

鳥型からヒト型への変化に関する分子基盤および抗インフルエンザ創薬

研究分担者 鈴木康夫 中部大学生命健康科学部 教授

研究要旨 1) 本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス (以下 H5N1) が変異してヒト-ヒト間伝播が可能となる変異を事前に予知する技術を開発するとともに、新型インフルエンザウイルスにも適応可能な抗インフルエンザ剤創製の基盤を創ることを目指した。まず、合成シアロ糖鎖ポリマー (Neu5Ac α 2-3(6)Gal β 1-4GlcNAc-polyglutamic acid) と抗 H5 モノクローナル抗体を用いる ELISA 技術を応用した鳥およびヒトインフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖認識 (Neu5Ac α 2-3Gal or 2-6) 監視技術を開発した。さらに、人工的に赤血球膜のシアロ糖鎖レセプターを改変する技術を考案し、H5N1 ウイルスのヒト型レセプター認識変異を監視することが可能となった。これに加えて、イムノクロマト技術による鳥およびヒトインフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖識別をより簡便かつ迅速に測定するキット「軽量 (約 5 グラム)、反応時間 15 分で完了」のプロトタイプを開発した。これにより、高価な機器用いず、安価で簡便に鳥→ヒトへのレセプター認識特異性変異を監視できる可能性が拓けた。2) 一方、H5N1 に対して感受性を持つ動物 (ブタ、ニワトリなど) の呼吸器や腸管におけるウイルスの受容体 N-結合型シアロ糖鎖解析の技術を開発し、これを応用してブタ (鳥-ヒト間の中間宿主) の気道、肺、および発育鶏卵のしょう尿膜 (ウイルスのワクチン株の培養器官) における N-型シアロ糖鎖の精密化学構造解析を行った。これらの結果から、ブタは、H5N1 が遺伝子の混合 (遺伝子再集合) を起こし、新型ウイルスを産生するばかりでなく、ヘマグルチニンのアミノ酸点変異により、ヒト型レセプター α 2-6 に結合出来る変異を起こし得る可能性を明らかにした。今後、ブタや家禽から分離される H5N1 のレセプターシアロ糖鎖結合特異性の監視は極めて重要な作業となる。3) 様々な天然および化合成シアロ糖鎖につき、抗インフルエンザウイルス活性を調べ、いくつかの新規ウイルスシアリダーゼ活性およびヘマグルチニン活性阻害剤を見出した。

A. 研究目的

香港で発生した高病原性トリインフルエンザ A 型ウイルス(1997 年発生、H5N1 亜型)は、現在、世界 63 ヶ国に伝播し、さらに 15 ヶ国でヒトへの伝播を果たしている。既に、日本を含むアジア、ロシア、ヨーロッパ、さらに中近東、アフリカに拡散し、ニワトリ等、家禽、野鳥を殺し、完全駆除は極めて困難とされる。2011 年 2 月 9 日までに、520 人に感染、307 名が死亡、致死率は約 60%と極めて高い (WHO 報告)。中国、ベトナム、タイ、インドネシア等では、家族内

ヒト-ヒト感染例も報告され、本ウイルスがトリ型からヒト-ヒト間で流行できるヒト型への変異を遂げつつあると懸念される。仮に、これが現実となれば、本ウイルスは数ヶ月以内に全世界のヒトに拡散、スペインインフルエンザに匹敵するパンデミック到来が予測され、緊急な対策が必須となっている。

一方、2009 年 4 月、本研究遂行過程で、ブタ由来の新型インフルエンザがメキシコで発生し、2009 年 6 月には、パンデミック (WHO によるインフルエンザ流行警告フェーズ 6) に達した。

2010年8月には本パンデミックもWHOによりPost Pandemic Periodへ移行したとする宣言がなされたが、依然、季節性インフルエンザと共に世界に勢力を持ち続け、多くの感染者を出している。よって本研究では、この新型インフルエンザウイルスの感染機構、これに対する創薬などについても研究を行うこととした。

本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス(以下H5N1)が変異してヒト-ヒト間伝播が可能となる変異を事前に予知する技術を開発するとともに、新型インフルエンザウイルスにも適応可能な抗インフルエンザ剤創製の基盤を創ることを目指した。

