

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 細胞核ダイナミクスを標的とした抗フラビウイルス治療薬の開発  
(英語) Development of anti-flavivirus compounds targeting nuclear dynamics

研究開発実施期間：令和2年8月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 宮本 洋一  
(英語) Yoichi Miyamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所  
(英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

## II 研究開発の概要

### [研究開発の目的]

蚊やダニによって媒介されるフラビウイルス感染症は、地球温暖化の影響や旅行者の増加に伴い国内外で脅威となっている重大な感染症である。主なウイルスには、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルスなどがあり、脳炎や出血熱など重篤な感染症を引き起こす。これら広範囲なフラビウイルスに対する抗ウイルス薬の開発が必要と考えるが、現在までに効果的な治療薬の開発には至っていない。本研究は、フラビウイルスの生活環に共通する「コア蛋白質の核輸送」に焦点を当て、複数のフラビウイルス感染症に効果のある治療薬の開発を推進するものである。研究は以下の3つの課題を柱としている。

(1) コア蛋白質の核輸送阻害剤の探索、(2) リン酸化阻害剤による核移行阻害機序の解析、(3) 核小体形成阻害剤の海外展開である。これらの課題を融合的に進め、広範囲なフラビウイルス感染症に効果のある広域スペクトラム治療薬の開発を目指すものである。

### [研究開発の成果]

#### (1) コア蛋白質の核輸送阻害剤の探索

本課題は、コア蛋白質と核輸送因子 X との相互作用 (protein-protein interaction: PPI) を阻害する化合物スクリーニング系を樹立し、新しい抗フラビウイルス薬の創製を目的とした。アッセイ系には AlphaScreen を採用し、大腸菌やバキュロウイルスより精製したリコンビナント蛋白質を用いてスクリ

ーニング系を確立した。低分子化合物ライブラリの選定は慎重に行い、信頼性が高く未知の構造をもった化合物を含むライブラリを調達することを目指した。そして、支援機関の協力により、企業やアカデミアから複数の化合物ライブラリを調達することに成功し、PPI スクリーニングを実施できた。結果として複数の低分子化合物が PPI 阻害効果、核輸送阻害効果、抗ウイルス効果があることが分かった。他方、ペプチドライブラリも活用し、PPI 阻害効果を示すものを複数見出した。これら同定したペプチドのほとんどが同一のペプチドをリードとするものであることも発見し、特定の構造によって阻害効果が発揮されることが分かった。さらに、同定ペプチドはコア蛋白質の核輸送を阻害する一方、調べた限りにおいて他の分子の核輸送には影響を与えないなど特異性の高い有望な阻害剤であることが明らかとなった。

## (2) リン酸化阻害剤による核移行阻害機序の解析

本課題では、リン酸化阻害剤 Y がコア蛋白質の核移行を阻害するとする独自の知見を端緒に、その構造特性の解析および作用機序解明を目的とした。まず、リン酸化阻害剤 Y と同等の核移行阻害活性を持つ化合物を複数同定することに成功した。また、それらがすべて特定の構造を持つことも見出した。次に、リン酸化阻害剤 Y の特性に着目し、コア蛋白質のリン酸化の有無で細胞内局在に影響がないかを検討した。その結果、コア蛋白質の細胞内局在やウイルス粒子形成に重要なリン酸化サイトを同定するに至った。以上の解析から、コア蛋白質の核移行には自身のリン酸化制御が重要であることが分かった。

## (3) 核小体形成阻害剤の海外展開

我々はこれまで、コア蛋白質が核内において「核小体」に局在することに着目し、「核小体形成阻害剤」が日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルスの培養細胞での増殖を抑制できることを明らかにしてきた。これらの知見を基盤に、特にデング熱が流行している東南アジア地域を中心に知財の海外移行並びに導出企業や治験機関の探索を試みた。この取り組みの一環として、デング熱が深刻な社会問題となっているシンガポールに重点を置いた活動を行い、セットアップ企業及び支援機関の協力のもと当該国研究機関と抗デングウイルス薬開発を目指した連携を開始した。この活動により、日本で患者数の少ないデング熱に対する日本とシンガポールの国際共同研究の枠組みを形成し臨床試験への道筋をつけた。

