

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04739

研究課題名(和文) 宿主細胞を殺傷せずにウイルス蛋白質を選択的に認識し排除する免疫機構の解明

研究課題名(英文) iHA-100 exhibited a high efficacy whether administered during the early phase or late phase of H5N1 infection

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：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以上の阻害活性を見出した。異なるタイミングで特殊環状ペプチド iHA-100を培養上清に添加する実験を行ったところ、ウイルス吸着前および直後の添加により完全にウイルス感染を阻止することが判明した。さらに細胞内侵入後、エンドソーム膜と融合を開始する感染吸着後90分に添加した場合においても強い抑制効果がみられた。これらの結果は、iHAは細胞膜を通過し、エンドソーム内に存在するウイルス粒子上のHAに結合し脱殻前の過程を強力に抑制する新たな仕組みが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代の抗体医薬として、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。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iHA100を創成し、マウスにおいてリレンザでは治療効果を示さない感染4日後および6日後からの投与においても治療効果を示した。さらに霊長類感染モデルとしてカニクイザルに高病原性H5N1インフルエンザ感染時の発症防御効果を検討したところ良好な結果が得られ、iHA100は新規インフルエンザ治療薬の可能性が示された。これらHAウイルス蛋白質の選択的な認識・排除機構を解明し、さらなる治療薬の最適化や治療法の確立につなげる。

研究成果の概要(英文)：Most anti-influenza drugs currently used, such as oseltamivir and zanamivir, inhibit the enzymatic activity of neuraminidase (NA). NA inhibitor-resistant viruses, however, have already been isolated among seasonal H1N1, pandemic (H1N1) 2009, and even highly pathogenic avian H5N1 viruses. These resistant viruses can only be controlled by a new antiviral with a mechanism of action that is totally different from NA inhibition. The recent development of the Random non-standard Peptides Integrated Discovery (RaPID) system enables the identification of high-affinity ligands for a protein of interest from easily prepared libraries consisting of over a trillion macrocyclic peptides. Here we report bi-functional, tropic macrocycles that bind the influenza viral envelope protein hemagglutinin and inhibit virus infection by blocking adsorption and fusion. They showed powerful efficacy in preventing severe pneumonia at later stages of infection in mouse and non-primate cynomolgus macaque models.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ウイルス 感染症 微生物 免疫学

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。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、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が、抗体は高分子であり、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。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、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。菅教授および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 蛋白に特異的に結合する特殊環状ペプチドを取得した。

この特殊環状ペプチドは現在治療に用いられているリレンザと同等の増殖阻害活性を示した。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。マウスを用いた治療実験において感染 6 日後に投与しても、比較対象の GANP-Tg マウスより取得した超高親和性抗 HA 抗体と同様な治療効果を示し、リレンザと異なり感染後期においても劇症肺炎治療効果があることが示された。HA は細胞表面の受容体分子との結合やその後のウイルス膜と細胞膜との融合を担う分子であることから、環状ペプチド及び抗体が中和活性(宿主細胞内への侵入阻害)を示すこと、また HA はウイルス生活環の最終段階で細胞膜上に現れ、粒子の放出にも関わることから、NA 阻害剤と同様の粒子放出を阻害している可能性も考えられた。

2. 研究の目的

次世代の抗ウイルス薬は宿主には影響せず、ウイルスに特化した効果が求められる。このうち、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。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以上の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出した。マウスを用いた治療実験において、リレンザと異なり感染後期においても劇症肺炎抑制による治療効果があることが示された。感染後期においても治療効果を示す低分子の環状ペプチドによる劇症肺炎抑制治療効果は感染細胞内ウイルス抗原分解によるものであり、宿主細胞を殺傷せずに免疫活性化に伴いウイルス蛋白質を選択的に認識し排除する事を見出した。これらウイルス蛋白質の選択的な認識・排除機構を解明し、さらなる治療薬の最適化や治療法の確立につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

特殊環状ペプチドはノイラミニダーゼ阻害薬を超えた治療効果が期待でき、ノイラミニダーゼ阻害薬と異なり感染後期においても劇症肺炎抑制治療効果があることが示された。特殊環状ペプチド投与により感染細胞内の HA 抗原が分解排除されており、免疫担当細胞からの攻撃を免れ劇症肺炎発症抑制効果を示すものと考えられる。この増殖発症阻害活性の作用機序を明らかにし、さらなる治療薬の最適化や新規治療法の確立につなげる。

- (1) HA 結合性特殊環状ペプチドの細胞質内移行・ウイルス複製阻害機序の解析
- (2) HA 結合性特殊環状ペプチドの HA 蛋白質分解機序の解析
- (3) HA 結合性特殊環状ペプチドによる自然免疫活性化機序の解析
- (4) 増殖阻害中和活性を示す特殊環状ペプチド治療効果最適化の検討

4. 研究成果

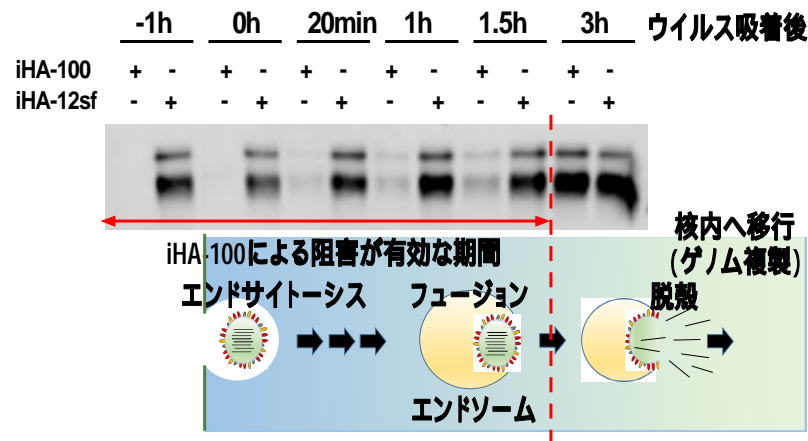
次世代の抗ウイルス薬は宿主には影響せず、ウイルスに特化した効果が求められる。H5N1 インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対して結合する特殊環状ペプチドを創成し、治療に用いられているリレンザと同等以上の阻害活性を見出した。H5N1 HPAIV HA 蛋白質に対して結合する特殊環状ペプチドのうちで、治療に用いられている Zanamivir (リレンザ) と同等以上の阻害活性を示す iHA-100 を見出した。特殊環状ペプチド iHA-100 がインフルエンザウイルス増殖を抑制するメ

カニズムを明らかにするためウイルス感染環のどこの段階を阻害しているかについて詳細な解析を行った。異なるタイミングで iHA-100 を培養上清に添加する実験を行ったところ、ウイルス吸着前および直後の添加により完全にウイルス感染を阻止することが判明した。さらに細胞内侵入後、エンドソーム膜と融合を開始する感染吸着後 90 分に添加した場合においても強い抑制効果がみられた。これらの結果は、iHA は細胞膜を通過し、エンドソーム内に存在するウイルス粒子上の HA に結合し脱殻前の過程を強力に抑制することを示す。以上より、iHA-100 の作用機序として、細胞外に存在するウイルス粒子の感染性を中和するだけでなく、細胞内においても HA と相

相互作用し侵入過程の複数の段階をブロックする新たな仕組みが明らかとなった。

iHA-100 は、マウスにおいてリレンザでは治療効果を示さない感染 4 日後および 6 日後からの投与においても治療効果を示した。さらに霊長類

感染モデルとしてカニクイザルに高病原性 H5N1 インフルエンザ感染時の発症防御効果を検討したところ良好な結果が得られ、iHA100 は新規インフルエンザ治療薬の可能性が示された。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件) 全て査読有り

