

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 11 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18120

研究課題名(和文)16員環マクロライド・ジョサマイシンによる抗インフルエンザウイルス作用機序の解明

研究課題名(英文)The investigation of anti-influenza A virus mechanism by 16-membered macrolide, Josamycin

研究代表者

菅又 龍一 (Sugamata, Ryuichi)

帝京大学・公私立大学の部局等・講師

研究者番号：70595917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ジョサマイシンは、1) ウイルスの感染効率には影響を与えておらず、2) 感染してから出芽前までの宿主細胞内におけるウイルス因子の産生レベルに影響を与えていないことを示した。一方で、出芽した娘ウイルスの産生量が激減しており、本薬剤による抗ウイルス活性の作用点は、感染後半の出芽のタイミングに絞られ、出芽を制限している可能性を明らかにした。本薬剤による宿主細胞への賦活作用を介した抗ウイルス作用機序を可能性の一つとして追究する必要がある。

また、アジスロマイシンについて、ウイルス粒子に直接作用することで、ウイルスのエンドサイトーシスを阻害する機能をもつことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたジョサマイシンやアジスロマイシンはすでに承認されている抗菌薬であり、人体への安全性も担保されている。ジョサマイシンによる抗インフルエンザウイルス活性の作用機序が科学的に明らかとなれば、新規インフルエンザ治療薬として迅速に感染患者に処方できる(リポジショニング)という社会的意義がある。アジスロマイシンについては、抗ウイルス作用メカニズムの一端を明らかにすることができたため、同様に新規治療薬として利用できるものと期待される。

現在、世界中で感染拡大している新型コロナウイルスもRNAウイルスであり、本研究で得られた成果の一部はコロナウイルス治療薬の開発にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the following 2 findings: 1) Josamycin, a 16-membered macrolide antibiotic, does not show an inhibitory role in efficiency of viral infection; 2) Josamycin does not affect on virus RNA expression and protein production from an infection by parental viruses to just before budding event of progeny viruses. On the other hand, the macrolide significantly reduced progeny virus production, indicating that the point of action by josamycin on anti-virus activity is involved in the later phase of virus replication. Further researches focused on an activatory functions for host cells by josamycin are required for better understanding of precise mechanism of anti-influenza A virus activity.

We also demonstrated that a 15-membered macrolide, Azithromycin (AZM), shows anti-influenza A(H1N1) pdm2009 virus. AZM directly influences virus particle, since then it deactivates an ability of endocytosis process during the virus infection.

研究分野：免疫学

キーワード：A型インフルエンザウイルス 16員環マクロライド ジョサマイシン アジスロマイシン インフルエンザ治療薬 ウイルス治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

人畜共通の病原体でもある A 型インフルエンザウイルスは、突然変異を起こしやすく、過去にはスペイン風邪 (AH1N1) のように、多大な犠牲者を出した歴史もある。近年、東南アジア諸国で感染例がみられる高病原性トリインフルエンザ (AH5N1) は、若年層での感染・発症も多く、致死率は 60% を超える。スペイン風邪やトリインフルエンザによる主な死因は、肺炎の重症化に伴う呼吸器不全である。トリインフルエンザによって引き起こされる重症肺炎には、ステロイドパルス療法では効果が認められず、ECMO 療法でも生存率は低く、これらに代わる有効な治療法も打ち出せていないのが現状である。既存薬であるタミフルなどのノイミラニダーゼ阻害剤は、インフルエンザ劇症肺炎への有効性に乏しく、季節性インフルエンザに対して大規模に使われ続けることにより、耐性ウイルスの出現を招くリスクも負う。これらの背景から、これまでに異なる機構で抗ウイルス作用を示し、かつ、劇症肺炎の発症を抑えて生存率を高める画期的な薬剤候補を見出し、その作用機序を解明する必要がある。

近年、抗菌剤として知られるマクロライド系薬剤が、病原性ウイルスの活動に対して抑制的に働くことや、感染個体の炎症を抑える機能をもつことが報告されている。申請者は、16 員環マクロライドであるジョサマイシンが、ヒト肺胞上皮細胞における A 型インフルエンザウイルスの増殖を抑制し、また劇症肺炎を誘発させた致死性感染マウスに投与することで、生存効果を著しく上昇させることを突き止め (>80%) A 型インフルエンザ感染症に対する画期的な有効性を発見していた。

