

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15171

研究課題名（和文）インフルエンザウイルスの宿主適応機構に着目した新規抗ウイルス薬リード化合物の探索

研究課題名（英文）Investigation for novel antiviral lead compounds focusing on the host adaptation mechanism of influenza virus

研究代表者

荒井 泰葉 (Arai, Yasuha)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・研究員

研究者番号：80793182

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、鳥インフルエンザウイルスが感染患者内で獲得するヒト適応変異を網羅的に探索することで、新規のヒト適応変異を同定してきた。本研究は当該変異導入ウイルスをヒト適応化モデルウイルスとして用いて、ウイルス複製に必須の宿主因子を同定することを目的とした。ポリメラーゼ三量体に結合する宿主因子を効率的に共沈させる免疫沈降法を確立し、変異体に特異的に結合する宿主因子をLC-MS/MSにより複数選出した。当該因子がウイルス複製に与える影響について評価したが、ウイルス複製に影響を与える因子は同定に至っておらず、候補因子の選択をより広範に行い、さらに複数のノックダウン細胞の作出を試みている状況である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス複製に重要な宿主因子を同定し、さらに宿主因子・ウイルス蛋白質の結合を阻害するリード化合物探索へ研究を展開する。既存の抗インフルエンザ薬は、特定のウイルス蛋白質の働きを抑えるが、ウイルス遺伝子の変異によって薬剤耐性ウイルスが出現する問題点がある。今後同定されるリード化合物は、ウイルス蛋白質に作用せずその複製を阻害するため、既存の抗ウイルス薬の弱点を克服できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have identified novel adaptive mutations in humans by comprehensively searching for adaptive mutations acquired by avian influenza virus in infected patients. The purpose of this study was to identify host factors essential for viral replication using the mutant viruses as human adaptation model viruses.

We established an immunoprecipitation method that efficiently coprecipitates host factors that bind to polymerase complex, and selected multiple host factors that specifically bind to mutants by LC-MS / MS. We evaluated the effect of this factor on viral replication, but the factors that affect viral replication have not been identified. We are trying to select candidate factors more widely and create multiple knockdown cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 宿主因子 ヒト適応性 ウイルス複製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在流行する全ての季節性インフルエンザウイルスは、鳥インフルエンザウイルスを起源としている。本来、インフルエンザウイルスは水禽類を自然宿主とするが、繰り返される感染伝播の過程において宿主域の障壁突破となる変異を獲得してヒト体内で複製しやすいウイルスに変化した (Neumann G et al, *Virology*, 2015; Cauldwell et al, *J. Gen. Virol*, 2014)。現在アジア・中東地域で流行する H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (以下 H5N1 ウイルス) は、散発的にヒトに感染して致死率が 60% となる重篤な呼吸器疾患を引き起こすことから公衆衛生上の懸案事項である (WHO; <http://www.who.int/>)。申請者はこれまで、アジア・中東地域で蔓延する H5N1 ウイルスが感染患者内で獲得したウイルス複製を司るポリメラーゼ領域におけるヒト適応変異をマシゲノム解析によって網羅的に探索し、当該地域における鳥インフルエンザウイルスがヒトでより複製しやすいウイルスへ進化していることを明らかにしてきた (Arai Y et al, *PLoS Pathog*, 2016)。ウイルスは自身のみでは増殖不能であり、宿主因子群と結合することで宿主細胞機構を巧みに利用して複製する。鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化においても、ヒト宿主因子の効率的利用が必須となる。H5N1 ウイルスがヒトで複製しやすいウイルスへと進化していることを見出した申請者の知見は、H5N1 ウイルスがヒト宿主因子と相互作用しやすく変化することで、ヒトへの宿主域を拡大していることを示唆する。

現在広く使用されている抗インフルエンザ薬としてオセルタミビルとザナミビルがある。これらの薬はウイルス表面蛋白質であるノイラミダーゼ (NA) 活性を阻害することで、感染細胞からのウイルス放出を抑制して抗ウイルス作用を発揮する。しかしながら、当該薬にはウイルス遺伝子変異によって薬剤耐性ウイルス出現する弱点がある。また、ウイルス複製そのものを抑制しないため、高病原性鳥インフルエンザウイルスや新型インフルエンザウイルス感染時のように、ウイルスに対する免疫が不十分でありウイルス増殖性が高い場合において有効性が低いと報告されている。このような状況にあって、ウイルス蛋白質に作用することなく、ウイルス複製を阻害する新規抗インフルエンザ薬の開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が同定したヒト適応変異群を導入した組換えウイルスをヒト適応化モデルウイルスとして解析ツールとして用いることで、インフルエンザウイルスの効率的なヒト細胞内複製に必須の新規宿主因子を同定すると共に、ウイルス蛋白質-宿主因子間の相互作用を阻害することで、ウイルス複製を阻害する抗ウイルス薬の新規リード化合物を選定することを目的とした。

