

令和元年6月17日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19878

研究課題名(和文)シアル酸とGALを発現するリポソームの吸入による汎用インフルエンザ治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy method for the treatment of influenza using liposomes expressing sialic acids and alpha-galactose epitopes

研究代表者

小川 晴子(OGAWA, HARUKO)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：10400079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂質を主成分とする微細粒子であるリポソームを用いて、インフルエンザに対する新たな吸入治療法を開発することを目的とする。治療に用いるリポソームには、人のインフルエンザウイルス感染において免疫応答が速やかに誘導されるように、2種類の糖鎖抗原を発現させてある。モデル動物であるマウスを用いた感染実験において、本吸入治療の効果と安全性を確認した。リポソームに発現する糖鎖抗原の調整などによりさらに効果の高い治療法の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

季節性インフルエンザは、健康人で重篤となることは稀だが、免疫機能が低い幼児や高齢者では重症化しやすいハイリスク群である。本研究は、インフルエンザに対して自分で実施可能な新たな治療法を開発を目指しており、ハイリスク群の重症化防止に貢献できる可能性がある。また、急速に進む少子高齢化社会において、医療を必要とする重症患者の数を減らすことにつながり、医療費高騰による国の財政圧迫を軽減できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a novel inhalation therapy for influenza by using liposomes that are small particles composed mainly of lipids. The liposomes used for the therapy express two types of carbohydrate antigens so that immune response against influenza virus can be initiated quickly in humans after the influenza virus infection. Using the mice as the model animals, effectiveness of the liposome inhalation treatment to influenza virus infection was confirmed. Further study is ongoing to increase the efficacy of therapy.

研究分野：ウイルス学、免疫学、伝染病学

キーワード：インフルエンザウイルス リポソーム シアル酸 -ガラクトース 自然抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2009年にメキシコで豚由来の新たなA型インフルエンザウイルス (H1N1亜型) が生まれ、21世紀最初のインフルエンザパンデミックを引き起こした。A型インフルエンザウイルスは極めて種類が多く、鳥類および多種類の哺乳動物に感染して進化を続けている。その中で、人から人へ伝播する新たなウイルスが生まれると、またたく間に世界中へひろまりパンデミックを引き起こす。歴史上、数十年に一度ほどの頻度で、新たなA型インフルエンザウイルスがパンデミックを引き起こしてきた。パンデミック発生後は、感染耐過した人が免疫を獲得するため、パンデミックはやがて終息する。しかし、原因ウイルスは、新たな季節性インフルエンザウイルスとして、寒冷期を中心に人から人への伝播を繰り返して地球上に存続する。A型インフルエンザウイルスは、その自然宿主が野鳥であること、家禽・家畜を含む多くの動物種に感染するウイルスが存在すること、遺伝子に変異や組換えが起きやすいことなどから、地球上から消滅することはないと考えられる。特にここ約25年間に大きく懸念されたのは、人に感染して重篤な病気を起こす鳥インフルエンザウイルスが次々と出現したことである。2003年以降、H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスがアジアを中心に世界的に広がり、家禽ばかりでなく人にも致死的な病気を引き起こし続けた。2013年からは、中国においてH7N9亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスによる人の致死例が次々と報告された。過去に例を見ない速度で人の健康を脅かすインフルエンザウイルスが生まれている印象をもつ。その背景の一つとして、新興国における急激な経済発展に伴う畜産振興が考えられている。家畜衛生や防疫の管理が不十分なままに家禽・家畜が増産される結果、様々なウイルス感染が容易に繰り返されている可能性がある。インフルエンザウイルスについても同様の背景があるものと考えられ、当面は注意深く見守りつつ可能な限りの備えをしていく必要がある。

一方、季節性インフルエンザは、健康人では重篤となることは稀だが、免疫機能が低い幼児や高齢者では重症化しやすく、ハイリスク群と呼ばれる。今後の超高齢化社会の到来に向けて、これまで以上にハイリスク群をインフルエンザから守る対策が求められる。近年、効果の高い抗インフルエンザ薬が次々と開発されて医療に貢献しているが、パンデミックのような緊急時には薬剤の需要が供給に追いつかない可能性がある。実際のところ、2009年のパンデミック発生時には、抗ウイルス剤やワクチンの供給が間に合わず、その調達をめぐって各国間のせめぎあいまで起きた。ワクチン予防は感染症の制御において極めて有効な手段であるが、未知のウイルスに対するワクチンは準備することはできない。すなわち、既存のワクチンが無効の新たなインフルエンザウイルスが出現した場合には、拡大する大流行に新たなワクチン製造は間に合わない可能性が高い。以上のような背景のもと、インフルエンザに対する新たな治療法の開発は極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、インフルエンザの症状を軽減するために個人レベルで安全に実施可能な新たな治療法の開発を目的とする。すなわち、有効性・安全性・汎用性・持続性を併せ持つ新たなインフルエンザの治療法開発である。本治療法では、リン脂質の微小なカプセル粒子であるリポソームを含む溶液を吸入する。リポソームは、脂質で構成されており、毒性や抗原性が低いことから、吸入製剤や薬物輸送システムとしてすでに医療の場で活用されている。本研究には、「シアル酸 (SA)」と「 α -ガラクトース (GAL)」という2種類の糖を発現したリポソームを用いる。SAはインフルエンザウイルスの受容体、GALは全ての人が大量の抗体 (抗GAL抗体) を保有する糖鎖抗原の末端構造である。そのため、SAとGALを発現するリポソームを吸入して、インフ

