

令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

| | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 企画題目 | 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）での死亡率を激減させる新規薬剤の開発—サイトカインストームの機序解明とその阻害薬の開発— |
| 研究者所属・氏名 | 研究代表者：薬学部・医療薬学科 西田 升三 共同研究者：薬学部・医療薬学科 田邊 元三、薬学総合研究所 森川 敏生、薬学部・医療薬学科 椿 正寛、薬学部・医療薬学科 武田 朋也、薬学部・医療薬学科 高島 克輝 |

1. 研究、開発・改良、提案目的・内容

【提案内容・目的】

新型コロナウイルス感染症（novel coronavirus disease 2019; COVID-19）は、現在（2021年3月18日時点）、日本において患者数46.1万人、死亡者数8929人、世界では患者数1億2500万人、死亡者数274万人とパンデミックを引き起こしている。日本では患者数、死亡者数ともに世界レベルと比べ、その数は非常に少ないものの、8929名の尊い命が失われており、世界では死亡者274万人という途方も無い犠牲が出ている。ワクチンが開発され、患者数は減少することが見込まれているものの変異株の出現によりワクチンの効果が減弱する懸念もある。また、変異株は従来株と比較し、若年者でも重症化することが報告されている。このことからCOVID-19との共存あるいは駆逐のためには、新たなワクチン及び治療薬の開発が必須であることに異論をささむ者はいない。

抗ウイルス薬のファビピラビル（商品名アビガン）、レムデシビルなどのウイルスの感染、増殖を阻止する薬剤はよく知られているが、特にこの感染症治療で最も重要な事項は死亡率を著しく低減させることであり、ワクチン開発と双肩し、重症化阻止薬の開発が特筆して重要である。死亡率が限りなくゼロに近づけば、経済活動も順調に推移し、医療崩壊も起こらず、COVID-19との共存は可能となる。このCOVID-19での重症患者では急性呼吸窮迫症候群や急性肺損傷が死亡原因となり、それを引き起こす重要な要因にサイトカインストームの関与が示唆されている。重症患者の血清中にはinterleukin 6 (IL-6)、IL-18、tumor necrosis factor α (TNF- α)などの炎症性サイトカイン等が著明に増加していることが認められている。このため、肺組織において過剰な免疫応答が引き起こされ、急性呼吸窮迫症候群や急性肺損傷が誘発されると考えられている。しかし、COVID-19によるサイトカインストームが起こる原因については、まだ不明な点が多く、患者の生命予後の観点からも、サイトカインストーム発症機構の全解明、そして発症を阻止する有効な治療薬の探索が非常に重要と考えられている。現在、このサイトカインストームに対してリウマチ様関節炎の治療薬である、抗IL-6受容体抗体であるトシリズマブが効果を示すことが報告されており、現在欧米で使用されている。

申請者らはこれまでの研究で、マウス血清中のサイトカイン量を著しく激減させる新規小分子化合物（近畿大学にて特許申請済み）を見出しており、先に記載の抗体医薬品と異なり、その作用機序はサイトカインストームに関与する様々なサイトカイン産生に関与するシグナル伝達経路の抑制であることも明らかにしている。つまり、申請者らが見出した新規シグナル伝達経路阻害薬は世界で例のない小分子医薬品であり、サイトカインストームに関与する様々なサイトカイン産生を抑制できるため、先に記載したトシリズマブ等の抗体医薬品とは全く作用機序、効果が異なることから、理論上さらに有効に作用し、サイトカインストームによる急性呼吸窮迫症候群や急性肺損傷を抑制し、死亡率を激減できる可能性を秘めている。また先に示した既存の抗体医薬品とは作用機序が異なるため、併用が可能である利点を持つ。本課題では、サイトカインストームの治療薬として死亡率を激減させる効果を判定するとともに、発症機序の解明も試み、かつ現在保有している新規小分子化合物をシードとして、より効率的な新規小分子医薬品の合成も並行し、さらに有効な近畿大学発の新規医薬品開発の研究も進め、COVID-19重症者の死亡率を激減させる、近畿大学発の治療薬開発が目的である。

2. 研究、開発・改良、提案経過及び成果

【提案経過及び成果】

①リード化合物の合成、新規化合物の合成

リード化合物の合成に関しては、現在合成方法を確立し取得済みである。また、このリード化合物から新規化合物の合成に取り組んでいる。リード化合物が有する水酸基に炭素数の異なる種々の置換基を導入し、脂溶性の異なる誘導体を合成することにより、効果の増強や生体内へより移行する化合物の合成を目指している。

