

課題番号 5

## 親電子性物質による SARS-CoV2 抗ウイルス作用の検討

### [1] 組織

代表者：澤 智裕  
(熊本大学大学院生命科学研究部)  
対応者：本橋 ほづみ  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 50 万円

### [2] 研究経過

新型コロナウイルス SARS-CoV2 の感染成立には、ウイルスゲノムにコードされている 2 種類のプロテアーゼ、PLpro と 3CLpro が必須である。PLpro と 3CLpro はいずれも、システイン・プロテアーゼであり、活性中心にシステイン残基を有している。そのシステイン残基のチオール基 (-SH) がプロトンを放出してチオレート・イオン (-S<sup>-</sup>) になり、基質タンパク質のペプチド結合にあるカルボニル基の炭素を求核攻撃することで、ペプチド結合を切断する。すなわち、これらのプロテアーゼでは、活性中心のシステイン残基のチオール基が極めて重要な役割を果たしている。最近、親電子性化合物であるエブセレンが 3CLpro のシステイン残基に共有結合を形成することで、その活性を強力に阻害し、ウイルスの増殖を抑制することが報告された。この結果は、親電子性物質が多かれ少なかれ、PLpro と 3CLpro を含むシステイン・プロテアーゼを阻害できることを示唆する。そこで、本研究では、さまざまな親電子性化合物のシステイン・プロテアーゼ阻害能を調べ、SARS-CoV2 の PLpro と 3CLpro の活性抑制効果を検討する。また、親電子性化合物は、生体防御に重要な役割を果たしている KEAP1-NRF2 系を活性化させることで、抗酸化作用に加えて強い抗炎症作用を発揮する。そのため、NRF2 の活性化は、SARS-CoV2 感染がひきおこすサイトカイン・ストームの抑制に有効であることが予想される。PLpro と 3CLpro の阻害効果を有する親電子性化合物について、NRF2 の活性化による抗炎症作用が認められるかを検討する。

以下、研究活動状況の概要を記す。

本研究においては、澤と本橋の間で、メールによる

研究打ち合わせを頻回に実施し、研究のデザイン、進捗についての議論を行った。また、親電子性物質として、アルツハイマー病モデルマウスにおいて神経組織の酸化ストレスの軽減、神経炎症の緩和、さらに認知機能の改善効果がみとめられたワサビスルフィニル 6MSITC を本橋より提供した。

澤は、6MSITC について、まずはじめに抗ウイルス作用の検証に用いるマウス DBT 細胞に対する細胞毒性を検討した。つづいて、細胞毒性が現れない濃度域における抗ウイルス作用を解析した。具体的には、SARS-CovV-2 と同じβコロナウイルスに属するマウス肝炎ウイルスの増殖に対する 6MSITC の影響を解析した。最後に、COVID-19 の重症に大きく関わる炎症応答について、マウスマクロファージを用いて 6MSITC の抗炎症作用を解析した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

細胞毒性作用：6MSITC を種々の濃度で DBT 細胞に作用させ、24 時間後の細胞生存率を MTT 法にて評価した。その結果、10 μM から細胞毒性が観察された (図 1)。そのため、以下では細胞毒性がないか、あっても少ないと考えられる 6MSITC が 5 および 15 μM で検討した。

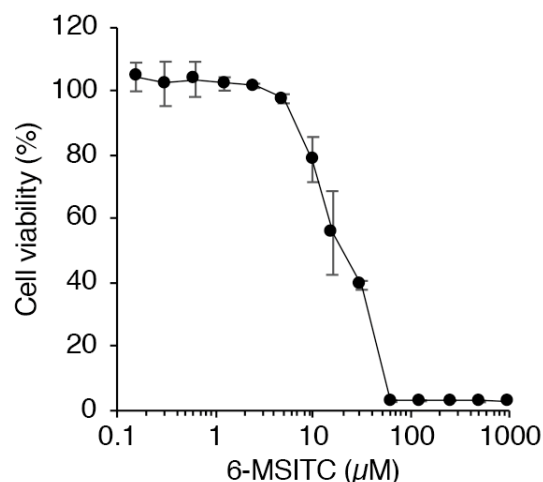


図 1. DBT細胞に対する6-MSITCの細胞毒性。

抗ウイルス作用：ポジティブコントロールとして SARS-CoV-2 の治療にも用いられているレムデシビルについて、本ウイルス感染モデルに対する効果を検討した。その結果、図2aに示すように、レムデシビル濃度が0.5 μMで顕著な抗ウイルス作用が見られた。つづいて、6MSITCについて抗ウイルス作用を検討したが、5および15 μMの濃度において有意な抗ウイルス作用は認められなかった(図2b)。今後、より高い濃度域における抗ウイルス作用の解析が必要であると考えられる。

