

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6778112号
(P6778112)

(45) 発行日 令和2年10月28日(2020.10.28)

(24) 登録日 令和2年10月13日(2020.10.13)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 5 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-550304 (P2016-550304)	(73) 特許権者	503360115
(86) (22) 出願日	平成27年9月18日 (2015. 9. 18)		国立研究開発法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/076674		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02016/047592	(74) 代理人	100149548
(87) 国際公開日	平成28年3月31日 (2016. 3. 31)		弁理士 松沼 泰史
審査請求日	平成30年9月12日 (2018. 9. 12)	(74) 代理人	100163496
(31) 優先権主張番号	特願2014-192752 (P2014-192752)		弁理士 荒 則彦
(32) 優先日	平成26年9月22日 (2014. 9. 22)	(74) 代理人	100161207
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		弁理士 西澤 和純
		(74) 代理人	100147267
			弁理士 大槻 真紀子
		(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗インフルエンザウイルス剤、及び抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

J A K 1 遺伝子の発現を抑制させる作用を有する化合物を含み、前記化合物が J A K 1 遺伝子に対する s i R N A、s h R N A、m i R N A、及びこれらを細胞内で生産させることができる R N A i 誘導ベクターからなる群より選択される 1 種以上であることを特徴とする、抗インフルエンザウイルス剤。

【請求項2】

ルキソリチニブ及びトファシチニブからなる群より選択される 1 種以上である J A K 1 の機能を抑制させる作用を有する化合物を含むことを特徴とする、抗インフルエンザウイルス剤。

【請求項3】

抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物をスクリーニングする方法であって、
J A K 1 遺伝子の発現又は J A K 1 の機能に対する抑制又は阻害能がある化合物を、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物としてスクリーニングすることを特徴とする、抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

【請求項4】

細胞に、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物か否かを評価する対象の化合物を導入する工程と、

前記化合物を導入した細胞中における前記遺伝子の発現量を測定する工程と、

J A K 1 遺伝子の発現量が、前記化合物が導入される前の細胞よりも有意に低減された

場合に、当該化合物を抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物として選抜する工程と、を有する、請求項3に記載の抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

【請求項5】

J A K 1の酵素活性を、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物か否かを評価する対象の化合物の存在下で測定する工程と、

前記化合物の存在下におけるJ A K 1の酵素活性が、前記化合物の非存在下よりも低下した場合に、当該化合物を抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物として選抜する工程と、

を有する、請求項3に記載の抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトをはじめとする宿主細胞の生体分子を標的とした抗インフルエンザウイルス剤、及び当該抗インフルエンザウイルス剤の候補分子をスクリーニングする方法に関する。

本願は、2014年9月22日に、日本に出願された特願2014-192752号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザウイルスは、毎年流行病を引き起こし、ときには何百万人もの犠牲者を出すパンデミックを引き起こす。このため、より有効な抗インフルエンザウイルス剤の開発が求められている。抗インフルエンザウイルス剤の標的分子としては、ウイルスタンパク質よりも、ウイルスの感染や複製に寄与する宿主細胞の生体分子の方が好ましい。宿主細胞の生体分子の方が、ウイルスタンパクに比べて薬剤による選択圧による変異が生じ難いためである。

20

【0003】

近年、6個のゲノムワイドスクリーニングにより、インフルエンザウイルスのライフサイクルに何等かの役割を果たしていると考えられる合計1449個のヒト遺伝子(110個のハエ(*Drosophila*)遺伝子のヒトオルソログを含む。)が同定された(非特許文献1~6参照。)。各ゲノムワイドスクリーニングの結果は、それぞれ部分的にしか一致しないが、これは、実験条件が相違するためと推察される。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Brass, et al., Cell, 2009, vol.139, p.1243~1254.

【非特許文献2】Hao, et al., Nature, 2008, vol.454, p.890~893.

【非特許文献3】Karlis, et al., Nature, 2010, vol.463, p.818~822.

【非特許文献4】Konig, et al., Nature, 2010, vol.463, p.813~817.

【非特許文献5】Shapira, et al., Cell, 2009, vol.139, p.1255~1267.

【非特許文献6】Sui, et al., Virology, 2009, vol.387, p.473~481.

40

【非特許文献7】Neumann, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, vol.96, p.9345~9350.

【非特許文献8】Tobita, et al., Medical microbiology and immunology, 1975, vol.162, p.9~14.

【非特許文献9】Ozawa et al., Journal of General Virology, 2011, vol. 92, p.2879~2888.

【非特許文献10】Octaviani et al., Journal of Virology, 2010, vol.84, p.10918~10922.

【非特許文献11】Kawakami et al., Journal of Virological Methods, 2011, vol.173, p.1~6.

50

【非特許文献 1 2】Wishart et al., Nucleic Acids Research, 2006, vol.34, p.D668 ~ 672.

【非特許文献 1 3】Patterson et al., Journal of General Virology, 1979, vol.43, p.223 ~ 229.

【非特許文献 1 4】Widjaja et al., Journal of Virology, 2010, vol.84, p.9625 ~ 9631.

【非特許文献 1 5】Noda et al., Nature, 2006, vol.439, p.490 ~ 492.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

幾つかのゲノムワイドスクリーニングにより、インフルエンザウイルスの複製等にかかわる宿主細胞のタンパク質が特定されている。しかし、これらのタンパク質がインフルエンザ感染症にどのように影響するかについては未だ明らかにされておらず、新たな抗インフルエンザウイルス剤の候補分子となり得るのかどうかは不明である。

【0006】

本発明は、ヒトをはじめとする宿主細胞内の生体分子であって、インフルエンザウイルスのライフサイクルに關与するタンパク質を標的とした抗インフルエンザウイルス剤、及び新たな抗インフルエンザウイルス剤の候補分子のスクリーニング方法を提供することを主たる目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意研究した結果、ヒト胚腎臓由来の HEK 293 細胞の細胞溶解液を用いた免疫沈降法により、インフルエンザウイルスタンパク質と相互作用を有する 1292 個のヒトタンパク質を特定し、次いで、RNA 干渉を利用し、これらのヒトタンパク質の中から、発現量を抑制した場合に宿主細胞の増殖性を大きく損なうことなく、インフルエンザウイルスの増殖が顕著に抑制されるタンパク質を特定することにより、本発明を完成させた。

【0008】

すなわち、本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤、及び抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法は、下記 [1] ~ [5] である。

[1] JAK1 遺伝子の発現を抑制させる作用を有する化合物を含み、前記化合物が JAK1 遺伝子に対する siRNA、shRNA、miRNA、及びこれらを細胞内で生産させることができる RNAi 誘導ベクターからなる群より選択される 1 種以上であることを特徴とする、抗インフルエンザウイルス剤。

[2] ルキソリチニブ及びトファシチニブからなる群より選択される 1 種以上である JAK1 の機能を抑制させる作用を有する化合物を含むことを特徴とする、抗インフルエンザウイルス剤。

[3] 抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物をスクリーニングする方法であって、
JAK1 遺伝子の発現又は JAK1 の機能に対する抑制又は阻害能がある化合物を、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物としてスクリーニングすることを特徴とする、抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

[4] 細胞に、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物が否かを評価する対象の化合物を導入する工程と、

前記化合物を導入した細胞中における前記遺伝子の発現量を測定する工程と、
JAK1 遺伝子の発現量が、前記化合物が導入される前の細胞よりも有意に低減された場合に、当該化合物を抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物として選抜する工程と、を有する、前記 [3] の抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

[5] JAK1 の酵素活性を、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物が否かを評価する対象の化合物の存在下で測定する工程と、

前記化合物の存在下における JAK1 の酵素活性が、前記化合物の非存在下よりも低下

10

20

30

40

50

した場合に、当該化合物を抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物として選抜する工程と、

を有する、前記 [3] の抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤は、インフルエンザウイルスを構成する物質ではなく、宿主細胞のタンパク質を標的としているため、薬剤による選択圧による変異が生じ難いという利点がある。

また、本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法は、インフルエンザウイルスの感染や複製に関与する宿主細胞のタンパク質を標的とした抗インフルエンザウイルス剤の候補分子をスクリーニングできるため、新たな抗インフルエンザウイルス剤の設計及び製造に好適である。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】実施例 2 において、Golgicide A で処理した細胞のウイルス力価 (\log_{10} (PFU/mL)) と細胞生存率 (%) の測定結果を示した図である。

【図 2】実施例 2 において、Ruxolitinib で処理した細胞のウイルス力価 (\log_{10} (PFU/mL)) と細胞生存率 (%) の測定結果を示した図である。

【図 3】実施例 3 において、コントロール *siRNA* を導入した細胞 (上段) と、*JAK1* 遺伝子の *siRNA* を導入した細胞 (下段) の電子顕微鏡写真である。

20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 】

< 抗インフルエンザウイルス剤 >

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤は、インフルエンザウイルスタンパク質と相互作用する宿主細胞タンパク質であって、宿主細胞内において発現が抑制されると、宿主細胞の増殖性を過度に損なうことなく、インフルエンザウイルスの複製が抑制されるタンパク質をコードする遺伝子 (以下、「抗 *Flu* 遺伝子」ということがある。) の発現を抑制させる作用、又は前記タンパク質の機能を抑制させる作用を有する。抗 *Flu* 遺伝子としては、具体的には、*JAK1* 遺伝子、*CHERP* 遺伝子、*DDX21* 遺伝子、*DNAJC11* 遺伝子、*EEF1A2* 遺伝子、*HNRNP K* 遺伝子、*ITM2B* 遺伝子、*MRC L3* 遺伝子、*MYH10* 遺伝子、*NDUFS8* 遺伝子、*PSMD13* 遺伝子、*RPL26* 遺
伝子、*SDF2L1* 遺伝子、*SDF4* 遺伝子、*SFRS2B* 遺伝子、*SNRPC* 遺伝子、*SQSTM1* 遺
伝子、*TAF15* 遺伝子、*TOMM40* 遺伝子、*TRM2B* 遺伝子、*USP9X* 遺
伝子、*BASP1* 遺
伝子、*THOC2* 遺
伝子、*PPP6C* 遺
伝子、*TESC* 遺
伝子、*PCDHB12* 遺
伝子、*CCDC56* 遺
伝子、*CLTC* 遺
伝子、*CYC1* 遺
伝子、*NI
BP* 遺
伝子、*ZC3H15* 遺
伝子、*C14orf173* 遺
伝子、*ANP32B* 遺
伝子、*BAG3* 遺
伝子、*BRD8* 遺
伝子、*CCDC135* 遺
伝子、*DDX55* 遺
伝子、*DPM3* 遺
伝子、*EEF2* 遺
伝子、*IGF2BP2* 遺
伝子、*KRT14* 遺
伝子、*S100A4* 遺
伝子、*ASCC3L1* 遺
伝子、*C19orf43* 遺
伝子、*DKFZp564K142* 遺
伝子、*FAM73B* 遺
伝子、*FLJ20303* 遺
伝子、*GBF1* 遺
伝子、*NCLN* 遺
伝子、*L
RPPRC* 遺
伝子、又は *RCN1* 遺
伝子が挙げられる。後記実施例に示すように、これらの抗 *Flu* 遺
伝子がコードするタンパク質は、11種のインフルエンザウイルスタンパク質 (*PB2*、*PB1*、*PA*、*HA*、*NP*、*NA*、*M1*、*M2*、*NS1*、*NS2*、及び *PB1-F2*) と直接的又は間接的に結合するタンパク質であり、両者の相互作用がインフルエンザウイルスのライフサイクルに重要な役割を果たす。

30

40

【 0 0 1 2 】

本発明に係る抗 *Flu* 遺伝子のうち、*JAK1* 遺伝子、*CHERP* 遺伝子、*DDX21* 遺
伝子、*DNAJC11* 遺
伝子、*EEF1A2* 遺
伝子、*HNRNP K* 遺
伝子、*ITM2B* 遺
伝子、*MRC L3* 遺
伝子、*MYH10* 遺
伝子、*NDUFS8* 遺
伝子、*PSMD13* 遺
伝子、*RPL26* 遺
伝子、*SDF2L1* 遺
伝子、*SDF4* 遺
伝子、*SFRS2B* 遺
伝子、*S*

