

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659238

研究課題名（和文） ウイルス増殖阻害特殊環状ペプチドの作出及び作用機序の解析

研究課題名（英文） Influenza viral hemagglutinin-targeted macrocycles as an antiviral agent

## 研究代表者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：10250218

## 研究成果の概要（和文）：

近年、第3世代の抗体医薬として特殊環状ペプチドが注目されている。インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対して結合する特殊環状ペプチドを創成し、治療に用いられているリレンザと同等の良好な阻害活性を見出した。これら特殊環状ペプチドの亜型を超えたインフルエンザウイルス増殖阻害効果における作用機序を明らかにし、新たな抗ウイルス剤として治療ペプチドの開発をめざした。

## 研究成果の概要（英文）：

We identified macrocyclic peptides that bind the viral envelope protein hemagglutinin (HA) of influenza A viruses and inhibit its biological function by using the Random non-standard Peptide Integrated Discovery (RaPID) system. The macrocycles inhibited virus replication and exhibited efficacy against viral pneumonia in a mouse model. These results indicate that the RaPID system allows for the development of a new class of HA-targeted antivirals for influenza treatment.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御・ワクチン、特殊環状ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 や世界的流行を起こした Pandemic 2009 H1N1、更に毎年流行する季節性インフルエンザウイルスによる感染症は健康、及び世界経済に深刻な影響を与え続けている。また、高頻度に生じる突然変異や複数の亜型ウイルス間で起こるゲノム再編による新たなウイルス株の出現がインフルエンザウイルス感染症対策をより困難にしている。インフルエンザウイルス感染症に対する主な治療薬はタミフル、リレンザである。しかしこの二つの抗ウイルス薬は発症後4

8時間以降のインフルエンザウイルス感染症には治療効果がないとされ、さらに、多くの耐性株の出現が報告されている。そのため、感染の時期を問わず、複数の異なるインフルエンザ亜型ウイルスによる感染症に対しても有効で、且つ耐性株の出現が抑えられるあらたな治療薬の開発が急務である。インフルエンザウイルス感染症に対してタミフル、リレンザ以外の有効な治療法として考えられているものに血清療法や抗体治療がある。抗体はウイルス蛋白に結合し、その機能を妨げることでウイルス複製を阻害する。ウイルス増殖を阻害

するモノクローナル抗体の投与がマウス等の実験モデル動物におけるインフルエンザ感染症に対して有効であることは既に明らかである (Nat. Struct. & Mol. Biol. 2009, P. N. A. S. 2010 等)。しかし、抗体は蛋白質として一定の大きさがあるため、あまりに狭い領域には物理的に入り込むことができない。例えば、インフルエンザ HA 蛋白質におけるシアル酸への結合部位(ポケット)は亜型間で非常に保存性が高いが、抗体が入り込むには狭すぎて結合できないとされる。その一方で、ペプチドは抗体よりもはるかに分子量が小さいために抗体が入り込めないウイルス蛋白質上の狭い領域にも入り込むことができる。そこで、我々はペプチドリーム社との共同研究により、約 12-15 個のアミノ酸から構成され、メチル化及び環状化により生体内における安定性が従来よりも 100-1000 倍に向上した特殊環状ペプチドをスクリーニングし、高病原性 H5N1 HA 蛋白質に特異的に結合する特殊環状ペプチドを 24 種類取得した。

## 2. 研究の目的

近年、第3世代の抗体医薬として特殊環状ペプチドが注目されている。特殊環状ペプチドはアミノ酸がメチル化されているものを用い、さらに環状化することにより、動物体内での安定性を 100-1000 倍に高めたものである。インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対して 12-15 アミノ酸からなる特殊環状ペプチドを創成し、治療に用いられているリレンザと同等の良好な阻害活性を見出した。しかし、低分子ペプチドがインフルエンザウイルス増殖を阻害する機序は不明である。従って、これら特殊環状ペプチドの亜型を超えたインフルエンザウイルス増殖阻害効果における作用機序を明らかにし、新たな抗ウイルス剤として治療ペプチドの開発をめざした。

