

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670224

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの増殖を阻害するパントロピック特殊環状ペプチドの構築

研究課題名(英文) Influenza viral hemagglutinin-targeted macrocyclic peptides 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・特任研究員

研究者番号：10250218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHA蛋白質の大量発現・精製を行い、これを用いて特殊環状ペプチドライブラリーのスクリーニングを行い、結合を示す特殊環状ペプチドを選択した。強い中和活性を示した特殊環状ペプチド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。特殊環状ペプチドのインフルエンザウイルス増殖阻害の作用機序は、HA結合を介したウイルス粒子の中和活性(細胞への吸着阻害)に加え、細胞内での侵入に必須のステップ(HAによる膜融合)を阻害する活性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To devise smaller molecules capable of binding to the influenza viral HA and have the potential as an antiviral agent, we used an emerging technology, RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) system. After five rounds selection of H5N1 HA-binding peptides, we found a total of 24 candidates for inhibitor HA (iHA).

iHA inhibited plaque formation against different clade H5N1 viruses, A/whooper swan/Mongolia/3/05 (H5N1/Mongolia; clade 2.2) and A/whooper swan/Hokkaido/1/08 (H5N1/Hokkaido; clade 2.3). Intriguingly, iHA was effective against pandemic (H1N1) 2009 viruses more than zanamivir. These results suggest that iHA is able to inhibit replication of a wide range of H1 and H5 influenza viruses via a mechanism of its interaction with HA. Polykaryon formation mediated by various clade H5 HAs were also inhibited by iHA in a dose-dependent manner.

研究分野：ウイルス学、感染免疫学

キーワード：インフルエンザ 特殊環状ペプチド 感染阻害

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは過去に4度世界的に大流行し、また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。過去に発生した世界的な大流行は、人類が未経験のトリインフルエンザウイルスの HA(Hemagglutinin)遺伝子がヒトの間で流行していたインフルエンザウイルスの HA 遺伝子と組変わる(遺伝子再集合)に起因する。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。現在インフルエンザの治療で主に用いられているのはノイラミニダーゼ阻害薬であるが、すでに耐性を獲得したウイルス株の出現が報告されている。そのため、広範の亜型ウイルスや新型ウイルスに対しても有効で、既存の抗ウイルス薬とは作用機序が異なる新たな治療薬の開発が急務である。

抗ウイルス薬に代わるものとして、インフルエンザに対する抗体医薬の開発が世界中で進められている。しかし、抗体は高分子であり、タンパク質の立体構造のうち狭い領域には物理的に入り込むことができないため、抗体の認識部位はアクセス可能な領域に制限されている。例えば、インフルエンザ HA 蛋白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上の狭い領域にも入り込むことができる。こうしたことから、我々は次世代の抗体医薬として、抗体より分子サイズが小さく従来抗体が結合し得ない抗原領域を認識することが可能な特殊環状ペプチドに着目した。

### 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。H5N1 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。さらに、リレンザ耐性の H1N1 パンデミック 2009 に対しても強力な阻害活性を示すことを見いだした。これは、インフルエンザウイルスの新たな抗ウイルス剤として pantropic な治療ペプチド樹立の可能性を示している。そこで、全てのインフルエンザウイルス亜型に対して感染阻害・治療効果を有する特殊環状ペプチドの構築をめざす。

### 3. 研究の方法

### 平成 25 年度

- (1) 亜型間で高度に保存される HA 領域のステムドメイン構造を有するスクリーニング用蛋白質の構築
- (2) H1N1, H2N2, H3N2 季節性インフルエンザウイルス亜型及び高病原性 H5N1 亜型の HA ステムドメインに高親和性で結合する特殊環状ペプチドの探索
- (3) 各亜型ウイルスの培養細胞に対する感染阻害効果の検討
- (4) 各亜型ウイルスの感染マウスモデルに対する感染阻害・治療効果の検討

### 平成 26 年度以降

- (5)
- (6) 特殊環状ペプチドの全てのインフルエンザウイルス亜型に対する感染阻害効果の検討
- (7) 特殊環状ペプチドの感染・増殖阻害作用機序の解析

### 4. 研究成果

新世代抗体医薬としての特殊環状ペプチドに着目し、高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1)のヘマグルチニン(HA)に結合し、亜型を超えたインフルエンザウイルス感染阻害活性を示す特殊環状ペプチド(iHA)を探索した。