50

NRPC遺伝子、SQSTM1遺伝子、TAF15遺伝子、TOMM40遺伝子、TRM2B遺伝子、USP9X遺伝子、BASP1遺伝子、THOC2遺伝子、PPP6C遺伝子、TESC遺伝子、及びPCDH12遺伝子は、宿主細胞内におけるインフルエンザウイルスのvRNA又はNPタンパク質のインフルエンザウイルス様粒子への取込みに関与するタンパク質をコードする遺伝子である。このため、これらの遺伝子の発現を抑制させる作用、又はこれらの遺伝子がコードするタンパク質の機能を抑制させる作用を有する物質を宿主細胞に投与することにより、宿主細胞内においてvRNA又はNPタンパク質のインフルエンザウイルス様粒子への取込みが抑制される結果、抗インフルエンザウイルス効果（インフルエンザウイルスの複製阻害効果）が奏される。

【0013】

本発明に係る抗Flu遺伝子のうち、CCDC56遺伝子、CLTC遺伝子、CYC1遺伝子、NIBP遺伝子、ZC3H15遺伝子、C14orf173遺伝子、ANP32B遺伝子、BAG3遺伝子、BRD8遺伝子、CCDC135遺伝子、DDX55遺伝子、DPM3遺伝子、EEF2遺伝子、IGF2BP2遺伝子、KRT14遺伝子、及びS100A4遺伝子は、宿主細胞内におけるインフルエンザウイルスの複製又は転写に関与するタンパク質をコードする。このため、これらの遺伝子の発現を抑制させる作用、又はこれらの遺伝子がコードするタンパク質の機能を抑制させる作用を有する物質を宿主細胞に投与することにより、宿主細胞内においてインフルエンザウイルスの複製又は転写が抑制される結果、抗インフルエンザウイルス効果が奏される。

【0014】

本発明に係る抗Flu遺伝子のうち、ASCC3L1遺伝子、BRD8遺伝子、C19orf43遺伝子、DDX55遺伝子、DKFZp564K142遺伝子、DPM3遺伝子、EEF2遺伝子、FAM73B遺伝子、FLJ20303遺伝子、GBF1遺伝子、NCLN遺伝子、C14orf173遺伝子、LRPPRC遺伝子、及びRCN1遺伝子は、宿主細胞内におけるインフルエンザウイルス様粒子の形成に関与するタンパク質をコードする。このため、これらの遺伝子の発現を抑制させる作用、又はこれらの遺伝子がコードするタンパク質の機能を抑制させる作用を有する物質を宿主細胞に投与することにより、宿主細胞内においてインフルエンザウイルス様粒子の形成が抑制される結果、抗インフルエンザウイルス効果が奏される。

【0015】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、本発明に係る抗Flu遺伝子の発現を抑制させる作用を有する物質を有効成分とするものが挙げられる。抗Flu遺伝子の発現を抑制させる作用を有する物質としては、例えば、抗Flu遺伝子のcDNAの部分領域（RNAi（RNA干渉）標的領域）のセンス鎖とアンチセンス鎖からなる二本鎖構造を有するsiRNA（small interfering RNA）、shRNA（short hairpin RNA）又はmiRNA（micro RNA）が挙げられる。また、宿主細胞内において、siRNA等を生産させることができるRNAi誘導ベクターであってもよい。siRNA、shRNA、miRNA、及びRNAi誘導ベクターの作製は、標的とする抗Flu遺伝子のcDNAの塩基配列情報から、常法により設計し製造することができる。また、RNAi誘導ベクターは、市販の各種RNAiベクターの塩基配列に、RNAi標的領域の塩基配列を挿入することによって作製することもできる。

【0016】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、本発明に係る抗Flu遺伝子がコードするタンパク質の機能（以下、単に「本発明に係る抗Flu遺伝子の機能」ということがある。）を抑制させる作用を有する物質を有効成分とするものが挙げられる。抗Flu遺伝子の機能を抑制させる作用を有する物質としては、本発明に係る抗Flu遺伝子がコードするタンパク質（以下、単に「本発明に係る抗Fluタンパク質」ということがある。）に対する抗体のように、本発明に係る抗Fluタンパク質と結合することにより、当該タンパク質の機能を抑制する物質が挙げられる。当該抗体としては、モノクローナル

10

20

30

40

50

抗体でもよく、ポリクローナル抗体でもよい。また、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の人工的に合成された抗体であってもよい。これらの抗体は、常法により製造することができる。

【0017】

本発明に係る抗Fluタンパク質が酵素であった場合、抗Flu遺伝子の機能を抑制させる作用を有する物質としては、当該酵素に対する阻害剤であってもよい。

【0018】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、1種類の抗Flu遺伝子の発現や機能を抑制する作用を有するものであってもよく、2種類以上の抗Flu遺伝子の発現や機能を抑制する作用を有するものであってもよい。

10

【0019】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、JAK1遺伝子、GBF1遺伝子、及びUSP9X遺伝子からなる群より選択される1種以上の抗Flu遺伝子の発現や機能を抑制する作用を有するものが好ましく、JAK1遺伝子及びGBF1遺伝子からなる群より選択される1種以上の抗Flu遺伝子の発現や機能を抑制する作用を有するものがより好ましく、JAK1遺伝子の発現や機能を抑制する作用を有するものがさらに好ましい。

【0020】

JAK1遺伝子の機能を抑制する作用を有する物質としては、Ruxolitinib (CAS No. : 941678-49-5) や Tofacitinib (CAS No. : 477600-75-2) 等のJAK阻害剤が挙げられる。Ruxolitinibは骨髄線維症の治療薬として、Tofacitinibはリウマチ薬として、それぞれ承認されており、人体に対して比較的安全に使用可能な物質である。また、GBF1遺伝子の機能を抑制する作用を有する物質としては、Golgicide A (CAS No. : 1005036-73-6) が挙げられる。Golgicide Aは、投与濃度を適切に設定することによって宿主細胞の増殖に影響を及ぼすことなくインフルエンザウイルスの増殖を抑制することができる。

20

【0021】

その他、Tofacitinib (CP-690550) Citrate (3-((3R,4R)-4-methyl-3-(methyl(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)piperidin-1-yl)-3-oxopropanenitrile)、Tyrophostin B42 (AG-490) ((E)-N-benzyl-2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acrylamide)、Baricitinib (LY3009104、INCB028050) (2-[1-ethylsulfonyl-3-[4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)pyrazol-1-yl]azetid-3-yl]acetonitrile)、AT9283 (1-cyclopropyl-3-(3-(5-(morpholinomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)urea)、Momeletinib (CYT387) (N-(cyanomethyl)-4-(2-(4-morpholinophenylamino)pyrimidin-4-yl)benzamide)、CEP33779 ([1,2,4]Triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine, N-[3-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl]-8-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-)、NV P - BSK805 (8-(3,5-difluoro-4-(morpholinomethyl)phenyl)-2-(1-(piperidin-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl)quinoxaline)、ZM39923 (1-Propanone, 3-[(1-methylethyl)(phenylmethyl)amino]-1-(2-naphthalenyl)-, hydrochloride (1:1))、Filgotinib (GLPG0634) (N-[5-[4-[(1,1-Dioxido-4-thiomorpholinyl)methyl]phenyl][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl]cyclopropanecarboxamide)、JANEX-1 (4-[(6,7-dimethoxy-4-quinazoliny)amino]-phenol)、NV P - BSK805 (4-[[2,6-difluoro-4-[3-(1-piperidin-4-yl)pyrazol-4-yl]quinoxalin-5-yl]phenyl]methylmorpholine; dihydrochloride)、SB1317 (20-Oxa-5,7,14,27-tetraazatetracyclo[19.3.1.12,6.18,12]heptacos-1(25),2,4,6(27),8,10,12(26),16,21,23-decaene, 14-methyl-) 等のJAK阻害剤も、本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤として用いられる。また、USP9X遺伝子の機能を抑制する作用を有する物質としては、DUB阻害剤であるWP1130 (Degrasyn) ((2E)-3-(6-bromo-2-pyridinyl)-2-cyano-N-[1S-p

30

40

50

henylbutyl]-2-propenamide) が挙げられる。

【0022】

本発明に係る抗Flu遺伝子の発現を抑制させる作用を有する物質を有効成分とする場合、本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、抗Flu遺伝子の発現量を、当該抗インフルエンザウイルス剤の非存在下と比べて、50%以上低下させられるものであることが好ましく、75%以上低下させられるものであることがより好ましく、80%以上低下させられるものであることがさらに好ましい。同様に、抗Flu遺伝子の機能を抑制させる作用を有する物質を有効成分とする場合、本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、抗Flu遺伝子の機能を、当該抗インフルエンザウイルス剤の非存在下と比べて、50%以上低下させられるものであることが好ましく、75%以上低下させられるものであることがより好ましく、80%以上低下させられるものであることがさらに好ましい。

10

【0023】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤は、動物に対するインフルエンザウイルスの感染予防や、インフルエンザウイルスに感染した動物に対する治療に用いることができる。インフルエンザウイルスへの感染予防又はインフルエンザに対する治療のために本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤が投与される動物としては、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、トラ等の哺乳類；ニワトリ、アヒル、ウズラ、ガチョウ、カモ、シチメンチョウ、セキセイインコ、オウム、オシドリ、ハクチョウ等の鳥類が挙げられる。本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤としては、ヒトに対するインフルエンザウイルスの感染予防や、インフルエンザウイルスに感染した動物に対する治療に用いられるものであることが好ましい。

20

【0024】

インフルエンザの治療は、インフルエンザウイルスに感染した動物又はインフルエンザウイルスへの感染を予防する必要がある動物に対して、本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤を有効量投与することにより行える。抗インフルエンザウイルス剤の有効量は、投与された動物に対し、投与されていない場合に比べて体内のインフルエンザウイルスの量を低減させられる量、又はインフルエンザウイルスに対する感染を防止できる量であればよく、当該抗インフルエンザウイルス剤により重篤な副作用が生じない量であることが好ましい。各抗インフルエンザウイルス剤の有効量は、抗インフルエンザウイルス剤の種類、投与対象の動物の種類、投与方法等を考慮して実験的に求めることができる。例えば、インフルエンザウイルスを感染させた実験動物に対して投与した場合に、投与していない実験動物と比べて当該実験動物の体内におけるインフルエンザウイルス量を、PFUで70%以下、好ましくは80%以下、より好ましくは90%以下にできる量を、有効量と規定することもできる。

30

【0025】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤は、経口投与、静注、鼻腔又は口腔への直接投与、経皮投与等の各種投与形態に適した剤型に、常法により製剤化できる。当該剤型としては、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、チュアブル剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤、注射剤、含嗽剤、噴霧剤、貼付剤、軟膏剤等が挙げられる。

40

【0026】

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤は、抗Flu遺伝子の発現や機能を抑制する作用を有する物質に加えて、各種添加剤を含有していてもよい。当該添加剤としては、賦形剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、溶剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、矯味矯臭剤、着色剤等が挙げられる。これらの添加剤としては、薬学上許容される物質であって、医薬の製剤化に使用されているものの中から適宜選択して使用することができる。

【0027】

<抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法>

本発明に係る抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法（以下、「本発明に係

50

るスクリーニング方法」ということがある。)は、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物をスクリーニングする方法であって、本発明に係る抗F1u遺伝子の発現又は機能に対する抑制又は阻害能がある候補化合物を、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物としてスクリーニングすることを特徴とする。本発明に係るスクリーニング方法においては、1種類の抗F1u遺伝子の発現又は機能に対する抑制又は阻害能がある物質をスクリーニングする方法であってもよく、2種類以上の抗F1u遺伝子の発現又は機能に対する抑制又は阻害能がある物質をスクリーニングする方法であってもよい。

