞生存アッセイを行った。
- (B,C) HeLa 細胞でも、IFN- α と CDM-3008 はルシフェラーゼの発光強度を有意に抑制し、SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA 分解作用を確認した。

さらに、HeLa 細胞で SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA を恒常的に発現する細胞株を作製しました。この細胞を IFN- α で 24 時間処理したところ、50%阻害濃度は 1,875 IU/mL でした。この SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA 抑制活性は、JAK 阻害剤であるピリドン 6 により消失しました（図 4）。このことから、IFN- α により JAK/STAT 経路が活性化され、ISGs が誘導され SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA を分解している可能性が示されました。

A SARS-CoV-2 Subreplicon 発現細胞 (3C5)



B Control (DMSO)



C 10 μ M Pyridone 6

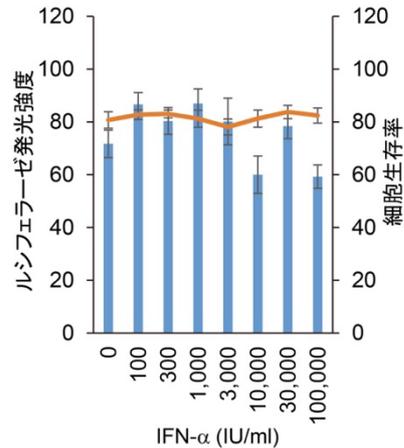


図 4 HeLa 細胞での IFN- α の活性測定と JAK 阻害剤ピリドン 6 による活性阻害

- (A) SARS-CoV-2 サブレプリコン発現細胞 (3C5) を用いた実験工程図。SARS-CoV-2 サブレプリコン発現細胞を 24 時間 IFN- α とピリドン 6 で処理し、ルシフェラーゼアッセイと細胞生存アッセイを行った。
- (B,C) 恒常的にサブレプリコン RNA を発現する細胞でも IFN- α の活性が確認でき、この活性はピリドン 6 により阻害されることから JAK/STAT 経路を介し発現した ISGs によるウイルス由来 RNA 分解作用であることが分かった。

ISGs はさまざまな抗ウイルス活性を発揮する遺伝子の集まりで、その中にはウイルス由来の RNA を認識し分解する因子が複数あります。その中から、OAS1、OAS2、OAS3、ISG20 を選択し、siRNA^[19]を用いた遺伝子発現抑制実験を行いました。その結果、主に DNA や RNA を末端から分解するエキソヌクラーゼである ISG20 が SARS-CoV-2 サブレプリコン RNA の分解を促進しており、ISG20 siRNA 処理により分解が抑制されました (図 5)。このことから、SARS-CoV-2 ゲノム RNA を分解し、複製を抑制するために働く分子として ISG20 を同定しました。

