

レセプター疑似分子による新しいヒトインフルエンザウイルス吸着素材の開発と応用

鈴木康夫

Development of a New Receptor Like Molecule Which Adsorbs Human Influenza Viruses

Yasuo Suzuki

We developed a new material which specifically binds to human influenza A, B viruses. This material was designed by our fundamental studies of influenza virus receptor binding specificity. It contains *N*-acetylneuraminic acid α 2-6Gal β 1-4GlcNAc sugar, polyglutamic acid and alkyl chain.

It binds to human influenza viruses and inhibits both functions of the influenza virus hemagglutinin which is responsible for the binding of the viruses to host receptor sialosugar chains and neuraminidase spikes which is responsible for virus budding from the host cells. It also inhibit the replication of the virus in the host cells (MDCK cells). This influenza virus receptor-like molecule may be applied as a potential polymeric adsorbent of influenza virus and anti-influenza drugs.

Keywords : *Influenza virus, Receptor, Sialosugar Chain, Sialic acid*

1. はじめに

ヒト間で流行するインフルエンザは、世界の経済、社会生活に大きな影響を与えている。世界におけるインフルエンザ重症患者は、毎年 300 - 500 万人発生し、死者は 25~50 万人/年と集計されている (WHO)。病原体であるインフルエンザウイルスは極めて変異しやすく、インフルエンザワクチン株は、その流行パターン、変異に対応して数年毎に変えていく必要があるほどである。従って、ウイルスの変異を克服した効果的な抗インフルエンザ薬の開発やインフルエンザウイルスを特異的に吸着し、不活化できる素材の開発は、極めて重要な課題である。

2. 研究計画と実験方法

2.1 インフルエンザの世界流行

これまで、インフルエンザウイルスは少なくとも 4 回世界大流行 (パンデミック) を起こしてきた (図 1)。すなわち、1918 年に発生し、世界で 4000 万人を殺したスペインインフルエンザ、アジア風邪 (1957

年発生, 世界で 200 万人死亡とされる), 香港風邪 (1967 年発生, 世界で約 100 万人死亡とされる), 2009 年に発生したブタ由来新型インフルエンザ (日本では現在も流行を続けている) などである. 世界流行を起こしてきたのは, 全て A 型ウイルスであるが, 本ウイルスの自然宿主は野生の水鳥である. 野生水鳥は地球規模の渡りにより, ウイルスをニワトリなどの家禽やブタなどの中間宿主へ伝播し, その過程で, ヒトへの伝播能力を獲得した変異ウイルスがヒトの間で世界流行を起こしてきたのである¹⁾.