【0028】

具体的には、抗F1u遺伝子の発現に対する抑制能又は阻害能がある物質のスクリーニングは、まず、細胞に、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物が否かを評価する対象の化合物を導入し、抗F1u遺伝子の発現が抑制されたか否かを調べる。抗F1u遺伝子の発現が有意に抑制された場合には、当該化合物を抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物として選抜する。すなわち、細胞に、抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物が否かを評価する対象の化合物を導入する工程と、当該化合物を導入した細胞中における抗F1u遺伝子の発現量を測定する工程と、当該抗F1u遺伝子の発現量が、当該化合物が導入される前の細胞における当該抗F1u遺伝子の発現量よりも有意に低減された場合に、当該化合物を抗インフルエンザウイルス剤の候補化合物として選抜する工程と、により行う。

【0029】

スクリーニングに使用する細胞は、インフルエンザウイルスの宿主となる生物種の細胞であることが好ましく、取扱いの利便性から、哺乳類や鳥類の培養細胞株であることがより好ましく、ヒトの培養細胞株であることがさらに好ましい。また、評価対象の化合物は、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、リン酸カルシウム法等により、細胞内へ導入することができる。評価対象の化合物が低分子化合物である場合には、当該化合物を培養液に添加することにより、当該化合物を細胞内へ導入することができる。

【0030】

抗F1u遺伝子の発現量の変化は、mRNAレベルで評価してもよく、タンパク質レベルで評価してもよい。例えば、RT-PCR法等の核酸増幅反応を利用したり、免疫組織化学法やウェスタンブロット法により、抗F1u遺伝子の発現量を定量的に比較することができる。具体的には、例えば、評価対象の化合物を導入した状態で1~2日間培養した細胞から抽出されたRNAから逆転写反応により合成されたcDNAを鋳型として抗F1u遺伝子のcDNAの全長又は一部分を増幅するPCRを行う。得られた増幅産物量が、当該化合物を導入する前の細胞から同様にして得られた増幅産物量よりも有意に減少している場合に、当該化合物は抗F1u遺伝子の発現に対する抑制能又は阻害能があると評価される。また、例えば、評価対象の化合物を導入した状態で1~2日間培養した細胞と当該化合物を導入する前の細胞に対して、細胞内の抗F1uタンパク質を蛍光標識した抗体を用いて染色し、細胞当たりの蛍光強度を比較する。当該化合物を導入した細胞の細胞当たりの蛍光強度が、当該化合物を導入していない細胞よりも有意に小さい場合には、当該化合物は抗F1u遺伝子の発現に対する抑制又は阻害能があると評価される。また、例えば、評価対象の化合物を導入した状態で1~2日間培養した細胞と当該化合物を導入する前の細胞の細胞抽出液(ライセート)を電気泳動して分離した後に膜に転写し、当該膜上の抗F1uタンパク質バンドを蛍光標識した抗体を用いて染色し、バンドの蛍光強度を比較する。当該化合物を導入した細胞に由来する抗F1uタンパク質バンドの蛍光強度が、当該化合物を導入していない細胞よりも有意に小さい場合には、当該化合物は抗F1u遺伝子の発現に対する抑制又は阻害能があると評価される。

【0031】

抗F1uタンパク質の機能が、特定の生体分子との相互作用である場合には、例えば、抗F1uタンパク質と当該特定の生体分子との結合アッセイを、評価対象の化合物の存在下と非存在下において行い、評価対象の化合物の存在下において非存在下よりも両者の結合性が低下した場合に、当該化合物は抗F1u遺伝子の機能に対する抑制又は阻害能があ

10

20

30

40

50

ると評価される。また、抗Fluタンパク質が酵素である場合には、例えば、抗Fluタンパク質の酵素活性を評価対象の化合物の存在下と非存在下において測定し、評価対象の化合物の存在下において非存在下よりも抗Fluタンパク質の酵素活性が低下した場合に、当該化合物は抗Flu遺伝子の機能に対する抑制又は阻害能があると評価される。

【実施例】

【0032】

次に、実施例等により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

【0033】

<細胞の培養>

以下の実施例において、HEK293細胞及びA549細胞（ヒト肺上皮細胞由来）は、10%FCS（ウシ胎児血清）と抗生物質を含有させたDMEM培地（シグマアルドリッチ社製）で、5%二酸化炭素雰囲気下、37℃で培養した。MDCK（Madin-Darby canine kidney）細胞は、5%NCS（ウシ新生児血清）含有イーグル最小必須培地（Eagle's MEM）（GIBCO社製）で、5%二酸化炭素雰囲気下、37℃で培養した。

【0034】

<インフルエンザウイルス>

以下の実施例において使用したインフルエンザウイルスは、特に記載のない限り、A型インフルエンザウイルス（A/WSN/33, H1N1サブタイプ；WSN）を用いた。当該ウイルスは、マウスに適応したヒト由来インフルエンザウイルスであり、リバーシジェネティクスを用いた手法（非特許文献7参照。）により作製されたものであり、MDCK細胞中で増殖させた。また、ウイルスの力価は、MDCK細胞を用いたブランクアッセイにより測定した（非特許文献8参照。）。

【0035】

PB2-KO/R1ucウイルス（ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有するPB2ノックアウトウイルス）は、複製能が欠落したウイルスであり、ポリメラーゼPB2タンパク質のコード領域に、レニラルシフェラーゼをコードするレポーター遺伝子を有する。PB2-KO/R1ucウイルスは、pPolIPB2(120)R1uc(120)（PB2セグメントに由来するN末端及びC末端の120塩基に挟まれたレニラルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド）と、7つのウイルスRNAセグメントをコードするプラスミドとから製造した。PB2-KO/R1ucウイルスの増殖と力価の測定は、PB2タンパク質を恒常的に発現しているMDCK細胞中にて行った（非特許文献9参照。）。

【0036】

<抗体>

以下の実施例において使用したマウス抗HA抗体（WS3-54）、マウス抗NA抗体（WS5-29）、及びマウス抗M1抗体（WS-27/52）は、国立感染症研究所の高下恵美主任研究官から提供されたものを用いた。マウス抗Aichi NP抗体（2S-347/3）及びウサギ抗WSNウイルス抗体（R309）は、発明者らが常法により作製したものを用いた。抗β-アクチン（AC-74）抗体は、シグマアルドリッチ社から購入したものを用いた。

【0037】

[実施例1]

<インフルエンザウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質の同定>

本発明者らは、まず、免疫沈降法により、インフルエンザウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定した。

具体的には、まず、11種のインフルエンザウイルスタンパク質（PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、NS2、及びPB1-F2）について、それぞれ、N末端又はC末端にFlagタグを融合させたFlag融合タンパク質をコードするプラスミドを、HEK293細胞にトランスフェクトとした。トランスフェクションは、TransIT 293 reagent（Mirus Bio Corp製）を用いて行った。トランスフェクション

10

20

30

40

50

から24時間培養した細胞を、細胞溶解バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitor mixture Complete Mini (Roche, Mannheim, Germany))に混合し、4℃、1時間インキュベートすることにより溶解させてライセートを得た。得られたライセートを遠心分離処理して回収した上清に、抗FLAG抗体が結合したアフィニティゲル(anti-FLAG M2 Affinity Gel、シグマアルドリッチ社製)を混合して4℃、18時間インキュベートした。その後、アフィニティゲルを、細胞溶解バッファーで3回、次いでIP(免疫沈降)バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)で2回洗浄した後、0.5 mg/mLのFLAGペプチド(F1804、シグマアルドリッチ社製)を含有させたIPバッファーで4℃、2時間攪拌した。その後、遠心分離処理によりアフィニティゲルを除去し、上清を回収した。

回収された上清を、Ultrafree-MC filter(ミリポア社製)でフィルター濾過した後、含有されているタンパク質を、nano LC-MS/MS(nanoflow liquid chromatography tandem mass spectrometry)分析により同定した。マススペクトリデータの解析には、Dina(ケーワイエーテクノロジー社製)を組み合わせたQ-STAR Elite(エービー・サイエックス社製)を用いた。免疫共沈降したHEK293細胞(宿主細胞)のタンパク質の同定は、得られたMS/MSシグナルを、RefSeq(National Center for Biotechnology Informationヒトタンパク質データベース)と比較して行った。当該比較は、マスコットアルゴリズム(version 2.2.04; Matrix Science社製)を用い、下記の条件で行った: variable modifications, oxidation (Met), N-acetylation; maximum missed cleavages, 2; peptide mass tolerance, 200 ppm; MS/MS tolerance, 0.5 Da.)。タンパク質の同定は、マスコットスコアが有意に閾値を超えるMS/MSシグナルが少なくとも1つあることを条件とした。

【0038】

この結果、388個の宿主タンパク質がPB2タンパク質と免疫共沈降し、322個の宿主タンパク質がPB1タンパク質と免疫共沈降し、304個の宿主タンパク質がPAタンパク質と免疫共沈降し、351個の宿主タンパク質がHAタンパク質と免疫共沈降し、574個の宿主タンパク質がNPタンパク質と免疫共沈降し、675個の宿主タンパク質がNAタンパク質と免疫共沈降し、659個の宿主タンパク質がM1タンパク質と免疫共沈降し、531個の宿主タンパク質がM2タンパク質と免疫共沈降し、113個の宿主タンパク質がNS1タンパク質と免疫共沈降し、42個の宿主タンパク質がNS2タンパク質と免疫共沈降し、81個の宿主タンパク質がPB1-F2タンパク質と免疫共沈降した。つまり、合計1292個の宿主タンパク質が、11種のインフルエンザウイルスタンパク質のいずれかと免疫共沈降した。

【0039】

< siRNA >

次いで、免疫沈降により同定された1292個の宿主タンパク質をコードする遺伝子について、RNA干渉を行い、これらのタンパク質が実際にインフルエンザウイルスの増殖に関与するか否かを調べた。使用するsiRNAは、各宿主遺伝子について、それぞれ、ゲノムワイド Human siRNA Library (FlexiTube siRNA; キアゲン社製)から2種類を選択して用いた。また、ネガティブコントロールとして、AllStars Negative Control siRNA(キアゲン社製)(コントロールsiRNA)を用いた。また、WSNウイルスのNP遺伝子のsiRNA(GGA UCU UAU UUC UUC GGA GUU)は、シグマアルドリッチ社から購入した。

具体的には、まず、RNAiMAX Reagent(Invitrogen社製)を用いて、HEK293細胞に、2種類のsiRNAを25 nMずつ(最終濃度: 50 nM)、2回トランスフェクションした。

【0040】

< 細胞の生残性 >

siRNAの2回目のトランスフェクションから24時間経過後の細胞の生存性を、CellTiter-Glo assay system(プロメガ社製)を添付の指示書に従って用いて調べた。コ

10

20

30

40

50

ントロール *siRNA* を導入した細胞の生細胞数に対する、各 *siRNA* を導入した細胞の生細胞数の割合を、細胞生存率 (%) として算出した。

【 0 0 4 1 】

< q R T - P C R >

siRNA のトランスフェクション前とトランスフェクションから 4 8 時間経過後の細胞について、q R T - P C R (quantitative reverse transcription-PCR) を行い、*siRNA* により標的の宿主遺伝子の発現が抑制されたかを確認した。

具体的には、まず、前記 < *siRNA* > と同様にして *siRNA* を H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクションし、2 回目のトランスフェクションから 4 8 時間経過後の細胞を、前記細胞溶解バッファーに溶解させてライセートを調製した。調製されたライセートから、Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (プロメガ社製) を用いて、総 R N A を抽出し、これを鋳型として、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡社製) 又は SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen 社製) を用いて逆転写反応を行った。合成された c D N A を鋳型とし、各宿主遺伝子に特異的なプライマーセットと THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡社製) を用いて、定量的 P C R を行った。各宿主遺伝子の m R N A 発現量レベルの比較は、 $2^{-\Delta C t}$ 法により算出した。コントロール *siRNA* を導入した細胞における m R N A 発現量に対する、各 *siRNA* を導入した細胞における m R N A 発現量の割合を、ノックダウン効率 (%) として算出した。

