様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　１８　日現在

機関番号：　８２６０９
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ１５１４６

研究課題名（和文）インフルエンザウイルスHAを標的とした特殊環状ペプチドの発症阻害機序の解明

研究課題名（英文）Macrocycles to target influenza viral hemagglutinin as bifunctional potent broad-spectrum 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）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルス粒子表面に多数存在するヘマグルチニン(HA)を標的とした特殊環状ペプチド(inhibitor of HA: iHA)の開発を進め、H1N1、H5N1の増殖を阻害する特殊環状ペプチドiHA-100を取得している。H5N1の動物感染モデルを用いてiHA-100の治療効果を検討し、発症後の投与においても有意な治療効果を確認した。iHA-100投与カニクイザルの肺では炎症性サイトカイン(IFN-ganma, IL-6)およびケモカインの量が有意に減少しており、iHA-100投与により炎症が抑制されていることが示された。iHA-100の病態抑制機序について解析を進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：HA-targeted antibodies have the potential to neutralize HA-mediated virion-cell binding. 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 system. After five rounds of selection, we found an appreciable increase in the cDNA recovery rate and sequencing of 69 molecular clones from the selected cDNAs revealed a total of 28 candidates for inhibitor HA (iHA). In order to investigate the influence of iHA-100 on the pathology of H5N1 infection, a comprehensive analysis of cytokines was performed. Inflammatory cytokines (IFN-ganma, IL-6) in the lung of iHA-100-treated monkeys were significantly reduced. These results suggest that H5N1-induced inflammation and pathogenesis was suppressed by administration of iHA-100. iHA-100 is a promising antiviral agent that exhibited the inhibitory effect of both virus replication and pathogenesis in vivo.

研究分野：　感染免疫学

キーワード：　特殊環状ペプチド　治療　インフルエンザ

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。

２．研究の目的

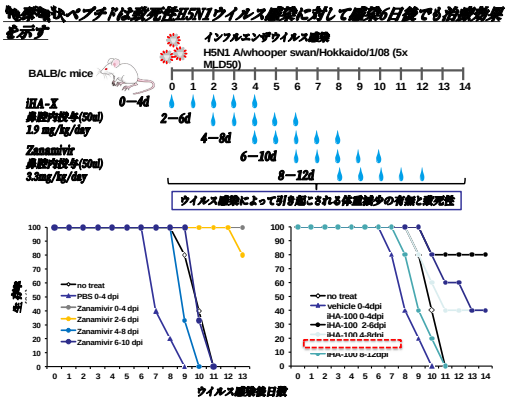
第3世代の抗体医薬として特殊環状ペプチドが注目されている。H5N1 インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対して結合する特殊環状ペプチドを創成し、治療に用いられているリレンザと同等の阻害活性を見出した。さらに、リレンザ耐性の H1N1 パンデミック 2009 に対しても強力な阻害活性を示すことを見いだした。マウスを用いた治療実験において、リレンザと異なり感染後期においても劇症肺炎抑制による治療効果があることが示された。特殊環状ペプチド投与により感染細胞内のＨＡ抗原が分解排除されており、免疫担当細胞からの攻撃を免れ劇症肺炎発症抑制効果を示すものと考えられる。この増殖発症阻害活性の作用機序を明らかにし、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。

３．研究の方法

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。

４．研究成果

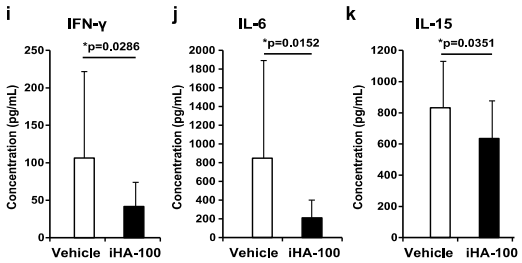
H5N1 インフルエンザウイルス HA 蛋白質に対して結合する 12-15 アミノ酸からなる特殊環状ペプチドを作成し、治療に用いられているリレンザと同等の良好な阻害活性を有するものを見出した。さらに、この特殊環状ペプチドがリレンザ耐性の H1N1 パンデミック 2009 に対しても強力な阻害活性を示すことを見出した。これは、インフルエンザウイルスの新たな抗ウイルス剤として強力な治療ペプチドの可能性を示している。マウスを用いた治療実験において図に示すように感染 6 日後に投与しても治療効果を示し、リレンザと異なり感染後期においても劇症肺炎抑制治療効果があることが示された。