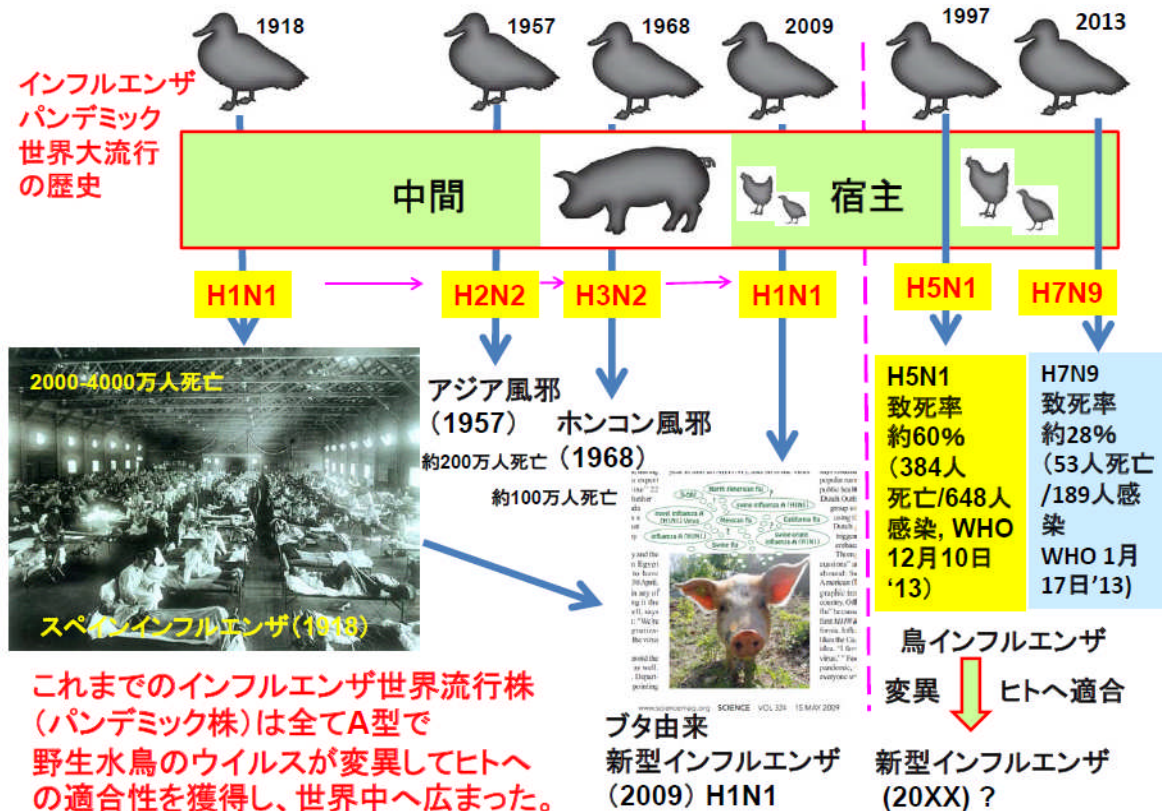


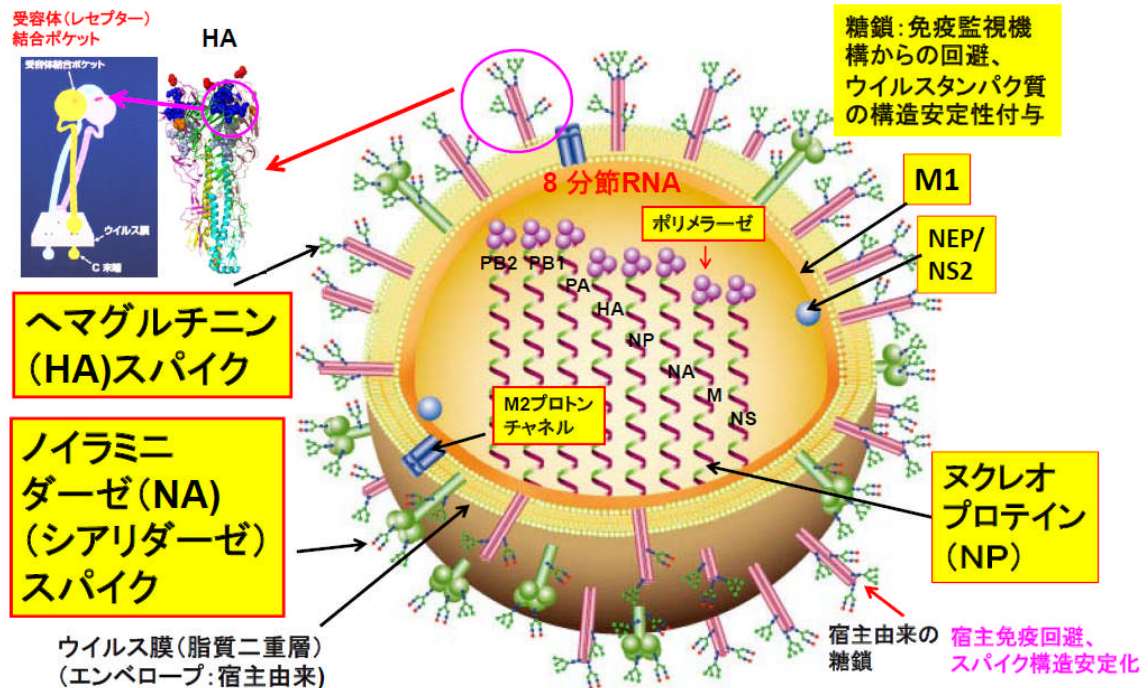
図 1 インフルエンザの世界流行および鳥インフルエンザのヒトへ伝播

2.2. 鳥インフルエンザウイルス

鳥からヒトへのインフルエンザウイルスの宿主域の変異とウイルスの宿主レセプター結合特異性の変化は, 深く関わっている. 1997 年には, 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) が, 香港で発生した. このウイルスは, ニワトリに対して致死性であり, ヒトに対しても高い致死率 (約 60%) で伝播し続けている²⁾. 2009 年には鳥, ヒト, ブタインフルエンザウイルス遺伝子を持つ新型インフルエンザウイルス (H1N1) がメキシコから発生し, パンデミックとなった. さらに, 2013 年 2 月に, 新しい型の鳥インフルエンザウイルス (H7N9) が上海で発生した. このウイルスは, ニワトリに対して低病原性であるが, ヒトに対してはこれまでのところ致死率 25%を超える高い病原性を持ちつつ, 感染が拡大しつつある (WHO). さらに, 2013 年 12 月, 中国江西省で, 全く新しい亜型の鳥インフルエンザウイルス (H10N8) がヒトへ伝播し, 73 才の女性が死亡した (WHO)³⁾. このように, 鳥インフルエンザウイルスのヒトへの伝播は相次いでおり, 早急に, 鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応性変異獲得の診断技術, ヒト間伝播阻止抗インフルエンザ薬の開発が望まれる.

2.3. インフルエンザウイルスヘマグルチニン (HA) とレセプター破壊酵素(ノイラミニダーゼ, NA)

A, B 型インフルエンザウイルス (図 2) は宿主由来のウイルス膜を持ち, その膜に埋め込まれた 2 種類のスパイクを発現している. ヘマグルチニン (HA, A 型ウイルスには H1-H17 の亜型が知られている) およびノイラミニダーゼ (NA, A 型ウイルスには N1-N10 の亜型が存在) である. 前者は,



インフルエンザウイルス HA, NA には糖鎖はあるが, 自己 HA 同士によるウイルス凝集を防ぐために, 糖鎖にシアル酸は含まれていない。

図 2 インフルエンザ A, B 型ウイルス粒子の模式図。

シアロ糖鎖レセプターへの結合性を担っており, 鳥インフルエンザウイルスの HA は宿主細胞表面のシアロ糖鎖, シアル酸 (Sia) α 2-3Gal へ, ヒトインフルエンザウイルス HA はシアル酸 (Sia) α 2-6Gal への結合性を持つ. ノイラミニダーゼはレセプターである宿主細胞膜上のシアロ糖鎖のシアル酸を加水分解する酵素 (レセプター破壊酵素とも呼ばれる) であり, インフルエンザウイルスが宿主細胞から出芽して近隣の細胞へ再感染する上で重要な機能を持つ¹⁻³⁾.

2.4. 宿主細胞膜上のレセプターシアロ糖鎖

宿主細胞に発現されているシアロ糖鎖は, シアル酸含有糖タンパク質 (N-グリカン, O-グリカン), スフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド), GPI アンカー, ムチンなどに発現されている. シアル酸 (Sia) の分子種は自然界で 50 を超えるが, その中でも, N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) と N-グリコリルイラミン酸 (Neu5Gc) は, A, B 型インフルエンザウイルス感染にとって重要な位置を占める. 米国, ロシア, ヨーロッパ, そして我々のグループにより, カモや高病原性鳥インフルエンザウイルスを含む鳥インフルエンザウイルスの HA は Sia α 2-3Gal (以後, α 2-3 あるいは鳥型レセプターと略) を含む糖鎖と優先的に結合するが, ヒト間で流行しているウイルスの HA は Sia α 2-6Gal (以後, α 2-6 またはヒト型レセプター) を含む糖鎖と結合することも明らかにされた^{1,4)}.

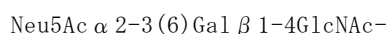
Sia α 2-3Gal-結合性から Sia α 2-6Gal-結合性への変異は, ヒトへの適応性獲得の最初のステップとして重要である. 実際, パンデミックを起こした 1918 年のスペインインフルエンザ (H1N1), 1957 年のアジア風邪 (H2N2), 1968 年のホンコン風邪 (H3N2) ウイルスは, 最近世界流行を起こした 2009 年のウイルスと同様に, これらのウイルスはヒト以外の動物種に由来しているにも関わらず, 全て, ヒト型レ

セプターへの結合性を獲得していた^{3, 5)}。

シアリル糖鎖—特異的レクチン染色によりヒト上気道上皮細胞には Sia α 2-6Gal が主に存在するが、ヒト下気道および肺にはヒト型および鳥型レセプターの両者が発現していることが報告されている⁶⁾。ブタ気道にも鳥およびヒト型レセプターが検出されている^{3, 6)}。カモやアヒルを含む水鳥の気道上皮には鳥型レセプターが主に存在する^{3, 6)}。しかし、ニワトリ、七面鳥、ウズラなど、陸棲の鳥の上皮細胞には鳥型、ヒト型の両方のレセプターが存在し^{3, 6)}、これらの種では、鳥およびヒトインフルエンザウイルス両方の増殖が可能となり、ウイルスがこれらの種の中で伝播を繰り返す間に、鳥からヒトへの宿主適応性変異が起こる可能性を示している。注目すべき事に、ニワトリやウズラなどの陸棲鳥から分離された H5N1 や H9N2 株の中には、ヒト型レセプターと結合するものが見出されている。

2.5. インフルエンザ A, B 型ウイルス共通したシアロ糖鎖レセプター構造

我々は、これまで、多くのヒト、鳥、ブタ、ウマなどのインフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖の精密化学構造を明らかにしてきた。その結果、少なくとも下記の 3 つの糖鎖配列が、ヒト A, B 型インフルエンザウイルス、動物のインフルエンザウイルス（全て A 型）に共通して必須な構造であることを見いだした¹⁻⁴⁾。言い換えれば、この構造を持つ人工疑似レセプター分子は、多くのヒト、動物



のインフルエンザウイルスヘマグルチニンと結合することが可能で、ウイルスの宿主細胞への感染を阻止できる分子であることを確認した。同時に、ヒト間で流行するウイルスは、全て Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc シアロ糖鎖配列（ヒト型レセプター配列を含む）を、鳥インフルエンザウイルスは、Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc 配列（鳥型レセプター配列を含む）を認識して結合するという法則性を見いだした。さらに、上記糖鎖は、オリゴ糖の状態では、ウイルスヘマグルチニンとの結合性は弱い、脂質あるいはタンパク質の基盤上にクラスター状に発現させると、飛躍的にインフルエンザウイルスヘマグルチニンとの結合性が向上することも明らかにした¹⁻⁶⁾。

2.6. 疑似レセプター分子（SK 化合物）の設計

これまでの基礎的成果および上記の背景を基に、ヒト型レセプター疑似分子素材を設計し、下記の構造を有するシアロ糖鎖ポリマー（SK 化合物）を合成した。本分子は、1998 年に Suzuki, Kanie が報告した鳥インフルエンザウイルスレセプター疑似分子⁷⁾から誘導された新化合物であるため SK 化合物と命名した。本分子は、ヒト型レセプター構造（Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc）を持ち、ウイルスの脂質二重膜への進入を容易にするアルキル鎖、さらに上記糖鎖をクラスター状に発現可能とするポリグルタミン酸（PGA）ポリマーを含有する。全てのヒト間で流行するインフルエンザウイルス（今後発生する新型インフルエンザウイルスを含む）は、本分子に結合することが可能で、あらかじめ、本分子でインフルエンザウイルスヘマグルチニンのレセプター結合部位を覆うことにより、ウイルスが真のレセプターへと結合することが阻害されウイルスの宿主細胞への感染が阻害されることが期待される。

3. 研究成果

3.1. SK 化合物の抗インフルエンザウイルス活性

2009 年世界流行となった新型インフルエンザウイルス（2009 年成田空港で我が国最初に分離されたパンデミック新型ウイルス株：A/Narita/1/2009(H1N1)）を用いて SK 化合物の抗ウイルス活性を測定した。結果を図 3 に示す。非常に興味深いことに、SK 化合物は当初想定していたウイルスヘマグルチニン（HA）の機能阻害に加えてノイラミニダーゼ（NA）スパイクの機能阻害活性も持つことが判明した。

○ウイルスヘマグルチニン (HA)
機能阻害 (HAI unit)

SK: 125ng/ml

Fetuin: 63 ug/ml

○感染性阻害 IC₅₀ (PFU):

SK: 4.3×10^{-8} M

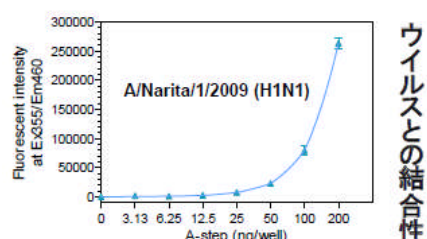
○SK化合物は、本ウイルスに実際に結合した。

○ウイルスノイラミナーゼ (NA)機能
阻害

IC₅₀: SK化合物 : 0.6 nM

○タミフル耐性株 (A/Kitakyushu/10/
2006 (H1N1))にも有効

○マウスに対して0.1mg/bodyまで毒性なし。
MDCK細胞に対して1mg/mlまで毒性なし。



○すべてのヒトパンデミック、季節性A型
インフルエンザウイルス、全てのB型ウイ
ルスに有効

図3 SK化合物の2009年パンデミック株, A/Narita/1/2009 (H1N1)およびその他の株に対するウイルス阻害活性

まず、ヘマグルチニン機能 (赤血球凝集) 阻害活性 (HAI 活性)は、陽性対照として用いたフェツイン (ウシ胎児血清に存在するシアロ糖タンパク質, HAI unit: 63 ug/ml)の約 500 倍も強い活性 (HAI unit: 125 ng/ml)を確認した. さらに、ノイラミナーゼ機能 (シアロ糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸を加水分解するシアリダーゼ活性) 阻害 (IC₅₀) は、0.6nM であり、陽性対照として用いた Osetamivir (インフルエンザウイルスノイラミナーゼ阻害剤)とほぼ同程度の強い活性を示した. ウイルスの感染阻害活性 (IC₅₀) をウイルス抗原の発現抑制を指標に調べたところ 43.0 nM であり、強力な抗インフルエンザウイルス活性を持つことを見いだした. さらに、SK 化合物は、用いた 2009 年パンデミックウイルスと結合することも確認した. SK 化合物は、他の A, B 型インフルエンザウイルス (未発表) にも同様な阻害活性を示し、広域性を持つウイルス阻害剤、ウイルス吸着剤であることを確認した. 以上、本研究で構築した SK 化合物は、ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニンおよびノイラミナーゼの両機能 (ウイルスの宿主細胞への吸着, 進入, および、宿主細胞からの出芽) を阻害する、全く新しい阻害機構を有する強力なインフルエンザ阻害分子、インフルエンザウイルス吸着剤であることが明らかとなった.

3.2. SK 化合物がインフルエンザウイルスノイラミナーゼ機能を阻害する理由

今回、SK 化合物が、ウイルスヘマグルチニンおよびノイラミナーゼの両者を阻害する多機能阻害剤であることが確認された. 本分子は、全てのヒトインフルエンザウイルスが認識結合する共通のレセプターシアロ糖鎖構造 (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-)を持つため、ウイルスヘマグルチニンの活性部位を結合しその機能を阻害する. しかし、ノイラミナーゼ機能 (レセプター破壊酵素, シアリダーゼ活性)をも阻害することが明らかとなった. その、理由を下記に述べる. SK 化合物は次の 3つのステップによりインフルエンザウイルスノイラミナーゼ機能を阻害すると考えられる (図4). 1) 第一ステップ: 先ず、SK 可能物は、自己のシアロ糖鎖を介してウイルスヘマグルチニンのレセプター結合ポケットへ結