【 0 0 4 2 】

< ウイルスの増殖性 >

2 つの 2 4 ウェルディッシュに、前記 < *siRNA* > と同様にして *siRNA* を H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクションし、2 回目のトランスフェクション後の細胞に 5 0 p f u (plaque-forming unit) のインフルエンザウイルスを感染させた。ウイルス感染から 4 8 時間経過後、培養上清を回収し、M D C K 細胞を用いたプラークアッセイにより、ウイルスの力価を調べた。各 *siRNA* を導入した細胞におけるウイルス力価の常用対数値を、コントロール *siRNA* を導入した細胞におけるウイルス力価の常用対数値で割った値を、ウイルス力価の変化量として算出した。

【 0 0 4 3 】

この結果、3 2 3 個の宿主遺伝子において、*siRNA* のトランスフェクションにより遺伝子発現レベルが低下した。この 3 2 3 個のうち、2 9 9 個の宿主遺伝子では、常用対数値で 2 以上インフルエンザウイルスの力価が低下し (すなわち、ウイルス力価の変化量が - 2 以上)、2 4 個の宿主遺伝子では、常用対数値で 1 以上インフルエンザウイルスの力価が向上した (すなわち、ウイルス力価の変化量が 1 以上)。中でも、以下の 9 1 個の宿主遺伝子は、宿主細胞の生存性が 8 0 % 以上維持されているにもかかわらず、常用対数値で 3 以上インフルエンザウイルスの力価が低下しており、抗インフルエンザウイルス剤の標的として有用であることが示唆された: A N P 3 2 B 遺伝子、A P 2 A 2 遺伝子、A S C C 3 L 1 遺伝子、A T P 5 O 遺伝子、B A G 3 遺伝子、B A S P 1 遺伝子、B R D 8 遺伝子、B U B 3 遺伝子、C 1 4 o r f 1 7 3 遺伝子、C 1 9 o r f 4 3 遺伝子、C A P R I N 1 遺伝子、C C D C 1 3 5 遺伝子、C C D C 5 6 遺伝子、C H E R P 遺伝子、C I R B P 遺伝子、C L T C 遺伝子、C N O T 1 遺伝子、C T N N B 1 遺伝子、C Y C 1 遺伝子、D D X 2 1 遺伝子、D D X 5 5 遺伝子、D K F Z p 5 6 4 K 1 4 2 遺伝子、D N A J C 1 1 遺伝子、D P M 3 遺伝子、E E F 1 A 2 遺伝子、E E F 2 遺伝子、F A M 7 3 B 遺伝子、F L J 2 0 3 0 3 遺伝子、G B F 1 遺伝子、G E M I N 4 遺伝子、H N R N P K 遺伝子、I A R S 遺伝子、I G F 2 B P 2 遺伝子、I T G A 3 遺伝子、I T G B 4 B P 遺伝子、I T M 2 B 遺伝子、J A K 1 遺伝子、K I A A 0 6 6 4 遺伝子、K R T 1 4 遺伝子、L R P P R C 遺伝子、M R C L 3 遺伝子、M Y H 1 0 遺伝子、N C A P D 3 遺伝子、N C L N 遺伝子、N D U F A 1 0 遺伝子、N D U F S 8 遺伝子、N F I A 遺伝子、N I B P 遺伝子、N U P 1 6 0 遺伝子、N U P 2 0 5 遺伝子、P C D H B 1 2 遺伝子、P H B 遺伝子、P P P 6 C 遺伝子、P S M A 4 遺伝子、P S M A 5 遺伝子、P S M B 2 遺伝子、P S M

C 1 遺伝子、P S M C 4 遺伝子、P S M C 6 遺伝子、P S M D 1 1 遺伝子、P S M D 1 2 遺伝子、P S M D 1 3 遺伝子、P S M D 1 4 遺伝子、P S M D 2 遺伝子、P S M D 6 遺伝子、R C N 1 遺伝子、R P L 2 6 遺伝子、S 1 0 0 A 4 遺伝子、S A M H D 1 遺伝子、S D F 2 L 1 遺伝子、S D F 4 遺伝子、S F 3 A 2 遺伝子、S F 3 B 2 遺伝子、S F 3 B 4 遺伝子、S F R S 1 0 遺伝子、S F R S 2 B 遺伝子、S N R P 7 0 遺伝子、S N R P C 遺伝子、S N R P D 3 遺伝子、S Q S T M 1 遺伝子、S T K 3 8 遺伝子、T A F 1 5 遺伝子、T E S C 遺伝子、T H O C 2 遺伝子、T O M M 4 0 遺伝子、T R I M 2 8 遺伝子、U A P 1 遺伝子、U S P 9 X 遺伝子、V C P 遺伝子、X P O 1 遺伝子、Z C 3 H 1 5 遺伝子。

【 0 0 4 4 】

前記 9 1 個の宿主遺伝子のウイルス力価の変化量、細胞生存率(%)、及びノックダウン効率(%)を、表 1 ~ 3 に示す。

【 0 0 4 5 】

【表 1】

遺伝子名	遺伝子 ID	ウイルス力価の 変化量	細胞生存率(%)	ノックダウン効率 (%)
ANP32B	10541	-4.65	99.45	1.56
AP2A2	161	-3.18	95.81	6.28
ASCC3L1	23020	-3.08	96.11	2.91
ATP5O	539	-3.74	82.96	13.09
BAG3	9531	-4.11	103.25	5.07
BASP1	10409	-3.51	107.98	40.30
BRD8	10902	-4.86	114.74	48.14
BUB3	9184	-3.28	97.88	9.68
C14orf173	64423	-3.01	87.95	14.83
C19orf43	79002	-4.18	108.05	8.39
CAPRIN1	4076	-4.83	97.06	5.98
CCDC135	84229	-4.13	114.76	2.24
CCDC56	28958	-3.45	101.34	33.50
CHERP	10523	-4.63	103.63	17.74
CIRBP	1153	-3.07	114.17	10.46
CLTC	1213	-3.11	95.80	4.45
CNOT1	23019	-3.02	119.11	6.63
GTNNB1	1499	-3.55	115.53	1.73
CYC1	1537	-3.66	94.25	3.10
DDX21	9188	-3.52	99.20	11.33
DDX55	57696	-3.37	97.39	24.07
DKFZp564K142	84061	-3.11	95.17	1.20
DNAJC11	55735	-3.14	96.26	35.77
DPM3	54344	-4.16	85.79	1.41
EEF1A2	1917	-3.15	91.40	1.67
EEF2	1938	-3.41	110.44	3.80
FAM73B	84895	-3.79	111.63	0.12
FLJ20303	54888	-3.68	103.10	46.80
GBF1	8729	-5.06	109.48	9.48
GEMIN4	50628	-3.00	85.59	41.30

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

【表 2】

遺伝子名	遺伝子 ID	ウイルスカ価の 変化量	細胞生存率(%)	ノックダウン効率 (%)
HNRNPK	3190	-4.99	113.48	1.12
IARS	3376	-3.17	103.38	8.00
IGF2BP2	10644	-3.30	89.82	6.61
ITGA3	3675	-3.38	92.90	8.68
ITGB4BP	3692	-3.27	81.34	26.05
ITM2B	9445	-3.23	100.15	0.68
JAK1	3716	-5.10	80.07	1.94
KIAA0664	23277	-3.82	91.33	12.35
KRT14	3861	-3.66	108.94	17.36
LRPPRC	10128	-4.16	108.87	8.33
MRCL3	10627	-3.11	92.84	2.00
MYH10	4628	-3.57	89.49	7.05
NCAPD3	23310	-3.14	87.57	30.04
NCLN	56926	-3.38	90.16	3.79
NDUFA10	4705	-3.52	103.54	9.75
NDUFS8	4728	-3.49	92.94	1.38
NFIA	4774	-4.34	98.05	3.00
NIBP	83696	-3.59	98.42	8.65
NUP160	23279	-3.77	98.13	47.25
NUP205	23165	-4.71	91.59	27.45
PCDHB12	56124	-3.66	110.37	35.50
PHB	5245	-5.89	86.57	1.56
PPP6C	5537	-4.84	104.25	5.65
PSMA4	5685	-3.03	101.54	11.10
PSMA5	5686	-4.01	103.75	4.66
PSMB2	5690	-3.14	86.44	1.92
PSMC1	5700	-4.02	80.49	15.81
PSMC4	5704	-4.52	90.10	27.87
PSMC6	5706	-4.77	94.29	17.43
PSMD11	5717	-5.16	86.58	10.03

10

20

30

【 0 0 4 7 】

【表 3】

遺伝子名	遺伝子 ID	ウイルス力価の 変化量	細胞生存率(%)	ノックダウン効率 (%)
PSMD12	5718	-3.41	109.54	8.30
PSMD13	5719	-3.28	102.30	6.80
PSMD14	10213	-4.09	83.53	15.39
PSMD2	5708	-3.66	83.48	14.71
PSMD6	9861	-3.91	81.82	17.91
RCN1	5954	-3.08	83.94	3.42
RPL26	6154	-3.14	89.03	9.93
S100A4	6275	-3.66	106.05	45.83
SAMHD1	25939	-3.48	101.14	34.03
SDF2L1	23753	-4.45	91.54	0.82
SDF4	51150	-3.44	92.11	6.35
SF3A2	8175	-3.13	89.26	16.05
SF3B2	10992	-3.06	82.55	17.71
SF3B4	10262	-4.33	102.63	5.89
SFRS10	6434	-4.92	105.62	32.28
SFRS2B	10929	-3.25	94.42	29.98
SNRP70	6625	-3.30	83.21	7.73
SNRPC	6631	-3.23	110.27	2.95
SNRPD3	6634	-4.02	82.34	0.83
SQSTM1	8878	-3.41	99.11	18.46
STK38	11329	-4.63	93.74	1.93
TAF15	8148	-3.65	106.52	0.72
TESC	54997	-4.34	104.88	8.30
THOC2	57187	-4.39	123.42	7.04
TOMM40	10452	-3.33	108.53	2.04
TRIM28	10155	-3.58	98.94	12.60
UAP1	6675	-3.01	106.91	44.47
USP9X	8239	-3.37	112.88	14.23
VCP	7415	-3.11	86.85	5.14
XPO1	7514	-4.91	102.74	17.20
ZC3H15	55854	-5.28	98.39	4.03

【 0 0 4 8 】

< 細胞内タンパク質の合成に対する影響 >

これらの 91 個の宿主遺伝子発現の抑制が、細胞内タンパク質合成に影響を及ぼすか否かを調べた。

具体的には、前記 < siRNA > と同様にして siRNA を HEK293 細胞にトランスフェクションし、2 回目のトランスフェクションから 24 時間経過後の細胞に、細胞内で機能する RNA ポリメラーゼ II プロモーター（例えば、ニワトリ - アクチンプロモーター）の制御下でレニラルシフェラーゼを発現させるプラスミドを、コントロールとして用いた。

トランスフェクションから 48 時間経過後の細胞に対して、Renilla Luciferase Assay System（プロメガ社製）を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性は、GloMax-96 Microplate Luminometer（プロメガ社製）を用いて計測した。

【 0 0 4 9 】

コントロール siRNA を導入した細胞のレニラルシフェラーゼ活性に対する、各 siRNA を導入した細胞のレニラルシフェラーゼ活性の割合を、細胞内タンパク質の合成効