## [研究開発の意義]

フラビウイルス感染症は、蚊やダニによって媒介される特性から国内よりも海外、特に熱帯・亜熱帯地域や衛生管理が整備されていない国において患者数の多い感染症である。特に、デングウイルスは、毎年数億人が感染するなど深刻な状況にある。地球温暖化や海外旅行による人的交流の増加なども考慮すると、フラビウイルス感染症の蔓延は世界中でますます深刻化するものと予想され、効果的な治療薬の開発は喫緊の課題である。その意味で「細胞核ダイナミクス」というこれまで注目されていなかった現象に焦点を当て、コア蛋白質の核輸送をターゲットとする新たな薬剤の開発を目指した本研究は、有効な治療薬開発の第一歩として意義ある成果を得たと言える。新型コロナウイルス感染症蔓延の経験も踏まえ、今後想定されるパンデミックに備える意味でもフラビウイルス感染症に対する広域スペクトラム治療薬の開発は引き続き進めていくべき重要な課題である。

Flavivirus infections are serious infectious diseases that have become a threat domestically and internationally due to the effects of global warming and increased number of travelers. Major viruses, including Japanese encephalitis virus, Dengue virus, and Zika virus, cause serious infectious diseases, such as encephalitis and viral hemorrhagic fever. Antiviral drugs against the wide-ranging flaviviruses are necessary; however, no effective therapeutic drugs have been developed. This study aims to develop effective broad-spectrum therapeutic drugs against the wide-ranging flaviviruses, focusing on the nuclear transport of viral proteins that are common to the life cycle of flaviviruses.

In this study, we searched for nuclear translocation inhibitors in the interaction between the viral protein and nuclear transporters. Specifically, we established a protein-protein interaction (PPI) assay system using recombinant proteins and performed PPI screening using multiple compound libraries, including proprietary low-molecular-weight compounds of companies and medium-molecular-weight peptides of cooperating institutions. Moreover, we conducted infection experiments using cultured cells and verified the inhibitory effects on nuclear transport for compounds with strong inhibitory effects; eventually, we succeeded in identifying several promising compounds. We discovered a phosphorylation inhibitor in the nuclear transport of the viral protein and identified phosphorylation sites on the proteins based on the inhibitor properties. Additionally, we performed analyses using recombinant viruses with pseudophosphorylated proteins and showed that regulating the proteins' phosphorylation is important for forming virus particles. We also searched for an overseas joint study colleague to proceed the preparation of clinical trials. This led to the initiation of an international joint study with researchers in Singapore, where dengue fever has become a serious social problem. Consequently, an international collaboration system for the development of therapeutic drugs for flavivirus infections was established, which paved the way for non-clinical to clinical studies.

The study provided significant results that serve as the first step in developing broad-spectrum drugs for flavivirus infections.

### III 事後評価総合所見

フラビウイルスによる感染症に対するウイルスのコア蛋白と核輸送因子 X との PPI 阻害に着目した新規機序の創薬研究は、各ウイルス感染症ごとの治療薬を必要とするこれまでのウイルス感染症治療を変える広域スペクトラム治療薬の開発を目指すもので、臨床的価値の高いものとして期待される。①スクリーニング系、化合物とペプチドのライブラリの構築、ヒット化合物、ヒットペプチドの取得と機序を検証し、特許を出願したこと、②リン酸化阻害剤 Y による核移行阻害機序解析を行い、コア蛋白質のリン酸化がその細胞内局在の制御に重要であることを見出し、コア蛋白質-核輸送因子 X との相互作用には影響を与えない新規治療薬開発の可能性を示したこと、③セットアップ企業等のバックアップを得て、シンガポールの大学との国際共同研究を企画・開始し、日本で患者数の少ないフラビウイルス感染症研究の臨床試験への道筋をつけることに成功したこと、以上3つの課題の目標をほぼ達成したことが評価された。

一方でヒット低分子化合物の構造活性相関およびヒットペプチドのアミノ酸配列の解析を行っているが、開発化合物としての絞り込みが十分ではなく具体的な創薬シーズの取得には至っていないという課題が残っている。

今後は確立したスクリーニング系を生かし、また今回構築した海外との連携を生かし、フラビウイルス感染症治療薬の取得を目指して課題を進めることを期待する。