

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460206

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスNS1蛋白の選択的変異誘導による病原性減弱機序の解明

研究課題名(英文) Characterization of the NS1 mutants induced by a chemical substance

研究代表者

林 京子 (HAYASHI, Kyoko)

中部大学・生命健康科学研究所・研究員

研究者番号：60110623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスをスフィドロフラン誘導体(MFPT)存在下で継代培養することによって得られた耐性ウイルスの弱毒化メカニズムを解明する目的で、耐性ウイルスのゲノム解析を行ったところ、非構造蛋白質であるNS1にP164S変異が生じていた。NS1は、宿主細胞由来の種々の蛋白質と相互作用して、ウイルスの増殖効率を高める役割を果たす。この変異によって、vRNPsの核外への移動が抑制されることが事態生ウイルスの弱毒化に寄与していることを突き止めた。

さらに、単純ヘルペスウイルスのマウス体内での増殖に対する本化合物の影響を検討したところ、用量依存的にウイルス産生量を減少させた。

研究成果の概要(英文)：An influenza virus mutant induced by treating the virus with a sphydrofuran derivative (MFPT) was found to possess attenuated pathogenicity when compared with that of non-treated parent virus. Sequence analysis revealed that a mutation, P164S in NS1 protein was detected in the mutant. Nucleoprotein was found to be retained in the nuclei in the mutant virus-infected cells. It can be shown that the mutation might be one of the key residues to control NS1 function, and as a result, might be a favorable mutation in the ns gene for the attenuation of influenza virus.

When the sphydrofuran derivative was intravaginally applied to mice, the virus yields decreased dose-dependently against both herpes simplex virus types 1 and 2.

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 スフィドロフラン誘導体 変異ウイルス 病原性 NS1蛋白 遺伝子解析

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 医療が発展した今日においても、依然として感染症が世界中で大きな問題となっている。その中でもとくにインフルエンザは流行を繰り返しており、2009年に発生したパンデミックはまだ記憶に新しい。現在、日本では数種類の抗インフルエンザウイルス薬が認可されていて、主としてノイラミニダーゼ阻害剤が使用されている。しかし、薬剤耐性ウイルスの出現が大きな問題となっている。インフルエンザ対策のもう一つの大きな柱としてワクチン接種がある。この場合にも、従来の接種方法では感染防御機能を担う分泌型 IgA の誘導はできず、この誘導が可能な弱毒生ワクチンを開発する意義は大きい。

(2) エイズウイルス (ヒト免疫不全ウイルス) への感染は世界的な脅威であり、最近になってその感染リスクが単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染によって高まることが明らかになった。日本で認可されている抗 HSV 薬は数種類あるが、いずれも核酸アナログであり、既に潜伏感染しているウイルスには無効であり、長期連用によって薬剤耐性ウイルスを誘導する。そのため、新規 HSV 治療薬が求められている。

### 2. 研究の目的

(1) 放線菌 *Streptomyces* sp. FV60 から単離されたスフィドロフラン誘導體 (1R, 2R)-1-(5'-methylful-3'-yl)propan-1,2,3-triol (MFPT) が A 型インフルエンザウイルス (IAV) を弱毒化することが予備実験で明らかになった。本研究では、その弱毒化のメカニズムの解明と、弱毒生ワクチン株としての可能性を検討する。

(2) MFPT は、培養細胞を用いた HSV 感染実験において、HSV の増殖阻害効果を示すことが既に明らかになっている。そこで本研究では、動物感染実験によってヘルペス治療効果を評価する。

### 3. 研究の方法

(1) MDCK 細胞に A 型 NWS 株 [A/NWS/33 (H1N1)] を感染後、2 mM MFPT 添加培地で 10 代継代培養し、ウイルスクローンインフルエンザウイルスを得た。この MFPT 耐性ウイルスの *in vitro* における増殖能を調べるために、プラークサイズ及び MDCK 細胞における子孫ウイルス放出量を、未処理の野生型 (WT) ウイルスと比較した。マウス感染モデルを用いて、WT ウイルスと MFPT 耐性ウイルスの病原性について調べた。WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルスを BALB/c マウスに経鼻接種した。感染 3 日後に肺及び気管・気管支洗浄液中のウイルス量を測定した。ダイレクトシーケンシング法を用いて、WT ウイルスと MFPT 耐性ウイルスのゲノムの塩基配列を決定した。NS1 の P164S 変異が