合する．2) 第二ステップ：ヘマグルチニンに結合した SK 化合物のアルキル鎖がウイルス膜脂質二重膜に入り込み、より強力にウイルスと SK 化合物とが結合する．同時に、ポリグルタミン酸部分の構造が変化して、それが、ノイラミニダーゼスパイクを含むウイルス膜を包み込む（ポリグルタミン酸部分の構造変化が起こることはすでに確認報告している⁷⁾．3) ステップ3：ポリグルタミン酸部位がノイラミニダーゼの活性中心を物理的に覆い、ノイラミニダーゼ機能（シアリダーゼ活性）を空間的に阻害する．

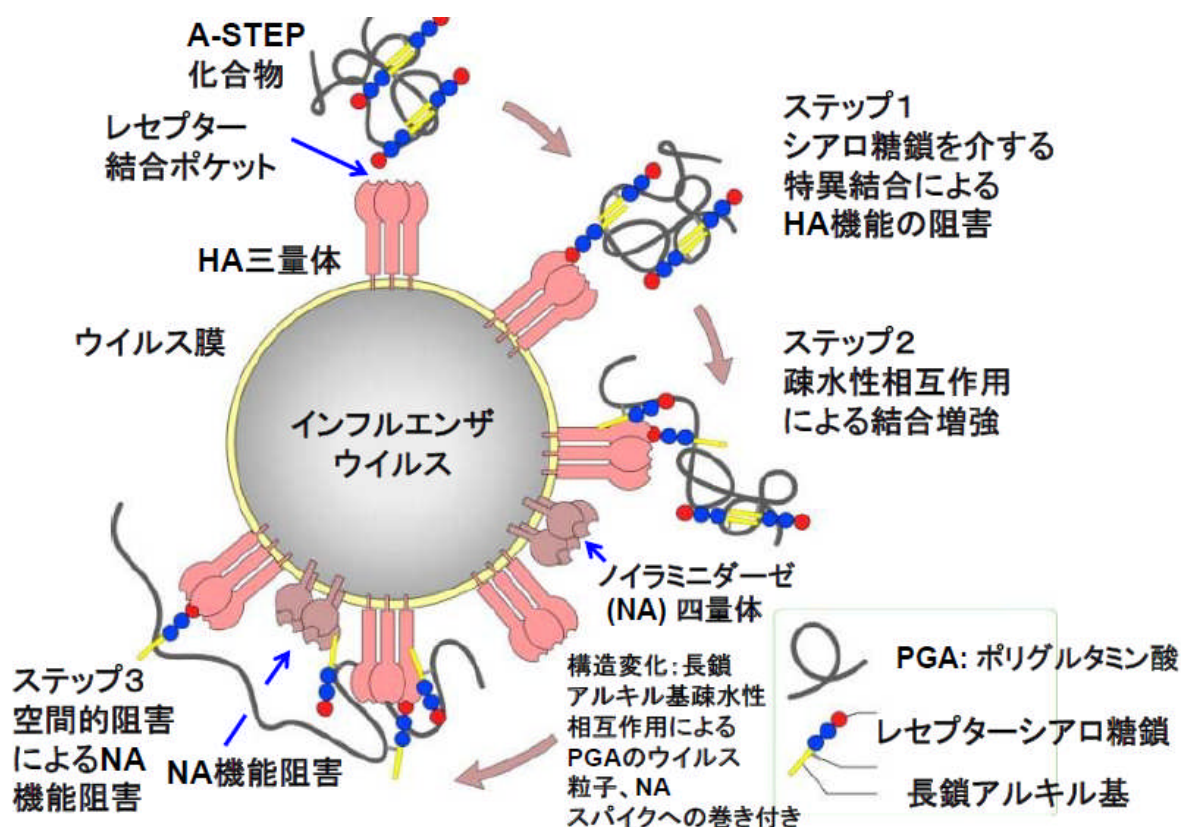


図4 SK 化合物のインフルエンザウイルスヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ機能阻害機構

