

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04002

研究課題名(和文) ラメラボディ様構造を誘導し感染防御に働く次世代抗インフルエンザ薬の創出

研究課題名(英文) Development of therapeutic agents against influenza that induce the formation of lamella body to inhibit the viral propagation.

研究代表者

西川 喜代孝 (Nishikawa, Kiyotaka)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40218128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、A型インフルエンザウイルス(IAV)のヘマグルチニン(HA)に結合し、顕著な抗ウイルス能を発揮する4価型HA阻害ペプチド、PVF-tetを同定している。PVF-tetは細胞内で新生されたHAに結合し、ラメラボディ様構造体形成を誘導し、そこにHAを隔離することで機能する。本研究では、このラメラボディ様構造体が、オートファジー経路の活性化により形成されるオートファゴソームの一形態、誘導性アンフィソームであることを見出した。さらにこの誘導性アンフィソーム形成時には細胞の脂質代謝がダイナミックに変動することを見出した。本知見は、脂質代謝制御によるIAV制御という新たな概念を提唱している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果において、脂質代謝を制御することでIAV増殖を制御できる可能性が示された。今後本脂質代謝に関わる一連の脂質合成酵素、脂質分子種修飾酵素、脂質輸送分子等の寄与を分子レベルで解明することにより、新たな創薬標的の同定へと発展することが期待できる。その場合治療標的は細胞由来分子となることから、従来型のウイルス分子を標的とする薬剤に比べ薬剤耐性の問題を回避できる可能性が高い。また、誘導性アンフィソーム形成が抗ウイルス作用発現の指標となることが示されたことから、高病原性ウイルスのHAを標的とした新規治療薬開発が簡便に推進できるようになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have already identified a novel tetravalent peptide, PVF-tet, which binds to hemagglutinin (HA) of type A influenza viruses (IAVs) and efficiently inhibits the virus propagation. PVF-tet was found to bind to newly synthesized HA, rather than to the HA of the parental virus and then induce the formation of lamella body-like structure to accumulate the HA in it. In this study, we found that this structure is the inducible amphisome, whose formation is induced by the activation of the autophagic pathway. Importantly, a dynamic change of the cellular phospholipid metabolism was found to be involved in its formation. Our findings are providing a new strategy to regulate the IAV infection by regulating the cellular phospholipid metabolism.

研究分野：生化学

キーワード：インフルエンザ ペプチド アンフィソーム オートファジー 脂質代謝 高病原性インフルエンザウイルス スクリーニング ヘマグルチニン

1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスは、強力な感染能を有し、毎年我が国をはじめ世界各地で季節的流行を引き起こす。その一方で、2009年にみられたような新型インフルエンザウイルスの出現や、H5N1、H7N7などの高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染能の獲得が危惧されており、公衆衛生上大きな脅威となっている。しかしながら、現在多用されているタミフルなどのノイラミニダーゼ(NA)阻害薬に対しては急速に耐性が広がりつつあり、新規インフルエンザ治療薬の確立が緊急に求められている。

近年、ウイルスの宿主細胞への結合を担うヘマグルチニン(HA)が新たな創薬標的分子として注目されている。HAはウイルス膜上で3量体構造をとっており、HA1分子が宿主細胞膜上に存在する糖タンパク質のシアル酸1個を認識して結合する。従って、HA3量体では合計3分子のシアル酸が結合しうる。このとき、1:1の結合に比べ3:3の結合では、結合親和性は数千倍に増加することが知られており、この現象はクラスター効果とよばれている。このため、従来の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングや、ファージディスプレイスクリーニング等の技術では基本的に1:1の相互作用にしか適用できないため、クラスター効果を発揮して機能するHAに対し、その受容体結合部位を標的として阻害剤を同定することは原理的に極めて困難である。