H5N1 の霊長類感染モデル（カニクイザル）を用いて iHA-100 の治療効果を検討し、発症後の投与においても有意な治療効果を確認した。この iHA-100 の治療効果に関与する機序の解析を行った。

iHA-100 投与カニクイザルの肺では炎症性サイトカイン(IFN-γ, IL-6)およびケモカイン(MIP-1α, MCP-1)の量が有意に減少しており、iHA-100 投与により炎症が抑制されている

ことが示唆された。



加えて、IL-15 についても iHA-100 投与群で顕著な減少がみられた。IL-15 依存性 CD8 T 細胞がインフルエンザウイルス感染における急性肺病態の病原性に関与するという報告もあり、上述の IL-15 の減少についても iHA-100 の病態抑制機序に関与している可能性がある。我々はさらに、iHA-100 投与マウスの脾臓細胞において①IFN-γ陽性の CD4+T, CD8+T 細胞が増加する②抗原提示細胞（樹状細胞、マクロファージ）の MHC classII, CD86 発現が上昇するという知見を得ている。これらの事から、iHA-100 投与により免疫担当細胞（マクロファージ、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞など）に対して影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後は、iHA-100 の病態抑制機序について、免疫学的な解析を進めていく。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）全て査読有り

1. 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 2017 Sep 20;7(1):12017. doi: 10.1038/s41598-017-08326-x.

2. 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 Nov 28;6:37915. doi: 10.1038/srep37915.

3. Naoki Yamamoto, Yusuke Sato, Tsubasa Munakata, Masakazu Kakuni, Chise Tateno, Takahiro Sanada, Yuichi Hirata, Shuko Murakami, Yasuhito Tanaka, Kazuaki Chayama, Hiroto Hatakeyama, Mamoru Hyodo, Hideyoshi Harashima and Michinori Kohara. Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection. ***J. Hepatrology*** 2016; 64:547-555. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.014.

4. Takahiro Sanada, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Naoki Yamamoto, Sayeh Ezzikouri, Soumaya Benjelloun, Shuko Murakami, Yasuhito Tanaka, Chise Tateno, and Michinori Kohara. Property of hepatitis B virus replication in *Tupaia belangeri* hepatocytes. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 2015 Nov 30. pii: S0006-291X(15)30990-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.121.

5. 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 Oct 14;90(1):300-7. doi: 10.1128/JVI.02293-15.

6. Kenji Sugata, Jun-ichirou Yasunaga, Yuichi Mitobe, Michi Miura, Paola Miyazato, Michinori Kohara and *Masao Matsuoka. Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. ***Blood*** 2015 Aug 27;126(9):1095-105. doi: 10.1182/blood-2015-04-641118.

7. 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 Apr 13;2(6):604-12. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.007.

8. Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, *Kyoko Tsukiyama-Kohara. 3β-Hydroxysterol

Δ24-reductase on the Surface of Hepatitis C Virus-related Hepatocellular Carcinoma Cells can be a Target for Molecular Targeting Therapy. ***PLoS ONE*** 2015 Apr 13;10(4):e0124197. doi: 10.1371/journal.pone.0124197. eCollection 2015.

〔学会発表〕（計 14 件）

1. 梶原直樹、野村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、山本直樹、小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、芝崎太：H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのシアル酸非依存的な細胞侵入経路の解析 第 40 回日本分子生物学会 2017
2. 安井文彦、宗片圭佑、本田智子、伊藤靖、迫田義博、喜田宏、阪口薫雄、小笠原一誠、小原道法：弱毒化ワクシニアウイルス DIs 株を母体とした組換え H5 亜型 HA インフルエンザワクチンによる発症防御機序の解析 第 21 回日本ワクチン学会 2017
3. Yumiko Shiogama, Takahiro Ohtsuki, Yuko Tokunaga, Yoshimi Tobita, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Yasuhiro Yasutomi,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
4. 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
5. 梶原直樹、野村奈美子、宇梶麻紗子、貞任大地、小原道法、芝崎 太：高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 のシアル酸非依存的感染機構 第 39 回日本分子生物学会 2016
6. 斉藤 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
7. Sanada T., Hirata Y., Naito Y., Yamamoto N., Kikkawa Y., Ishida Y., Yamasaki C., Tateno C., Ochiya T., Kohara M. : Transmission of HBV-DNA mediated by extracellular vesicles. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016
8. 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：ワクチニアウイルス Dls 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
9. 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
10. Tomoko Fujiyuki, Ryo Horie, Misako Yoneda, Takeshi Kuraishi, Fumihiko Yasui, Hyun-jeong Kwon, Fusako Ikeda, Keisuke Munekata, Miho Ishii, 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 antigen in non-human primate model. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015
11. 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 interaction of dendritic cells with T cells. 第 44 回日本免疫学会 2015
12. 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
13. 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
14. 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

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔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