## 2. 研究の目的

申請者は、北里大学の共同研究者らと化合物スクリーニングをおこない、16 員環マクロライドであるジョサマイシンが感染マウスに対してウイルス遺伝子の発現を阻害し、肺炎の重症化を抑制することを明らかにしていたが、その詳細な抗ウイルス作用機序は不明であった。そこで本研究によって、ジョサマイシンによるウイルスの増殖抑制作用にフォーカスをあて、本薬剤が A 型インフルエンザウイルスが宿主細胞内で発現する遺伝子産物のどれに、そして、どの時点で作用しているかを調べることによって、ジョサマイシンによる抗 A 型インフルエンザウイルス作用機序を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

ジョサマイシンによる A 型インフルエンザウイルスの宿主細胞への侵入時の作用を調べ、ジョサマイシンがウイルスの宿主への感染プロセスを阻害するか否かを明確にした。次に感染細胞に対してジョサマイシンを後処理し、ジョサマイシンによるウイルス遺伝子の発現ならびにタンパク質の翻訳を阻害するかどうかを調べた。一方で、同じマクロライド系薬であるアジスロマイシンについて同様の実験を行い、ジョサマイシンの作用機序と比較検討することとした。

## 4. 研究成果

ジョサマイシンは宿主細胞に感染し細胞外へ出芽する娘ウイルスの産生量を著しく減少させる抗ウイルス活性をもつが、1) 感染時の親ウイルスの感染効率に影響を与えていないこと、2) 感染してから出芽のイベントがおこる前までの宿主細胞内におけるウイルス RNA の発現ならびにウイルスタンパク質の産生レベルに影響を与えていないことを明確にした。

A 型インフルエンザウイルスは、感染 8~10 時間後に、宿主細胞から大量の娘ウイルスを産生するが、感染後にジョサマイシンを投与し、出芽時期の周辺で娘ウイルスの RNA コピー数が激減していたことなどから、出芽の前後の時期にウイルス因子の産生と娘ウイルスの産生に対して抑制的に作用していることを示した。研究計画に沿って進められた実験のデータから、ジョサマイシンによる抗インフルエンザウイルス作用機序について、上記 1) と 2) の抗ウイルス作用メカニズムを否定し、そして抗ウイルス作用メカニズムの作用点は、感染後半の出芽のタイミングに絞ることができた。

一方で、アジスロマイシンの抗ウイルス活性機序については、ジョサマイシンのそれとは大きく異なり、アジスロマイシンがウイルス粒子に直接作用することで、親ウイルスの細胞内への侵入 (エンドサイトーシス) のプロセスを阻害していることを明らかにした。この研究成果については学術論文を投稿し、特許を申請している。