我々はこれまでに、クラスター効果に基づく強い相互作用を阻害する分子を同定する技術、多価型ペプチドライブラリー法を開発しており、H1N1/PR8株由来のHAの受容体結合領域を標的として、4価型HA阻害ペプチド、PVF-tetを同定した。PVF-tetはMDCK細胞において強力な抗ウイルス活性を示し、さらにマウス感染実験でも顕著な治療効果を示すことを見出した。

PVF-tetの作用機構をMDCK細胞を用いて検討したところ、1)ウイルス感染後9時間後にPVF-tetを投与した場合でも、強い抗ウイルス活性を保持していること、2)PVF-tetの細胞内局在性は新生HAと完全に一致しており、両者は細胞質に形成される小胞様の構造体に存在すること、3)電子顕微鏡による解析から、本構造体は内部に極めて密な層構造を有し、肺胞II型上皮細胞で観察されるラメラボディ(LB)と類似したユニークな構造体をとっていること、が明らかとなった。すなわち、PVF-tetは新生HAと結合後、本構造体形成を顕著に誘導し、そこにHAを隔離することにより、ウイルス産生を効率よく抑制すると考えられた。その一方で、本構造体はPVF-tet非存在下でもウイルス感染時にはごくわずかに観察されることから、その形成は細胞が潜在的に保有する新規感染防御機構である、と考えられた。このことから、本構造体の性状解析ならびにその形成の分子機構の解明は、新たな創薬につながる分子基盤を提供すると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、PVF-tetによる本構造体形成の分子機構を解明し、一連の創薬標的を同定するとともに新規治療薬を創出すること、さらに本現象を応用し、通常施設では取り扱えない高病原性インフルエンザウイルス治療薬開発のスクリーニング系を確立し、独自性の高い候補化合物を取得すること、を目的とする。

3. 研究の方法

1) PVF-tet処理により誘導されるLB様構造体(induced LB; iLB)の性状ならびに機能解析:各種オルガネラ・エンドソーム・オートファゴソームならびにLB、各々に特異的なマーカーとiLBとの共有性を、共焦点顕微鏡ならびに細胞分画法により検討し、その詳細な性状解析を行なう。その情報に基づき、iLBの形成に影響を与えられる化合物群を用い、ウイルス産生に及ぼす影響を検討することにより、iLB形成誘導がウイルス感染防御に必須であることを証明する。

2) iLB形成機構の解明:ウイルス感染後にPVF-tetによって発現誘導されるmRNAを網羅的に解析すること、ならびにiLBを特異的に分画し、質量分析装置によるプロテオミクス解析を行なうこと、によりiLB形成誘導に必須の責任分子を同定する。同定した候補分子のノックダウン、阻害剤の使用により、形成機構を分子レベルで解明する。

3) iLB形成促進による新規感染制御法の確立:同定したiLB形成機構の増強を指標として、PVF-tetのさらなる機能成熟、ならびに促進分子のスクリーニングを行い、iLB形成誘導能に優れた新たな感染制御法を確立する。

4) 高病原性H5N1治療薬への発展:PVF-tetは強毒性のH5N1由来HA5にも結合活性を示す予備的結果を得ていることから、HA5についてウイルスに依らないiLB形成誘導系を確立し、その誘導能を指標に、PVF-tetの機能モチーフをHA5に最適化させることにより、病原性ウイルスに対しても新規治療薬を開発する。

