

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591590

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの遺伝子再集合を応用した新規治療戦略

研究課題名(英文) New strategy of the therapy that applied antigenic-shift of the influenza virus.

研究代表者

柏木 孝仁 (KASHIWAGI, takahito)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70320158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗原不連続変異(Antigenic shift)は新型インフルエンザウイルスの発生メカニズムとして良く知られている。これまでの研究で、この抗原不連続変異はときにウイルス複製に抑制的に作用することが分かっている。そこで我々はウイルスの複製に重要なPAとPB2サブユニットに注目した。結果、PAとPB2サブユニットを阻害因子としてインフルエンザウイルスに作用させると、顕著に遺伝子複製が阻害された。さらにこれらのサブユニットを断片化したところ、阻害効果がさらに増強された。加えて、我々は、これら断片の大量発現系と精製系を確立した。将来は、これらの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Antigenic shift is well known as an emerging mechanism of influenza virus. Previous study showed that the antigenic shift sometimes affects as a negative factor for the viral replication. Therefore, we focused on the PA and PB2 subunits, which are essential subunits for the viral replication. Consequently, the viral replication was significantly impaired by introducing either PA or PB2 subunit as inhibitor. By fragmentation of the subunit, the inhibitory effect was emphasized. In addition we constructed the mass expression system and purification method for the fragments. Future applications are expected.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス RNAポリメラーゼ 遺伝子複製 抗ウイルス薬 PAサブユニット PB2サブユニット

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは異なる亜型間で遺伝子の再集合を起こす。これまでの研究から、組み合わせによってはウイルス複製活性が低下するものがあることが分かった。この抑制機構を利用することで、ウイルスを抑えられと我々は考えた。すなわち、インフルエンザウイルスを用いて、インフルエンザウイルスを阻害するという発想である。ここでは特に遺伝子複製に重要な因子である PA および PB2 に着目して研究を行った。

2. 研究の目的

変異性が高く、薬剤耐性を獲得しやすいインフルエンザウイルスにおいては、様々な作用機序による対抗手段が必要である。現在の抗インフルエンザ薬は NA 阻害薬に分類され、作用機序が全く同じである。近年、核酸合成阻害薬も登場したが、その種類は限られている。そこで、当該研究では、これまでの基礎研究を基に、インフルエンザウイルスの流行機序（抗原不連続変異）を逆手に取った新しい阻害法の開発を行う事を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 株間で PA および PB2 による遺伝子再集合の阻害効果に差があることから、より阻害効果の高い株を選択する。
- (2) PA および PB2 サブユニットの阻害部位の検討を進め、できうる限りの低分子化を目指す。
- (3) 低分子化に加え、現存するインフルエンザ株に広く阻害効果を示す部位を探す。
- (4) その阻害部位が薬剤として利用可能であるかどうか、既存の実験系（試験管内実験系、培養細胞系）を用いて検討する。
- (5) 阻害部位の大量発現と高純度精製系を構築する。

4. 研究成果

細胞内に人工的に H1N1 標準株 (WSN) インフルエンザウイルスのレプリコン（遺伝子複製系）を構成し、他株の PB2 サブユニットの遺伝子を導入すると、ウイルスの遺伝子複製が著しく阻害されることが確認できた（図 1）。同様に他株の PA サブユニットを作用させると PB2 に比べると弱いながらも阻害効果を確認できた（図 2）。

この PB2 サブユニットを断片化することでさらに強い阻害効果を得る事ができた（図 3）。この断片によって実際のウイルスが増殖抑制されることも培養細胞系を用いて確認できた。PA についても PB2 同様に断片化を進めて行ったところ、断片にウイルス遺伝子複製に対する強い阻害効果がある事が分か

