

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860096

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染阻害活性を示す特殊環状ペプチドの探索

研究課題名(英文) Exploitation of macrocyclic peptides that show inhibitory effect on influenza virus infection

研究代表者

齊藤 誠 (SAITO, Makoto)

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・主任研究員

研究者番号：20433021

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)：インフルエンザウイルスHAタンパク質をbaitとした特殊環状ペプチドライブラリーのスクリーニングを実施し、H5亜型HAに強い結合性を示す特殊環状ペプチドを4種得た。これらはいずれもH5亜型ウイルスに対し感染阻害活性を示すが、このうちの1種はH5に加え同じGroup1に属するH1, H2亜型ウイルスに対しても感染阻害活性を示した。また、高病原性H5N1ウイルスの致死性感染マウスモデルにおいて、この特殊環状ペプチドはZanamivirよりも高い治療効果を示した。本研究により、インフルエンザウイルスの亜型を超えた感染阻害活性を示し、既存薬とは作用機序が異なるHA結合性特殊環状ペプチドを取得した。

研究成果の概要(英文)：To devise smaller molecules capable of binding to the influenza viral HA and have the potential as an antiviral agent, we used RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) system. After five rounds of selection, we found 4 candidates of macrocyclic peptides. These candidates inhibit H5N1 viruses replication. Intriguingly, one of the candidates was also effective against H1N1 and H2N2 viruses more than zanamivir. These results suggest that the macrocyclic peptide is able to inhibit replication of a wide range of Group 1 influenza viruses via a mechanism of its interaction with HA. Furthermore, we evaluated the in vivo efficacy of the macrocyclic peptide against highly pathogenic H5N1 infection in a murine lethal infection model. The macrocyclic peptide showed higher therapeutic potential compared with zanamivir. Taken together, we could identify a new class of HA-targeted broad-spectrum antiviral candidates for influenza treatment.

研究分野：ウイルス学

キーワード：特殊環状ペプチド インフルエンザウイルス ヘマグルチニン 高病原性H5N1 H1N1 H2N2 感染阻害活性

### 1. 研究開始当初の背景

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 (Oseltamivir, Zanamivir) などであるが、こうした投与実績の多い抗インフルエンザウイルス薬については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、広範の亜型ウイルスや新型ウイルスに対しても有効で、既存の抗ウイルス薬とは作用機序が異なる新たな治療法の確立が急務である。

こうしたことから、我々は次世代の抗体医薬として、特殊環状ペプチドに着目した。特殊環状ペプチドは天然アミノ酸に加え N-メチルアミノ酸、D-アミノ酸等の特殊アミノ酸で構築され構造多様性が豊富であり、従来安定性が低いペプチドを環状化することにより構造的に安定となり生体内において高い安定性 (100-1000 倍) を示す。また、分子量が抗体の 100 分の 1 程度 (分子量 1,200-1,500) であり、抗体では認識が難しい立体構造上の狭い領域にも入り込むことが理論上可能である。

我々のグループでは、既存の医薬とは異なるウイルス分子を標的とする新規な作用機序を持った抗インフルエンザ薬の開発を目指し、インフルエンザウイルス粒子表面に多数存在し感染に重要な役割を果たしているヘマグルチニン (HA) に結合する特殊環状ペプチドを多種類選択することが、インフルエンザウイルスに対する新規の阻害作用を示す薬剤の開発に結び付くと考えた。

### 2. 研究の目的

既存の医薬とは異なるウイルス分子を標的とする新規な作用機序を持った抗インフルエンザ薬の開発を目指し、インフルエンザウイルス HA に結合する特殊環状ペプチドの開発を進める。

### 3. 研究の方法

(1) 特殊環状ペプチドのスクリーニング  
特殊環状ペプチドライブラリーの創出には、Flexizyme 技術及び再構成型の無細胞翻訳系 (Flexible In-vitro Translation system) を用いた。このライブラリーのスクリーニングは、H5N1 (A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005) HA タンパク質をターゲットとしてペプチドリーム社の RAPID ディスプレイシステムにより実施した。

(2) HA 結合性特殊環状ペプチドの抗インフルエンザウイルス活性評価

HA 結合性特殊環状ペプチドの H5N1 感染に対する効果を検討するため、MDCK 細胞に H5N1 (A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007), H1N1 (A/Narita/1/2009), H2N2 (A/Adachi/2/1957) を感染させ、各ペプチド

を含むアガロース培地を重層する (増殖阻害活性) あるいはウイルスを前処理 (ペプチドと混合し、37 °C 1 時間インキュベート) して (中和活性) プラークアッセイを行った。