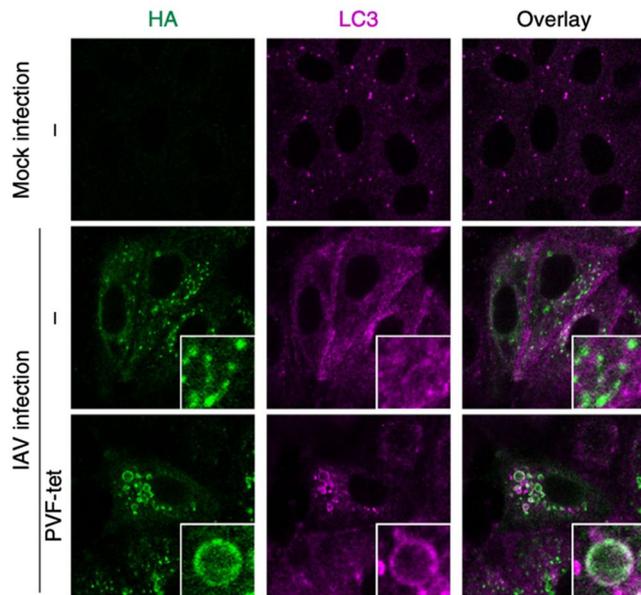
4. 研究成果

1) iLB の性状ならびに機能解析

PVF-tet 処理により形成誘導される iLB の性状を解析するため、各種オルガネラ・エンドソーム・オートファゴソームならびに LB、各々に特異的なマーカーと iLB との共局在性を、共焦点顕微鏡ならびに細胞分画法により検討した。その結果、ゴルジ体のマーカーである p230、ER のマーカーである Calnexin、初期エンドソームマーカーである EEA1、は iLB とは共局在しないこと、一方で、リソゾームマーカーである LAMP-1 と部分的に、さらに酸性コンパートメントマーカーである lysotracker とは極めて高く共局在することを見出した。また、コレステロールを検出する filipin、ならびに ceramide を検出する Body-P-ceramide はいずれも iLB に濃縮されていることを見出した。すなわち、iLB はコレステロール、ceramide 等の脂質成分に富み、かつ酸性を示す構造体であることを明らかにした。さらに興味深いことに、オートファゴソームマーカーである LC3 が iLB に存在すること、すなわち iLB 形成に必要な膜成分はオートファゴソームから供給されている可能性を示唆することができた(右図)。

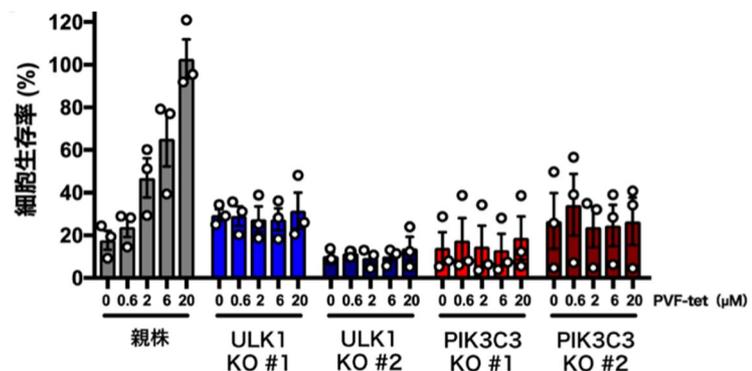
以上に示す iLB の構造体としての性状解析の結果に基づき、その形成に影響を与えると考えられる化合物の効果を検討した。オートファゴソーム形成に必須の役割を果たしている classIII PI3K の阻害剤、3-メチルアデニン(3MA)の効果を検討した。その結果、3MA 処理によって iLB の形成が顕著の阻害されること、すなわち iLB 形成にはオートファゴソームの形成が必須であることを見出した。

PVF-tet 処理により、IAV 感染時に誘導される液胞状オルガネラ、iLB の実体をさらに詳細に明らかにするために、蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡による同一箇所を観察を可能にする CLEM による検討をおこなった。本手法を用い、蛍光標識された iLB そのものの内部構造を電子顕微鏡で詳細に観察することに成功した。その結果、蛍光によって明確に同定できる iLB 内には、ラメラ状膜ならびに高電子密度構造体や小胞が多数含まれていること、これらの性状はむしろアンフィソームと一致すること、を見出した。アンフィソームはエンドソームとオートファゴソームの融合により形成され、その後オートリソソームへと成熟する一過性のオルガネラである。