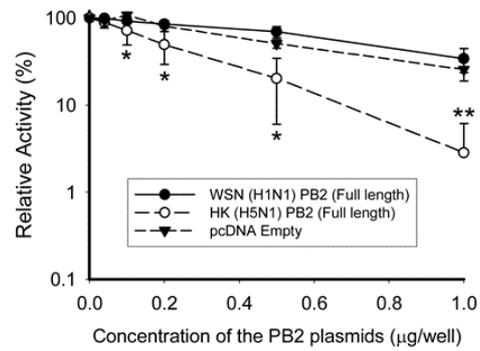


図 1 . PB2 による阻害効果

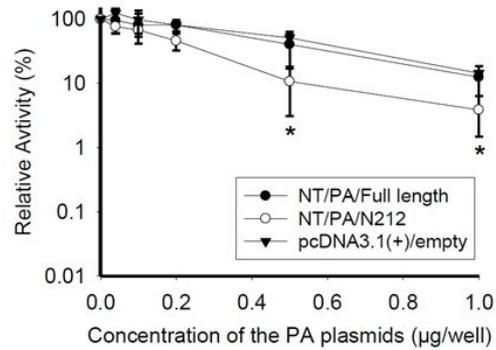


図 2 . PA による阻害効果

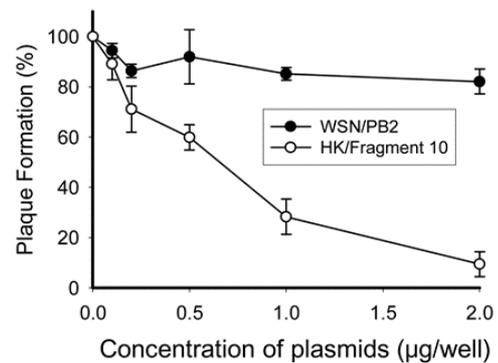


図 3 . PB2 断片による阻害効果

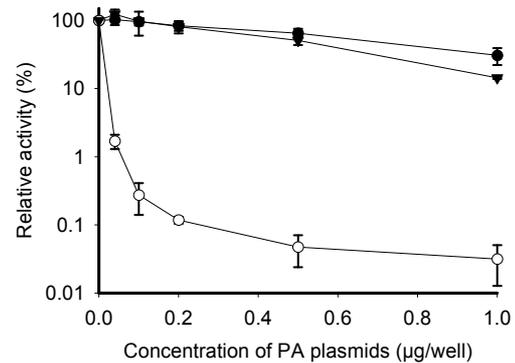


図 4 . PA 断片による阻害効果

り（図 4）、株に対する特異性を検証したところ、この PA 断片は、様々な亜型に強い阻害活性があることが分かった。

このように、PA および PB2、すなわちインフルエンザウイルスによってインフルエンザウイルスを阻害するという方法の構築に

向けた基礎的データを、当該研究期間に十分に集める事ができたと考えている。さらに我々は、これら断片の大量発現系を構築し、精製法を検討し、純度の高い断片の大量合成に成功している。現在は、これらの断片を用いて細胞培養系によるウイルス複製の阻害効果を検証している。

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 7件)

1. Uemura Y, Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. The N-terminal fragment of PA subunit of the influenza A virus effectively inhibits ribonucleoprotein (RNP) activity via suppression of its RNP expression. *J Infect Chemother*, 21(9): 296-301, 2015. 査読有
2. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Uemura Y, Imamura Y, Hamada N, and Watanabe H. The N-terminal fragment of a PB2 subunit from the influenza A virus (A/Hong Kong/156/1997 H5N1) effectively inhibits RNP activity and viral replication. *PLoS ONE*, 9(12): e114502, 2014. 査読有
3. Hamada N, Hara K, Matsuo Y, Imamura Y, Kashiwagi T, Nakazono Y, Gotoh K, Ohtsu Y, Ohtaki E, Motohiro T and Watanabe H. Performance of a rapid human metaneumovirus antigen test during an outbreak in a long-term care facility. *Epidemiol Infect*, 142: 424-427, 2014. 査読有
4. Hara K, Nakazono Y, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. Co-incorporation of the PB2 and PA polymerase subunits from human H3N2 influenza virus is a critical determinant of the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. *J. Gen. Virol*, 94: 2406-2416, 2013. 査読有
5. 今村宜寛、濱田信之、原 好勇、柏木孝仁、渡邊 浩. インフルエンザ (H1N1) 2009 発生時に地域に密着して実施した実験室内診断症例の検討. *感染症学雑誌* 第 87 巻 第 3 号 368-374. 2013. 査読有
6. Hamada N, Imamura Y, Hara K, Kashiwagi

T, Imamura Y, Nakazono Y, Chijiwa K, and Watanabe H. Intrahost emergent dynamics of oseltamivir-resistant virus of pandemic influenza A (H1N1) 2009 in a fatally immunocompromised patient. *J Infect Chemother*, 18:865-871, 2012. 査読有

7. Nakazono Y, Hara K, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. The RNA polymerase PB2 subunit of influenza A/HongKong/156/1997(H5N1) restricts the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. *PLoS ONE* 7(2) e32634: 1-9, 2012. 査読有

[学会発表](計 17件)

1. 原 好勇、柏木 孝仁、濱田 信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニットの RNA 結合部位の同定」第 89 回日本感染症学会総会、国立京都国際会館(京都) 2015.4.16.
2. 柏木 孝仁、原 好勇、上村 勇作、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルスの N 末端 PA による RNP 合成阻害とその特異性について」第 89 回日本感染症学会総会、国立京都国際会館(京都) 2015.4.16.
3. 緒方 啓、柏木孝仁、井出達也、原 好勇、宮島一郎、有永照子、桑原礼一郎、天野 恵介、濱田信之、渡邊 浩、鳥村 拓司 「deep-sequencing を用いた治療抵抗性 HCV における IRES 領域の遺伝子解析」第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(横浜) 2014. 11.25.
4. 柏木孝仁、上村勇作、原 好勇、今村宜寛、濱田信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルス PA サブユニットによる RNP 合成阻害の特異性の検証」第 88 回日本感染症学会学術講演会、第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会、ヒルトン福岡シーホーク(福岡) 2014.6.20.
5. 上村勇作、柏木孝仁、原 好勇、濱田信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルス PA サブユニットの N 末端断片は RNP の合成を抑制する」第 88 回日本感染症学会学術講演会、第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会、ヒルトン福岡シーホーク(福岡) 2014.6.20.
6. 原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルス A/H3N2 の遺伝子再集合では PB2 と PA の同時移行が重要である」第 88 回日本感染症学会学術講演会、第 62 回日本化学療法学会総