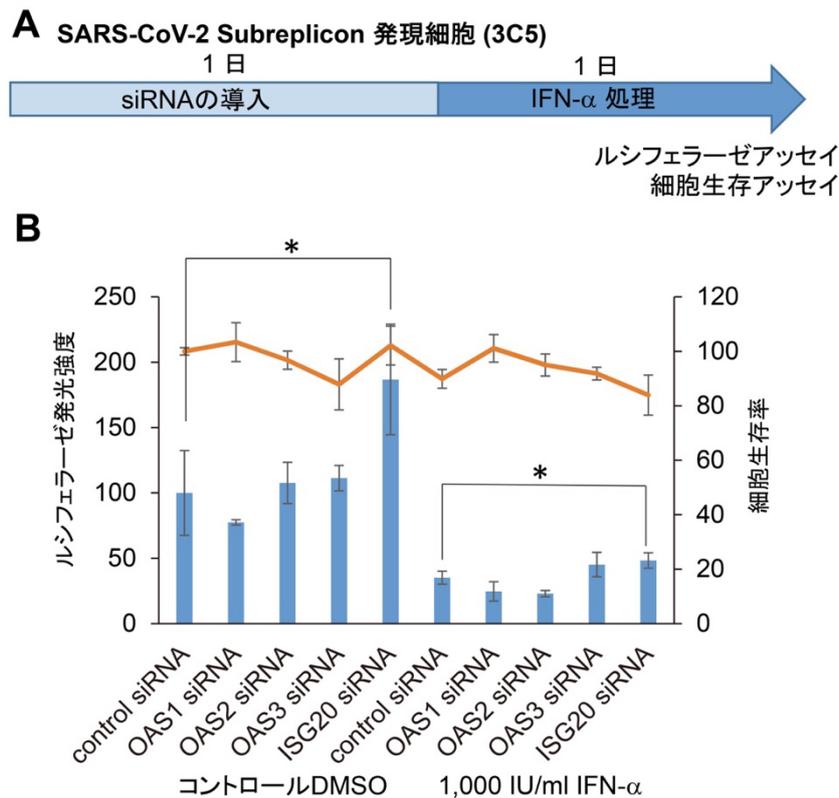


図5 ウイルス由来のRNA分解作用を持つOAS1, 2, 3, ISG20遺伝子の発現抑制実験

- (A) SARS-CoV-2 サブレプリコン発現細胞(3C5)を用いたsiRNAにより遺伝子発現抑制実験の工程図
SARS-CoV-2 サブレプリコン発現細胞にOAS1 siRNA、OAS2 siRNA、OAS13 siRNA、ISG20s siRNAを導入し、1日後にIFN- α で24時間処理した。
- (B) ルシフェラーゼの発光強度がISG20 siRNAで処理することにより有意に上昇したことから、SARS-CoV-2 サブレプリコンRNAはISG20のエキソヌクレアーゼ活性により分解されることが示された。

3. 今後の期待

今回開発したSARS-CoV-2ゲノムRNA分解作用を持つ化合物スクリーニングシステムを用いることで、新しい治療薬をさらに同定できると期待できます。

さらに共同研究チームは、CDM-3008の構造を基にして合成展開し、特異的にIFNシグナルを活性化するCDM誘導体を複数同定しています。今後、CDM-3008やCDM誘導体を用いて治療薬を開発し、IFNに対する自己抗体が体内で産生されているためにIFNが効かず、重症化する可能性のある患者にCDM治療薬を投与すれば、重症化を防ぐことができると期待できます。

また、IFNと比較して安定であり、常温での備蓄も可能なCDMは、さまざまなウイルス由来のRNAを分解する作用があります。次に起こり得るコロナウイルスやフラビウイルス^[20]によるパンデミックの際の治療薬としても使用可能であり、次世代治療薬としての活用が期待できます。

4. 論文情報

<タイトル>

Establishment of a Rapid Detection System for ISG20-Dependent SARS-CoV-2 Subreplicon RNA Degradation Induced by Interferon- α .

<著者名>

Furutani, Y., Toguchi, M., Higuchi, S., Yanaka, K., Gailhouste, L., Qin, X.-Y., Masaki, T., Ochi, S., Matsuura, T.

<雑誌>

International Journal of Molecular Sciences

<DOI>

[10.3390/ijms222111641](https://doi.org/10.3390/ijms222111641)

5. 補足説明

[1] CDM

インターフェロン α/β 受容体 2 のアゴニストとして働く低分子化合物。

[2] インターフェロン (IFN)、IFN α/β

ウイルス感染に反応して感染細胞で産生されるサイトカイン。

[3] アゴニスト

生体内の受容体に働いてリガンドと同等の効果を示す薬。

[4] エキソヌクレアーゼ

DNA や RNA を 5'末端または 3'末端から分解する酵素。

[5] ISG20

インターフェロン誘導性遺伝子 (ISGs) の一つで、一本鎖 DNA と RNA を分解するエキソヌクレアーゼ。

[6] レプリコン

ウイルスの感染に必要な遺伝子を欠損させ、代わりにルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子を挿入し、自己増殖を可能にしたウイルス遺伝子。