2) iLB の形成機構の解析

オートファゴソーム形成に必須の分子である ULK1 ならびに PIK3C3 をそれぞれノックアウトした MDCK 細胞を樹立し、iLB の形成、ならびに PVF-tet の抗 IAV 活性に及ぼす影響を検討した。その結果、これらのノックアウト細胞では PVF-tet による iLB の形成が阻害されていること、さらにこの時 PVF-tet による抗 IAV 活性も

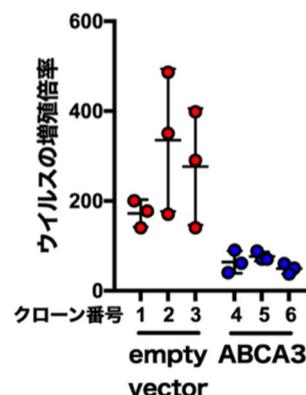
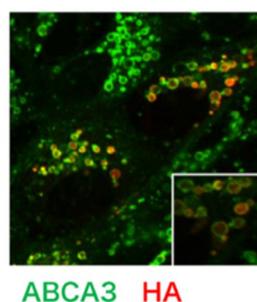


観察されなくなること、を見出した(上図)。以上の結果から、PVF-tet によって形成誘導される iLB の実体はアンフィソームであり、その形成誘導が抗 IAV 活性の発現に直接関与していること、を見出した。その一方で、iLB の形成は PVF-tet により特異的に誘導されること、また内部に蓄積されている HA の分解は誘導されないこと、等から誘導性アンフ

ィソームと呼ばれるべき新規オルガネラであるということが出来る（以後誘導性アンフィソームと呼称）。

3) PVF-tet のマウス感染モデルでの効果： PVF-tet が他の A 型インフルエンザウイルスに対しても効果を示すか否かを、A/California/04/09 (H1N1pdm)、A/Tokyo/UTHP013/2016 (H1N1pdm)、A/Aichi/2/68(H3N2)（東京大学医科学研究所河岡義裕先生より供与）の 3 株を用いて検討した。その結果いずれの場合にもマウスに対する致死性を効率よく阻害することを見出した。さらにこれらウイルス株に対する PVF-tet の阻害効果、構造体形成誘導能の有無について MDCK 細胞を用いた検討を行ったところ、いずれの現象についても H1N1-PR8 の場合と同様に観察できること、すなわち PVF-tet は共通したメカニズムで複数の亜型ウイルスに対しても抗ウイルス活性を示す汎用性の高い治療薬として期待できることが示された。

4) iLB 形成における ABCA3 の効果： LB 形成には ABC トランスポーターの 1 種である、ABCA3 が必須の役割を果たしていることが知られている。そこで、ABCA3 高発現細胞株を MDCK 細胞より樹立し、ウイルス感染に対する防御能を検討した。その結果、ABCA3 高発現細胞株では、強い防御能を示すことを見出した。さらに、ABCA3 高発現でも PVF-tet 処理の場合と同様に、抗ウイルス活性を示すアンフィソームが形成されていることを見出した（右図）。



5) ABCA3 高発現誘導性アンフィソームの生化学的解析：

ABCA3 高発現細胞株より調製したアンフィソームを単離する系の確立を試みた。密度勾配遠心法による分離、さらにフローサイトメトリー(FCM)による濃縮を試み、他のオルガネラと効率よく分離できる条件を決定した。さらに、FCM を用い、ABCA3 発現量を指標に分画し、最終的に他のオルガネラをほとんど含まない純度で分画することができた。本画分を用いて、質量分析機による含有リン脂質を分析した。その結果、感染により PC 画分では dipalmitoyl-PC (16:0-16:0; 32:0)、palmitoyl-stearoyl-PC (16:0-18:0; 34:0)の di 飽和型 PC が増加すること、PS 画分では LB には全く存在しない dipalmitoyl-PS (32:0; DPPS)が全 PS の 50%を占めるまで著増すること、を見出した。本知見は、IAV 感染時に細胞が防御的に働く際に、特定のオルガネラでダイナミックな脂質代謝変動が起こっていることを初めて示すものである。