今後の研究の展開として、娘ウイルスが出芽する後半期において、ジョサマイシンが宿主細胞の本来備えている機能に影響を与えることにより、娘ウイルスの増殖を抑えているという可能性にアプローチしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tran DH, Sugamata R, Hirose T, Suzuki S, Noguchi Y, Sugawara A, Ito F, Yamamoto T, Kawachi S, Akagawa KS, Omura S, Sunazuka T, Ito N, Mimaki M, Suzuki K. | 4. 巻<br>10            |
| 2. 論文標題<br>Azithromycin, a 15-membered Macrolide Antibiotic, Inhibits Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Infection by Interfering With Virus Internalization Process      | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Antibiotics  | 6. 最初と最後の頁<br>759-768 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41429-019-0204-x. Epub 2019 Jul 12.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>菅又龍一、菅原章公、廣瀬友靖、Tran H. Dat、山本友子、河内正治、赤川清子、大村智、砂塚敏明、鈴木和男 |
| 2. 発表標題<br>マクロライド系薬剤による抗インフルエンザウィルス活性と16員環マクロライドをベースとした新規治療薬の探索    |
| 3. 学会等名<br>第24回 マクロライド新作用研究会                                       |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tran H. Dat, Ryuichi Sugamata, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Yoshihiko Nonaka, Shoji Kawachi, Tomoko Yamamoto, Kiyoko S. Akagawa, Satoshi Omura, Toshiaki Sunazuka, and Kazuo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>The inhibitory effect of Azithromycin on proliferative activities of 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus   |
| 3. 学会等名<br>第100回 日本細菌学会関東支部総会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tran H. Dat, Ryuichi Sugamata, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Yoshihiko Nonaka <sup>2</sup> , Shoji Kawachi <sup>1</sup> , Tomoko Yamamoto <sup>1</sup> , Kiyoko S. Akagawa, Satoshi Omura, Toshiaki Sunazuka, and Kazuo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>The inhibitory effect of Azithromycin on proliferative activities of 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus   |
| 3. 学会等名<br>第23回 MPO研究会   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>菅又龍一, 菅原章公, 廣瀬友靖, 野口吉彦, Tran H. Dat, 山本友子, 河内正治, 赤川清子, 大村智, 砂塚敏明, 鈴木和男 |
| 2. 発表標題<br>16員環マクロライドLeucomycin A3による 抗インフルエンザウイルス活性機序の解析                         |
| 3. 学会等名<br>第25回 マクロライド新作用研究会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tran H. Dat, Ryuichi Sugamata, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose, Yoshihiko Noguchi, Shoji Kawachi, Tomoko Yamamoto, Kiyoko S. Akagawa, Satoshi Omura, Toshiaki Sunazuka, and Kazuo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Anti-influenza 2009 pandemic virus activity of azithromycin derivatives  |
| 3. 学会等名<br>第25回 マクロライド新作用研究会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Leucomycin A3マクロライドによる抗インフルエンザウイルス活性機序の解析                               |
| 2. 発表標題<br>菅又龍一, 菅原章公*, 廣瀬友靖, 野口吉彦, Tran H. Dat, 山本友子, 河内正治, 赤川清子, 大村智, 砂塚敏明, 鈴木和男 |
| 3. 学会等名<br>第24回 MPO研究会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tran H. Dat, Ryuichi Sugamata, Shoichi Suzuki, Akihiro Sugawara, Tomoyasu Hirose <sup>3</sup> , Yoshihiko Noguchi, Fuyu Ito, Thuy Thu Nguyen, Shoji Kawachi, Tomoko Yamamoto <sup>2</sup> , Kiyoko S. Akagawa <sup>3</sup> , Satoshi Omura <sup>3</sup> , Toshiaki Sunazuka, Naoki Ito, Masakazu Mimaki and Kazuo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Anti-influenza 2009 pandemic virus activity of azithromycin derivatives  |
| 3. 学会等名<br>第24回 MPO研究会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tran H. Dat, Sugamata, Tomoyasu Hirose, Shoichi Suzuki, Yoshihiko Noguchi, Akihiro Sugawara, Fuyu Ito, Tomoko Yamamoto, Shoji Kawachi, Kiyoko S. Akagawa, Satoshi Omura, Toshiaki Sunazuka, Naoki Ito, Masakazu Mimaki and Kazuo Suzuki |
| 2. 発表標題<br>Azithromycin, a 15-membered macrolide antibiotic, inhibits influenza A(H1N1)pdm09 virus infection by interfering with the virus internalization process   |
| 3. 学会等名<br>第26回 マクロライド新作用研究会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>菅又龍一、廣瀬友靖、Dat H. Tran、鈴木章一、野口吉彦、伊藤吹夕、赤川清子、大村智、砂塚敏明、鈴木和男 |
| 2. 発表標題<br>マクロライド系薬によるA型インフルエンザウイルスに対する抑制的作用                       |
| 3. 学会等名<br>第3回 日本ワンヘルスサイエンス学会                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tran H. Dat、菅又龍一、廣瀬友靖、鈴木章一、野口吉彦、伊藤吹夕、山本友子 <sup>2</sup> 、河内正治、赤川清子、大村智、砂塚敏明、伊藤直樹、三牧正和、鈴木和男 |
| 2. 発表標題<br>15員環マクロライド・アジスロマイシンはインフルエンザA(H1N1)pdm09ウイルスのエンドサイトーシスを阻害することでウイルス感染を抑制する                  |
| 3. 学会等名<br>第25回 MPO研究会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|  |                                     |               |
|--|-------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>新たなインフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) 治療薬 | 発明者<br>鈴木和男、菅又龍一、鈴木章一、Tran H. Dat、他 | 権利者<br>帝京大学   |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2019-100691              | 出願年<br>2019年                        | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

帝京大学アジア国際感染症制御研究所（ADC）

[https://www.teikyo-u.ac.jp/affiliate/laboratory/adc\\_lab/](https://www.teikyo-u.ac.jp/affiliate/laboratory/adc_lab/)

北里大学と「インフルエンザ誘発性呼吸器疾患に対する治療薬の開発」についての共同研究を行っています。

[https://www.teikyo-u.ac.jp/affiliate/labjavascript: onSave\(\) oratory/adc\\_lab/](https://www.teikyo-u.ac.jp/affiliate/labjavascript: onSave() oratory/adc_lab/)

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|