

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：亜熱帯生物素材ライブラリの活用によるウイルス感染症に対する天然物創薬研究

Natural Product Drug Discovery Research for Viral Diseases Using a Subtropical Organism Library

研究開発実施期間：令和3年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：荻 貴之

Takayuki Ogi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

沖縄県工業技術センター 環境・資源班 主任研究員

Supervisory Researcher, Environment and Resources Group, Okinawa Industrial Technology Center

## II 研究開発の概要

### 【研究開発の成果】

沖縄県を含む奄美・琉球諸島は、南北約 500 km に約 200 もの島々で構成されており、緯度差による気温の多様性、豊富な降水量、海による隔離といった特異な自然環境を持ち、多様な生物相を有している。生物の多様性は、物質レベルの多様性にも繋がっており、創薬研究の幅が広がることが期待できる。また、沖縄では、地域に根差した医食同源の考え方から、長命草やヨモギ類といった薬草類、マクリ、オゴノリ等の豊富な海洋生物資源を伝統食材として利用してきた歴史を持っている。このような地域性を産業に活かすことを目指し、沖縄県工業技術センターでは、生物素材を収集したライブラリを構築し、素材保存と機能性評価、機能性データ蓄積を行っている。このライブラリは、原料植物数 650 種、エキス数 2,500 点以上、機能性試験データ 25,500 点以上を収録しており、企業や共同研究機関へ研究開発用素材として提供し、製品開発に活用している。

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) および B 型肝炎ウイルス (HBV) は、ともに世界での感染者数が多く重大な社会的影響を及ぼしている。SARS-CoV-2 の感染症に対して中和抗体カクテルやいくつかの合成化合物の治療効果が認められているが薬価や変異株の問題が懸念されている。また、HBV は耐性ウイルスや既存薬によるウイルスの完全排除が困難といった課題がある。このため、これら感染症に対する治療法の確立には抗ウイルス薬だけでなく自然免疫応答の賦活化や宿主細胞の抗ウイルス能の活性化など多面的な対応が必要である。

本研究グループはこれまでに、日本国内で唯一の亜熱帯・島嶼生物資源のライブラリを駆使し、SARS-CoV-2 の S タンパク質依存的な膜融合を阻害する生物資源の候補素材、HBV 持続感染細胞において抗ウイルス活性を示す候補素材、ISG15 誘導による自然免疫を活性化させる候補素材、Nrf2 活性を調節する候補素材を複数見出している。そこで、これらのスクリーニングによって見出された候補素材を対象に、以下の研究開発を行なった。(1)

SARS-CoV-2 膜融合阻害分子の特定、(2) B 型肝炎ウイルス阻害剤の探索、同定、(3) ISG15 誘導物質の探索、同定、(4) Nrf2 活性調節物質の特定と作用機序、(5) タンパク質ビーズ法を用いた SARS-CoV-2 膜融合阻害に関連する物質の分離精製と構造解析。

### 1) SARS-CoV-2 膜融合阻害分子の特定（活性評価：山本瑞生、成分分離精製：荻貴之）

SARS-CoV-2 の膜融合阻害能のスクリーニングによりライブラリから見出した素材から 25 種類の化合物を単離し、同定した。このうち化合物 25 は約 0.1  $\mu\text{M}$  で膜融合を阻害すること、また同程度の濃度域において細胞毒性を示さずに SARS-CoV-2 シュードウイルスの感染を阻害することを見出した。さらに、気道上皮細胞株 Calu-3 細胞と SARS-CoV-2 生ウイルスを用いた感染実験から、従来株および抗体医薬やワクチン効果の減弱が問題となっている SARS-CoV-2 変異株に対して化合物 25 が強い感染阻害能を示すことを明らかにした。一方で、研究班内における共同研究として平良らが Nrf2 活性調節物質としてライブラリから見出した化合物の中から SARS-CoV-2 感染阻害剤を探索し、ボタンボウフウ由来のクマリン化合物である化合物 26 が気道上皮由来の Calu-3 細胞において細胞毒性を示さずにウイルス感染を抑制することを見出した。この化合物 26 は従来株 SARS-CoV-2 と同じ濃度域で変異株に対しても感染阻害能を示すことが分かった。化合物 26 には Nrf2 活性化作用以外にもブチルコリンエステラーゼ (BuChE) 阻害作用 ( $\text{IC}_{50}=30\ \mu\text{M}$ ) が報告されていた。一方で化合物 26 よりも強い BuChE 阻害能を持つ Tacrine ( $\text{IC}_{50}=25.6\ \text{nM}$ ) には SARS-CoV-2 感染阻害作用が見られなかったことから化合物 26 のウイルス感染阻害機構は Nrf2 活性化作用による可能性が強く示唆された。また、構造活性相関の解析を目的として化合物 26 の幾何・立体異性体である化合物 27 を用いた解析を行い、同様の SARS-CoV-2 阻害活性を持つことを見出した (図 5)。一方で、標準試薬として入手したクマリン化合物は、SARS-CoV-2 阻害活性を持たないことから、クマリンの基本骨格ではなく側鎖の存在により活性を示すことも示唆された。また、マウスマクロファージ (RAW264.7) を用いた細胞試験において、化合物 26 はクマリン (Coumarin) および 3,4-ジヒドロクマリン (3,4-Dihydrocoumarin) よりも高い Nrf2 活性化作用とヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 発現誘導を示すことが明らかとなっており、この結果も Nrf2 活性化作用によるウイルス感染阻害機構を支持している。以上の結果から、亜熱帯生物素材ライブラリに含まれる複数のウイルス感染阻害能を持つ生理活性物質を見出すことに成功し、ライブラリの有用性を示すと共に SARS-CoV-2 阻害薬シーズの発見や感染機構の解析に有用な新たなツールの同定を達成した。