B. 研究方法

本研究開始、当初、ELISA技術による、後半ではそれに加えてイムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖結合識別特異性監視法を様々な条件で構築した。さらに、ウイルスの受容体であるN型-シアロ糖鎖の精密構造解析技術の開発(高速液体クロマト-質量分析系の開発)も行った。この技術を駆使して、ブタやニワトリなどの中間宿主呼吸器におけるN型シアロ糖鎖の精密構造解析を実行した。さらに、様々な天然、化学合成化合物につき、インフルエンザウイルス感染阻害、ヘマグルチニン、シアリダーゼ活性阻害評価を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

先ず、合成シアロ糖鎖ポリマー(Neu5Ac α 2-3(6)Gal β 1-4GlcNAc-polyglutamic acid)、抗H5モノクローナル抗体を用いるELISA技術を応用した鳥およびヒトインフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖認識(Neu5Ac α 2-3Gal or 2-6)を簡便かつ迅速に測定する技術を開発した(Glycobiology, 2008)。加えて、イムノクロマト技

術による鳥およびヒトインフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖識別をより簡便かつ迅速に測定するキット「軽量(約5グラム)、反応時間15分で完了」の試作品を開発した。

基質特異性の異なるシアリダーゼを用いて、赤血球を処理し、鳥型レセプターシアロ糖鎖を欠いた赤血球を人工的に作り、これを用いて、ヒト型レセプターに結合できる変異を遂げたH5N1を識別する方法を開発した。1, 2の方法を駆使して、ブタ由来H1N1ウイルスのEgg adaptation(北米ブタインフルエンザウイルスのレセプター特異性はヒト型であるが、発育鶏卵のしょう尿膜でpassageすると鳥型レセプターへの結合性を獲得する)機構を明らかにした(J. Gen. Virol., 2010, Glycoconjugate J, 2009)。

3. インフルエンザウイルスのレセプターN-glycanの詳細な化学構造を決定する基本技術を構築した(Carbohydrate Res., 2008)。これにより、ブタの上気道、下気道、肺におけるN-グリカンの解析を行い、ブタの呼吸器には、ヒト型シアロ糖鎖レセプター(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-)が鳥型シアロ糖鎖レセプター(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-)に比数倍多いことを見出した。これにより、H5N1ウイルスがブタに感染、ブタ間での流行が起こった場合、ブタ体内からヒト型レセプター結合能力を獲得した新型ウイルスが発生する可能性が明らかとなった(PLoS ONE, 2011)。さらに、H5N1ウイルスに感受性である動物(ネコ、イヌ、トラ、ニワトリなどの家禽)におけるレセプターシアロ糖鎖の分布をレクチンを用いて調べた。その結果、ニワトリ個体からヒトへの適応性を獲得した変異H5N1が発生する可能性を見出した(Asian Pacific J. Allergy & Immunol., 2010)

ラオス人民民主主義共和国におけるH5N1分離株にヒト間伝播可能な変異およびNA阻害剤抵抗性株を発見した(J Gen Virol., 2010)。

1918年に発生したスペインインフルエンザの病原性発現にウイルスノイラミニダーゼスパイクの細胞内エンドソーム・リソソームにおける弱酸

性安定性が関わることを発見した。この機構は次期パンデミックインフルエンザウイルスの発生監視技術開発に有用である(PLoS ONE, 2010)。

日本産の梅から古式法により製造される梅肉エキスに存在する新物質ムメフラールは、多様な抗インフルエンザウイルス活性を持つことを明らかにした。本研究は、インフルエンザの予防と古来受け継がれてきた民間食素材とが密接に関わることを示すもので興味深い (Food Chem., 2011)。

インドネシアブタから分離された H5N1 にヒト型レセプター(Neu5Ac2-6Gal) への結合性を獲得した株を見出した (Emerg. Infect. Dis.,2010)。インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼやヘマグルチニンスパイクの機能を阻害する新しい分子を合成し、その活性を見出した。その一つは、シアル酸の誘導体で、C9 N-acyl Neu5Ac2en の構造を持つ。これは、これまで臨床に使われている 4-guanizino-Neu5Ac2en (ザナミビル) に匹敵する強力な抗シアリダーゼ活性を持つことを見出した(International J. Med.Chem., 2011)。

D. 考察

イムノクロマトを原理とする簡便な、H5N1 ウイルスの鳥→ヒトレセプター結合特異性の変異監視キットのプロトタイプは、32HAU のウイルス濃度で、15 分以内に測定可能である。さらに感度上昇とウイルスクレード間における反応性の格差なく改良が必要である。このような、キットの試作は世界初であり、さらに実用化に向けて努力すべきである。これまでは、H5N1 の抗原性や遺伝子の変異による監視のみであったが、今後、ヒト喉にあるウイルス受容体結合性やヒト間伝播可能な変異の監視を可能とする本法の開発は、全く新しい、パンデミックの事前対策を可能とするものであり重要且つ期待出来るものである。また、宿主動物細胞におけるシアロ糖鎖受容体の精密構造解析法も本研究で確立されたので、今後、ウイルスの変異と宿主動物の標的組織細胞シア