(3) H5N1 致死性感染マウスモデルにおける特殊環状ペプチドの治療効果の検討

9 週齢の Balb/c マウスに高病原性 H5N1 (A/whooper-swan/Hokkaido/1/2008) を 5x MLD50 (半数致死量の 5 倍量) で経鼻感染させると、感染後 9 日前後で全個体死亡する。この致死性感染マウスモデルにおいて、特殊環状ペプチドあるいは Zanamivir を感染後より 5 回投与 (1 回/1 日、5 日連日、感染後 0-4 日、2-6 日、4-8 日、6-10 日、8-12 日) し、ウイルス感染に伴う体重減少や生存率を経日的に観察した。また、感染後 14 日で剖検し、肺の病理所見を観察 (H&E 染色) するとともに、肺ホモジネートを調製し、肺中ウイルス量をプラークアッセイにより測定した。

(4) HA 結合性特殊環状ペプチドの escape mutant ウイルスの単離

特殊環状ペプチドと H5N1 (A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007) あるいは H1N1 (A/Narita/1/2009)  $10^8$  pfu を混合し、37 °C で 1 時間インキュベートし、96 well plate に播種した MDCK 細胞に感染させ、感染後の培地にも特殊環状ペプチドを添加して培養した。CPE がみられた well よりウイルス液を回収し、再度特殊環状ペプチドと混合し、MDCK 細胞に感染、ペプチド含有培地で培養といった操作を 3~5 回繰り返し、増殖してくるウイルスクローンをそれぞれのウイルスについて 10 クローン取得した。取得したクローンよりゲノム RNA を抽出し、RT-PCR で得られた DNA の塩基配列をダイレクトシーケンズで決定した。

(5) HA 結合性特殊環状ペプチドの感染阻害活性の作用機序の解析

HA による膜融合活性に対する特殊環状ペプチドの影響を検討するため、H5N1 (A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007) あるいは H1N1 (A/Tokyo/2619/2009)  $10^7$  pfu をニワトリ赤血球と混合し、そこに特殊環状ペプチドを添加して赤血球膜融合試験を行った。また、HA 発現ベクターを 293 細胞にトランスフェクションして過剰発現させ、そこに特殊環状ペプチドを処理して多核細胞体形成試験を実施した。

### 4. 研究成果

(1) 特殊環状ペプチドのスクリーニング  
インフルエンザウイルス H5N1 HA タンパク質を bait とした特殊環状ペプチドライブラリー (  $4 \times 10^{13}$  種 ) のスクリーニング ( RAPID display system ) を実施し、H5 亜型の HA に強い結合性を示す特殊環状ペプチドを 4 種 A,

B, C, D) 取得した。

#### (2) HA 結合性特殊環状ペプチドの抗インフルエンザウイルス活性評価

H5 HA に結合性を示す特殊環状ペプチド(A, B, C, D)について、H5N1 感染に対する阻害効果を検討したところ、いずれも増殖阻害活性および中和活性を示した。また、これらのペプチドについて H5 亜型と同じ Group1 に属する H1 亜型、H2 亜型ウイルスの感染に対する阻害活性についても同様に検討したところ、これらのうち 1 種のペプチド(A)は H1N1 および H2N2 に対しても、増殖阻害活性および中和活性を示した。

#### (3) H5N1 致死性感染マウスモデルにおける特殊環状ペプチドの治療効果の検討

高病原性 H5N1 を感染させた Balb/c マウスに、特殊環状ペプチド(A)を投与したところ、用量依存的にウイルス感染に伴う体重減少を抑制し、生存率が上昇した。ペプチド投与群は、Zanamivir 投与群と同様に、ウイルス感染による肺の炎症像はみられず、また未処理群で  $10^6$  pfu/g lung 程度検出される肺中ウイルス量はペプチド投与群では検出限界以下となった。さらに、このペプチド(A)による治療効果は感染後期(感染 4 日後, 6 日後)においてもみられ、Zanamivir よりも顕著に強い効果を示した(Zanamivir では感染 2 日後までは治療効果がみられるが、4 日後以降は効果を示さない)。

#### (4) HA 結合性特殊環状ペプチドの escape mutant ウイルスの単離

ペプチド(A)が HA タンパク質のどの部位に結合しているか推測するために、大量のウイルスプールからペプチド(A)に耐性を示す escape mutant ウイルスを取得し、その HA の配列を解析したところ、HA のうち亜型間で保存性が高い stalk 領域に変異が集中しており、ペプチド(A)は HA の stalk 領域に結合していることが示唆された。