10

20

30

40

50

率(%)として算出した。算出した細胞内タンパク質の合成効率(%)を表4に示す。この結果、前記91個の宿主遺伝子のうち、28個の宿主遺伝子(ATP5O遺伝子、CNOT1遺伝子、GEMIN4遺伝子、ITGB4BP遺伝子、NCAPD3遺伝子、NUP160遺伝子、NUP205遺伝子、PSMA4遺伝子、PSMA5遺伝子、PSMB2遺伝子、PSMC1遺伝子、PSMC4遺伝子、PSMD11遺伝子、PSMD2遺伝子、PSMD6遺伝子、SF3A2遺伝子、SF3B4遺伝子、SNRPD3遺伝子、VCP遺伝子、PSMC6遺伝子、PSMD12遺伝子、PSMD14遺伝子、SAMHD1遺伝子、SF3B2遺伝子、SNRP70遺伝子、CAPRIN1遺伝子、PHB遺伝子、及びSFRS10遺伝子)の*siRNA*を導入した細胞において、ホタルルシフェラーゼ活性がコントロール*siRNA*を導入した細胞に比べて80%以上($p < 0.05$)も低下していた。この結果から、これらの宿主遺伝子は宿主細胞における転写や翻訳に関与しており、これらの宿主遺伝子の発現を低下させることにより、インフルエンザウイルスの転写や翻訳が抑制され、ひいてはインフルエンザウイルスの複製が阻害されることが示唆された。

【0050】

【表4】

宿主タンパク質の合成効率(%)					
遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)
AP2A2	75.11	KIAA0664	60.55	TRIM28	37.64
ASCC3L1	65.37	KRT14	26.22	UAP1	80.46
ATP5O	2.79	MRCL3	134.23	USP9X	202.02
BAG3	72.00	MYH10	96.54	VCP	2.27
BRD8	146.60	NCAPD3	4.02	ZC3H15	71.50
BUB3	50.58	NCLN	135.47	BASP1	84.14
C19orf43	101.04	NDUFS8	88.55	C14orf173	77.71
CCDC135	72.77	NIBP	135.35	CTNNB1	164.22
CCDC56	112.47	NUP160	9.04	PSMC6	9.36
CHERP	172.80	NUP205	3.97	PSMD12	3.67
CIRBP	69.48	PSMA4	10.32	PSMD14	0.95
CLTC	22.74	PSMA5	4.23	SAMHD1	10.13
CNOT1	10.93	PSMB2	1.47	SF3B2	1.99
CYC1	48.89	PSMC1	6.49	SNRP70	4.52
DDX21	92.65	PSMC4	3.33	THOC2	22.91
DDX55	38.81	PSMD11	1.82	XPO1	20.42
DKFZp564K142	116.60	PSMD13	23.75	ANP32B	45.32
DNAJC11	89.91	PSMD2	1.55	CAPRIN1	5.42
DPM3	22.56	PSMD6	0.30	LRPPRC	24.48
EEF1A2	89.30	RPL26	32.18	NFIA	54.13
EEF2	67.89	S100A4	109.39	PHB	8.83
FAM73B	47.30	SDF2L1	40.47	PPP6C	39.93
FLJ20303	39.03	SDF4	116.39	SFRS10	10.82
GBF1	67.13	SF3A2	2.81	STK38	34.02
GEMIN4	12.89	SF3B4	2.77	TESC	30.75
HNRNPK	105.55	SFRS2B	112.74	JAK1	83.80
IARS	114.19	SNRPC	87.85	PCDHB12	77.64
IGF2BP2	151.66	SNRPD3	5.34	NDUFA10	102.53
ITGA3	212.86	SQSTM1	34.14	RCN1	40.47
ITGB4BP	9.07	TAF15	192.11		
ITM2B	137.49	TOMM40	125.32		

【0051】

10

20

30

40

50

<ミニレプリコンアッセイ>

前記91個の宿主遺伝子が、ウイルスゲノム複製及び転写に関与しているか否かを、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼ活性を調べるミニレプリコンアッセイ(非特許文献10参照。)により調べた。より詳細には、ミニレプリコンアッセイは、ホタルルシフェラーゼレポータータンパク質をコードするウイルス様RNAの複製活性に基づくウイルス複製複合体(PB2タンパク質、PB1タンパク質、PAタンパク質、及びNPタンパク質を含有する複合体)の活性を調べるアッセイである。

具体的には、前記<siRNA>と同様にしてsiRNAをHEK293細胞にトランスフェクションし、2回目のトランスフェクションから24時間経過後の細胞に、PAを発現させるためのプラスミド、PB1を発現させるためのプラスミド、PB2を発現させるためのプラスミド、NPを発現させるためのプラスミド、及びホタルルシフェラーゼをコードするウイルス様RNAを発現させるためのプラスミド(pPolINP(0)Luc2(0))をトランスフェクションした。なお、PA、PB1、PB2又はNPを発現させるためのプラスミドは、それぞれ、プラスミドpCAGGSのマルチクローニングサイトに各タンパク質をコードするcDNAを組み込んだものである。また、宿主細胞内で機能するRNAポリメラーゼIIプロモーター(例えば、ニワトリ - アクチンプロモーター)の制御下でレニラルシフェラーゼを発現させるプラスミドを、コントロールとして用いた。

トランスフェクションから48時間経過後の細胞に対して、Dual-Glo Luciferase assay system(プロメガ社製)を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性は、GloMax-96 Microplate Luminometer(プロメガ社製)を用いて計測した。ウイルスRNAポリメラーゼ活性は、レニラルシフェラーゼ活性によりノーマライズされたホタルルシフェラーゼ活性として算出した。

【0052】

コントロールsiRNAを導入した細胞のホタルルシフェラーゼ活性に対する、各siRNAを導入した細胞のホタルルシフェラーゼ活性の割合を、ウイルスポリメラーゼ活性(%)として算出した。このウイルスポリメラーゼ活性は、ホタルルシフェラーゼレポータータンパク質の発現レベルを示し、ウイルスゲノム複製及び転写の効率の指標となる。算出したウイルスポリメラーゼ活性(%)を表5に示す。この結果、前記91個の宿主遺伝子のうち、9個の宿主遺伝子(BUB3遺伝子、CCDC56遺伝子、CLTC遺伝子、CYC1遺伝子、NIBP遺伝子、ZC3H15遺伝子、C14orf173遺伝子、CTNNB1遺伝子、及びANP32B遺伝子)のsiRNAを導入した細胞において、ウイルスポリメラーゼ活性、すなわちウイルスゲノム複製及び転写が、コントロールsiRNAを導入した細胞に比べて50%以上($p < 0.05$)も低下していた。この結果から、これらの宿主遺伝子がウイルスゲノム複製及び転写に関与しており、これらの宿主遺伝子の発現を低下させることにより、インフルエンザウイルスのゲノム複製及び転写が抑制されることが示唆された。

【0053】

10

20

30

【表5】

ウイルスポリメラーゼ活性(%)					
遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)
AP2A2	137.72	KIAA0664	125.03	TRIM28	113.41
ASCC3L1	55.38	KRT14	126.87	UAP1	83.45
ATP5O	87.21	MRCL3	82.07	USP9X	179.66
BAG3	212.58	MYH10	133.56	VCP	132.26
BRD8	134.18	NCAPD3	75.26	ZC3H15	16.67
BUB3	29.86	NGLN	67.85	BASP1	65.72
C19orf43	60.22	NDUFS8	62.68	C14orf173	31.32
CCDC135	164.75	NIBP	32.54	CTNNB1	41.41
CCDC56	35.89	NUP160	161.95	PSMC6	68.22
CHERP	50.76	NUP205	185.48	PSMD12	83.21
CIRBP	125.42	PSMA4	78.06	PSMD14	135.56
CLTC	21.45	PSMA5	152.59	SAMHD1	112.95
CNOT1	122.58	PSMB2	186.22	SF3B2	89.83
CYC1	39.77	PSMC1	60.30	SNRP70	116.15
DDX21	227.00	PSMC4	123.01	THOC2	432.48
DDX55	243.36	PSMD11	105.10	XPO1	345.49
DKFZp564K142	73.46	PSMD13	87.38	ANP32B	20.97
DNAJC11	115.60	PSMD2	168.78	CAPRIN1	240.52
DPM3	166.79	PSMD6	165.82	LRPPRC	99.80
EEF1A2	120.27	RPL26	75.28	NFIA	103.74
EEF2	56.88	S100A4	108.15	PHB	482.29
FAM73B	148.67	SDF2L1	76.28	PPP6C	337.17
FLJ20303	73.70	SDF4	60.57	SFRS10	143.36
GBF1	218.22	SF3A2	395.26	STK38	181.90
GEMIN4	80.46	SF3B4	139.22	TESC	113.84
HNRNPK	220.87	SFRS2B	67.87	JAK1	170.25
IARS	119.39	SNRPC	134.40	PCDHB12	230.68
IGF2BP2	96.58	SNRPD3	173.08	NDUFA10	135.21
ITGA3	57.93	SQSTM1	136.86	RCN1	228.41
ITGB4BP	142.67	TAF15	60.96		
ITM2B	136.82	TOMM40	221.22		

【0054】

<PB2-KO/R1uc ウイルスアッセイ>

前記91個の宿主遺伝子について、ウイルスのライフサイクルの初期段階に関与するかどうかを調べるため、PB2-KO/R1uc ウイルスアッセイを行い、ウイルスの侵入効率を調べた。

具体的には、前記<siRNA>と同様にしてsiRNAをHEK293細胞にトランスフェクションし、2回目のトランスフェクションから24時間経過後の細胞に、PB2-KO/R1uc ウイルスを感染させた。感染から8時間経過後の細胞に対して、Renilla Luciferase Assay System(プロメガ社製)を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。蛍光は、GloMax-96 Microplate Luminometer(プロメガ社製)を用いて計測した。

【0055】

コントロールsiRNAを導入した細胞のレニラルシフェラーゼ活性に対する、各siRNAを導入した細胞のレニラルシフェラーゼ活性の割合を、ウイルスの侵入効率(%)として算出した。算出したウイルス侵入効率(%)を表6に示す。この結果、前記91個の宿主遺伝子のうち、23個の宿主遺伝子(SF3A2遺伝子、GEMIN4遺伝子、SFRS10遺伝子、BAG3遺伝子、CAPRIN1遺伝子、CCDC135遺伝子、I

10

20

30

40

50

G F 2 B P 2 遺伝子、K R T 1 4 遺伝子、A T P 5 O 遺伝子、S A M H D 1 遺伝子、P S M D 6 遺伝子、B R D 8 遺伝子、P S M D 1 1 遺伝子、S F 3 B 2 遺伝子、S F 3 B 4 遺伝子、D P M 3 遺伝子、N C A P D 3 遺伝子、E E F 2 遺伝子、P H B 遺伝子、N U P 2 0 5 遺伝子、S 1 0 0 A 4 遺伝子、P S M D 1 4 遺伝子、及び D D X 5 5 遺伝子)において、ウイルス侵入効率が、コントロール s i R N A を導入した細胞に比べて50%以上 ($p < 0.05$) も低下していた。この結果から、これらの宿主遺伝子はインフルエンザウイルスの宿主細胞への侵入に関与しており、これらの宿主遺伝子の発現を低下させることにより、インフルエンザウイルスの宿主細胞への侵入が阻害され、ひいてはインフルエンザウイルスの複製が阻害されることが示唆された。