### 2) B 型肝炎ウイルス阻害剤の探索、同定（活性評価：鈴木哲朗、成分分離精製：荻貴之）

HBV 阻害活性が認められた 10 検体について、HPLC 分画の活性評価を行った結果、沖縄島嶼地域の阿嘉島に生育する未同定種 2 の葉、未同定種 4 の実および葉の未同定種の特定分画に最も高い抗 HBV 活性が含まれることを見出した。これらの未同定種は採取当時の写真および HPLC クロマトグラムパターンを照合したところ、植物 A であることが明らかとなった。そこで、沖縄本島中部の恩納村で新たに採取した植物 A 活性があることを確認し、活性成分の分離精製を進めた。これまでに、この活性画分から 3 種類のトリテルペン配糖体 (37-39) を単離しており、このうち化合物 37 の平面構造を決定した。現在、NMR 等により立体構造を含めた詳細な構造解析を進めている。

### 3) ISG15 誘導物質の探索、同定（活性評価：鈴木哲朗、成分分離精製：荻貴之）

ISG15 誘導活性の見られた 13 検体について HPLC 分画し活性評価を行ったところ、植物素材#2570 由来の画分 1 に高い ISG15 誘導活性を見出した。この画分について実際に抗ウイルス活性を有するか解析した結果、インフルエンザウイルス感染阻害活性を見出した。

#### 4) Nrf2 活性調節物質の特定と作用機序（活性評価：平良淳誠、成分分離精製：荻貴之）

香辛料のヒハツモドキ由来のピペリン類縁化合物が Nrf2 活性に伴い HO-1 タンパク発現を増加させることを見出し、ピペリン類縁体を化学修飾した合成物との活性比較によって分子内の Nrf2 活性部位を特定した。また、平良らと鈴木らは HBV 感染細胞における Nrf2 シグナル伝達を解析し、初期において Nrf2 活性が高く細胞保護作用に働くが、感染経過に伴い炎症惹起、細胞死のアポトーシスシグナルの発現が進行していることを明らかにした。平良らと山本らが進めた SARS-CoV-2 感染細胞における Nrf2 シグナル研究においては、感染直後から Nrf2 活性の低下に伴う HO-1 タンパク質発現の抑制、及び炎症及びアポトーシスの亢進が見られた。本研究成果に基づき、ライブラリより明らかにした Nrf2 活性化剤の海洋性カロテノイド2種類、ボタンボウフウより単離した化合物 26、またピペリン類縁化合物などについて、抗 HBV 感染作用および抗 SARS-CoV-2 感染作用の評価を進めた。同アッセイ系において、効果のあった Nrf2 活性化剤について抗 HBV 感染細胞のタンパク発現レベルでの効果、並びに制御機構解明を進めている。また、抗 SARS-CoV-2 感染作用においては、感染 Calu3 細胞における Nrf2 活性効果の検証を行っている。

#### 5) タンパク質ビーズ法を用いた SARS-CoV-2 膜融合阻害に関連する物質の分離精製と構造解析（ビーズ法の構築、スクリーニング：荒井緑、齋藤駿）

SARS-CoV-2 感染に関連するタンパク質 ACE2 および Spike-RBD を固定化したアフィニティビーズの作成を進めた。慶應義塾大学大澤教授から提供を受けたタンパク質 ACE2 を固定化したビーズを作成し、スクリーニング系の構築に成功した（図 14）。膜融合活性のあったエキスの評価を進めたところ、生物素材#3021、#3381、#3477、#3505 に ACE2 ビーズに選択的に脱着する HPLC ピークを見出した。また、タンパク質 Spike-RBD については、哺乳類細胞で発現し、解析に必要な量を精製した。現在ビーズへの固定法と化合物精製法について検討を進めている。