ロ糖鎖との関係がより分子レベルで解析が可能となった。本法は、H5N1 のワクチン株の産生に最も好都合な宿主細胞を解析できる可能性を拓くもので、さらなる応用が期待される。また、本研究により、いくつかのインフルエンザウイルス HA および NA の機能阻害剤 (天然および化学合成) が見出された。その中には、現行のザナミビル (リレンザ) やオセルタミビル (タミフル) と同等あるいはそれ以上に強力なウイルスシアリダーゼ活性阻害剤も含まれており、さらなる応用が期待できる。以上、本研究により、今後パンデミックが危惧される H5N1 ウイルスのヒト型への変異予測が全く新しい糖鎖ウイルス学的視点から可能となり、次世代の抗インフルエンザ薬開発の基盤が達成できたと思われる。

E. 結論

以上、本研究により、今後パンデミックが危惧される高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 のヒト型への変異予測が全く新しい糖鎖ウイルス学的視点から可能となり、さらに次世代の抗インフルエンザ薬開発の基盤が達成できたと思われる。

F. 研究発表

- 論文発表
01. Nongluk Sriwilajaroen, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Nobuhiro Takemae, Takehiko Saito, Hiroaki Hiramatsu, Koichi Kato, Yasuo Suzuki: N-glycans from porcine trachea and lung: Predominant NeuAca2-6Gal could be a selective pressure for influenza variants in favor of human-type receptor. *PLoS ONE*, 6, issue 2, e-16302 (2011)
02. Nongluk Sriwilajaroen, Akiko Kadowaki, Yuriko Onishi, Nobuyuki Gato, Makoto Ujike, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yasuo Suzuki: Mumefural and related HMF derivatives from Japanese apricot fruit juice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A (H1N1) virus. *Food Chem.*, 127, 1-9 (2011)
03. Magesh Sadagopan, Sriwilajaroen Nongluk, Moriya Setsuko, Hiromune Ando, Miyagi Taeko, Yasuo Suzuki, Hideharu