6) PVF-tet 誘導性アンフィソームの生化学的解析：

PVF-tet 処理によって誘導されるアンフィソームについても、上記と同様の検討を行った。mVenusHA 高発現 MDCK 細胞を用い、IAV 感染後 PVF-tet 処理により産生誘導されるアンフィソームを単離する系を確立した。本系では、mVenus とオートファゴソームマーカーである LC3 との double positive 小胞を FCM によって単離することができた。

7) 高病原性 H5N1 由来 HA (H5HA) に対する阻害ペプチドの同定

PVF-tet の配列をベースとし、ヒト型受容体であるアルファ 2-6 結合のシアル酸 (SA) を認識できるように変異導入した強毒性 HA5 変異体 (mH5HA) に最適化した阻害ペプチドを取得することを目的とし、多価型ペプチドシートスクリーニング技術を用いたスクリーニングを行った。その結果、PVF-tet の配列中に mH5HA への結合活性に必須の役割を果たしているアミノ酸を複数同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 近江純平、西川喜代孝	4. 巻 93
2. 論文標題 誘導性アンフィソームはインフルエンザウイルス感染防御に働く	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 234-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omi J., Watanabe-Takahashi M., Igai K., Shimizu E., Ching-Yi Tseng, Miyasaka, T., Waku T., Hama S., Nakanishi R., Goto Y., Nishino Y., Miyazawa A., Natori Y., Yamashita M., Nishikawa K.	4. 巻 11(1):162
2. 論文標題 The Inducible Amphisome Isolates Viral Hemagglutinin and Defends Against Influenza A Virus Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13974-w	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jumpei Omi, Miho Watanabe-Takahashi, Kuniyuki Kano, Junken Aoki, Kiyotaka Nishikawa
2. 発表標題 The inducible amphisome enriched with lamellar membranes functions to defend against influenza A virus infection
3. 学会等名 60th International Conference of the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近江 純平, 高橋 美帆, 山下 誠, 西川 喜代孝
2. 発表標題 インフルエンザウイルスの感染を制御する新規液胞状オルガネラの性状解明
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤佑基、近江純平、長岡峻平、高橋美帆、西川 喜代孝
2. 発表標題 ヘマグルチニンを標的とした高病原性H5N1亞型インフルエンザウイルスに対する新規阻害ペプチドの開発
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱 信一郎、近江 純平、中村 友美、西村 浩輝、高橋 美帆、西川 喜代孝
2. 発表標題 新規CaMK2阻害ペプチドによるA型インフルエンザウイルス感染制御法の確立
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近江 純平、高橋 美帆、猪飼 桂、Ching-Yi Tseng、名取 泰博、山下 誠、西川 喜代孝
2. 発表標題 新規ペプチド性抗インフルエンザ薬は新生ヘマグルチニンを誘導性ラメラボディへと隔離する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Omi J., Watanabe-Takahashi M., Igai K., Tseng C.Y., Natori Y., Yamashita M., Nishikawa K.
2. 発表標題 Regulation of influenza A virus infection by a novel tetravalent peptide which binds to and inactivates viral hemagglutinin
3. 学会等名 The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nishikawa, K.
2. 発表標題 Strategic development of peptide-based therapeutic agents against bacterial and viral infections.
3. 学会等名 The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗インフルエンザウイルス活性ペプチドおよびインフルエンザウイルス感染症の予防・治療薬	発明者 西川喜代孝、高橋美帆、近江純平、濱信一郎	権利者 学校法人同志社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-163326	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ヘマグルチニン結合ペプチド、および、これを含むインフルエンザウイルス感染症の予防・治療薬	発明者 西川喜代孝、高橋美帆、近江純平、山下誠、本郷桂、名取泰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/30158	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------