3. 研究の方法

LC-MS/MS による宿主因子の選出

申請者が確立したポリメラーゼ三量体に結合する宿主因子を効率的に共沈させる免疫沈降法を用いて、wt ウイルスポリメラーゼと比較して変異体ポリメラーゼ三量体に特異的に検出されるバンドを選出する。さらに、これらのバンドに対して LC-MS/MS による質量解析を実施することで、ヒト細胞内においてモデルウイルスポリメラーゼ蛋白質が特異的に結合するヒト宿主因子群を選出する。

ウイルス複製に必須の宿主因子同定

siRNA 及び CRISPR/Cas9 システムによって、質量解析により選出した候補宿主因子群をノックダウンまたはノックアウトさせたヒト由来細胞を作製し、当該細胞におけるウイルス増殖性を解析する

ことで、インフルエンザウイルス複製に重要なヒト細胞因子群を同定する。また、同定宿主因子の部分欠損体を作成することで、ウイルスポリメラーゼ蛋白質 宿主因子間の相互作用ドメインを決定する。

in silico スクリーニングによる抗ウイルス薬リード化合物候補の選出

相互作用ドメインに対する *in silico* docking study によって、既存の化合物ライブラリーの中から標的ドメインと結合することで宿主因子 ウイルスポリメラーゼ間の相互作用を特異的に抑制すると予想される低分子化合物を網羅的に探索する。

in vitro スクリーニングによる候補リード化合物の同定

培養細胞を用いた *in vitro* スクリーニングによって、各リード化合物がウイルス複製に与える影響を評価する。ウイルスをヒト細胞に感染させ、ウイルス複製を70%以上阻害する化合物をプラークアッセイにより同定する。

4 . 研究成果

LC-MS/MS による解析により選出したヒト細胞内においてモデルウイルスポリメラーゼ蛋白質が特異的に結合していると推定されるヒト宿主因子群をノックアウトした細胞株を複数作出し、当該因子がウイルス複製に与える影響について評価した。現在までに、ウイルス複製に大きな影響を与える宿主因子は同定できておらず、候補因子の選択をより広範に行い、さらに複数のノックダウン細胞の作出を試みている状況である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Ono T, Takagi T, Nakaya T, Matsumoto K, Watanabe Y.	4. 巻 15(7)
2. 論文標題 PB2 mutations arising during H9N2 influenza evolution in the Middle East confer enhanced replication and growth in mammals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007919	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 該当する
1. 著者名 Watanabe Y, Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Kajikawa J, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Ono T, Takagi T, Takahashi K, Shioda T, Matsumoto K, Suzuki Y, Nakaya T	4. 巻 92(11)
2. 論文標題 Characterization of H5N1 Influenza Virus Quasispecies with Adaptive Hemagglutinin Mutations from Single-Virus Infections of Human Airway Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e02004-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02004-17	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Arai Y, Kawashita N, Hotta K, Hoang PVM, Nguyen HLK, Nguyen TC, Vuong CD, Le TT, Le MTQ, Soda K, Ibrahim MS, Daidoji T, Takagi T, Shioda T, Nakaya T, Ito T, Hasebe F, Watanabe Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Multiple polymerase gene mutations for human adaptation occurring in Asian H5N1 influenza virus clinical isolates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31397-3	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 該当する
1. 著者名 Arai Y, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Ono T, Suzuki Y, Nakaya T, Matsumoto K, Watanabe Y.	4. 巻 93(4)
2. 論文標題 Genetic Compatibility of Reassortants between Avian H5N1 and H9N2 Influenza Viruses with Higher Pathogenicity in Mammals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Virol.	6. 最初と最後の頁 e01969-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01969-18	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yasuha Arai, Emad M. Elgendy, Tomo Daidoji, Madiha S. Ibrahim, Takaaki Nakaya, Yohei Watanabe.
2. 発表標題 Accumulation of PA mutations in Egyptian H5N1 viruses during viral evolution conferred the increased replication ability.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuha Arai*, Madiha Ibrahim, Takaaki Nakaya, Yohei Watanabe.
2. 発表標題 GENETIC COMPATIBILITY AND VIRULENCE OF REASSORTANTS DERIVED FROM H9N2 AND H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUSES CO-CIRCULATING IN EGYPT
3. 学会等名 Negative Strand Virus 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuha Arai*, Madiha S. Ibrahim, Emad M. Elgendy, Tomo Daidoji, Takaaki Nakaya, Yohei Watanabe.
2. 発表標題 Evolutionally dynamics of Egyptian H9N2 avian influenza virus in nature conferred enhanced replication ability in humans.
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomo Daidoji, Junichi Kajikawa, Yohei Watanabe, Yasuha Arai, Takaaki Nakaya.
2. 発表標題 Evaluation of avian influenza virus infection in human tracheal epithelial cell clones
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------