

日本医療研究開発機構 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
事後評価報告書

I 基本情報 **公開**

研究開発課題名：（日本語）新型コロナウイルスに有効な治療薬としての Pin1 阻害薬の開発を
加速するための基礎研究

（英語）Basic Research to Accelerate the Development of Pin1 Inhibitors
as Effective Therapeutics for the Novel Coronavirus

研究開発実施期間：令和4年7月19日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：坂口 剛正

（英語）Takemasa Sakaguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）広島大学・大学院医系科学研究科・教授

（英語）Hiroshima University・Graduate School of Biomedical and Health Sciences・
Professor

II 研究開発の概要 **公開**

研究の背景と目的

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 による感染症 COVID-19 を制御するための抗ウイルス剤は、
まだ種類が限られており、新たな薬剤の開発が急務である。

Pin1 は、生体内のタンパク質中の [リン酸化 Ser/Thr-Pro] 配列中のプロリンの cis/trans 異性化
を触媒するプロリン異性化酵素である。Pin1 ノックアウトマウスは成育できることから、Pin1 は生存
に必須な遺伝子ではないと考えられるが、老齢のノックアウトマウスでは体重減少、皮膚萎縮、協調
運動障害などの不調が起こることから、生体内でさまざまな酵素の調節を行っていると考えられる。
一方で、感染症の治療のために短期間 Pin1 を阻害しても副作用は出現しにくいと予想される。

癌、炎症、糖尿病、肥満では、細胞の Pin1 活性が亢進するため、私たちは Pin1 阻害薬の合成に
取り組み、これらの疾患の治療薬としての利用を試みてきた（特許出願 6 件、Nakatsu et al.,
2020）。さらに最近、Pin1 阻害薬が培養細胞での SARS-CoV-2 の増殖を阻害することを発見した。
そのため、2021 年度 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「Pin1
阻害化合物を用いる新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 治療薬開発」（代表：浅野知一郎）にお
いて、SARS-CoV-2 に対する強力な抗ウイルス作用を持つ誘導体を作製することに成功した（特願
2020-191046; Yamamotoya et al., 2021）。本研究では、Pin1 阻害薬を COVID-19 治療薬として
開発するために基礎的な研究を進めることを目的とした。

(1) 効果の強い薬剤の作製

これまで、培養細胞での 50%有効濃度 (ED50) が 3.2 μ M の H-77 を使用してきた。その後、

新たな誘導体を作製し、スクリーニングを繰り返した結果、H-958、H-1134、H-1209、H-1211 (EC50 0.6~1.0 μ M)を得た(構造式などの詳細は特許申請前であり、非公開とする)。これらの化合物は、培養細胞に対する細胞傷害性が低い。COVID-19 の低分子薬として特例承認されているレムデシビル[®]の ED50 は約 0.7 μ M であり、これと同等またはそれ以上の有望な化合物を得ることができた。

(2) 動物実験

広島大学で研究分担者が樹立した hACE2 ノックインマウス(C57BL 系)で SARS-CoV-2 感染実験を行った。しかし感染実験系が不十分なためもあるのか、明瞭な薬剤の効果を検出できなかった。そこで、SARS-CoV-2 に感受性の高い Balb/c 系をバックグラウンドとする hACE2 ノックインマウスを作出し、さらにマウス肺で 37 代継代してマウスに馴化した SARS-CoV-2 を用いることで、適切な感染系を構築した。今後、薬剤の選択あるいは投与量を含む投与方法についても検討を行い、感染実験を行う予定である。

(3) 作用機構の解明

Pin1 阻害薬を作用させると、宿主細胞におけるウイルス RNA 合成の場である二重膜空胞 (Double membrane vesicle) が形成されず、ウイルス RNA 転写が阻害されることを観察している。初期翻訳の後のタンパク質プロセッシングやポリメラーゼ複合体の形成などが阻害されている可能性がある。

N タンパク質がリン酸化依存的に Pin1 と結合するという報告 (Ino et al., 2022) があったので、その追試験を行った。しかし、私たちの手では両タンパク質の結合について再現性のある結果を得ることができなかった。また、報告されたリン酸化部位である 79 位の Ser を Ala に置換したウイルスを reverse genetics 法で人工合成したが、Pin1 阻害剤の存在下および非存在下で親株との増殖の違いが見られなかった。

二重膜空胞の形成には、nsp3、nsp4、nsp6 の同時発現で十分であるという報告がある。現在、それぞれの発現プラスミドを構築し、in vitro での二重膜空胞形成系を構築し、確認を行っている。これにより、タンパク質を絞り込み、さらに Pin1 が相互作用するアミノ酸残基を特定する予定である。この様に Pin1 阻害剤の作用機序がウイルスによる細胞膜系の再構築への関与を示すことができる可能性がある。引き続き現在も、二重膜空胞形成阻害のメカニズム解明に取り組んでいる。

(4) 他のウイルスに対する効果(追加項目)