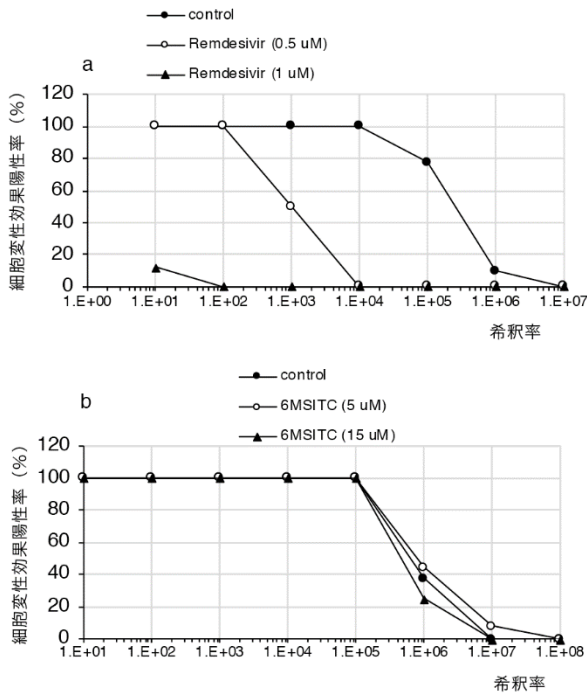


図2. マウス肝炎ウイルス増殖に対するレムデシビル(a)および6-MSITC(b)の影響。

抗炎症作用：COVID-19の重症化に、炎症応答であるインフラマソームの活性化が関わるとの報告がある。そこで、インフラマソームの活性化に対して6MSITCがどのように影響するかを解析した。マウスマクロファージ J774.1 細胞をグラム陰性菌のリポ多糖とアデノシン3リン酸 (ATP) で刺激する細胞モデルを用いた。この細胞モデルで、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子α (TNFα) とインターロイキン1β (IL-1β) の生成をELISAで解析した。その結果、非常に興味深いことに、6MSITCはIL-1βの生成を強力に阻害することがわかった(図3a)。一方、同じ条件においてTNFαの生成は影響を受けなかった(図3b)。

### (3-2) 波及効果と発展性など

COVID-19に対する治療では、感染のフェーズに応じて、ウイルス自体を抑制することが効果的なのか、ウイルスに対する過剰な生体応答を抑制することが効果的なのか、治療戦略を慎重に選択する必要がある。

感染初期では、ウイルス自体の増殖抑制が重要である一方、感染中期以降では、ウイルス自体の増殖よりも、それに対する生体の応答として起こってくるサイトカイン・ストームを抑制することが重症化の予防に重要であることが示唆され始めている。したがって、本研究成果は、感染初期と中期以降の両方のフェーズにおいて、親電子性化合物のCOVID-19に対する治療薬としての有効性を明らかにすることができると期待される。すなわち、感染初期の投与では、ウイルスのプロテアーゼ阻害により感染の成立を阻害できる。また、感染中期以降の投与では、NRF2経路の活性化により過剰なサイトカイン産生が抑制され、重症化の予防やその治療が可能になると予想される。

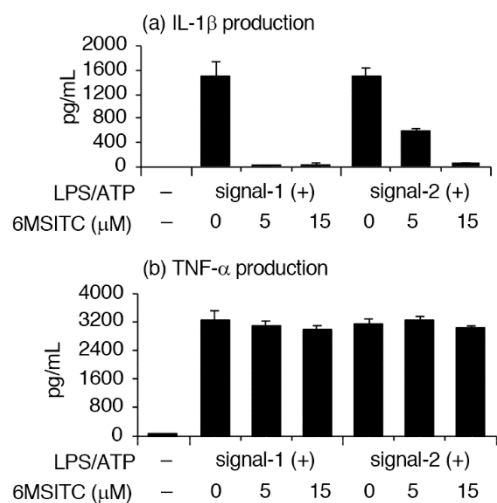


図3. J774.1細胞におけるLPS/ATP誘発性NLRP3インフラマソームの活性化によるIL-1β (a)およびTNF-α (b)の産生に対する6-MSITCの影響。

### [4] 成果資料

今回、記載した研究内容についてはすべて未発表データであり、今後、論文投稿・学会発表を含めて検討を進めていく予定である。