

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10119

研究課題名(和文) インフルエンザ新規治療戦略及びウイルス感染細胞アポトーシス制御に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for influenza and control of apoptosis of virus-infected cells

研究代表者

佐藤 晶論 (Sato, Masatoki)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60423795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オセルタミビルやペラミビルに感受性が低下したA型インフルエンザウイルス(以下変異ウイルス)に感染し重症となった患者さんに対する治療戦略について検討しました。この変異ウイルスを細胞に感染させ、オセルタミビルまたはペラミビルを含む培養液で培養しても、ウイルスの増殖を抑制するためには高濃度の薬剤が必要となります。しかし、ここにプロテアーゼ阻害薬であるカモスタットやナファモスタットを加えることで、比較的濃度の低いオセルタミビルまたはペラミビルでもウイルスの増殖を抑制できることが分かりました。また、その際に用いた各薬剤の濃度では細胞に毒性がないことも確認されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、オセルタミビルもしくはペラミビルに感受性が低下したインフルエンザウイルス(以下変異ウイルス)に感染し重症化した患者さんに対しては、これら既存の抗インフルエンザ薬に加え、カモスタットやナファモスタットといったプロテアーゼ阻害薬を併用することで、治療が可能である可能性が示されました。特に静注薬であるペラミビルとナファモスタットを併用すると、それぞれ単独での有効濃度よりも低い濃度でウイルス増殖を抑制できることが判明しました。これまで変異ウイルスによる重症例に対しては有効な抗ウイルス療法はありませんでしたが、作用機序の異なる薬剤を併用することで、治療が可能であることが示されました。

研究成果の概要(英文)：We examined therapeutic strategies for patients who develop severe influenza caused by influenza A virus variant with reduced susceptibility to oseltamivir and peramivir. Even if a cell is infected with this variant and cultured in a culture medium containing oseltamivir or peramivir, a high concentration of a drug is required to inhibit sufficiently the growth of the virus. However, it was found that by adding a protease inhibitor, Camostat mesilate and Nafamostat Mesilate, here, the virus growth can be inhibited even with relatively low concentrations of oseltamivir or peramivir. It was also confirmed that the concentration of each drug used at that time was not toxic to cells.

研究分野：小児感染症学

キーワード：インフルエンザ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスはその表面にヘマグルチニン(以下 HA)とノイラミニダーゼ(以下 NA)と呼ばれる蛋白質を発現している。

現在、臨床で用いられている抗インフルエンザ薬は NA 活性を阻害し、宿主細胞内で複製された仔ウイルスの細胞からの放出を制御することでその効果を発揮している。しかし、近年、多くの NA 阻害薬低感受性ウイルスが報告されており、NA 阻害薬低感受性ウイルスに対する抗ウイルス療法の改善・開発は必須であるが、NA 阻害薬低感受性獲得機序は不明であるため重症例に対する有効な抗ウイルス療法はない(Hayden FG, Influenza Other Respi Viruses.2013;Suppl 1 63-75)。唯一の静注用 NA 阻害薬であるペラミビルは高い血中濃度を確保できるため、感受性がある程度低下していても抗ウイルス効果が期待できる。しかし、研究代表者である佐藤がペラミビルの薬物動態(PK)と薬物力学(PD)とを検討した結果、NA 阻害薬低感受性ウイルスに対しては投与方法に工夫をする必要がある(Sato M ら, Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:1643-1649)。

さらに、本研究代表者である佐藤は NA 阻害薬に感受性を有しているにも関わらず、NA 阻害薬投与中であってもウイルスが分離される場合があることを報告してきた(Sato M ら, J Clin Virol. 2015;68:97-103, Pediatr Infect Dis J. 2014;33:e168-172, Pediatr Infect Dis J. 2005;24:931-932)。これは HA に特定の糖鎖が付加され、NA の作用なしに仔ウイルスが容易に宿主細胞から放出されるようになったためであると考えられ(Mishin VP ら, J Virol. 2005;79:12416-12424.)、これら NA の作用を介さず宿主細胞から放出されるウイルスに対して NA 阻害薬は無効である。以上のことから、ウイルス NA のみを標的とした抗ウイルス薬による制御には限界があるため、NA 以外を標的とした抗インフルエンザ薬の開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

宿主内で複製されたインフルエンザウイルスが新たに感染性を獲得するためには、宿主由来のセリンプロテアーゼを利用し、二量体である HA0 を HA1 と HA2 に開裂する必要がある。そのため、プロテアーゼ阻害薬は新規作用機序を持った抗インフルエンザ薬として期待される。

そこで、現在、実際の臨床の現場において使用されているプロテアーゼ阻害薬と NA 阻害薬とを併用することで、NA 阻害薬低感受性ウイルスに対する抗ウイルス療法の基礎的な検討をすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、基礎実験としてインフルエンザウイルス感染実験で汎用されている MDCK 細胞を用い、H1 亜型インフルエンザウイルスの野生株(以下 WT)とオセルタミビルとペラミビルに感受性が低下した H275Y 変異株(以下 H275Y 変異株)を感染させ、段階希釈した各 NA 阻害薬(NAI)(オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル)とプロテアーゼ阻害薬(PI)とともに 72 時間培養し、各薬剤単独および PI と NAI との併用効果について、リアルタイム PCR 法にて培養上清中のウイルス量を定量し、コントロールと比較してウイルス産生量を半減できる薬剤濃度(EC50)を検討した。