MFPT 耐性ウイルスの増殖能や病原性の低下に寄与していると考えられた。そこで、NS1 の機能に対する P164S 変異がもたらす影響を解析した。

(2) MFPT の *in vitro* における抗 HSV 活性を調べたが、その際に、本研究では、抗 HSV-1 活性が既に確認されている HF 株に加えて、HSV-1 の標準株の 1 つである KOS 株、チミンキナーゼに変異を有するアシクロビル (ACV) 耐性株の A4-3 株及び HSV-2 である UW 268 株を対象ウイルスとした。また、既存の抗ヘルペスウイルス薬である ACV を陽性対照とした。抗 HSV 活性の評価は、Vero 細胞の増殖に対する 50% 細胞増殖阻止濃度 (CC<sub>50</sub>) と、50% ウイルス増殖阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) の比、すなわち選択指数 (selectivity index, CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) を算出して行った。マウスに HSV を感染させる性器ヘルペスモデルを用いて、*in vivo* における MFPT の抗 HSV 活性を検討した。BALB/c マウスに、HSV-1 (KOS 株、A4-3 株または HF 株) または HSV-2 (UW 268 株) を腔内接種し、MFPT または ACV を感染 1 時間前から感染 7 日後まで、1 日 2 回経腔投与した。感染 1, 3, 5 及び 7 日後に腔内洗浄液を採取し、感染 14 日後まで死亡例・死亡日及び発症の程度を表す発症スコアを記録した。

### 4. 研究成果

(1) プラークサイズを比較したところ、耐性ウイルスは、WT ウイルスが形成するプラークよりも明らかに小さいプラークを形成した。プラークの大きさはウイルスの増殖能を表す指標の一つであることから、耐性ウイルスは WT ウイルスよりも増殖能が低下していることが推察された。また、MDCK 細胞に感染させた時の子孫ウイルス放出量を測定したところ、MFPT 耐性ウイルスは WT ウイルスと比べて子孫ウイルスの放出量が減少していた。以上の結果から、MFPT 耐性ウイルスは *in vitro* において増殖能が低下していることが確認された。感染 3 日後に肺及び気管・気管支洗浄液中のウイルス量を調べたところ、耐性ウイルス接種群では WT ウイルス接種群よりもウイルス量が減少していた。耐性ウイルス接種群の体重減少は WT ウイルス接種群よりも抑制された。さらに、WT ウイルス接種群では死亡率が 60% だったのに対し、耐性ウイルス接種群では死亡例が確認されなかった。以上の結果から、MFPT 耐性ウイルスは、マウスに対する病原性が低下していて、弱毒化していることが確認された。そして、この病原性の低下は、宿主細胞における増殖能の低下を反映しているものと推察された。変異部位の検出を試みた結果、インフルエンザウイルスの PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M 遺伝子には、全クローンに共通する変異はみられなかった。これに対して、NS 遺伝子には共通して P164S 変異が見られた。

NS1 の機能に対する P164S 変異がもたらす影響を解析した結果、PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されていることが示唆された。このために感染細胞のアポトーシスの進行を抑制することが確認された。そしてこのアポトーシス進行の抑制が、MFPT 耐性ウイルスと同様に、子孫ウイルス放出量の低下につながったと考えられた。以上の結果から、IAV (NWS 株) を MFPT で処理することで得られた MFPT 耐性ウイルスは、これまでに報告されていない新規の変異である NS1 蛋白の P164S を有し、*in vitro* で増殖能が低下し、マウス感染モデルにおいて病原性が低下していた。また、MFPT 耐性ウイルスをマウスに接種することによって、親株である WT ウイルスに対する中和抗体が産生されたことから、MFPT 耐性ウイルスを弱毒生ワクチンとして利用できる可能性が考えられた。MFPT 耐性ウイルスは宿主細胞においてかなり高い増殖能を示したことから、ワクチン株ウイルスとして大量増殖させる上で支障はないと考えられた。さらに、人工的にインフルエンザウイルスを作製する reverse genetics 技術などを必要とせず、弱毒化ウイルスを容易に、かつ比較的短期間（最短で約 2 週間程度）で作製することができる点は、MFPT 耐性ウイルスの利点と考えられる。また、今回確認された変異 (NS1 の P164S 変異) を増殖能に関与する他の変異と組み合わせることで、弱毒生ワクチンの安全性及び優位性を高めることも可能であると考えられた。MFPT 耐性ウイルスのゲノムを WT ウイルスと比較したところ、クローン毎に複数の変異が認められた。これらの変異の中で、NS1 の P164S 変異のみが全クローンに共通して認められたことから、MFPT 処理による IAV の増殖能の低下はこの変異に依存するものと推察された。この仮説を確かめるために、引き続き NS1 の P164S 変異がどのようなメカニズムで IAV の増殖能の低下をもたらしているのか検討した。NS1 は感染細胞内で大量に発現されて宿主由来の様々なタンパク質と相互作用し、ウイルスの増殖効率を高めるが、その機能の 1 つとして、PI3K と相互作用してこれを活性化し、Akt のリン酸化を経て、PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化する。変異が見られた NS1 の <sup>164</sup>Pro は PI3K との相互作用に重要なアミノ酸残基の 1 つであることが報告されている。これらの情報に基づいて、MFPT 耐性ウイルスを使って、感染細胞内における p-Akt の量を調べたところ、感染細胞内では Akt のリン酸化が WT ウイルス感染時よりも抑制されていた。このことから、耐性ウイルス感染細胞では P164S 変異によって NS1 と PI3K との間の相互作用が減弱したためと推察された。実際、NS1 が PI3K の p85 サブユニットにある i-SH2 ドメインと相互作用する時、<sup>164</sup>Pro はちょうどエッジの部分に位置しており、複合体を形成する上で重要