[7] 抗体医薬

培養細胞を用いて人工的に病気の原因となる物質を認識する抗体を作製し、患者に抗体を投与することにより病気の原因を排除する医薬品。

[8] 自己抗体

抗体は一般的に体外から侵入してきた異物を抗原として作製されるが、自己抗体は体内で産生されたタンパク質などを抗原として産生され、自己免疫疾患の原因となる。

- [9] インターフェロン誘導性遺伝子 (ISGs)
インターフェロンにより発現誘導される抗ウイルス活性を発揮する遺伝子群。ISGs は Interferon-stimulated genes の略。
- [10] JAK/STAT 経路
インターフェロン受容体は活性化すると JAK をリン酸化し、JAK は STAT をリン酸化し、核に移行したリン酸化 STAT 複合体はインターフェロン誘導性遺伝子の発現を誘導する。
- [11] バイオセーフティーレベル (BSL)
細菌やウイルスを実験室で扱う際の実験室のレベル分けのことで、扱う微生物によって BSL-1, 2, 3, 4 に分けられ、新型コロナウイルスは BSL-3 の実験室で扱う必要がある。
- [12] 5'非翻訳領域 (5'-UTR)、3'非翻訳領域 (3'-UTR)
mRNA のタンパク質に翻訳される領域の 5'側と 3'側にある非翻訳領域で、タンパク質の発現制御などに関与している。
- [13] ORF (open reading frame)
遺伝子配列のうちタンパク質として翻訳されうる領域で、開始コドンから始まり終止コドンで終わる。
- [14] ヌクレオカプシド
ウイルス RNA または DNA に結合し、多量体を形成し包み込むタンパク質。
- [15] ベクター
ベクターは遺伝子を細胞間で運ぶために用い、一般的に大腸菌での増幅が可能で、精製したのちに培養細胞に導入し、導入遺伝子の発現を促進する。ベクターに抗生物質耐性遺伝子を付加することで、発現細胞の選択が可能になる。
- [16] CMV プロモーター
ヒトサイトメガロウイルスのプロモーター配列で、哺乳類細胞での発現誘導能が高くタンパク質の発現に用いられている。
- [17] 50%阻害濃度
薬の効果を示す指標で、薬のターゲットとなる因子を 50%抑制する濃度を示す。
- [18] エレクトロポレーション
電気パルスにより細胞内に DNA や RNA を導入する方法。電気穿孔法ともいう。
- [19] siRNA
ループ構造を持つ 2 本鎖 RNA で、RNA 干渉を引き起こし、標的となる mRNA を分解する。

[20] フラビウイルス

ジカウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルスなどがフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで、蚊またはダニにより媒介され、これらのウイルスが原因となり公衆衛生上問題となる感染症を引き起こす。

6. 発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 開拓研究本部 肝がん予防研究ユニット

上級研究員 古谷 裕 (ふるたに ゆたか)
(東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 訪問研究員)
ユニットリーダー 前田 瑞夫 (まえだ みずお)
(理研 研究政策審議役)

客員主管研究員 松浦 知和 (まつうら ともかず)
(東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 教授)

TEL : 048-467-7938 (古谷)、048-467-9311 (前田)、03-3433-1111 (松浦)

FAX : 048-462-4675 (古谷)、03-5400-1264 (松浦)

E-mail : yfurutani[at]riken.jp (古谷)、mizuo[at]riken.jp (前田)、matsuurat[at]jikei.ac.jp (松浦)



古谷 裕



前田 瑞夫



松浦 知和

<機関窓口>

* 今般の新型コロナウイルス感染症対策として、理化学研究所では在宅勤務を実施しておりますので、メールにてお問い合わせ願います。

理化学研究所 広報室 報道担当

E-mail : ex-press[at]riken.jp

学校法人慈恵大学 法人事務局 経営企画部 広報課

TEL : 03-3433-1111 (代表) 内線 2641

E-mail : koho[at]jikei.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。