4. 研究成果

- (1) WT に対するオセルタミビル、ザナミビルおよびペラミビルの EC50 は、それぞれ、46.0 nM、49.6 nM および 5.5 nM、PI である Camostat Mesilate(以下 CM)と Nafamostat Mesilate(以下 NM)の EC50 はそれぞれ 4.3 μ M と 0.9 μ M であった(表 1)。
- (2) H275Y 変異株に対するオセルタミビル、ザナミビルおよびペラミビルの EC50 は、それぞれ、> 10,000 nM、81.4 nM および 2,940 nM、CM と NM の EC50 はそれぞれ 3.8 μ M と 1.4 μ M であった(表 1)。
- (3) 各 NAI と各 PI について、それぞれ最高濃度を 10,000 nM と 1,000 μ M で細胞毒性を評価したが、細胞毒性は認められなかった(表 1)。
- (4) WT と H275Y 変異株について、各 NAI と各 PI を併用したところ高い相乗効果を認めた(表 2、3、4、5)。特に、ヒトにおいて静注製剤であるペラミビルと NM との併用で最も高い相乗効果が認められた。

これらの結果は、NA 阻害薬低感受性ウイルス感染により重症化した場合であっても、既存のプロテアーゼ阻害薬、とくに静注製剤である Nafamostat Mesilate と併用することにより、毒性を示すことなく治療が可能であることを示唆するものである。

表1 H1N1pdm09野生株とH275Y変異株に対する各薬剤の効果と細胞毒性

	EC50		CC50
	WT	H275Y	
CM (μM)	4.3	3.8	>1,000
NM (μM)	0.9	1.4	>1,000
Oseltamivir (nM)	46.0	>10,000	>10,000
Zanamivir (nM)	49.6	81.4	>10,000
Peramivir (nM)	5.5	2,940.5	>10,000

EC50: 50%ウイルス産生抑制濃度、CC50: 50%細胞毒性濃度

WT: wild type H275Y: H275Y変異株

CM: Camostat Mesilate、NM: Nafamostat Mesialte

表2 H1N1pdm09野生株に対するCamostat MesilateとNAIとの相乗効果

CM (μM)	H1N1 pdm09 WT		
	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI
0	46.0/-	49.6/-	5.5/-
1	34.5/0.98	11.6/0.47	2.1/0.61
2	50.2/1.55	1.8/0.50	0.4/0.54
3	0.5/0.71	0.5/0.70	0.1/0.71
4	0.4/0.93	-	0.1/0.94
5	-	-	-

WT: wild type CM: Camostat Mesilate、CI: Combination Index

表3 H1N1pdm09 H275Y変異株に対するCamostat MesilateとNAIとの相乗効果

CM (μM)	H1N1 pdm09 H275Y		
	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI
0	>10,000/-	81.4/-	2,940.5/-
1	2,707.4/0.53	3.5/0.31	411.5/0.40
2	76.0/0.53	0.8/0.54	83.8/0.56
3	4.5/0.80	2.4/0.82	37.1/0.80
4	-	-	-
5	-	-	-

WT: wild type CM: Camostat Mesilate、CI: Combination Index

表4 H1N1pdm09野生株に対するNafamostat MesilateとNAIとの相乗効果

H1N1 pdm09 WT			
	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
NM (μ M)	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI
0	46.0/-	49.6/-	5.5/-
0.1	49.4/1.2	40.6/0.9	5.9/1.2
0.5	9.0/0.76	17.1/0.9	3.4/1.2
1	7.2/1.3	0.9/1.2	1.7/1.4
5	-	0.1/5.7	0.02/5.7
10	-	-	-

WT: wild type NM: Nafamostat Mesilate, CI: Combination Index

表5 H1N1pdm09 H275Y変異株に対するNafamostat MesilateとNAIとの相乗効果

H1N1 pdm09 H275Y			
	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
NM (μ M)	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI	EC50 (nM)/CI
0	>10,000/-	81.4/-	2,940.5/-
0.1	5,018.7/0.57	61.0/0.82	441.3/0.22
0.5	4132.4/0.78	36.6/0.81	97.6/0.39
1	681.4/0.79	33.3/1.12	-
5	-	-	-
10	-	-	-

WT: wild type NM: Nafamostat Mesilate, CI: Combination Index

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masatoki Sato, Koichi Hashimoto, Yukihiko Kawasaki, Mitsuaki Hosoya	4. 巻 23
2. 論文標題 Immune response after a single intravenous peramivir administration in children with influenza.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antiviral Therapy	6. 最初と最後の頁 435-441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3851/IMP3222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masatoki Sato, Koichi Hashimoto, Mitsuaki Hosoya
2. 発表標題 Synergistic effect of nafamostat mesilate and neuraminidase inhibitors against the H1N1 pdm09 H275Y variant
3. 学会等名 The 6th ESWI Influenza Conference, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 晶論 橋本 浩一 細矢 光亮
2. 発表標題 プロテアーゼ阻害薬とノイラミニダーゼ阻害薬併用によるインフルエンザ治療戦略の基礎的検討
3. 学会等名 第49回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masatoki Sato, Koichi Hashimoto, Mitsuaki Hosoya
2. 発表標題 Synergistic effect of camostat mesilate and neuraminidase inhibitors against the H1N1 pdm09 H275Y variant
3. 学会等名 5th ISIRV-AVG Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	橋本 浩一 (Hashimoto Koichi) (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
研究 分担者	細矢 光亮 (Hosoya Mitsuaki) (80192318)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	