- Ishida and Makoto Kiso: Evaluation of a set of C9 N-acyl Neu5Ac2en mimetics as viral sialidase selective inhibitors. *International J. Medicinal Chemistry*, In press (2011)
04. Sukanya Thongratsakul, Yasuo Suzuki, Hiroaki Hiramatsu, Thavajchai Sakpuaram, Theerapol Sirinarumitr, Chaithep Poolkhet, Pattra Moonjit, Rungrueang Yodsheewan, Thaweesak Songserm Avian and human influenza A virus receptors in trachea and lung of animals. *Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology*, 28, 294-301 (2010)
 05. Tadanobu Takahashi, Yuuki Kurebayashi, Kumiko Ikeya, Takashi Mizuno, Keijo Fukushima, Hiroko Kawamoto, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic influenza A virus enhances virus replication. *PLoS ONE* Vol. 5, Issue 12 (Nov.), e-15556 (2010)
 - 06 Chairul A. Nidom, Ryo Takano, Shinya Yamada, Yuko Sakai-Tagawa, Syafril Daulay, Didi Aswadi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Kyoko Shinya, Yukiko Muramoto, Yoshihiro Kawaoka: Influenza A(H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010 Oct; [Epub ahead of print] DOI: 10.3201/eid1610.100508
 07. David A. Boltz, Bounlom Douangneun, Phouvong Phommachanh, Settha Sinthasak, Ricarda Mondry, Caroline Obert, Patrick Seiler, Rachael Keating, Yasuo Suzuki, Hiroaki Hiramatsu, Elena A. Govorkova, Robert G. Webster: Emergence of H5N1 Avian Influenza Viruses with Reduced Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors and Novel Reassortants in LAO PDR *J. gen Virol.*, 91, 949-959 (2010)
 08. Nobuhiko Takemae, Ruttapong Ruttanapumma, Sujira Parchariyanon, Shuji Yoneyama, Tsuyoshi Hayashi, Hiroaki Hiramatsu, Nongluk Sriwilaijaroen, Yuko Uchida, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Yasuo Suzuki, Takehiko Saito: Alterations in receptor binding properties of swine influenza viruses of H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J. gen. Virol.*, 91, 938-948 (2010)
 09. Tadanobu Takahashi, Asako Hashimoto, Mami Murayama, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA containing to the recognition of molecular species of sialic acid. *FEBS Lett.* 583 (19) 3171-3174 (2009), Doi: 10.1016/j.febslet.2009.08.037
 10. Nongluk Sriwilaijaroen, Prapon Wilairat, Hiroaki Hiramatsu, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Morihiro Ito, Yasuhiko Ito, Masato Tashiro, Yasuo Suzuki: Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal*, 6, 124 Open access, doi:10.1186/1743-422X-6-124 (2009)
 11. Hiroyuki Oka, Tomotsune Onaga, Tetsuo Koyama, Chao-Tan Guo, Yasuo Suzuki, Yasuaki Esumi, Ken Hatano, Daiyo Terunuma and Koji Matsuoka: Syntheses and biological evaluations of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with sialyl $\alpha(2\rightarrow3)$ lactose moieties as inhibitors for human influenza viruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 5465-5475 (2009)
 12. Jun-Ichi Sakamoto, Tetsuo Koyama, Daisei Miyamoto, Sangchai Yingsakmongkon, Kazuya I.P.J. Hidari, Wipawee Janpangern, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Yasuaki Esumi, Takemichi Nakamura, Ken Hatano, Daiyo Terunuma, Koji Matsuoka: Systematic synthesis of influenza neuraminidase inhibitors: A series of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with thioglycoside-type sialic acid moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 5451-5464 (2009).
 13. Sukanya Thongratsakul, Thaweesak Songserm, Chaithep Poolkhet, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Hiroaki Hiramatsu, Masato Tashiro, Harue Okada, Koichi Kato, Yasuo Suzuki: Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) *Open Glycoscience*, 2, 28-36 (2009)
 14. Yasuo Suzuki: The Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 - Initial Molecular Signals for Next influenza Pandemic - *Chang Gung Med. J.*, 32, 258-263 (2009)
 15. Nongluk Sriwilaijaroen, Sachiko Kondo, Hirokazu Yagi, Prapon Wilairat, Hiroaki Hiramatsu, Morihiro Ito, Yasuhiko Ito, Koichi Kato, Yasuo Suzuki: Analysis of N-glycans in embryonated chicken egg chorioallantoic and amniotic cells responsible for binding and adaptation of