1. Takahiro Sanada, Fumihiko Yasui, Tomoko Honda, Mohammad Enamul Hoque Kayesh, Jun-ichiro Takano, Yumiko Shiogama, Yasuhiro Yasutomi, Kyoko Tsukiyama-Kohara, and Michinori Kohara. Avian H5N1 influenza virus infection causes severe pneumonia in the Northern tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Virology* 2019;529:101-110. doi: 10.1016/j.virol.2019.01.015
2. Yusuke Sato, Hideki Matsui, Naoki Yamamoto, Risa Sato, Tsubasa Munakata, Michinori Kohara, Hideyoshi Harashima. Highly specific delivery of siRNA to hepatocytes circumvents endothelial cell-mediated lipid nanoparticle-associated toxicity leading to the safe and efficacious treatment of chronic hepatitis B infections. *Journal of Controlled Release* 2017 3;266:216-225. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.044.
3. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kuraishi, Fumihiko Yasui, Hyun-jeong Kwon, Keisuke Munekata, Fusako Ikeda, Miho Hoshi, Yuri Kiso, Mio Omi, Hiroki Sato, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Michinori Kohara, Chieko Kai. Efficacy of recombinant measles virus expressing highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) antigen against HPAIV infection in monkeys. *Scientific Reports* 2017 20;7(1):12017. doi: 10.1038/s41598-017-08326-x.
4. Kayesh Mohammad, Ezzikouri Sayeh, Takahiro Sanada, Haiying Chi, Yukiko Hayashi, Khadija Rebbani, Bouchra Kitab, Aya Matuu, Noriaki Miyoshi, Tsunekazu Hishima, Michinori Kohara*, and Kyoko Tsukiyama-Kohara*. Oxidative Stress and Immune Responses During Hepatitis C Virus Infection in *Tupaia belangeri*. *Scientific Reports* 2017 29;7(1):9848. doi: 10.1038/s41598-017-10329-7.
5. Kayesh MEH, Kitab B, Sanada T, Hayasaka D, Morita K, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Susceptibility and initial immune response of *Tupaia belangeri* cells to dengue virus infection. *Infect Genet Evol.* 2017 6;51:203-210. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.003.
6. Yuko Tokunaga, Yosuke Osawa, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Kenzaburo Yamaji, Daisuke Yamane, Mitsuko Hara, Keisuke Munekata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Tsunekazu Hishima, Soichi Kojima, Kiminori Kimura, and Michinori Kohara. Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Scientific Reports* 2017 23;7(1):325. doi:10.1038/s41598-017-00282-w.