チオエーテル環状化ペプチドライブラリーを無細胞翻訳系で発現させ、組換えワクシニアウイルスベクターで発現させたインフルエンザウイルス(H5N1 clade 2.2) HA タンパク質と高い親和性で結合したペプチド(iHA)について、ウイルスの中和活性、増殖阻害活性及びHA膜融合に対するiHAの阻害活性を検討した。さらに、H5N1 および H1N1 の致死性感染マウスモデルを用い、iHA の感染防御効果および治療効果を検討した。新たに取得した iHA は、高病原性株を含む多様なクレードの H5N1 ウイルスの感染阻害(中和および増殖阻害)を示し、さらに同じく Group1 に属する H1, H2 亜型ウイルスの感染増殖も顕著に阻害した。この iHA は、HA による膜融合活性を濃度依存的に阻害した。致死性感染マウスモデルにおいて、iHA の腹腔内投与および鼻腔内投与は感染防御効果および治療効果を示した。特に、感染 4 日後からの投与において Zanamivir 投与群では治療効果を示さないのに対し、iHA 投与群では有意な治療効果を示した。特殊環状ペプチド iHA は、Group1 に属する亜型ウイルスの感染阻害活性を示すことが明らかとなった。この iHA の作用機序として、中和活性に加え HA による膜融合活性を阻害することも明らかとなった。このように、iHA は NA 阻害剤とは作用機序が異なるため、NA 阻害剤に耐性を獲得したウイルスに対しても効果を示し、また感染後期においても十分な治療効果を発揮すると考えられる。

## 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 6件)すべて査読あり

1. Kyoko Tsukiyama-Kohara and Michinori Kohara. *Tupaia belangeri* as an experimental animal model for viral infection. *Experimental Animals* 2014 Oct 30;63(4):367-74. doi:10.1538/expanim.63.367.Epub 2014 Jul 22.
2. Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Masahiro Kitabatake, Toru Nishiwaki, Hideki Fujii, Chise Tateno, Misako Yoneda, Kouichi Morita, Kouji Matsushima, Shigeo Koyasu, Chieko Kai. Phagocytic cells contribute to the antibody-mediated elimination of pulmonary-infected SARS coronavirus. *Virology* 454-455:157-168. doi: 10.1016/j.virol.2014.02.005. Epub 2014 Mar 4. (2014).
3. Haru Ogiwara, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Asako Takagi-Kamiya, Tsubasa Munakata, Namiko Nomura, Futoshi Shibasaki, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida and Michinori Kohara. Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. *The American Journal of Pathology* 184(1):171-183. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.10.004 (2014).
4. Tomoko Fujiyuki, Misako Yoneda, Fumihiko Yasui, Takeshi Kuraishi, Shosaku Hattori, Hyun-jeong Kwon, Keisuke Munekata, Yuri Kiso, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Chieko Kai. Infection of a Japanese isolate of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) to macaques by aerosol exposure. *PLoS ONE* 2013; 8(12):e83551. doi: 10.1371/journal.pone.0083551 (2013).
5. Akira Sakurai, Katuyoshi Takayama, Namiko Nomura, Tsubasa Munakata, Naoki Yamamoto, Tsuruki Tamura, Jitsuho Yamada, Masako Hashimoto, Kazuhiko Kuwahara, Masatoshi Okamatsu, Yoshihiro Sakoda, Yoshihiko Suda, Yukuharu Kobayashi, Nobuo Sakaguchi, Hiroshi Kida, Michinori Kohara and Futoshi Shibasaki. Broad-Spectrum Detection of H5 Subtype Influenza A Viruses with a New Fluorescent Immunochromatography System. *PLoS ONE* 8(11):e76753, doi: 10.1371/journal.pone.0076753 (2013).
6. 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, doi: 10.1002/jmv.23466 (2013).