## 3. 研究の方法

HA を標的とした特殊環状ペプチドの亜型を超えたインフルエンザウイルス増殖阻害機序を明らかにするとともに、感染動物モデルに対する治療効果についても検討する。本研究においては、1) 特殊環状ペプチドが組織細胞内の感染ウイルスを排除するときに惹起される応答の解析をする。また、2) 細胞内のウイルス蛋白質等異物の認識、分解排除機構を解析する。これにより、感染ウイルス排除に重要な役割を担っている全く新たな感染防御機構を明らかにする。このために以下の研究を進めた。

- (1) ウイルス複製過程における特殊環状ペプチドによる増殖阻害効果の作用機序解析。
- (2) インフルエンザウイルス感染動物モデルに対する特殊環状ペプチドによる治療効果の検討。

(3) 複数の異なるインフルエンザ亜型ウイルスに対する増殖阻害、感染動物モデルにおける治療効果の検討。

(4) セレクションされた特殊ペプチドの配列構造を解析して標的蛋白質間で共通性・親和性などに関して解析し、より高い特異結合活性をもつペプチドを創製する。

## 4. 研究成果

特殊環状ペプチド(No. 24)のインフルエンザウイルスの増殖阻害活性の作用機序の解析を進めた。本研究で開発した特殊環状ペプチドは、インフルエンザウイルスの粒子表面の HA タンパク質に結合するため、その作用機序としてはウイルス生活環において HA が関与するステップ (HA の開裂、細胞への吸着、ウイルス膜と細胞膜との融合、ウイルス粒子形成、出芽) であると想定され、これまでに中和活性を示すデータを得ている。そこで、まず No. 24 ペプチドの HA の結合部位を同定するため、H5N1 の Vac-3 株と H1N1 の PR8 株を No. 24 ペプチドと反応させ、それぞれ 20  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M で増殖してくる変異ウイルス (エスケープミュータント) を単離した。これらのウイルスの HA 配列を解析したところ、Vac-3 株のエスケープミュータントでは HA 遺伝子に変異は検出されていないが (PA, NA 遺伝子上にはアミノ酸置換を伴う変異が見出された)、PR8 株のエスケープミュータントでは HA 遺伝子に 2 箇所のアミノ酸置換変異 (E232G, L345I) を見出した。E232G は細胞表面の受容体であるシアル酸との結合に関与する HA1 フラグメントの globular head ドメインに位置しており、また L345I は HA2 フラグメントの fusion peptide の領域に位置している。この変異部位のいずれかあるいは両方が No. 24 ペプチドの結合に関与する部位であると考えられる。

また、No. 24 ペプチドの結合関連部位の候補の一つである HA タンパク質の fusion peptide は、インフルエンザウイルスの細胞内への侵入に必要な領域である。ウイルスが吸着後に細胞内に侵入する過程で、ウイルス膜上の開裂した HA は後期エンドソームの酸性下において構造変化を起こし、露出した fusion peptide を細胞膜に突き刺してウイルス膜と細胞膜との融合を起こす。そこで、No. 24 ペプチドによる HA の膜融合活性への影響について、HA 発現細胞を用いた polykaryon 形成試験で検討した。No. 24 ペプチドの処理により、H5N1 の高病原性株由来の HA タンパク質および H1N1 の IVR153 株由来の HA タンパク質による polykaryon 形成が用量依存的に有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件 ; すべて査読有り)

1. Shin-ichiro Nakagawa, Yuichi Hirata, Takeshi Kameyama, Yuko Tokunaga, Yasumasa Nishito, Kazuko Hirabayashi, Junichi Yano, Takahiro Ochiya, Chise Tateno, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshiba, Akinori Takaoka and Michinori Kohara. Targeted induction of interferon- $\lambda$  in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. PLoS ONE 8(3):e59611 (2013)

2. Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. J. Med. Virol. J. Med. Virol. 85(2):241-9 (2013).

3. Tsunamasa Watanabe, Fuminaka Sugauchi, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Hiroshi Yatsuhashi, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Etsuko Iio, Masaya Sugiyama, Takashi Shimada, Masakazu Kakuni, Michinori Kohara, Masashi Mizokami. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut (2012) in press.

4. Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. PLoS ONE 7(12):e51656 (2012).

5. Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda1, Mitsutoshi Yoneyama,

Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshiba and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein basic region 1. Biochem Biophys Res Commun. 428(4):494-499 (2012).

6. Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. PLoS Pathog. 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).

7. Qiang Wang, Shijian Zhang, Hongbing Jiang, Jinalan Wang, Leiyun, Weng, Yingying Mao, Satoshi Sekiguchi, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Philippe Buchy, Vincent Deubel, Ke Xu, Bing Sun and Tetsuya Toyoda. PA from an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus activates viral transcription and replication, and induces apoptosis and interferon expression. Virology Journal 8;9:106-118 (2012).

8. Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. Sci. Comm 2: 259 : 1 – 9 (2012).

9. Leiyun Weng; Michinori Kohara; Takaji Wakita; Kunitada Shimotohno; Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. Gene 496:79-87 (2012).

10. Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of  $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Sp1. *J. Med. Virol.* 84:733-746 (2012).
11. Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. *Virus Res.* 163: 405-409 (2012).
12. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Takashi Takano, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Yasumasa Nishito, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Masayuki Sudo, Chieko Kai, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.* 204(8):1172-80 (2011).
13. Tomoko Chiyo, Satoshi Sekiguchi, Masahiro Hayashi, Yoshimi Tobita, Yumi Kanegae, Izumu Saito, and Michinori Kohara. Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice. *Virus Res.* 160(1-2):89-97 (2011).
14. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology* 55(3):512-21 (2011)
15. Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases.* *Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).
16. Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).
17. Kiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).
18. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).
- [学会発表] (計 22 件)
1. Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T., Tokunaga Y., Kohara M. : Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the hepatitis C virus ameliorates chronic hepatitis in the liver of transgenic mice. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology* 2012. 12. 13-18. Ottawa (Canada)
2. Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Self-enhancement of hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11-14. 福岡国際会議場 (福岡)
3. Yasui F., Munekata K., Itoh Y., Sakoda Y., Kida H., Ogasawara K., Kohara M. : Single immunization with H5N1 influenza vaccine based on recombinant vaccinia virus protects mice and macaques from challenge with H5N1 influenza virus. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012. 12. 5-7. 神戸国

際会議場 (神戸)

4. 小原道法、大槻貴博、徳永優子、木村公則 : HCV感染による慢性肝炎の病態形成と治療ワクチン 第16回日本ワクチン学会学術集会 2012.11.17-18. パシフィコ横浜

5. 齊藤 誠、飛田良美、棟方 翼、伊藤利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田規一、小澤 真、小原恭子、小原道法 : 新世代抗体医薬としての特殊環状ペプチドによるインフルエンザウイルス増殖阻害効果 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012.11.13-5. グランキューブ大阪(大阪)

6. 平田雄一、池田和貴、須藤正幸、徳永優子、田口 良、小原道法 : C型肝炎ウイルスによるスフィンゴ脂質の合成促進とウイルス複製環境の構築 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012.11.13-5. グランキューブ大阪(大阪)

7. Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Itoh Y., Ogasawara K., Kohara M. : Development of recombinant H5N1 influenza vaccine based on vaccinia virus vector. 6<sup>th</sup> Vaccine & ISV Congress 2012.10.14-16. Shanghai(China)

8. Hirata Y., Kameyama T., Tokunaga Y., Nakagawa S., Hayashi Y., Takaoka A., Kohara M. : Interferon-lambda plays a critical role in antiviral response in human hepatocytes. 第34回日本分子生物学会 2011.12.13-16. 横浜

9. 宗片圭祐、安井文彦、迫田義博、喜田宏、柴田伸一、村上利夫、小原道法 : H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス HA発現組換えワクシニアウイルスワクチンによる発症防御機序の解析 第15回日本ワクチン学会 2011.12.10-11. 東京

10. Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29. 千葉

11. Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis

C virus has robust anti-viral effects in human livers. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco

12. Kimura K., Otsuki T., Kohara M. : Recombinant vaccinia virus encoding hepatitis C virus nonstructural protein modulates host immune response and ameliorates chronic hepatitis in mouse model. The American Association for the Study of Liver Diseases 2011.11.4-8. San Francisco