なアミノ酸残基と考えられるため、このアミノ酸残基が変異することで PI3K との相互作用が減弱する可能性が考えられた。PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化は、細胞の生存や抗ウイルス反応などの様々な細胞の生命現象を制御している。そこで、MFPT 耐性ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの進行の程度と IFN- $\alpha$  の mRNA の発現量を、WT ウイルスと比較した。その結果、耐性ウイルス感染細胞でアポトーシス関連タンパク質 (cCasp-3 及び cPARP-1) の発現量が減少し、MFPT 耐性ウイルス感染細胞で IFN- $\alpha$  の mRNA の発現量が減少していた。これらは、PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制された結果起きたものと考えられた。感染細胞内における IFN- $\alpha$  の mRNA の発現量を評価した際、MFPT 耐性ウイルス感染細胞では、感染 10 時間後と 15 時間後でほとんど差がない、あるいは感染 15 時間後の方が感染 10 時間後より抑制されているという、WT ウイルスとは異なるパターンが観察された。宿主タンパク質の protein kinase R (PKR) と retinoic acid inducible gene 1 (RIG-I) は細胞質中の vRNA を認識して抗ウイルス反応を活性化することから、これらのタンパク質は vRNP 中の vRNA を認識していると推察される。また、IAV 感染細胞において RIG-I は IFN- $\alpha$  の産生を誘導するのに必須のタンパク質であることが報告されている。したがって、MFPT 耐性ウイルス感染細胞において、細胞質に運ばれる vRNPs が減少したことで RIG-I による vRNA の認識が減少し、その結果 IFN- $\alpha$  の mRNA の発現を含めた RIG-I によって誘導される抗ウイルス反応が抑制されたことが、WT ウイルス感染細胞と異なる発現パターンを示したことに寄与していると考えられた。

MFPT 耐性ウイルス感染細胞でアポトーシスの進行が抑制されていることは、アポトーシスの進行によって促進される IAV の vRNPs の核外への移行が cl.1 感染細胞で抑制されていたことから確認された。さらに、IFN- $\alpha$  はオートクリンまたはパラクリン作用によって宿主細胞のアポトーシスを誘導することから、IFN- $\alpha$  の mRNA の発現が減少していたことも、アポトーシス進行の抑制に寄与していると考えられた。感染後期における宿主細胞のアポトーシスの進行は、核内で新たに作られた vRNP が細胞質へ移行するのを補助し、子孫ウイルス量を増加させることが報告されている。また、NEP/NS2 が関わる vRNP の能動的輸送メカニズムが別に存在するものの、アポトーシスによって vRNPs が細胞質へ移行されることは子孫ウイルスの効率よい産生に必要であるとされている。したがって、MFPT 耐性ウイルスの増殖能の低下は、NS1 の P164S 変異によって PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されたことで、感染後期におけるアポト

ーシスの進行が抑制され、そのために核内で新しく作られた vRNPs の核外への移行が減少し、効率よい子孫ウイルスの産生が抑制された結果生じたものであると推察された。