7. Fumihiko Yasui, Yasushi Itoh, Ai Ikejiri, Masahiro Kitabatake, Nobuo Sakaguchi, Keisuke Munekata, Shintaro Shichinohe, Yukiko Hayashi, Hirohito Ishigaki, Misako Nakayama, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara. Sensitization with vaccinia virus harboring hemagglutinin recovers the immune potential against highly pathogenic H5N1 influenza virus in non-human primates. *Scientific Reports* 2016 28;6:37915. doi: 10.1038/srep37915.
8. Takahiro Ohtsuki, Kiminori Kimura, Yuko Tokunaga, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, and Michinori Kohara. M2 macrophages play critical roles in progression of inflammatory liver disease in hepatitis C virus transgenic mice. *J. Virology* 2015 14;90(1):300-7. doi: 10.1128/JVI.02293-15.
9. Chise Tateno, Yosuke Kawase, Yoshimi Tobita, Satoko Hamamura, Hiroki Ohshita, Hiroshi Yokomichi, Harumi Sanada, Masakazu Kakuni, Akira Shiota, Yuha Kojima, Yuji Ishida, Hiroshi Shitara, Naoko A. Wada, Hiromi Tateishi, Masayuki Sudoh, Shin-Ichiro Nagatsuka, Kou-ichi Jishage, *Michinori Kohara. Generation of Novel Chimeric Mice with 1 Humanized Livers Using Hemizygote cDNA-uPA/SCID mice: Tool for Developing New Drugs. *PLoS One*. 2015 4;10(11):e0142145.
10. Sayeh Ezzikouri, Kiminori Kimura, Hajime Sunagozaka, Shuichi Kaneko, Kazuaki Inoue, Tomohiro Nishimura, Tsunekazu Hishima, *Michinori Kohara, and *Kyoko Tsukiyama-Kohara. Serum DHCR24 auto-antibody as a new biomarker for progression of hepatitis C. *EBioMedicine* 2015 13;2(6):604-12.
11. Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, *Kyoko Tsukiyama-Kohara. 3β -Hydroxysterol Δ 24-reductase on the Surface of Hepatitis C Virus-related Hepatocellular Carcinoma Cells can be a Target for Molecular Targeting Therapy. *PLoS ONE* 2015 13;10(4):e0124197.
12. Yutaka Amako, Tsubasa Munakata, Michinori Kohara, Aleem Siddiqui, Chris Peers and, *Mark Harris. Hepatitis C virus attenuates mitochondrial lipid β -oxidation by down-regulating mitochondrial trifunctional protein expression. *J. Virology* 2015 15;89(8):4092-101.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 山地賢三郎, 安井文彦, 伊藤靖, 鈴木紗織, 本田智子, 山本直樹, 真田崇弘, 石垣宏仁, 石井孝司, 小笠原一誠, 小原道法. カニクイザルでの H7N9 鳥インフルエンザ HA タンパク質発現組換えワクシニアワクチンの発症防御効果の検討. 第 22 回日本ワクチン学会学術集会 2018
2. 梶原 直樹, 山本 直樹, 小原 道法, 安井 文彦, 迫田 義博, 喜田 博, 芝崎 太
H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアン酸非依存的な細胞侵入経路の解析
第 41 回日本分子生物学会年会 2018
3. Makoto Saito, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Oxidative stress and pathogenesis of chronic hepatitis C. HCV2018 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2018
4. Yuko Tokunaga, Kiminori Kimura, Kenzaburo Yamaji, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Michinori Kohara. Intermittent administration of selective Wnt/ β -catenin/CBP signaling inhibitor ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis. HCV2018 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2018
5. Mohammad Enamul Hoque Kayesh, Sayeh Ezzikouri, Takahiro Sanada, Haiying Chi, Yukiko Hayashi, Khadija Rebbani, Bouchra Kitab, Aya Matsuu, Noriaki Miyoshi, Tsunekazu Hishima, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Oxidative Stress and Immune Responses During Hepatitis C Virus Infection in *Tupaia belangeri*. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018
6. Tomoko Honda*, keisuke Munekata, Fumihiko Yasui, Kenzaburo Yamaji, Nobuo Sakaguchi, and Michinori Kohara. Essential Role for Serial Immune responses in Protection against Influenza H5N1 in Mice by an Attenuated Vaccinia Virus Vector Expressing Influenza Virus H5 HA. 12th Vaccine Congress 2018
7. F.Yasui*, K.Munekata, T.Fujiyuki, T.Karaisi, T.Honda, Y.Sakoda, M.Yoneda, H.Kida, C.Kai, M.kohara. Evaluation of vaccine potential of recombinant vaccinia virus encoding H5 subtype hemagglutinin against H5N1 influenza virus. 12th Vaccine Congress 2018
8. Yumiko Shiogama, Takahiro Ohtsuki, Yuko Tokunaga, Kenzaburo Yamaji, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Yasuhiro Yasutomi, and Michinori Kohara*. Effective Therapeutic Vaccine for Hepatitis C virus