Pin1 阻害剤が SARS-CoV-2 以外の他のウイルスに対しても有効かどうか調査し、広範なウイルスに対する抗ウイルス剤となる可能性を検証した。文献の調査によると、Pin1 を増殖に要求するウイルスとして、ネココロナウイルス(コロナウイルス科)、サイトメガロウイルス(ヘルペスウイルス科)、ヒト免疫不全ウイルス、ヒト T 細胞向性ウイルス(レトロウイルス科)、B 型肝炎ウイルス(ヘパドナウイルス科)、C 型肝炎ウイルス(フラビウイルス科)など、様々なウイルスが存在することがわかった。これらをまとめた総説も作成した (Kanna et al., 2022)。

様々なウイルスに対して、Pin1 阻害剤が実際に効果を示すかどうかを検証した。現時点では、単純ヘルペスウイルス 1 型(ヘルペスウイルス科)や Pin1 要求性が示されていないコクサッキーウイルス、ポリオウイルス(ピコルナウイルス科)、インフルエンザウイルス(オルソミクソウイルス科)、センドライウイルス(パラミクソウイルス科)の増殖が Pin1 阻害剤によって顕著に抑制されることを観察している。

本研究の意義

現在、世界中で開発されている多くの低分子化合物治療薬のパイプラインは、ウイルス自体に作用するものやウイルス受容体に作用するものが主流である。これに対して、我々の研究で開発している Pin1 阻害薬は、他の COVID-19 治療薬とは異なる作用点を持つ薬剤である。そのため、他の薬剤と併用しやすいという利点がある。また、Pin1 阻害薬はウイルスタンパク質ではなく、宿主のタンパク質を直接的な標的とするため、耐性ウイルスが出現しにくい可能性がある。このように、Pin1 阻害薬を COVID-19 に対して使用することはユニークな試みであり、他に類例がない。

本研究によって、培養細胞に対する細胞傷害性が低く、ED50 が 1 μ M 以下で高い抗ウイルス能力を持つ薬剤を開発することができた（これらは特許申請に向けて準備中である）。また、マウスでの SARS-CoV-2 感染実験での有効性検証については、マウスモデルの最適化に時間がかかり、まだ有効性を示すことはできていない。しかし、hACE2 ノックインマウスへのウイルス馴化も合わせて、抗ウイルス効果を評価しやすい系が確立されたと考える。さらに、薬剤の作用機序の解明により、Pin1 阻害剤の SARS-CoV-2 への利用に向けた研究の進展があった。

さらに、他の複数のウイルスに対しても Pin1 阻害剤の有効性が示されたことから、Pin1 阻害薬は SARS-CoV-2 だけでなく、次のパンデミックを引き起こす新興ウイルスにも有効な広域抗ウイルス剤となる可能性を示すことができた。

本文中の文献

- Nakatsu Y et al. *Curr. Med. Chem.* 2020, 27, 3314-3329
- Yamamotoya T et al. *Sci. Rep.* 2021, 11, 18581
- Kanna M et al. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022, 10, 1005325
- Ino Y et al. *J. Proteomics.* 2022, 255, 104501.

(英文：1 ページ程度)

Background and Objectives:

Antiviral drugs for COVID-19 are limited, necessitating the development of new agents. This study aims to develop Pin1 inhibitors as COVID-19 therapeutics.

Pin1 is an enzyme that catalyzes proline isomerization in proteins. Pin1 knockout mice survive but exhibit dysfunctions, indicating its regulatory role. Short-term Pin1 inhibition is expected to have minimal side effects.

We synthesized Pin1 inhibitors for cancer, inflammation, diabetes, and obesity and discovered their effectiveness against SARS-CoV-2. Derivatives with strong antiviral effects were developed. The study is led by Tomoichiro Asano under the 2021 AMED research project.

Objectives:

(1) Develop highly effective drugs:

New derivatives, H-958, H-1134, H-1209, and H-1211 (EC₅₀ 0.6-1.0 μ M), were obtained, exhibiting low cytotoxicity. Their efficacy is comparable to or superior to Remdesivir.

(2) Conduct animal experiments:

Initial experiments using hACE2 knock-in mice showed inconclusive results. A better infection model was established by passaging SARS-CoV-2 in mouse lungs for 37 generations. Drug selection, dosage, and infection experiments are planned.

(3) Elucidate the mechanism of action:

Pin1 inhibitors prevent the formation of double-membrane vesicles involved in viral RNA synthesis. The interaction between Pin1 and the N protein was inconclusive. Protein expression and vesicle formation studies are underway.

(4) Assess effectiveness against other viruses:

Pin1 inhibitors were effective against herpes simplex virus-1, coxsackievirus, poliovirus, influenza virus, and Sendai virus, irrespective of Pin1 dependency.

Significance:

Pin1 inhibitors offer a unique approach to COVID-19 treatment by targeting host proteins rather than the virus itself. Their compatibility with other drugs and reduced likelihood of resistance are advantages. They demonstrate high antiviral potency and low cytotoxicity. Although efficacy in mice is pending, their potential against emerging viruses is promising.