最後に、IAV に対する MFPT の作用機序について確認を行った。MFPT 耐性ウイルスの特性から、MFPT の IAV に対する作用メカニズムは NS1 と PI3K の相互作用の阻害であることが予想されたため、MFPT 存在下で WT ウイルスを感染させて、p-Akt の量を比較した。その結果、MFPT 存在下では p-Akt の量が減少し、さらにアポトーシス関連タンパク質の量が減少していた。したがって、MFPT は NS1 が PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化することを抑制することで抗 IAV 活性を示すことが示唆された。また、この結果から、IAV を MFPT で処理した際に PI3K との相互作用に関わる重要なアミノ酸残基に変異 (NS1 の P164S 変異) が生じたのは、MFPT 存在下で増殖するために、すなわち MFPT が存在する環境に順応するために生じたものと推察された。一般的に、薬剤耐性ウイルスでは変異が生じると、その変異によって増殖能が低下することが知られている。MFPT についても、このことが当てはまり、その結果 MFPT 耐性ウイルスの増殖能や病原性が低下したと考えられた。

(2) ACV は、KOS 株及び HF 株に対する選択指数はそれぞれ 1100, 450 と高かった。しかし、ACV 耐性株である A4-3 株に対する選択指数は 75 であり、抗ウイルス活性は有するものの、他の ACV 感受性 HSV-1 よりも相対的に低かった。また、ACV は、HSV-2 に対しては 1900 という高い選択指数を示した。一方、MFPT は、HSV-1 である KOS 株、A4-3 株及び HF 株に対する選択指数がそれぞれ 410, 340 及び 530 であった。特に A4-3 株については、MFPT の方が ACV よりも高い選択指数を示した。また、HSV-2 の UW 268 株に対する選択指数は 310 であった。MFPT を HSV 感染マウスの性器に投与したところ、KOS 株接種時のウイルス量は濃度依存的に減少し、特に MFPT を 1.0 mg/day で投与した時の感染 1 日後におけるウイルス量は有意に減少していた。ACV 耐性 A4-3 株接種時のウイルス量も MFPT の投与によって濃度依存的に減少した。いずれの群においても感染 7 日後において腔内洗浄液中にウイルスは検出されなかった。HF 株接種時のウイルス量も MFPT の投与によって濃度依存的に減少した。

HSV-2 の UW 268 株を接種した時の腔内洗浄液中のウイルス量を測定したところ、各サンプリングポイントにおいて、MFPT 投与群では濃度依存的にウイルス量が減少し、対照群よりもウイルス量が有意に減少した。

HSV の感染によるマウスの発症の程度を検討したところ、HSV-1 の KOS 株を感染させた時、対照群では感染 4 日後に発症スコ

アが増加し始めた。MFPT 投与群では、観察していた期間において対照群よりも発症スコアが低く、また発症する時期も遅かった。1 mg/day で MFPT を投与した時は、観察期間を通じて無症状であった。ACV 投与群でも、80% (5 匹中 4 匹) のマウスが無症状であった。A4-3 株を感染させた場合は、対照群では感染 5 - 8 日後にわずかな発症スコアの上昇が見られたものの、その他の群では症状が見られなかった。また、HF 株を感染させた場合は、いずれの群においても症状は見られなかった。HSV-2 を接種した場合、対照群では感染 3 日後から発症スコアが上昇し始め、感染 9 日後には全例死亡した。MFPT 投与群では、対照群に比べて発症スコアの上昇はわずかに抑制されたものの、感染 10 日後までに全例死亡した。以上の結果から、MFPT は HF 株 (HSV-1) だけでなく、KOS 株 (HSV-1)、ACV 耐性株である A4-3 株 (HSV-1) 及び UW 268 株 (HSV-2) に対しても、*in vitro* における抗ウイルス活性試験において高い選択指数を示し、さらに感染動物でのヘルペス治療効果を示した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

K. Sasaki, K. Hayashi, Y. Matsuya, K. Sugimoto, J.-B. Lee, F. Kurosaki, T. Hayashi, In vitro and in vivo antiherpetic effects of (1R,2R)-1-(5'-methylful-3'-yl)propane-1,2,3-triol, Journal of Natural Medicines, 70 巻, 2016, 217-224, 査読有  
(DOI:10.1007/s11418-016-0964-6)

K. Sasaki, K. Hayashi, J.-B. Lee, F. Kurosaki, T. Hayashi, Characterization of a novel mutation in NS1 protein of influenza A virus induced by a chemical substance for the attenuation of pathogenicity, PLOS ONE, 10 巻, 2015, 1-14, 査読有  
(DOI:10.1371/journal.pone.0121205)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 京子 (HAYASHI, Kyoko)

中部大学・生命健康科学研究所・研究員  
研究者番号：6 0 1 1 0 6 2 3

### (2) 研究分担者

李 貞範 (LEE, Jung-Bum)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：4 0 3 3 2 6 5 5