- Infection by Heterologous antigen Immuno-therapy 12th Vaccine Congress 2018
9. Sayeh Ezzikouri, Kiminori Kimura, Shuichi Kaneko, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. DHCR24 auto-antibody as a new biomarker for progression of hepatitis C. International Union of Microbiological Societies 2017
 10. Bouchra Kitab, Masaaki Satoh, Masayuki Sudoh, Michinori Kohara and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus replication requires ribonucleotide reductase M2 to stabilize NS5B protein, an RNA-dependent RNA polymerase. International Union of Microbiological Societies 2017
 11. Shiogama M., Yasutomi Y., Ohtsuki T., Tokunaga Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Cross-reactive antigen Rime/Boost Immuno-therapy of Hepatitis C Virus Infection. 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2017
 12. Yasui F., Munekata K., Honda T., Itoh Y., Sakoda Y., Kida H., Sakaguchi N., Ogasawara K., Kohara M. : Elucidation of mechanism undergoing elimination of HPAI H5N1 virus in mice vaccinated with recombinant H5 vaccine based on vaccinia virus vector. 2017 International Society for Vaccines (ISV) Annual Congress 2017
 13. Yumiko Shiogama¹, Takahiro Ohtsuki², Yuko Tokunaga², Yoshimi Tobita², Kyoko Tsukiyama-Kohara³, Yasuhiro Yasutomi¹, and Michinori Kohara. Effective Therapeutic Vaccine for Hepatitis C virus Infection by Heterologous antigen Prime/Boost Immuno-therapy. 2017 International Society for Vaccines (ISV) Annual Congress 2017
 14. Munekata K., Yasui F., Itoh Y., Ishii K., Sakoda Y., Kida H., Ogasawara K., Kohara M.: Prevention effect of H5N1 HPAI and H1N1 pdm2009 influenza vaccine based on highly attenuated vaccinia virus vector in cynomolgus monkeys. 10th Vaccine Congress 2016
 15. Sayeh Ezzikouri., Kimura K., Kaneko S., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. : Serum DHCR24 auro-antibody as a new biomarker for prognosis of hepatitis C. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016)
 16. 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法 : ワクチンアウイルス DIs 株を母体としたインフルエンザ HA 組換えワクチンのカニクイザルでの八章防御効果の検討 第 20 回日本ワクチン学会学術集会 2016
 17. 齊藤 誠、安井文彦、棟方 翼、飛田良美、小澤 真、小原恭子、伊藤利紗、菅 裕明、窪田規一、小原道法 : インフルエンザウイルス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 39 回日本分子生物学会 2016
 18. 大槻貴博、徳永優子、小原道法 : C 型肝炎ウイルスに対する治療ワクチンの作製と作用機序の解明 第 39 回日本分子生物学会 2016
 19. Ai Ikejiri, Fumihiko Yasui, Nobuo Sakaguchi, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara : Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) causes severe symptoms due to insufficient induction of humoral immune responses. 4th European Congress of Immunology 2015
 20. Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara : DHCR24 on the surface of HCV-related hepatocellular carcinoma cells can be a target for molecular targeting therapy. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015
 21. 池尻 藍、安井文彦、伊藤 靖、宗方圭祐、阪口薫雄、迫田義博、喜田 宏、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液性免疫低応答機序とインフルエンザ組換え生ワクチン接種による応答性の回復 第 19 回ワクチン学会 2015

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当なし

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：齊藤 誠

ローマ字氏名：SAITO Makoto

所属研究機関名：公益財団法人 東京都医学総合研究所

部局名：ゲノム医科学研究部門

職名：研究員

研究者番号(8桁): 20433021

研究分担者氏名：宗片 優子

ローマ字氏名：MUNAKATA Yuko

所属研究機関名：公益財団法人 東京都医学総合研究所

部局名：ゲノム医科学研究部門

職名：研究員

研究者番号(8桁): 80555011

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：棟方 翼

ローマ字氏名：MUNAKTA Tsubasa

研究協力者氏名：今井 由美子

ローマ字氏名：IMAI Yumiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。