②リード化合物によるマウスマクロファージ分画の減少効果

マウスマクロファージ分画にリード化合物が与える影響について解析した。方法としては、マウスから単球を negative selection kit を用いて分取後、24 時間前培養を行い、リード化合物を添加した。4 時間後、サイトカインストーム誘導剤である lipopolysaccharide (LPS) を添加し、48 時間培養後、FACS Aria にて解析を行った。リード化合物及び LPS 未処置のコントロールと比較し、LPS 添加時においてマクロファージの集団が顕著に増加していることが認められた。また、リード化合物を添加時においては LPS にマクロファージ数の増加が抑制させることが明らかとなった。このことから、サイトカインストーム誘導剤である LPS はマクロファージの誘導することで、サイトカインストームを誘導することが考えられ、我々が見出した化合物はマクロファージを抑制することでサイトカインストームを抑制する可能性が考えられた。

③リード化合物によるマウスマクロファージからのサイトカイン分泌の抑制

次にマクロファージにおけるサイトカイン発現を抑制するか検討を行った。方法としては、リード化合物を添加し、4 時間後 LPS を投与した。4 時間培養した後、マクロファージから mRNA を回収し、real time PCR にてサイトカイン発現量を測定した。LPS のみを添加したマクロファージではコントロールの細胞と比較し、8 倍程度発現量が増加しているのに対し、リード化合物を添加したものはコントロールと同程度まで発現が減少しているのを認めた。このことから、リード化合物はマクロファージにおけるサイトカイン発現を抑制することで、サイトカインストームを抑制する可能性がある。

④リード化合物におけるマウス B 細胞の成熟抑制及びサイトカイン発現抑制

リード化合物がマクロファージ以外の免疫細胞に与える影響を確認するため、LPS 刺激時における B 細胞の成熟及びサイトカイン発現を検討した。マウスからの B 細胞分取は negative selection kit を用いて行った。分取した B 細胞にリード化合物を添加し、4 時間培養を行った。その後、LPS を添加し、7 日間培養後、FACS Aria にて解析を行った。その結果、コントロールでは、ほとんどプレ B 細胞であったのに対し、LPS 刺激では未熟 B 細胞、成熟 B 細胞の割合が顕著に増加していた。また、リード化合物を添加した場合は、ほとんどプレ B 細胞の状態で存在していることを確認した。さらに、B 細胞でのサイトカイン発現を real time PCR にて検討した結果、マクロファージと同様に LPS 刺激では顕著に発現量が増加し、リード化合物添加により抑制することが認められた。

⑤LPS でのサイトカインストームモデルの確立

上記で得られた *in vitro* の結果を *in vivo* で検証するため、LPS によるサイトカインストームモデルの確立を行っている。モデルを確立次第、現有のリード化合物にてサイトカインストームを抑制するか検討を行って予定である。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・改良、提案計画

① *In vivo* における LPS でのサイトカインストームモデルの確立

現有のリード化合物及び新規化合物でのサイトカインストーム抑制効果を確認するため、上記したように *in vivo* でのモデルの確立は非常に重要である。このため、引き続きモデルの確立を行い、出来次第、リード化合物及び新規化合物による検証を行う。

②より顕著な効果を示す新規化合物の合成

【提案経過及び成果】の項目①に記載したように現在も新規化合物の合成を行っている。今後も引き続き項目①に記載した内容にて、より顕著な効果を示す新規化合物の取得を目指す。

③作用機序の解析

In vitro にてマクロファージの活性化及びサイトカイン発現抑制、B 細胞分化制御及びサイトカイン発現抑制を認めているが、その詳細な作用機序には明らかに出来ていない。そのため、リード化合物等の詳細な作用機序を明らかにしていく。方法としては、サイトカイン産生に関わるシグナル伝達経路の活性化機構を Luminex 200 を用いて網羅的に解析する。これにより、リード化合物等の作用機序を同定する予定である。

4. 研究成果の発表等

| 発 表 機 関 名 | 種 類 (著書・雑誌・口頭) | 発表年月日(予定を含む) |
|-----------|----------------|--------------|
| なし | なし | なし |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

5. 開発・改良、提案課題の成果発表等

研究結果が出次第、論文を作成し、国際学術雑誌（査読有り）に投稿する予定である。