4. 総括および今後の展望

我々はインフルエンザウイルスの受容体への結合、脱殻、増殖、出芽において重要な役割を果たす二つのスパイクタンパク（ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ）に対して強力な阻害能、即ち、ウイルスの感染開始および宿主からの出芽を阻害する新規シアロ糖鎖含有分子（SK 化合物）を見出した．本分子は、その作用機序から、今後発生する全ての季節性、パンデミックウイルスに有効であり、且つインフルエンザの予防・治療の両者を可能とするものである．さらに、独立に進化する HA, NA の薬剤耐性変異を克服できる可能性も得た（未発表）．このような抗インフルエンザ薬はこれまでに無い．

SK 化合物は、全く新しい阻害機構を持つ抗インフルエンザ薬としての開発が期待される．現在、日本および世界で、臨床で用いられている抗インフルエンザ薬は、ノイラミニダーゼ阻害薬であり、ウイルスの出芽を阻害できるが、ウイルスの感染初期反応（ウイルスの宿主細胞への吸着・侵入）は阻害できない．すなわち、予防効果は期待できない．SK 化合物は、インフルエンザウイルスの感染初期に重要なレセプターシアロ糖鎖の共通構造を持つため、全てのウイルスヘマグルチニンと結合できる広域性のあ

るヘマグルチニン機能阻害作用剤であり、インフルエンザの「予防効果」を可能とする「インフルエンザ予防薬」として全く新しい機能が期待できる。同時にノイラミニダーゼ機能も阻害できるため、これまでのノイラミニダーゼ阻害薬と同様にインフルエンザの増殖、出芽も阻害する「治療薬」としての機能も期待できるものである。

SK 化合物は、上記の他に、インフルエンザウイルスの特異的吸着剤としての応用が考えられる。これをフィルター、カーテン、壁などの素材に組み込むことにより、部屋、建物内部の環境中のインフルエンザウイルスの浄化、さらに、マスク、衣類などの素材に組み込むことにより、抗ウイルス機能を持つ素材として新たな付加価値を付与できる可能性が期待できる（図 5）。



図 5 全ての A, B 型インフルエンザウイルスに結合するウイルスレセプター疑似分子の創製と次世代抗インフルエンザ薬およびウイルス吸着剤としての応用

謝辞

本研究は、中部大学総合工学研究所 平成 25 年度の第 4 部門の援助を受けて遂行されたものであり、ここに謝意を表します。

成果発表

本研究は、平成 25 年度中部地区・医療・バイオ系シーズ発表会（平成 25 年 12 月 12 日）（ウインクあいち）で発表した。本研究を含む内容は特許申請（特願 2013-065700）を行った。

参考文献

- 1) Suzuki, Y.: Sialobiology of influenza Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol. Pharm. Bull. 28, 399-408 (2005).
- 2) Suzuki, Y.: Highly pathogenic avian influenza. J. Disaster Res. (Review), 6, 398-403 (2011).

- 3) Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki: Molecular Basis of a Pandemic of Avian-type Influenza Virus. Methods and Protocols, Part 4: Overview. "Lectins"/Methods in Molecular Biology (Humana Press), in press (2014).
- 4) Suzuki, Y. : The highly pathogenic avian influenza H5N1 – Initial molecular signals for the next influenza pandemic. Chang Gung Med. J. (Review), 32: 258-263 (2009).
- 5) 鈴木康夫：インフルエンザウイルスレセプターと宿主域変異，医学のあゆみ， 241 (1), 19-22 (2012).
- 6) Sriwilaijaroen, N., Suzuki, Y.: Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. Proc. Japan Academy Ser. B, Physical and biological Sciences 88 (6) 226-249 (2012).
- 7) Hiroshi Kamitakahara, Takashi Suzuki, Noriko Nishigogori, Yasuo Suzuki, Osamu Kanie, Chi-Huey Wong: A lysoganglioside/poly-L-glutamic acid conjugates a picomolar inhibitor of influenza hemagglutinin. Angew. Chem. Int. Ed., 37 (11), 1524-1528 (1998).