13. 高野貴士、小原道法、小原恭子 : C型肝炎ウイルスの複製における DHCR24 の役割 第70回日本癌学会学術総会 2011.10.3-5. 名古屋

14. 小原道法、木村公則、小原恭子 : C型肝炎発症におけるウイルス蛋白質と炎症性サイトカイン 第70回日本癌学会学術総会 2011.10.3-5. 名古屋

15. Gomi S., Naganawa S., Yasui F., Munekata K., Ishii K., Sakoda Y., Kida H., Kohara M. : A single immunization with highly attenuated vaccinia virus DIs-based vaccines induce protective immunity against H5N1 avian influenza virus in mice. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo

16. Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo

17. Yasui F., Kai C., Morita K., Kohara M. : Clearance of SARS-CoV by cooperation of antibodies and phagocytes. International Union of Microbiological Societies(IUMS)2011 2011.9.11-16 Sapporo

18. Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Spontaneous development of B-cell lymphomas by persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells in mice. 2011 ASBMB Special Symposia Series 2011.7.24-26 Guangzhou China

19. 井上和明、塗谷秀子、小原道法 : PCRとin situ hybridizationを組み合わせたHCVとHBVのウイルスゲノム存在様式

可視化の試み 第 47 回日本肝臓学会総会 2011. 6. 2-3 東京

20. 木村公則、小原道法：HCV 感染による慢性肝炎の病態形成と炎症性サイトカインの関与 第 47 回日本肝臓学会総会 2011. 6. 2-3 東京

21. 大槻貴博、関口 敏、飛田良美、木村公則、小原道法：新規 C 型慢性肝炎モデルマウスを用いた C 型慢性肝炎の病態解析 第 58 回日本実験動物学会総会 2011. 5. 25-27 東京

22. Yasui F., Munekata K., Sakoda Y., Kida H., Shibata S., Murakami T., Kohara M.: Immunization with recombinant vaccinia virus expressing hemagglutinin protein of H5N1 HPAIV protect mice from lethal H5N1 HPIV infection via the neutralizing antibody-independent mechanism. Keystone Symposia-Pathogenesis of Influenza 2011. 5. 23-28 Kowloon (Hong Kong)

〔図書〕(計 7 件)

1. 小原道法、木村公則、小原恭子：肝炎ウイルスモデル〈series モデル動物利用マニュアル〉疾患モデルの作成と利用-がん 第 3 章 消化器系 第 2 節 肝臓 第 3 章 肝炎ウイルスモデル 346-358 (2012)

2. 木村公則、小原道法：HCV 治療ワクチンの開発について がんと化学療法 39(10):1451-1457, 2012

3. 小原道法、木村公則、小原恭子：「C 型肝炎ウイルス感染モデル」〈series モデル動物利用マニュアル〉疾患モデルの作成と利用-糖尿病・肥満/感染症 第 II 部 感染症 188-197 (2012)

4. 平田雄一、小原道法：「ヒト肝細胞における強力な IFN- $\lambda$  誘導による抗ウイルス効果」消化器内科 55(2):271-277 (2012)

5. 須藤正幸、小原道法：細胞膜成分を標的とした C 型肝炎治療薬 BIO Clinica 26(8):920-924 2011.9

6. 小原恭子、小原道法：C 型肝炎ウイルスによる免疫攪乱と炎症発がん BIO Clinica 26(10):904-910 2011.9

7. 小原恭子、棟方 翼、小原道法：新時代のウイルス性肝炎学-「HCV の病原性発現に關与するウイルス因子とその機能 日本臨床 69 巻増刊号 4 2011.5.20

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 1 件)

名称：抗インフルエンザウイルス活性を有するペプチド

発明者：小原道法、佐々木 亨、パトリック・リード

権利者：ペプチドリーム株式会社、財団法人東京都医学総合研究所

種類：特許

番号：特願 2011-211100

出願年月日：2011 年 9 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：10250218

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

棟方 翼 (MUNAKATA TUBASA)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員  
研究者番号：50420237

安井 文彦 (YASUI FUMIHIKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員  
研究者番号：40399473

宗片 圭佑 (MUNEKATA KEISUKE)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員  
研究者番号：30569140