ルエンザウイルスが侵入した呼吸器組織に存在させると、以下のように反応が進行すると考えられる。

- 1) ウイルスがリポソームのSAに結合して中和される結果、組織中のウイルス量をある程度減らすことができる。
- 2) 組織液中の抗GAL抗体がリポソームのGALに速やかに結合する。
- 3) 結果的に「ウイルス - リポソーム - 抗GAL抗体」の免疫複合体が形成される。
- 4) 形成された免疫複合体は、免疫系のオプソニン効果より、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に効率よく取り込まれ、ウイルス抗原としてT細胞へ抗原提示される。
- 5) ウイルス抗原に対する獲得免疫が速やかに始動する結果、ウイルスが生体内から速率的に排除される。

本研究では、マウスのインフルエンザウイルス感染実験モデルを用いて本治療法の効果を確認し、上記仮説を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究に用いるリポソーム溶液の作製には、人の赤血球から調整したSAリポソームおよびウサギの赤血球から調整したGALリポソームを用い、これらを混合することによりSAとGALの両者を発現するSA/GALリポソームを調整した。作製の過程で、有機溶媒の処理を行うことから、作製されたリポソームは無菌状態となり、安定的に冷蔵・冷凍保存が可能である。リポソーム溶液を超音波処理することにより、粒子の大きさを調整することも可能である。実験には、SAとGALを異なる比率で発現するリポソームおよび粒子の大きさの異なるリポソームを準備して用いた。本実験に使用する実験動物としては、人と同様に抗GAL抗体を保有することが求められる。インフルエンザ研究に一般的に用いられる小型実験動物（マウス、モルモット、フェレットなど）は、いずれも自らの細胞にGALが発現しており、そのため抗GAL抗体を保有しないため、本研究に用いることはできない。本研究では、目的に合致した唯一の小型実験動物である、GALを生成する酵素の遺伝子を欠如させたノックアウトマウス（GAL-KOマウス）を用いた。

抗GAL抗体を保有するGAL-KOマウスに、H1N1亜型インフルエンザウイルス（PR株ウイルス）を接種する感染実験を行い、SA/GALリポソームの吸入治療の安全性と効果を検証した。各実験項目について以下にまとめる。

- 1) *in vitro*におけるリポソームの評価：作製したSA/GALリポソームについて、インフルエンザウイルスおよび抗GAL抗体の結合性を評価した。超音波処理で様々な大きさに調整したリポソームを準備し、さらにSAリポソームとGALリポソームを様々な比率で混合したSA/GALリポソームを作製して検討した。インフルエンザウイルスと抗GAL抗体の両者の結合を効率的に実現するためのSAリポソームとGALリポソームの比率、リポソームの大きさ、濃度などを決定した。
- 2) マウスにおけるリポソーム投与の安全性の確認：治療目的で投与するリポソームの安全性を確認するために、抗GAL抗体を保有するGT-KOマウスにSA/GALリポソームを繰り返し吸入させ、症状観察を行った。対照とする無処置群および生理食塩水吸入群との十分な比較検証を行った。
- 3) マウス感染実験による治療効果の検証：上述の実験で決定された最適条件のSA/GALリポソームを用い、GT-KOマウスを用いたインフルエンザウイルス感染実験において、簡易吸入装置を用いた吸入治療の効果を検証した。ウイルス感染後の症状および体重変化を観察した。経日的に安楽殺したマウスから肺を摘出し、肺中のウイルス量を培養細胞およびリアルタ

イムPCRにより定量した。

4. 研究成果

*in vitro*における評価により、作製した SA/GAL リポソームに目的通りに PR8 株ウイルスと抗 GAL 抗体の両者が結合することを ELISA および Western blotting で確認した。SA リポソームと GAL リポソームの比率を変えた SA/GAL リポソームを用いることにより、ウイルスと抗体の結合の変化について検証した。

GT-K0 マウスに、簡易吸入器を用いて SA/GAL リポソーム溶液を鼻から吸入させる処置を繰り返し行ったが、健康状態に変化は全く観察されなかった。さらに、安楽殺個体の各種臓器に肉眼的な異常が認められないことを確認した。

GT-K0 マウスの感染実験における治療効果の評価において、SA/GAL リポソーム投与群とリポソーム非投与群（対照群）における病態の進行について検証した。まず、致死量のウイルスを接種する条件下で、SA と GAL の発現比率がそれぞれ 1:10 [SA/GAL(1:10)リポソーム] および 1:1 [SA/GAL(1:1)リポソーム]の 2 種類の SA/GAL リポソームの治療効果について比較した。その結果、対照群の致死率が 80%に達した一方、SA/GAL(1:10)リポソームおよび SA/GAL (1:1)リポソームを投与した群の致死率はそれぞれ 20%および 40%であり、リポソーム吸入治療による致死率の低下が観察された。当初、SA/GAL (1:1)リポソームによる治療効果が高いことを想定していたが、GAL の発現量が多いリポソームでより高い治療効果が認められる傾向にあった。この原因を明らかにすることは、本治療効果の機序を確認することにつながるため、詳細な解析を進めている。加えて、接種ウイルス量を減らした実験系を組み、1) SA/GAL リポソーム投与群、2) SA リポソーム投与群、3) GAL リポソーム投与群、以上 3 群における治療効果の差について検証を進めている。これらの実験により、SA/GAL リポソーム吸入治療の抗インフルエンザ効果とその機序を十分に検証し、さらに大型の実験動物を用いた研究への展開を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：武田洋平

ローマ字氏名：(TAKEDA, Yohei)

研究協力者氏名：Uri Galili

ローマ字氏名：(GALILI, Uri)

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。