- influenza viruses *Glycoconjugate J.*, 26, 433-443 (2009)
16. Toshihiko Sawada, Tomohiro Hashimoto, Hiroaki Tokiwa, Tohru Suzuki, Hirofumi Nakano, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Yasuo Suzuki: *Ab initio* base fragment molecular orbital studies of influenza viral hemagglutinin HA1 full-domains in complex with sialoside receptors. *J. Mol. Genet. Med.*, 3, 133-142 (2009)
 17. Keiko Hata, Koichi Koseki, Kazunori Yamaguchi, Setsuko Moriya, Yasuo Suzuki, Sangchai Yingsakmongkon, Go Hirai, Mikiko Sodeoka, Mark von Itzstein, Taeko Miyagi: Limited inhibitory effects of Oseltamivir and Zanamivir on Human sialidases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 3467-3471 (2008)
 18. Jun-Ichi Sakamoto, Tetsuo Koyama, Daisei Miyamoto, Sangchai Yingsakmongkon, Kazuya I. P. J. Hidari, Wipawee Jampangern, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Yasuaki Esumi, Takemichi Nakamura, Ken Hatano, Daiyo Terunuma, Koji Matsuoka: Systematic syntheses of influenza neuraminidase inhibitors: A series of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with thioglycoside-type sialic acid moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 4405-4408 (2008)
 19. Toshihiko Sawada, Tomohiro Hashimoto, Hirofumi Nakano, Tohru Suzuki, Yasuo Suzuki, Yoshihiro Kawaoka, Hideharu Ishida, Makoto Kiso: *Ab initio* fragment molecular orbital studies of influenza virus hemagglutinin-sialosaccharide complexes toward chemical clarification about the virus host range determination. *Glycoconjugate J.* 25, 805-815 (2008)
 20. Kazuya IPJ Hidari, Takeomi Murata, Kazuhiro Yoshida, Yoshiharu Takahashi, Yo-hei Minamijima, Yoshinobu Miwa, Satoshi Adachi, Makoto Ogata, Taiichi Usui, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: Chemoenzymatic synthesis, characterization, and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. *Glycobiology*, 18, 779-788 (2008).
 21. Hirokazu Yagi, Nakao Yasukawa, Shin-Yi Yu, Chao-Tan Guo, Noriko Takahashi, Tadanobu Takahashi, Wakoto Bukawa, Takashi Suzuki, Kay-Hooi Khoo, Yasuo Suzuki, Koichi Kato: The expression of sialylated high-antennary *N*-glycans in edible bird's nest. *Carbohydrate Res.*, 343, 1373-1377 (2008).
 22. Hiroyuki Oka, Tomotsune Onaga, Tetsuo Koyama, Chao-Tan Guo, Yasuo Suzuki, Yasuaki Esumi, Ken Hatano, Daiyo Terunuma, Koji Matsuoka: Sialyl α (2-3) lactose clusters using carbosilane dendrimer core scaffolds as influenza hemagglutinin blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 4405-4408 (2008)
 23. Tadanobu Takahashi, Kouichi Murakami, Momoe Nakagawa, Hideyuki Kishita, Shinya Watanabe, Koichi Honke, Kiyoshi Ogura, Tadashi Tai, Kazunori Kawasaki, Daisei Miyamoto, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Chao-Tan Guo, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: Sulfatide regulates influenza A virus replication by association with hemagglutinin delivered to the cell surface. *J. Virol.*, 82 (12) 5940-5950 (2008)
 24. Sangchai Yingsakmongkon, Daisei Miyamoto, Nongluk Sriwilaijaroen, Kimie Fujita, Kousai Matsumoto, Wipawee Jampangern, Hiroaki Hiramatsu, Chao-Tan Guo, Toshihiko Sawada, Tadanobu Tskahashi, Kazuya Hidari, Takashi Suzuki, Morihito Ito, Yasuhiko Ito, Yasuo Suzuki: *In Vitro* Inhibition of Human Influenza A Virus Infection by Fruit-Juice Concentrate of Japanese Plum (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *Biol. Pharm. Bull.* 31 (3), 511-515 (2008)
 25. Daisei Miyamoto, Sayaka Hasegawa, Nongluk Sriwilaijaroen, Sangchai Yingsakmongkon, Takashi Suzuki, Kazuya, I. P. J. Hidari, Tadanobu Takahashi, Chao-Tan Guo, Yuichi Sakano and Yasuo Suzuki: Clarithromycin inhibits progeny virus production from influenza virus – Infected host cells. *Biol. Pharm. Bull.* 31 (2), 217-222 (2008)
 26. Ornpreeya Suptawiwat, Alita Kongchanagul, Wisoot Chan-It, Arunee Thitithanyanont, Witawat Wiriyarat, Krisda Chaichuen, Taweesak Songserm, Yasuo Suzuki, Pilaipan Puthavathana, Prasert Auewarakul: A simple screening assay for receptor switching of avian influenza viruses. *J. Clinical Virol.*, 42, 186-189 (2008)
2. 学会発表
 1. Yasuo Suzuki: Highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) –Avian H5N1 is now acquiring human receptor specificity and anti-influenza drug discovery-. The 8th China-Japan International Conference of Virology Abstract book pp.21, July 4-7, 2010, Harbin, China(発表 : 7月5日)
 2. Yasuo Suzuki: Glycovirolgy of Influenza virus -Highly pathogenic avian H5N1 viruses that acquire human receptor

- specificity· 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul 2010. Abstract book pp. 14-15 July, 15-17 (July 16), Seoul National University, Seoul, Korea, Japanese Society for Neurovirology, (2010).
3. Yasuo Suzuki: Highly pathogenic avian H5N1 viruses that acquire human receptor specificity and anti-influenza drug discovery
BIT's 1st World Congress of Virus and Infections 2010, July 31-August 3, 2010, Busan Exhibition & Convention Center, Korea. Abstract book, pp 195 (2010)
 4. Yasuo Suzuki: Mechanism of host range mutation of influenza viruses. (Aug. 26th, 2010), Sialoglyco 2010 (13th International Congress on Biology and Chemistry of sialic acids), Kongresshotel Potsdam, Potsdam, Germany, August 21-26 (2010) Abstract Book pp.55 (2010)
 5. 鈴木康夫: パンデミックインフルエンザと抗インフルエンザウイルス素材の開発 Chubu University's Week in World Expo 2010 Shanghai China, DEVNET 国際交流館, 2010年9月1日(水)～7日(火)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