#### (5) HA 結合性特殊環状ペプチドの感染阻害活性の作用機序の解析

ペプチド(A)は、インフルエンザウイルス生活環のうち HA が関与するステップ(宿主細胞への吸着、侵入、ウイルス粒子形成、出芽)に作用すると想定される。そこで、ウイルスの細胞内への侵入に必須のステップであるウイルス膜と細胞膜との融合に対するペプチド(A)の影響を検討した。HA によるウイルス膜と細胞膜との融合はペプチド(A)の用量依存的に阻害されることを明らかにした。この HA による膜融合活性は stalk 領域の fusion peptide が担うものであり、この結果からもペプチド(A)は HA の保存性の高い stalk 領域を標的として結合することで膜融合活性を阻害し、その結果ウイルスの細胞内への侵入を阻害していると考えられる。一方、

宿主細胞への吸着の際に受容体であるシアル酸に結合するのは HA の stalk 領域ではなく globular head 領域であるが、ペプチド(A)は上記(2)のとおり中和活性も示す。このことから、ペプチド(A)が stalk 領域に結合することで HA の立体構造に影響を及ぼし(受容体結合部位が存在する globular head 領域に何らかの変化が起こる?)細胞への吸着が阻害されると推測される。

#### (6)まとめと今後の展望

以上、本研究によりインフルエンザウイルスの亜型を超えた感染阻害活性を示し、既存薬とは作用機序が異なる HA 結合性特殊環状ペプチドを取得した。今後は、取得したペプチド(A)の臨床医療への応用に向けて、霊長類モデルを用いた前臨床試験を進める。また、Group2 のインフルエンザウイルスに対して感染阻害活性を示す特殊環状ペプチドの取得も進めており、これが取得できればペプチド(A)との併用により A 型インフルエンザウイルス全ての亜型の感染に対応することが可能となる。

#### 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 3 件)

— Saito M, Takano T, Nishimura T, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K.  $3\beta$ -hydroxysterol  $\Delta 24$ -reductase on the surface of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma cells can be a target for molecular targeting therapy. PLoS One, 10(4):e0124197. (2015) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0124197

— Katsume A, Tokunaga Y, Hirata Y, Munakata T, Saito M, Hayashi H, Okamoto K, Ohmori Y, Kusanagi I, Fujiwara S, Tsukuda T, Aoki Y, Klumpp K, Tsukiyama-Kohara K, El-Gohary A, Sudoh M, Kohara M. A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. Gastroenterology, 145(4):865-873. (2013) 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2013.06.012

— Salem NE, Saito M, Kasama Y, Ozawa M, Kawabata T, Harada S, Suda H, Asonuma K, El-Gohary A, Tsukiyama-Kohara K. Genomic polymorphisms in  $3\beta$ -hydroxysterol  $\Delta 24$ -reductase promoter sequences. Microbiology and Immunology, 57(3):179-184. (2013) 査読有 doi: 10.1111/1348-0421

〔学会発表〕(計6件)

- 齊藤 誠、安井 文彦、棟方 翼、飛田 良美、小澤 真、小原 恭子、伊東 利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田 規一、小原 道法、亜型を超えた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62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
  
- 安井 文彦、桑原 一彦、飛田 良美、棟方 翼、齊藤 誠、七戸 新太郎、迫田 義博、喜田 宏、阪口 薫雄、小原 道法、GANPトランスジェニックマウスを用いたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス HAに対する汎クレード高親和性中和単クローン抗体の開発、第61回日本ウイルス学会、2013年11月、神戸国際会議場、(兵庫県、神戸市)
  
- 徳永 優子、棟方 翼、齊藤 誠、勝目 朝夫、須藤 正幸、小原 道法、肝臓選択的セリンパルミトイル基転移酵素阻害剤による抗HCV作用、第61回日本ウイルス学会、2013年11月、神戸国際会議場、(兵庫県、神戸市)
  
- Saito M, Ozawa M, Yasui F, Sasaki T, Munakata T, Tobita Y, Ito R, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Sakurai A, Shibasaki F, Sakoda Y, Kida H, Reid PC, Kubota K, Suga H, Kohara M. Influenza viral hemagglutinin-targeted macrocyclic peptides as an antiviral agent. 7th Vaccine and ISV Congress、2013年10月、Sitges, Spain
  
- Tokunaga Y, Katsume A, Hirata Y, Munakata T, Saito M, Hayashi H, Okamoto K, Ohmori Y, Kusanagi I, Fujiwara S, Tsukuda T, Aoki Y, Klumpp K, Tsukiyama-Kohara K, El-Gohary A, Sudoh M, Kohara M. A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses、2013年10月、Melbourne、Australia
  
- Saito M, Ozawa M, Yasui F, Sasaki Munakata T, Tobita Y, Ito R, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Sakurai A, Shibasaki F, Sakoda Y, Kida H, Reid PC, Kubota K, Suga H, Kohara M. Influenza viral hemagglutinin-targeted macrocycles as an antiviral agent [Options for the Control of Influenza VIII、2013年9月、Cape Town, South Africa

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 誠 (SAITO, Makoto)  
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・主任研究員  
研究者番号：20433021

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし