

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的先端研究開発支援事業
2. 研究開発課題名：インフルエンザ制圧を目指した革新的治療・予防法の研究・開発
3. 研究開発代表者：国立大学法人東京大学 医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野  
教授 河岡 義裕
4. 研究開発の成果

以下の A, B, C の 3 項目を大項目として研究開発を行っている。

### A. 宿主因子を標的とした新規抗インフルエンザ薬の研究開発

当研究室はその発現を抑制することでインフルエンザウイルスの増殖を 1/100 以下に抑える宿主因子を 299 因子見出し、そのうちのある因子の阻害剤はウイルス増殖を抑制することを報告している。この背景のもと、また新たなスクリーニングも行いつつ、既存薬と作用機作が異なり、耐性変異も起こしづらいと考えられ宿主因子阻害剤の研究開発を進めている。

#### 1. in silico 解析からのアプローチ

詳細なメカニズムを考慮した標的およびスクリーニング対象の阻害剤絞り込みを進めた。JAK 関連阻害剤の標的関連パスウェイの拡張、細胞内のパスウェイ、免疫細胞を含めた細胞間の相互作用も含めたパスウェイマップの拡張などの構築を進めた。また、各種阻害剤と宿主因子とのドッキングシミュレーションを行った。

#### 2. 生物学的、ウイルス学的実験からのアプローチ

##### i) スクリーニングの実施:

市販の化合物ライブラリーから Nano-Luc 発現組換えインフルエンザウイルスの増殖を指標に増殖阻害剤スクリーニングを行った。in vivo 試験に供与する化合物の絞り込みに着手している。

##### ii) hit 品の in vitro, in vivo での各種評価や標的因子同定、作用機構解明

C646 : 宿主因子の発現の ON/OFF に重要な役割を果たしているヒストンアセチル転移酵素 (HAT) の阻害剤の抗ウイルス活性を検討し、HAT ファミリーの一つである p300/CBP の阻害剤 C646 に in vitro でブロードな抗ウイルス活性を、さらに in vivo でのウイルス産生阻害作用を確認した。

アドレナリン受容体作動薬 : 東京大学の松井先生との共同研究。東京大学化合物ライブラリーから増殖阻害化合物を HTS で探索し見出した化合物。本品は in vitro でブロードな抗ウイルス活性を示し、in vivo でウイルス増殖阻害は示さなかったものの延命効果を示すことがわかった。

##### iii) 宿主因子阻害化合物の in vitro 及び in vivo で評価

上記の 299 因子のうち JAK/STAT に注目し、市販阻害剤 36 種の in vitro と in vivo での検討を行った。In vitro で抗ウイルス活性がある化合物が複数見いだされた。In vivo では経鼻 1 回投与で評価化合物の優先順位付けを行い、特に STAT 阻害剤に着目し評価を行っている。

##### iv) 有望候補化合物について詳細な検討

- ・ ERATO 成果で出願した特許に JAK 系阻害化合物の実施例を追加。
- ・ C646 の出願予定の特許をより強固なものにするために、周辺化合物 50 種を選択し評価予定。

##### vi) ノックアウト細胞および動物の作成による標的因子妥当性の検証

標的因子としての妥当性を個体レベルで検討するために、299 個の宿主因子の中から、特に重要と思われる 50 個の宿主因子を選択し、他研究室の協力のもと、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト (KO) マウスの作出を開始。一部はヘテロマウスの交配の段階にある。また細胞レベルでは、同方法で TRIM28 を KO した細胞株を作製した。今後ウイルス増殖効率を調べる予定である。KO マウス作製で胎生致死などの障害を起こす宿主因子についても、KO 細胞を作製する準備に着手した。

##### vii) ノックアウト細胞や動物を用いた抗ウイルス候補化合物の薬効検討

平成 27 年度は未着手。

#### 3. 細胞生物学的実験からのアプローチ

##### i) ウイルス増殖効率を上昇させる細胞株の樹立

ウイルス増殖効率を上昇させる細胞株を作製する目的で、鳥ウイルスに対するレセプターの発現を KO し、ヒトウイルスに対するレセプターの発現を上昇させた細胞株の樹立を目指す。今年度は、KO 細胞の作製を進めている。

#### 4. 企業などへのアプローチ活動

- ・ JST 主催の新技术説明会で発表し、来訪した MSD 社とロッシュ社に本プロジェクトを説明した。
- ・ (株) 東京大学 TLO を通じて BIO USA で C646 を紹介予定。
- ・ C646 論文発表。アドレナリン受容体作動薬論文投稿中。

#### B. ワクチン製造のためのウイルス高生産システムの樹立

培養細胞ワクチンの高生産システムを構築するために、高生産性培養細胞株の作出と高増殖性ウイルス作出を行っている。高生産性培養細胞株には ERATO プロジェクトで見出したノックダウンによりウイルス増殖能を亢進する遺伝子の情報を利用している。

##### 1. ウイルス高生産システムの構築

###### i) 高生産培養細胞の作出

MDCK を用いてスクリーニングを行い、その発現抑制によりウイルス産生を増強する宿主因子を 39 個選択した。現在、CRISPR/Cas9 法を用いこれら遺伝子を KO した MDCK 細胞の作製作業を進めている。

###### ii) 高増殖性ウイルスの作出

A/PR/8/34 の変異ウイルスライブラリーから高増殖能を持つ変異ウイルスを取得した。この変異ウイルス基に、H5N1、H3N2、H7N9 の各亜型の HA と NA をウイルス表面に有する高増殖能リコンビナントウイルスの作出系を確立した。

##### 2. 企業などへのアプローチ活動

- ・ 阪大微研、北里第一三共ワクチンを訪問し、細胞ワクチン高生産システムを紹介した。
- ・ 高増殖性ウイルス作出の論文発表、プレスリリースを行った。

#### C. インフルエンザ予防・治療のための次世代医薬品の研究開発

型・亜型を超えてブロードな中和活性を示すモノクローナル抗体の作製を目標とする。また、ウイルスタンパク質と相互作用しない新たな抗ウイルス標的の宿主因子を見出す目的で、ワクチン接種あるいはウイルス感染により誘導される抗体価や症状と相関する microRNA を同定することを当初の目標とする。さらにワクチンの有効性を高めるために新規の安全な免疫賦活化剤の探索も進行中である。

##### 1. 医薬用治療抗体関連

###### i) 多様なウイルスに共通な抗原の探索

HA で型・亜型間で保存されている領域はブロード抗原として期待が持て、その同定を目指す。まず保存領域として知られる HA stalk を培養細胞系で分泌タンパク質として取得する系の確立を試みた。さらに HA の免疫原性の高い抗原決定部位に種々の変異を導入した HA 変異体を多数作出した。

###### ii) 多様なウイルスに有効な抗体の研究開発

H5 ワクチンや季節性ワクチンを接種したヒトボランティアから採取した抗体産生細胞を用いて、ブロードな反応性を有するヒトモノクローナル抗体を複数種取得することに成功した。

###### iii) 抗体産生細胞の樹立

得られたヒトモノクローナル抗体のうち約 20 種類について、抗体産生 CHO 細胞を樹立した。無血清培地への馴化や中スケールでの培養系の確立を試みている。

##### 2. 次世代免疫賦活化剤の開発

###### i) 自然感染とワクチン後の宿主応答解析

感染マウスにおける気管支肺胞洗浄液及び血清中に存在する microRNA について解析し、感染によって自然免疫の活性化に関与する microRNA が誘導されることが示唆された。

###### ii) 年齢を意識した宿主応答解析

高齢マウスを準備するため、12 ヶ月齢のマウスを購入し当研究室の動物飼育施設で飼育を開始した。18 ヶ月齢以上になるのを待ち、見出した新規免疫賦活化剤の効果を検討する。

###### iii) 免疫賦活化剤の探索とその効果の検証

約 150 種の化合物から安全性が高く新規の免疫賦活化剤活性のスクリーニングを開始し、複数の陽性品を得た。感染防御効果を検証する高次評価に進んだ。

##### 3. ヒトにおける宿主応答解析

###### i) ワクチン投与後の宿主応答解析

新たに医療機関の協力を得、ワクチン接種ボランティアからの血液採取を加速した。少量のマウス血清サンプルからの microRNA 定量に成功しており、同じ手法を用いたヒト検体からの解析を行う。

ii) ワクチンに対する応答の弱いヒトのゲノム解析

上記のように検体入手が加速しており、ワクチン低応答性メカニズムの解明を目指した実験の準備を進める。

4. 企業などへのアプローチ活動

平成 27 年度は未着手。