#### 【研究成果の意義】

本研究開発で亜熱帯生物資源ライブラリを活用し、SARS-CoV-2、HBV、Nrf2 に関する知見が豊富な研究者と共同で研究を進めることで、各種活性化合物の単離精製を効率的に進められることが示された。また、天然有機化合物の活性成分の探索研究においては、分離精製過程で活性の消失（化合物の変性や凝集、揮発など）が起きることがしばしば起こるため、本研究で荒井教授らが構築した ACE2 ビーズ法を用いることで、抽出物を分画する前に ACE2 受容体に結合する物質を検出することが可能で、亜熱帯生物資源ライブラリの活用が広がると期待できる。本研究開発によって、SARS-CoV-2 阻害活性を有する化合物 25 や現在分離精製に取り組んでいる ACE2 ビーズ法で単離される化合物、HBV 活性を有する化合物は、知財化と論文化けを進め、安全性試験を行うことで研究開発を進める。また、Nrf2 活性や ISG15 誘導に関与する化合物は、他のウイルスにおいても効果があるか試験を行うことで展開を図ることができる。

The Amami and Ryukyu Islands, including Okinawa Is., have a unique natural environment and a diverse biota. The biological diversity is also linked to the diversity at the material level, which is expected to expand the scope of drug discovery research. Okinawa Industrial Technology Center has constructed a library containing 650 raw material plant species, more than 2,500 extracts, and more than 25,500 bioassay data, which are used for research and development. Both of SARS-CoV-2 and HBV have a significant social impact with a large number of infections worldwide. Establishment of treatments for these infectious diseases requires not only antiviral drugs but also multifaceted measures such as activation of the innate immune response and antiviral activity of host cells. The research group has so far identified several candidate plant materials with activities to inhibit membrane fusion of SARS-CoV-2, inhibit HBV, activate innate immunity by inducing ISG15, and modulate Nrf2 activity, making full use of the library. In this study, the following (1) to (5) research and development was conducted on the candidate materials found by these screenings. (1) Identification of SARS-CoV-2 membrane fusion inhibitors. Twenty-five compounds were isolated and identified from materials found in the library by screening for their ability to inhibit membrane fusion of SARS-CoV-2. Of these, compound 25, which inhibited membrane fusion at approximately 0.1  $\mu\text{M}$ , was found to have strong inhibitory activity against conventional and mutant strains of SARS-CoV-2 virus, based on infection experiments using the airway epithelial cell line Calu-3 cells and SARS-CoV-2 virus. In addition, when we searched for compounds that inhibit SARS-CoV-2 infection among the Nrf2 activity-modulating compounds found in the library, we found that compound 26 from *Peucedanum japonica* inhibited SARS-CoV-2 infection in Calu-3 cells. Compound 26 has been reported to have butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}=30\text{ }\mu\text{M}$ ) as well as Nrf2 activation. Tacrine ( $\text{IC}_{50}=25.6\text{ nM}$ ), a more potent BuChE inhibitor than compound 26, did not inhibit SARS-CoV-2 infection, strongly suggesting that the mechanism of inhibition of viral infection by compound 26 may be due to Nrf2 activation. (2) Search and identification of HBV inhibitors. As a result of the activity evaluation of HPLC fractions from 10 samples with HBV inhibitory activity, we found that the highest anti-HBV activity was contained in specific fractions of unidentified 2 species growing on Aka Island in the Okinawa Is. These unidentified species were matched to the photographs and HPLC chromatogram patterns at the time of collection, and were identified as plant A. Therefore, we confirmed the presence of Plant A activity in a new collection in Onna Village, central Okinawa Is., and proceeded with the separation and purification of the active component. So far, three triterpene glycosides (37-39) have been isolated from this active fraction, of which the planar structure of compound 37 was determined. Detailed structural analysis, including steric structure, is currently underway using NMR and other methods. (3) Search and identification of ISG15 inducers. Thirteen samples with ISG15-inducing activity were fractionated by HPLC and evaluated for activity, and high ISG15-inducing activity was found in fraction 1 derived from plant material #2570. This fraction was analyzed for actual antiviral activity and was found to inhibit influenza virus infection. (4) Identification and mechanism of action of Nrf2 activity modulators. We found that piperine analogues derived from the spice *Piper nigrum* increased HO-1 protein expression in response to Nrf2 activity and identified the intramolecular Nrf2 active site by comparing the activity of piperine analogues with that of chemically modified synthetic compounds. We also analyzed Nrf2 signaling in HBV-infected cells and found that Nrf2 activity is high in the early stage of HBV infection and acts as a cytoprotective agent, but that the expression of apoptotic signals such as inflammation and cell death progresses as the infection progresses. On the other hand, in SARS-CoV-2-infected cells, suppression of HO-1 protein expression accompanied by a decrease in Nrf2 activity and an increase in inflammation and apoptosis were observed immediately after infection. Based on the results of this study, we proceeded to evaluate the anti-HBV and anti-SARS-CoV-2 infection effects of two marine carotenoids, an Nrf2 activator isolated from the library, a compound isolated from the buttonflies26, and a piperine analog, among others. (5) Isolation and purification of substances related to SARS-CoV-2 membrane fusion inhibition using protein bead method, and structural analysis. We proceeded to prepare affinity beads immobilized with ACE2 and Spike-RBD, proteins associated with SARS-CoV-2 infection. Beads immobilized with protein ACE2 provided by Prof. Osawa at Keio University were created, and a screening system was successfully constructed.