【 0 0 5 6 】

【表 6】

ウイルス侵入効率 (%)					
遺伝子名	活性 (%)	遺伝子名	活性 (%)	遺伝子名	活性 (%)
AP2A2	105.13	KIAA0664	368.93	TRIM28	57.02
ASCC3L1	127.45	KRT14	29.12	UAP1	101.45
ATP5O	32.22	MRCL3	66.72	USP9X	69.50
BAG3	26.26	MYH10	127.85	VCP	139.02
BRD8	36.25	NCAPD3	37.22	ZC3H15	61.72
BUB3	111.12	NCLN	102.04	BASP1	81.97
C19orf43	72.52	NDUFS8	89.39	C14orf173	52.52
CCDC135	26.41	NIBP	157.58	CTNNB1	107.63
CCDC56	135.37	NUP160	78.57	PSMC6	72.44
CHERP	152.40	NUP205	38.39	PSMD12	70.67
CIRBP	81.17	PSMA4	141.94	PSMD14	41.13
CLTC	130.96	PSMA5	61.95	SAMHD1	34.45
CNOT1	99.07	PSMB2	58.19	SF3B2	36.43
CYC1	208.99	PSMC1	170.15	SNRP70	79.70
DDX21	152.99	PSMC4	111.62	THOC2	74.46
DDX55	41.36	PSMD11	36.26	XPO1	56.05
DKFZp564K142	61.95	PSMD13	128.58	ANP32B	77.65
DNAJC11	89.42	PSMD2	122.48	CAPRIN1	26.29
DPM3	37.04	PSMD6	35.49	LRPPRC	117.05
EEF1A2	118.58	RPL26	53.03	NFIA	143.19
EEF2	37.31	S100A4	40.97	PHB	37.52
FAM73B	72.07	SDF2L1	87.44	PPP6C	50.69
FLJ20303	171.60	SDF4	111.77	SFRS10	26.23
GBF1	110.84	SF3A2	16.50	STK38	90.17
GEMIN4	19.22	SF3B4	36.86	TESC	91.50
HNRNPK	89.22	SFRS2B	62.16	JAK1	234.62
IARS	122.66	SNRPC	192.30	PCDHB12	80.80
IGF2BP2	27.46	SNRPD3	189.24	NDUFA10	58.58
ITGA3	148.66	SQSTM1	70.37	RCN1	89.00
ITGB4BP	58.65	TAF15	182.19		
ITM2B	84.31	TOMM40	74.91		

【 0 0 5 7 】

また、これらの23個の宿主遺伝子のうち、9個の宿主遺伝子 (B A G 3 遺伝子、B R D 8 遺伝子、C C D C 1 3 5 遺伝子、D D X 5 5 遺伝子、D P M 3 遺伝子、E E F 2 遺伝子、I G F 2 B P 2 遺伝子、K R T 1 4 遺伝子、及び S 1 0 0 A 4 遺伝子) は、宿主細胞の転写や翻訳には関与せず、インフルエンザウイルスの転写や翻訳に特異的に関与していることがわかった。また、これらの9個の宿主遺伝子は、前記のミニレプリコンアッセイ

10

20

30

40

50

ではインフルエンザウイルスの複製の阻害活性は確認できなかったことから、これらの宿主遺伝子は、ウイルスの宿主細胞表面への結合、宿主細胞への取込み、vRNP（ウイルスリボ核酸タンパク質）複合体の核への移行等のウイルスのライフサイクルの初期段階において重要な役割を果たしていることが示唆された。

【0058】

<VLPフォーメーションアッセイ>

前記91個の宿主遺伝子が、ウイルス粒子形成に関与しているか否かを、ウイルス様粒子（virus-like particle、VLP）フォーメーションアッセイにより調べた。

具体的には、前記<siRNA>と同様にしてsiRNAをトランスフェクションしたHEK293細胞に、HAを発現させるためのプラスミド、NAを発現させるためのプラスミド、及びM1を発現させるためのプラスミドを、TransIT293 transfection reagent（Mirus社製）を用いてトランスフェクションした。なお、HA、NA、又はM1を発現させるためのプラスミドは、それぞれ、プラスミドpCAGGSのマルチクローニングサイトに各タンパク質をコードするcDNAを組み込んだものである。

プラスミドトランスフェクションから48時間経過後の細胞を、100mM DTTを含有させたSDS Sample Buffer Solution（和光純薬社製）により溶解させた。得られたライセートを回収し、遠心分離処理（3000×g、4、5分間）を行って、VLPを含む上清を細胞残渣から分離して回収した。得られた上清を、超遠心用チューブに注入した30質量/容量%シュクロースを含有するPBS（リン酸緩衝生理食塩水）の上へのせ、超遠心分離処理（50000rpm、4、1時間、SW55Ti Rotor）を行った。得られた沈殿物を、100mM DTTを含有させたSDS Sample Buffer Solution（和光純薬社製）に溶解させたものを、ウェスタンブロッティング用サンプルとした。

【0059】

調製されたウェスタンブロッティング用サンプルにTris-Glycine SDS sample buffer（Invitrogen社製）を混合したサンプルを、4%-20% Mini-PROTEAN TGX gradient gels（バイオ・ラッド社製）にアプライしてSDS-PAGEを行い、分離したタンパク質をPVDF膜に転写し、転写膜をBlocking One solution（ナカライテスク社製）を用いてブロッキングした。当該転写膜を、一次抗体溶液（ウサギ抗WSNウイルス抗体（R309）又は抗-アクチン（AC-74）抗体を、Can Get Signal（東洋紡社製）に付属の溶液solution Iで希釈した溶液）中で、室温で少なくとも1時間インキュベートした。次いで、当該転写膜を0.05容量%のTween-20を含有させたTBS（TBST）で3回洗浄した後、二次抗体溶液（西洋ワサビペルオキシダーゼを連結したECLロバ抗マウスIgG抗体（GEヘルスケア社製）を、Can Get Signal（東洋紡社製）に付属の溶液solution IIで希釈した溶液）中でインキュベートした後、TBSTで3回洗浄した。当該転写膜を、ECL Prime Western blotting detection reagent（GEヘルスケア社製）中でインキュベートした後、化学発光によるシグナルをVersaDoc Imaging System（バイオ・ラッド社製）によりVLP中のHAタンパク質及びM1タンパク質のバンドと-アクチンのバンドを検出した。

【0060】

VLPの産生量は、ライセート中のHAタンパク質又はM1タンパク質の量に対するVLP中のHAタンパク質又はM1タンパク質の量の割合として算出した。コントロールsiRNAを導入した細胞のVLPの産生量に対する、各siRNAを導入した細胞のVLPの産生量の割合を、VLPの産生効率（%）として算出した。HAタンパク質に基づくVLP生産効率（%）の結果を表7に、M1タンパク質に基づくVLP生産効率（%）の結果を表8に、それぞれ示す。この結果、前記91個の宿主遺伝子のうち、15個の宿主遺伝子（ASCC3L1遺伝子、BRD8遺伝子、C19orf43遺伝子、DDX55遺伝子、DKFZp564K142遺伝子、DPM3遺伝子、EEF2遺伝子、FAM73B遺伝子、FLJ20303遺伝子、GBF1遺伝子、NCLN遺伝子、C14orf173遺伝子、XPO1遺伝子、LRPPRC遺伝子、及びRCN1遺伝子）において、VLPの産生効率が、コントロールsiRNAを導入した細胞に比べて50%以上（p <

10

20

30

40

50

0.05)も低下していた。この結果から、これらの宿主遺伝子はVLPの形成に関与しており、これらの宿主遺伝子の発現を低下させることにより、VLPの形成が阻害され、ひいてはインフルエンザウイルスの複製が阻害されることが示唆された。

【0061】

【表7】

HAタンパク質に基づくVLP産生効率(%)					
遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)
AP2A2	177.34	KIAA0664	116.85	TRIM28	111.28
ASCC3L1	164.31	KRT14	121.78	UAP1	96.46
ATP5O	231.41	MRCL3	257.17	USP9X	113.07
BAG3	76.58	MYH10	144.03	VCP	251.95
BRD8	131.03	NCAPD3	60.43	ZC3H15	346.37
BUB3	141.86	NCLN	49.60	BASP1	198.63
C19orf43	138.87	NDUFS8	82.87	C14orf173	63.05
CCDC135	80.11	NIBP	88.27	CTNNB1	115.18
CCDC56	99.94	NUP160	91.43	PSMC6	138.70
CHERP	139.28	NUP205	87.21	PSMD12	173.40
CIRBP	206.25	PSMA4	109.43	PSMD14	200.50
CLTC	183.70	PSMA5	81.34	SAMHD1	134.99
CNOT1	113.66	PSMB2	209.71	SF3B2	200.77
CYC1	145.24	PSMC1	135.75	SNRP70	404.20
DDX21	89.03	PSMC4	212.29	THOC2	174.33
DDX55	62.07	PSMD11	149.91	XPO1	61.99
DKFZp564K142	77.20	PSMD13	94.54	ANP32B	206.57
DNAJC11	98.32	PSMD2	134.75	CAPRIN1	75.64
DPM3	37.43	PSMD6	125.70	LRPPRC	72.43
EEF1A2	73.32	RPL26	88.86	NFIA	97.73
EEF2	32.28	S100A4	143.16	PHB	69.14
FAM73B	22.48	SDF2L1	219.96	PPP6C	79.39
FLJ20303	24.25	SDF4	363.99	SFRS10	82.25
GBF1	46.44	SF3A2	411.61	STK38	295.34
GEMIN4	38.02	SF3B4	693.20	TESC	85.68
HNRNPK	60.20	SFRS2B	229.98	JAK1	74.23
IARS	117.45	SNRPC	161.92	PCDHB12	82.21
IGF2BP2	145.77	SNRPD3	264.49	NDUFA10	115.30
ITGA3	108.10	SQSTM1	123.78	RCN1	117.61
ITGB4BP	105.61	TAF15	119.20		
ITM2B	152.06	TOMM40	119.26		

【0062】

【表 8】

M1タンパク質に基づくVLP産生効率(%)					
遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)
AP2A2	105.25	KIAA0664	65.31	TRIM28	124.46
ASCC3L1	37.96	KRT14	65.35	UAP1	129.75
ATP5O	30.59	MRCL3	362.33	USP9X	233.73
BAG3	54.31	MYH10	260.58	VCP	239.19
BRD8	46.15	NCAPD3	246.13	ZC3H15	332.94
BUB3	77.36	NCLN	25.09	BASP1	88.45
C19orf43	31.44	NDUFS8	126.10	C14orf173	49.67
CCDC135	65.85	NIBP	211.85	CTNNB1	93.10
CCDC56	84.01	NUP160	75.36	PSMC6	76.21
CHERP	86.77	NUP205	49.40	PSMD12	159.72
CIRBP	192.75	PSMA4	56.67	PSMD14	139.36
GLTC	452.07	PSMA5	93.31	SAMHD1	86.38
CNOT1	180.01	PSMB2	67.65	SF3B2	113.47
CYC1	353.99	PSMC1	39.83	SNRP70	232.69
DDX21	68.64	PSMC4	84.63	THOC2	52.38
DDX55	34.18	PSMD11	42.69	XPO1	22.30
DKFZp564K142	24.61	PSMD13	51.04	ANP32B	157.69
DNAJC11	66.02	PSMD2	88.15	CAPRIN1	33.65
DPM3	28.47	PSMD6	63.50	LRPPRC	41.86
EEF1A2	54.03	RPL26	93.69	NFIA	98.23
EEF2	75.49	S100A4	96.92	PHB	29.04
FAM73B	95.69	SDF2L1	78.78	PPP6C	87.35
FLJ20303	34.39	SDF4	114.31	SFRS10	34.02
GBF1	52.00	SF3A2	91.21	STK38	188.37
GEMIN4	34.51	SF3B4	87.39	TESC	59.33
HNRNPK	72.32	SFRS2B	75.66	JAK1	57.70
IARS	196.77	SNRPC	70.65	PCDHB12	105.78
IGF2BP2	101.08	SNRPD3	56.78	NDUFA10	89.91
ITGA3	108.01	SQSTM1	91.41	RCN1	30.55
ITGB4BP	66.69	TAF15	121.08		
ITM2B	114.84	TOMM40	130.27		