[学会発表](計 14件)

## 平成 26 年度

1. Ai Ikejiri, Fumihiko Yasui, Yasushi Itoh, Masahiro Kitabatake, Nobuo Sakaguchi, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Highly pathogenic avian influenza A H5N1 virus causes severe symptoms due to insufficient induction of humoral immune response. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12. 京都国際会館(京都府京都市)
2. 安井文彦、伊藤 靖、池尻 藍、北畠正大、宗方圭祐、迫田義博、喜田 宏、坂口 薫雄、小笠原一誠、小原道法 : H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染に対する哺乳動物宿主の免疫応答とインフルエンザ組換え生ワクチン接種による発症防御 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 2014.12.6-7 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
3. 齋藤 誠、安井文彦、棟方 翼、飛田良美、小澤 真、小原恭子、伊東利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田規一、小原道法 : 亜型を超えた感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 安井文彦、宗方圭祐、倉石 武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田 宏、甲斐智恵子、小原道法 : H5N1 高病原性鳥インフルエンザ組換えワクチニアワクチン単回接種による免疫長期持続作用機序の解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10-12. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Yasushi Itoh, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Prophylactic effect of H5N1 influenza vaccine based on vaccinia virus vector in cynomolgus monkeys. 8<sup>th</sup> Vaccine & ISV Congress 2014.10.26-28 Philadelphia (USA)
6. Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Yasushi Itoh, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Prophylactic effect of H5N1 influenza vaccine based on attenuated replicative vaccinia virus that contains endogenous adjuvant component. KeystoneSymposia (The Modes of Action of Vaccine Adjuvants (S1)) 2014.10.8-13 Seattle

(USA)

7. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kurashi, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Shosaku Hattori, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Chieko Kai.: Attenuated recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen is protective against HPAIV challenge in cynomolgus monkeys. XVIth International Congress of Virology 2014.7.27-8.1 Montreal (Canada)
- 8 武、安井文彦、宗片圭祐、池田房子、基礎友里、権賢 貞、石井美穂、佐藤宏樹、服部正策、喜田 宏、小原道法、甲斐知恵：霊長類感染モデルを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原発現組換え麻疹ウイルスの防御効果の解析 第 61 回日本実験動物学会 2014.5.15-5.17(北海道札幌)

### 平成 25 年度

9. 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法：ワクチニアウイルス Dis 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症防御効果 第 17 回日本ワクチン学会 2013.11.30-12.1 三重県総合文化センター (三重県津市)
10. 安井文彦、宗片圭祐、倉石 武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田 宏、甲斐知恵子、小原道法：カニクイザルの H5N1 高病原性トリインフルエンザ組換えワクチニアワクチンの単回接種による長期防御効果の検討 第 17 回日本ワクチン学会 2013.11.30-12.1 三重県三重市 三重県総合文化センター (三重県津市)
11. 安井文彦、桑原一彦、飛田良美、棟方 翼、齋藤 誠、七戸新太郎、迫田義博、喜田 宏、阪口薫雄、小原道法：GANP トランスジェニックマウスを用いた H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス HA に対する汎クレード高親和性中和単クローン抗体の開発 第 61 回日本ウイルス学会 2013.11. 10 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
12. 藤幸知子、米田美佐子、堀江 亮、倉石武、池田総子、石井美穂、小見美央、安井文彦、宗片圭祐、佐藤宏樹、服部正策、喜田 宏、小原道法、甲斐知恵子：高病原性鳥インフルエンザ抗原タンパク質発現組換え麻疹ウイルスのサル感染モデルにおける防御効果の検討 第 61 回日本ウイルス学会 2013.11. 10 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
13. Makoto Saito, Makoto Ozawa, Fumihiko Yasui, Toru Sasaki, Tsubasa Munakata, Yoshimi Tobita, Risa Ito, Keisuke Munekata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Akira Sakurai, Futoshi Shibasaki, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Patrick C Reid, Kiichi Kubota, Hiroaki Suga, Michinori Kohara: Influenza viral

hemagglutinin-targeted macrocyclic peptides as an antiviral agent. 7<sup>th</sup> Vaccine & ISV Congress 2013.10.27-29 Barcelona (Spain)

14. Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kurashi, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Yasushi Itoh, Kazumasa Ogasawara, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Michinori Kohara: Protection of cynomolgus monkeys from H5N1 HPAI virus challenge by recombinant influenza vaccine based on vaccinia virus vector. Options for the Control of Influenza VIII 2013.9.5-10. Cape Town (South Africa)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/infectious.html>

### 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・特任研究員  
研究者番号：10250218

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

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

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

齋藤 誠 (SAITO, Makoto)

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：20433021

宗片 圭祐 (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

菅 裕明 (SUGA, Hiroaki)

東京大学大学院理学系研究科・教授  
研究者番号：00361668