HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the efficacy of anti-influenza drug baloxavir marboxil against animal-derived influenza viruses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	谷口, 恵一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	乙第7206号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92538
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keiichi_Taniguchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学）　　氏名：谷口　恵一

Studies on the efficacy of anti-influenza drug baloxavir marboxil against animal-derived influenza viruses
（動物由来インフルエンザウイルスに対する抗インフルエンザ薬バロキサビルマルボキシルの有効性に関する研究）

インフルエンザは、インフルエンザウイルスの感染に起因するヒト及び動物の呼吸器感染症で、不定期にヒトで世界的大流行（パンデミック）を繰り返している。それらは全て鳥とヒト、或いは鳥とブタ、ヒトの間での遺伝子再集合により生じたウイルスが原因である。また、H5N1 や H7N9 等、様々な亜型の鳥インフルエンザウイルスが散発的にヒトへ直接感染する事例も繰り返し報告されている。今後も全ての亜型のウイルス株がヒトに感染する可能性が考えられ、広域な有効性を示す予防・治療薬の備えが重要である。インフルエンザの治療には、罹患早期に抗インフルエンザ薬を投与することが重要である。米国疾病予防管理センターは、鳥インフルエンザウイルス感染時に、ヒトに対して抗ウイルス薬としてノイラミニダーゼ阻害薬（NAI）の投与を推奨している。しかし、季節性インフルエンザウイルスで検出される薬剤耐性変異［NA/H275Y や NA/R292K (N2 ナンバリングで定義)］と同じ変異が鳥インフルエンザウイルス感染患者の治療中に検出される事例や、上記変異を保有する株が自然界で検出されており、治療の選択肢拡充が重要である。

バロキサビルマルボキシル（BXM）は、A 型及び B 型インフルエンザウイルス感染症の治療及び予防を目的に製造承認された低分子化合物である。本薬はプロドラッグであり、生体内で活性体であるバロキサビル酸（BXA）に変換され、それがインフルエンザウイルスの PA タンパク質が保有するキャップ依存性エンドヌクレアーゼ活性を選択的に阻害し、ウイルスゲノムの転写過程を抑制する。PA タンパク質のアミノ酸配列の相同性は亜型によらず高く、BXA は A 型、B 型季節性インフルエンザウイルス株や、H5 や H7 亜型等の動物由来株を含む様々なウイルス株に対して有効性を示す。しかし、NAI 耐性変異を保有した動物由来株の BXA 感受性や、*in vivo* モデルでの動物由来株に対する BXM の有効性に関する情報は少なく、動物由来株に感染した患者に対する治療法の選択肢拡充のための知見の収集は重要である。また臨床では、PA タンパク質のアミノ酸 38 位のイソロイシン（PA/I38）の変異に代表される、BXA 感受性の低下に関わるアミノ酸変異が報告されている。しかし、動物由来株における PA/I38 変異の性状解析は不十分であり、BXA 感受性低下に関わる PA タンパク質のアミノ酸多型に関する知見も少ない。そこで本研究

では、種々の動物由来株を用いて、BXM の有効性に関する *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

第 I 章では、H5 及び H7 亜型株に対する BXM の有効性を検証した。その結果、近年国内で分離された株を含む複数の H5 及び H7 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスや、様々な NAI 耐性変異を導入した組換え A/Hong Kong/483/1997 (H5N1、HK483) 株及び A/Anhui/1/2013 (H7N9、Anhui1) 株 が、BXA 感受性であることがわかった。またその阻害活性は、オセルタミビルやファビピラビルのそれらよりも高かった。なお、PA タンパク質のアミノ酸多型解析から、多くの H7 亜型株は PA/A37S 多型を有していた。本多型は、BXA が結合する PA タンパク質のエンドヌクレアーゼドメインの活性中心付近に位置しているが、BXA 感受性は変化しなかった。次に、Anhui1 株及び HK483 株をマウスに経鼻感染させ、感染直後より BXM 或いはリン酸オセルタミビル (OSP) を、5 mg/kg 或いは 50 mg/kg の用量で、1 日 2 回 5 日間経口投与した。その結果、BXM は感染翌日の肺内ウイルス増殖を OSP より強力に抑制し、以降の肺内ウイルス負荷を OSP より低く維持し続けた。なお、肺内から回収されたウイルスの PA タンパク質にはアミノ酸置換等の変異は確認されなかった。また BXM 投与によって、ウイルス感染に伴う肺組織の炎症が抑制され、致死抑制効果が認められた。HK483 株をマウスに感染させると、脳や腎臓からもウイルスが検出されるが、BXM 投与によって、それらが抑制された。さらに、Anhui1 或いは HK483 株の感染 24、48 時間後より BXM を投与した場合でも、致死抑制効果が認められた。また HK483 感染モデルで BXM と OSP (それぞれ 5 mg/kg、10 mg/kg を 1 日 2 回 5 日間) を併用投与することで、各化合物を単剤で投与するよりも優れた致死抑制効果が認められた。以上より、BXM は H5 及び H7 亜型インフルエンザウイルス感染時の治療オプションとして有用であることが示唆された。

第Ⅱ章では、PA/I38 に変異を有する動物由来株の性状解析のため、PA/I38F、PA/I38M、PA/I38T 変異を導入した組換え HK483 株をそれぞれ作出し、それらのウイルスの BXA 感受性や MDCK 細胞における増殖性を検証した。また、世界各地で様々な年代に鳥とブタから分離されたウイルス株の BXA 感受性と、PA タンパク質のアミノ酸多型を解析した。その結果、各 PA/I38 変異を導入した組換え HK483 株の BXA 感受性が野生型株のそれより数十倍低下した。また各変異体の MDCK 細胞における増殖性が野生型株のそれより低下し、特に PA/I38T 変異を保有するウイルス株で顕著であった。なお、BXA とは異なる作用機序を有するオセルタミビル及びファビピラビルの感受性は、野生型株のそれらと同程度であった。次に、世界各地で様々な年代に分離された計 28 株の鳥とブタ分離株の BXA 感受性を調べたところ、いずれの株も BXA 感受性であることがわかった。また、過去 10 年間に分離された A 型インフルエンザウイルス株に認められる PA タンパク質上のアミノ酸多型をデータベース上で確認したところ、99%以上の株で PA/I38 が保存されている一方、PA/A20T、Y24H、A37S 等の多型が全株の 1%以上に認められた。なお、今回評価した株の一部に上記多型が認められたが、いずれも BXA 感受性は低下しなかった。以上の結果から、動物由来インフルエンザウイルスにおいても、PA/I38 が BXA の耐性変異マーカーとして有用である可能性が示唆された。

以上より、第 I 章では、国内外で分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスや NAI 耐性変異を導入した組換えウイルスを含む種々の H5 及び H7 亜型株に対する BXM の有効性が明らかとなった。本結果は、ヒトで動物由来インフルエンザウイルスの感染が確認された際の治療法の一つとして BXM が有用である事を示唆している。また第Ⅱ章では、季節性インフルエンザウイルスの BXA 耐性変異マーカーとして知られる PA/I38 変異が動物由来株に導入された場合の *in vitro* における性状の一端が明らかとなった。また世界各地で様々な年代に分離された動物由来株が広く BXA に対して感受性を示し、BXA 感受性を低下させる新たな多型は見つからなかった。今後も、自然界で分離される動物由来株における PA タンパク質のアミノ酸多型の継続的なモニターや、BXA の耐性変異を有する動物由来株の更なる性状解析が重要である。本研究で得られた知見が、将来発生しうるインフルエンザパンデミックに活用されることが期待される。