【 0 0 6 3 】

< 子孫ウイルス粒子へのvRNPの取込み効率 >

前記91個の宿主遺伝子が、子孫ウイルス粒子へのvRNPの取込みに関与しているか否かを調べるため、vRNA及びNPの子孫ウイルス粒子への取込みを調べた。

具体的には、まず、前記< siRNA >と同様にしてsiRNAをHEK293細胞にトランスフェクションし、2回目のトランスフェクション後の細胞に、MOI (multiplicity of infection) が5のインフルエンザウイルスを感染させた。感染から12時間経過後に、放出されたウイルス粒子を含む培養上清を、遠心分離処理(3000×g、4、5分間)により細胞残渣から分離して回収した。得られた上清を、超遠心用チューブに注入した30重量/容量%シュクロースを含有するPBSの上へのせ、超遠心分離処理(50000rpm、4、1時間、SW55Ti Rotor)を行った。ウイルス粒子を含む沈殿物をPBS中でホモジナイズし、Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kitを用いてウイルスRNAを抽出した。上清中のウイルスRNA量と細胞中のウイルスRNA量を、Kawakamiらの方法(非特許文献11参照。)に準じて、鎖特異的リアルタイムPCRにより定量した。なお、総RNAを鋳型とした逆転写反応は、SuperScript III Reverse Transcriptaseと、5'末端に19塩基からなるタグ配列を付加したインフルエンザウイルスゲノム特

10

20

30

40

50

異的プライマー（vRNA_{tag}_NP_1F；ggccgtcatggtggcgaatAGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTC（小文字部分がタグ配列））を用いて行った。また、定量的PCRは、前記タグ配列に特異的なプライマー（vRNA_{tag}；GGCCGTCATGGTGGCGAAT）と、ウイルスゲノムに特異的なプライマー（WSN-NP_100R；GTTCTCCATCAGTCTCCATC）と、6-FAM/ZEN/IBFQで標識されたプローブ（IDT，WSN-NP_46-70；ATGGCGACCAAAGGCACCAAACGAT）と、THUNDERBIRD Probe qPCR Mixを用いて行った。

【0064】

子孫ウイルス粒子へのvRNA及びNPタンパク質の取込み量は、培養上清から回収されたウイルス中におけるvRNA又はNPタンパク質の量をライセート中におけるvRNA又はNPタンパク質の量で割った値により決定した。コントロールsiRNAを導入した細胞の子孫ウイルス粒子へのvRNAの取込み量に対する、各siRNAを導入した細胞の子孫ウイルス粒子へのvRNAの取込み量の割合を、vRNAの取込み効率（％）として算出した。コントロールsiRNAを導入した細胞の子孫ウイルス粒子へのNPタンパク質の取込み量に対する、各siRNAを導入した細胞の子孫ウイルス粒子へのNPタンパク質の取込み量の割合を、NPタンパク質の取込み効率（％）として算出した。算出結果を表9及び10に示す。この結果、前記91個の宿主遺伝子のうち、16個の宿主遺伝子（HNRNP K遺伝子、DDX21遺伝子、JAK1遺伝子、EEF1A2遺伝子、SFRS2B遺伝子、DNAJC11遺伝子、SQSTM1遺伝子、BASP1遺伝子、PCDHB12遺伝子、KIAA0664遺伝子、SNRPC遺伝子、PPP6C遺伝子、MRCL3遺伝子、ITM2B遺伝子、TAF15遺伝子、及びSDF4遺伝子）のsiRNAを導入した細胞において、子孫ウイルス粒子へのvRNAの取込み効率が、コントロールsiRNAを導入した細胞に比べて50％以上（ $p < 0.05$ ）も低下しており、27個の宿主遺伝子（SFRS2B遺伝子、BASP1遺伝子、THOC2遺伝子、SNRPC遺伝子、KIAA0664遺伝子、PPP6C遺伝子、HNRNP K遺伝子、ITM2B遺伝子、SQSTM1遺伝子、RPL26遺伝子、NDUFS8遺伝子、SDF2L1遺伝子、JAK1遺伝子、DDX21遺伝子、EEF1A2遺伝子、TRIM28遺伝子、SDF4遺伝子、USP9X遺伝子、PSMD13遺伝子、TAF15遺伝子、CIRBP遺伝子、CHERP遺伝子、TESC遺伝子、MYH10遺伝子、TOMM40遺伝子、MRCL3遺伝子、及びPCDHB12遺伝子）のsiRNAを導入した細胞において、子孫ウイルス粒子へのNPタンパク質の取込み効率が、コントロールsiRNAを導入した細胞に比べて50％以上（ $p < 0.05$ ）も低下していた。この結果から、これらの宿主遺伝子は子孫ウイルス粒子へのvRNA又はNPタンパク質の取込みに関与しており、これらの宿主遺伝子の発現を低下させることにより、vRNA又はNPタンパク質の子孫ウイルス粒子への取込みが抑制され、ひいてはインフルエンザウイルスの複製が阻害されることが示唆された。

【0065】

10

20

30

【表9】

vRNAの子孫ウイルスへの取り込み効率(%)					
遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)
AP2A2	64.90	KIAA0664	37.10	TRIM28	56.47
ASCC3L1	N/A	KRT14	N/A	UAP1	73.58
ATP5O	N/A	MRCL3	41.24	USP9X	51.30
BAG3	N/A	MYH10	102.84	VCP	N/A
BRD8	N/A	NCAPD3	N/A	ZC3H15	N/A
BUB3	N/A	NCLN	N/A	BASP1	34.55
C19orf43	N/A	NDUFS8	59.61	C14orf173	N/A
CCDC135	N/A	NIBP	N/A	CTNNB1	N/A
CCDC56	N/A	NUP160	N/A	PSMC6	N/A
CHERP	60.18	NUP205	N/A	PSMD12	N/A
CIRBP	100.55	PSMA4	N/A	PSMD14	N/A
CLTC	N/A	PSMA5	N/A	SAMHD1	N/A
CNOT1	N/A	PSMB2	N/A	SF3B2	N/A
CYC1	N/A	PSMC1	N/A	SNRP70	N/A
DDX21	22.01	PSMC4	N/A	THOC2	69.69
DDX55	N/A	PSMD11	N/A	XPO1	N/A
DKFZp564K142	N/A	PSMD13	77.25	ANP32B	N/A
DNAJC11	33.98	PSMD2	N/A	CAPRIN1	N/A
DPM3	N/A	PSMD6	N/A	LRPPRC	N/A
EEF1A2	30.38	RPL26	69.12	NFIA	114.66
EEF2	N/A	S100A4	N/A	PHB	N/A
FAM73B	N/A	SDF2L1	50.50	PPP6C	40.69
FLJ20303	N/A	SDF4	48.77	SFRS10	N/A
GBF1	N/A	SF3A2	N/A	STK38	105.10
GEMIN4	N/A	SF3B4	N/A	TESC	65.09
HNRNPK	7.61	SFRS2B	33.34	JAK1	29.55
IARS	55.35	SNRPC	38.36	PCDHB12	35.01
IGF2BP2	N/A	SNRPD3	N/A	NDUFA10	103.50
ITGA3	104.80	SQSTM1	34.21	RCN1	N/A
ITGB4BP	N/A	TAF15	44.19		
ITM2B	43.04	TOMM40	62.85		

10

20

30

【 0 0 6 6 】

【表 10】

NPタンパク質の子孫ウイルスへの取り込み効率(%)					
遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)	遺伝子名	活性(%)
AP2A2	100.03	KIAA0664	17.38	TRIM28	27.83
ASCC3L1	N/A	KRT14	N/A	UAP1	53.41
ATP5O	N/A	MRCL3	44.54	USP9X	29.00
BAG3	N/A	MYH10	42.45	VCP	N/A
BRD8	N/A	NCAPD3	N/A	ZC3H15	N/A
BUB3	N/A	NCLN	N/A	BASP1	11.72
C19orf43	N/A	NDUFS8	21.10	C14orf173	N/A
CCDC135	N/A	NIBP	N/A	CTNNB1	N/A
CCDC56	N/A	NUP160	N/A	PSMC6	N/A
CHERP	35.95	NUP205	N/A	PSMD12	N/A
CIRBP	35.27	PSMA4	N/A	PSMD14	N/A
CLTC	N/A	PSMA5	N/A	SAMHD1	N/A
CNOT1	N/A	PSMB2	N/A	SF3B2	N/A
CYC1	N/A	PSMC1	N/A	SNRP70	N/A
DDX21	24.15	PSMC4	N/A	THOC2	15.61
DDX55	N/A	PSMD11	N/A	XPO1	N/A
DKFZp564K142	N/A	PSMD13	30.63	ANP32B	N/A
DNAJC11	75.70	PSMD2	N/A	CAPRIN1	N/A
DPM3	N/A	PSMD6	N/A	LRPPRC	N/A
EEF1A2	24.53	RPL26	20.81	NFIA	72.47
EEF2	N/A	S100A4	N/A	PHB	N/A
FAM73B	N/A	SDF2L1	21.32	PPP6C	17.55
FLJ20303	N/A	SDF4	28.85	SFRS10	N/A
GBF1	N/A	SF3A2	N/A	STK38	123.81
GEMIN4	N/A	SF3B4	N/A	TESC	40.75
HNRNPK	17.88	SFRS2B	11.18	JAK1	23.93
IARS	126.54	SNRPC	15.81	PCDHB12	49.28
IGF2BP2	N/A	SNRPD3	N/A	NDUFA10	65.44
ITGA3	118.53	SQSTM1	18.59	RCN1	N/A
ITGB4BP	N/A	TAF15	32.28		
ITM2B	17.88	TOMM40	44.32		

10

20

30

【0067】

[実施例 2]

実施例 1 において、siRNA 導入によりインフルエンザウイルスの力価が常用対数値で 2 以上低下した 299 個の宿主遺伝子について、公知の阻害剤が抗インフルエンザウイルス剤として使用可能かどうかを調べた。

まず、DrugBank database (非特許文献 12 参照。)、IPA (Ingenuity)、及び製薬メーカー (Millipore、シグマアルドリッチ、Selleck Chemicals) のデータベースから、これらの宿主遺伝子の機能の阻害剤となる化合物を調べた。この結果、44 個の宿主遺伝子に対する阻害剤として 61 個の化合物が見つかった。

40

【0068】

前記 61 個の化合物から表 11 に示す 11 個の阻害剤を選択し、これらの化合物のインフルエンザウイルスの複製に対する影響を調べた。これらのうち、Bortezomib と Colchicine は、インフルエンザウイルスの複製阻害剤として公知である (非特許文献 13 及び 14 参照。)。

【0069】

【表 1 1】

薬剤名	標的タンパク質	機能
Bortezomib	PSMB2, PSMD2	プロテアソーム阻害剤
2,3-Butanedione 2-Monoxime	BAT1, DHX15, HSPD1, PSMC1, PSMC3, PSMC4, PSMC6, PSMD6, VCP	ミオシン ATPase 阻害剤
Carboxyatractyloside	SLC25A5	ANT(アデニンヌクレオチド輸送体)の高選択的かつ強力な阻害剤 (Ki < 10 nM) であり、PTP(膜透過性遷移孔)の開口の誘導因子である。ANT のヌクレオチド結合部位を内膜の細胞質側に安定させ、ミトコンドリア内の ATP と細胞質の ADP の交換をブロックする。
Colchicine	TUBA1, TUBB, TUBB2A	抗有糸分裂剤(チューブリンに結合してその重合を阻害することによって微小管を破壊する)
17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)	HSP90AB1	HSP90 阻害剤
Golgicide A	GBF1	ArfGEF と GBF1 を選択的に標的とする(ただし、BIG1/2 は標的としない)、細胞透過性キノリン化合物(GBF1 を介した細胞内小胞輸送を可逆的に軽減する。)
PPIase-Parvulin Inhibitor	PIIB	Pin1/Par14 PPIase 阻害剤
Decitabine	DNMT1	DNMT 阻害剤
Ruxolitinib	JAK1	JAK1/JAK2 阻害剤
Pepstatin A	CTSD	カテプシン D、ペプシン、レニン 阻害剤
WP1130	USP9X	脱ユビキチン化酵素 (DUB) 阻害剤