- 会 合同学会、福岡、2014.6.20.
7. 原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊 浩
「インフルエンザウイルス A/H3N2 の遺
伝子再集合について」 第 61 回日本化
学療法学会西日本支部総会・第 56 回日
本感染症学会中日本地方会学術集会・第
83 回日本感染症学会西日本地方会学術
集会共同開催、大阪国際会議場(大阪)、
2013.11.8.
 8. Hara K, Nakazono Y, Kashiwagi T,
Hamada N, and Watanabe H. Functional
interaction between PB2 and PA
polymerase subunits of influenza
virus is a critical determinant of the
replication of reassortant viruses.
XI International Conference on
Negative Strand Viruses, Granada,
Spain. 2013.6.16-21.
 9. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y,
Uemura Y, Imamura Y, Hamada N, and
Watanabe H. The N-terminal fragment of
influenza A virus (H5N1) PB2 subunit
strongly inhibits its RNA-dependent
RNA polymerase. XI International
Conference on Negative Strand Viruses,
Granada, Spain. 2013.6.16-21.
 10. Hara K, Kashiwagi T, Nakazono Y,
Hamada N and Watanabe H.
Co-incorporation of the PB2 and PA
polymerase subunits is a critical
determinant for the generation of H3N2
reassortant viruses. 28th
International Congress of
Chemotherapy and Infection. Yokohama,
Japan. 2013.6.8.
 11. 柏木孝仁、原 好勇、上村勇作、今村宜
寛、濱田信之、渡邊 浩「PB2 サブユニ
ットによるインフルエンザウイルス遺
伝子複製酵素の阻害効果に関する研究」
第 87 回日本感染症学会学術講演会、パ
シフィコ横浜(横浜) 2013.6.5.
 12. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y,
Uemura Y, Imamura Y, Hamada N and
Watanabe H. The N-terminal fragment of
influenza A virus (H5N1) PB2 subunit
strongly inhibits its RNA-dependent
RNA polymerase. United States-Japan
Cooperative Medical Science Program.
16th US-Japan Acute Respiratory
Infections Panel Meeting. Singapore,
2013.3.13.
 13. 原 好勇、中園陽子、柏木孝仁、今村宜
寛、濱田信之、渡邊 浩「インフルエン

ザウイルス RNP の活性発現には PB2-PA
の組み合わせが重要である」 第 60 回日
本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議
場(大阪) 2012.11.14

14. 柏木孝仁、原 好勇、中園陽子、今村宜
寛、濱田信之、渡邊 浩「インフルエン
ザウイルスの PB2 サブユニットによる
RNA ポリメラーゼの阻害効果」 第 60 回
日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会
議場(大阪) 2012.11.14.
15. 濱田信之、原 好勇、松尾勇作、今村宜
寛、柏木孝仁、後藤憲志、大津 寧、本
廣 孝、渡邊 浩「重症心身障害児施設
でのヒト・メタニューモウイルス集団感
染における新規迅速診断キットの有用
性」 第 86 回 日本感染症学会総会、長
崎ブリックホール(長崎) 2012.4.26.
16. 原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊 浩
「インフルエンザウイルスの PB2 と PA
は遺伝子再集合を制御する」第 86 回 日
本感染症学会総会、長崎ブリックホール
(長崎) 2012.4.26.
17. 柏木孝仁、原 好勇、今村宜寛、濱田信
之、「インフルエンザウイルスの遺伝子
再集合を応用した阻害薬の開発」 第 86
回 日本感染症学会総会、長崎ブリック
ホール(長崎) 2012.4.26.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：インフルエンザ阻害薬
発明者：上村勇作、柏木孝仁、原好 勇、渡
邊 浩
権利者：学校法人 久留米大学
種類：国際出願
番号：WO 2015/050170 A1
出願年月日：2014 年 10 月 1 日
国内外の別： 国外

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol>

/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏木 孝仁 (KASHIWAGI, takahito)
久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70320158

(2) 研究分担者

渡邊 浩 (WATANABE, hiroschi)
久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90295080

原 好勇 (HARA, koyu)
久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40309753

(3) 連携研究者

()

研究者番号：