10

20

30

【 0 0 7 0 】

具体的には、HEK293細胞又はA549細胞に、MOIが0.001のインフルエンザウイルスを感染させた。感染から1時間経過した細胞を洗浄した後、各阻害剤を含有する培養液中で培養した。コントロールとして、各阻害剤に代えて、DMSO溶液(最終濃度: 1容量%)を用いた。阻害剤存在下で48時間培養した後、培養上清を回収し、実施例1と同様にして、ウイルスの力価を求めた。また、細胞の生存率(%)は、CellTiter-Glo assay system(プロメガ社製)を添付の指示書に従って用い、コントロール(DMSO溶液)を含有する培地で培養した細胞の生細胞数に対する、各阻害剤を含有する培地で培養した細胞を、細胞生存率(%)として算出した。

【 0 0 7 1 】

この結果、2,3-Butanedione 2-Monoxime (30mM)、及びWP1130 (50 μM) は、ウイルス力価を常用対数値で5以上も低下させることができたが、細胞生存率も顕著に低下し、宿主細胞に対する毒性が強いことがわかった。公知の抗インフルエンザウイルス剤であるBortezomib (0.2 μM) とColchicine (2.5 μM) は、A549細胞において、ひどい細胞毒性を示すことなく、ウイルス力価を常用対数値で4 (Bortezomib) 又は2 (Colchicine) 以上も低下させることができた。一方で、これまでインフルエンザウイルスの複製との関係性は指摘されてこなかったGolgicide A (10 μM) とRuxolitinib (30 μM) は、有意にウイルス力価を低下させることができた。Ruxolitinib (30 μM) は、目立った細胞毒性は示さず、Golgicide A (10 μM) は、HEK293細胞で細胞生存率の低下が確認されたが、A549細胞では確認されなかった。Golgicide Aの結果を図1に、Ruxolitinibの結果を図

40

50

2に、それぞれ示す。これらの結果から、Histone acetyltransferase inhibitor II、Genistein、2,3-Butanedione 2-Monoxime、WP1130、Golgicide A及びRuxolitinibは、Bortezomib及びColchicineと同様に、抗インフルエンザウイルス作用を有していること、中でも、Golgicide A及びRuxolitinibは、宿主細胞への毒性が比較的小さく、抗インフルエンザウイルス剤として非常に有用であることがわかった。

【0072】

[実施例3]

Ruxolitinibは、チロシンキナーゼであるJAK1に対する阻害剤である。実施例1に示すように、siRNA導入によりJAK1の発現を低下させた細胞におけるM1タンパク質に基づくVLP産生効率は、57.7%であり、カットオフ値として設けた50%に近かった。そこで、JAK1のsiRNAを導入した細胞を電子顕微鏡により観察し、インフルエンザウイルスのウイルス粒子形成に対するJAK1遺伝子の発現低下の影響を調べた。

【0073】

具体的には、まず、前記<siRNA>と同様にしてJAK1遺伝子のsiRNA又はコントロールsiRNAをHEK293細胞にトランスフェクションし、2回目のトランスフェクション後の細胞に、MOIが5のインフルエンザウイルスを感染させた。感染から12時間経過後の細胞から、Nodaらの方法(非特許文献15)に従い、細胞の超薄切片を調製し、これを電子顕微鏡により観察した。電子顕微鏡は、Tecnai(登録商標)F20 electron microscope(FEI社製)を用いた。

【0074】

コントロールsiRNAを導入した細胞の電子顕微鏡写真(上段)と、JAK1遺伝子のsiRNAを導入した細胞の電子顕微鏡写真(下段)を、図3に示す。JAK1遺伝子のsiRNAを導入した細胞では、コントロールsiRNAを導入した細胞よりも形成されているウイルス様粒子が明らかに少なく、JAK1遺伝子の発現を低下させることにより、ウイルス粒子の形成が低下することがわかった。これらの結果から、JAK1は、インフルエンザウイルス複製サイクルの後期に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【0075】

[実施例4]

表12に示すタンパク質阻害剤を被験化合物として、細胞に対する毒性と、インフルエンザウイルスの増殖に対する効果を調べた。

【0076】

【表12】

	阻害剤名	CAS番号	機能
J1	Tofacitinib (CP-690550) Citrate	477600-75-2	JAK 阻害剤
J4	Tyrphostin B42	133550-30-8	JAK 阻害剤
J6	Baricitinib	1187594-09-7	JAK 阻害剤
J7	AT9283	896466-04-9	JAK 阻害剤
J8	Momelotinib	1056634-68-4	JAK 阻害剤
J11	CEP33779	1257704-57-6	JAK 阻害剤
J13	NVP-BSK805 2HCl	1092499-93-8 (free base)	JAK 阻害剤
J15	ZM39923 HCl	1021868-92-7	JAK 阻害剤
J19	Filgotinib	1206161-97-8	JAK 阻害剤
J20	JANEX-1	202475-60-3	JAK 阻害剤
J21	NVP-BSK805 dihydrochloride	1092499-93-8(free base)	JAK 阻害剤
J23	SB1317	937270-47-8	JAK 阻害剤
J25	WP1130	856243-80-6	DUB 阻害剤

【0077】

<細胞毒性試験>

まず、被験化合物溶液として、被験化合物を終濃度として1000、100、10、1、0.1、0.01、又は0.001 μM となるように、1%ジメチルスルフォキシド含有MEMで調製した。

MDC K細胞、A549細胞、及びHEK293細胞を、最小必須培地 (minimum essential medium; MEM) でそれぞれ 6.25×10^5 細胞/mL、 2.5×10^6 細胞/mL、 1.25×10^5 細胞/mLの濃度に調製した細胞液を、96穴プレートに0.1 mL/穴ずつ添加して細胞を播種した。当該96穴プレート中の細胞を、炭酸ガス培養器中、37 で培養し、播種日の翌日にMEMで洗浄した。洗浄後の96穴プレート中の細胞に、各被験化合物溶液0.1 mLを一の濃度につき3穴に添加した後、当該96穴プレート中の細胞を、炭酸ガス培養器中、37 で48時間培養した。培養後にCell Counting Kit-8溶液 (同仁化学研究所製) を各穴に10 μL ずつ添加し、さらに数時間37 で培養した。培養後、マイクロプレートリーダーで、当該96穴プレートの各穴の溶液の450 nmの吸光度を測定した。被験化合物の代わりに溶媒 (1%ジメチルスルフォキシド含有MEM) を添加した時の吸光度値を全細胞が生存する100%とし、吸光度が50%となる時の被験化合物の終濃度値を50%細胞毒性濃度 (CC50値) として算出した。

10

【0078】

<抗ウイルス効果試験>

まず、被験化合物溶液として、被験化合物を終濃度として1000、100、10、1、0.1、0.01、又は0.001 μM となるように、1%ジメチルスルフォキシド含有MEMで調製した。

20

MDC K細胞、A549細胞、及びHEK293細胞をMEMでそれぞれ 1.25×10^6 細胞/mL、 5×10^6 細胞/mL、 2.5×10^5 細胞/mLの濃度に調製した細胞液を、96穴プレートに0.1 mL/穴ずつ添加して細胞を播種した。当該96穴プレート中の細胞を、炭酸ガス培養器中37 で培養し、播種日の翌日にMEMで洗浄した。洗浄後の96穴プレート中の細胞に、各被験化合物溶液0.1 mLを一の濃度につき3穴に添加した後、当該96穴プレート中の細胞を、炭酸ガス培養器中、37 で1時間培養した。培養後、各穴から被検化合物溶液を除去し、50 μL のインフルエンザウイルスA/WSN RG # 1 - 1株をMOI (細胞1個当たりのウイルスの感染個数) が0.001になるように感染させ、炭酸ガス培養器中、37 で1時間培養した。培養後、各穴からウイルス液を除去し、1 $\mu\text{g/mL}$ トリプシンを含有する被験化合物溶液を0.1 mL/穴ずつ添加し、さらに37 で48時間培養した。培養後の各穴のウイルスの有無を調べ、同じ濃度の被検化合物を添加した培養穴の半分 (50%) でウイルスが無しと計算される被験化合物の終濃度値を50%ウイルス増殖阻害濃度 (IC50) として算出した。なお、各培養穴のウイルスの有無は、各培養穴から採取した50 μL の培養液に、1%モルモット赤血球を含有する赤血球溶液50 μL を添加した場合の凝集の有無を判定することにより行った。

30

【0079】

各タンパク質阻害剤のCC50及びIC50の常用対数値を表13に示す。表中、空欄は、IC50とCC50の差が10倍未満 (常用対数値で差が1未満) であったものである。この結果、これらのタンパク質阻害剤は、少なくともMDC K細胞、A549細胞、及びHEK293細胞のいずれかにおいて、IC50がCC50の10倍以上低い濃度となった。つまり、これらのタンパク質阻害剤は、宿主細胞の増殖性を大きく損なうことなく、インフルエンザウイルスの増殖を抑制することが可能であり、抗インフルエンザウイルス剤の有効成分として好適であった。

40

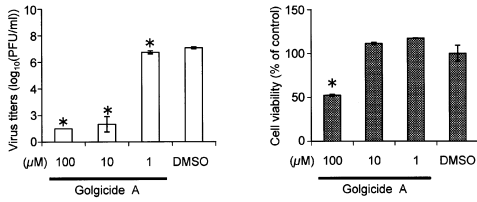
【0080】

【表 1 3】

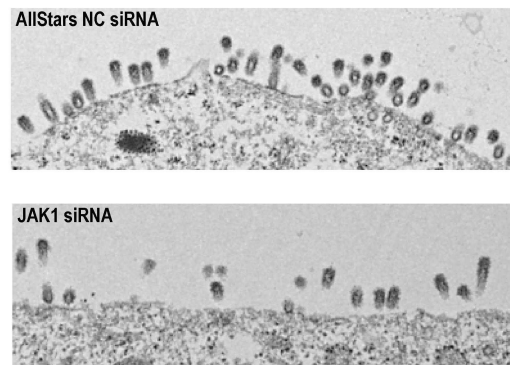
化合物	細胞株					
	MDCK		A549		293	
	濃度 (log ₁₀ , nM)					
	IC50	CC50	IC50	CC50	IC50	CC50
J1					4.50	>5.5
J4			4.50	6.43		
J6			4.50	>5.5	4.50	>5.5
J7			3.50	>5.5		
J8					4.50	>5.5
J11					3.50	>5.5
J13					3.17	4.32
J15					2.50	4.68
J19	4.50	>5.5	4.50	>5.5	4.50	>5.5
J20					4.50	>5.5
J21					3.50	4.59
J23	1.50	3.90	1.50	4.55	1.50	4.72
J25					2.50	3.69

10

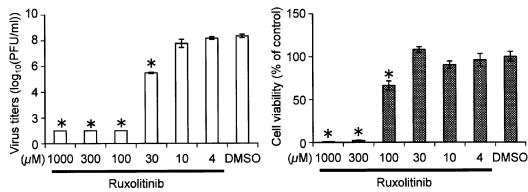
【図 1】



【図 3】



【図 2】



【配列表】

0006778112000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/26	(2006.01)	C 1 2 Q	1/26	Z N A
C 1 2 Q	1/6883	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6883	

- (72)発明者 河岡 義裕
東京都港区白金台5 - 1 3 - 3 8 - 3 0 3
- (72)発明者 渡邊 登喜子
東京都杉並区久我山2 - 7 - 2 3
- (72)発明者 川上 英良
神奈川県横浜市鶴見区鶴見中央5 - 1 6 - 9 - 5 0 1
- (72)発明者 渡邊 真治
東京都杉並区久我山2 - 7 - 2 3

審査官 大島 彰公

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 1 / 1 0 9 2 1 7 (W O , A 1)
Blood , 2 0 1 2 年 , Vol.120, No.6 , pp.1202-1209
Cell Host & Microbe , 2 0 1 4 年1 2 月1 0 日 , Vol.16 , pp.795-805
BioDrugs , 2 0 1 3 年1 0 月 , Vol.27, No.5 , pp.431-438 , 添付資料はAuthor Manuscript
Arthritis Research & Therapy , 2 0 1 1 年 , Vol.13 , Article Number R68 , pp.1-15
Clinical Immunology , 2 0 0 3 年 , Vol.106 , No.213-225

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K、A 6 1 P、C 1 2 Q
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)