

抗ウイルス薬ファビピラビル (T-705) の

作用メカニズム解析

富山大学 博士論文

米納 孝

# 目次

目次.....	1
要旨.....	3
第 1 章 序論：本研究の目的と背景 .....	6
第 2 章 ファビピラビルの標的作用部位の解析 .....	9
第 1 節 目的 .....	9
第 2 節 実験材料ならびに実験方法 .....	11
2-1 使用細胞 .....	11
2-2 被験化合物.....	11
2-3 系統樹解析.....	11
2-4 インフルエンザレプリコンシステムによるレプリコン活性及び薬剤による阻害活性測定 .....	12
2-5 リバビリンの交差耐性の確認試験 .....	16
2-6 ファビピラビル RTP のポリオウイルス 3Dpol への結合の 3D モデル .....	17
第 3 節 実験結果 .....	18
3-1 各種 RNA ウイルスに対するファビピラビル感受性とその RNA ポリメラーゼの系統樹 解析.....	18
3-2 各 PB1 変異体のインフルエンザウイルスレプリコン活性.....	20
3-3 ファビピラビルのインフルエンザウイルスのレプリコン阻害活性.....	22
3-4 PB1 K229R 変異体に対するリバビリンの交差耐性の評価 .....	24
第 4 節 考察 .....	25
第 5 節 小括 .....	30

第3章 ファビピラビルの活性増強薬の探索 .....	31
第1節 目的 .....	31
第2節 実験材料ならびに実験方法 .....	32
2-1 使用細胞 .....	32
2-2 被験化合物 .....	32
2-3 インフルエンザレプリコンシステムによるレプリコン阻害活性評価 .....	33
2-4 抗インフルエンザウイルス活性評価 .....	36
2-5 抗 PuntaToro ウイルス活性評価 .....	38
2-6 代謝物解析 .....	40
第3節 実験結果 .....	41
3-1 代謝拮抗剤との併用薬スクリーニング解析 .....	41
3-2 ヒット薬剤との併用下での抗インフルエンザウイルス活性評価 .....	44
3-3 抗 Punta Toro ウイルス活性評価 .....	45
3-4 6-MPとの併用下での細胞内代謝物解析 .....	46
第4節 考察 .....	48
第5節 小括 .....	53
総括 .....	55
参考文献 .....	56
引用文献 .....	57
謝辞 .....	62
略語表 .....	63

# 要 旨

## 目的

ファビピラビル (T-705) は、既存薬耐性インフルエンザウイルスを含むインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス活性を示す RNA ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 阻害剤である。RdRp は、多くの RNA ウイルスが共通して保有するウイルス特有の酵素であることから、ファビピラビルは幅広い RNA ウイルスに対して選択的に抗ウイルス活性を示す (ブロードスペクトラム)。私は本研究で、ファビピラビルがブロードスペクトラムを示す作用機序の詳細解析、及びそのブロードスペクトラムを活かすことを目的とした最適な併用薬剤を見出すため、各種 *in vitro* 試験系を用いて評価を行った。

## 方法並びに成績

ファビピラビルの標的作用分子が RNA ウイルスの RdRp であることは既に報告されているが、ファビピラビルがブロードスペクトラムを示す作用機序は明らかにされていないことから、標的作用分子である RNA ウイルスの RdRp のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を実施した。ファビピラビルの抗ウイルス活性は最も高い活性を示すインフルエンザを中心とした系統樹の分岐に伴い、概ね活性が低下する傾向が確認された。また、インフルエンザウイルスならびに系統樹的に近いアレナウイルス科、ブニヤウイルス科のウイルスに着目し、RdRp のアミノ酸配列をアライメント解析したところ、ポリメラーゼモチーフが保存されていた。ポリメラーゼモチーフ内にあるアミノ酸のうち、共通保存されていた箇所に着目し、インフルエンザウイルスのポリメラーゼサブユニット PB1 タンパク質のアミノ酸変異体を用いた Influenza virus/A/PR/8/34 株のレプリコンシステムによるファビピラビルの標的作用部位解析を行った。

作製した 30 アミノ酸変異体のうち 10 アミノ酸変異体が、野生型に対して 10%以上のレプリコン活性を保持していた。この 10 アミノ酸変異体に対するファビピラビルのレプリコン阻害活性を確認したところ、Pre-Motif A (Motif Fとも言われる) に位置する PB1 K229R

(PB1 の 229 番目のアミノ酸をリジンからアルギニンに変換したもの) のみが、低感受性を示した。さらに 229 番のアミノ酸に着目し、すべての種類のアミノ酸変異体を作製し、レプリコン活性を確認したところ、レプリコン活性を維持したのは、野生型 K229 及び K229R 体のみであった。

ブロードスペクトラムを示すファビピラビルの抗ウイルス活性を高めることを目的に、複数の代謝拮抗剤を用いてインフルエンザウイルスのレプリコンシステムによる併用薬スクリーニングを実施した。その結果、チオプリン系薬剤である 6-メルカプトプリン、アザチオプリン、チオグアニン、葉酸代謝系薬剤であるメトトレキサート、プララトレキサート併用下でファビピラビルによるレプリコン阻害活性が増強された。このうち、もっとも増強効果が強かった 6-メルカプトプリンに着目し、*in vitro* 抗インフルエンザウイルス活性を評価したところ、6-メルカプトプリン単剤では抗インフルエンザウイルス活性は確認されなかったが、6-メルカプトプリン併用下でファビピラビルの抗ウイルス活性が増強された。また、この活性増強効果はブニヤウイルス科の Punta Toro ウイルスでも同様に確認された。さらに、本増強効果の機序を明らかにするため、6-メルカプトプリン併用下の細胞内のファビピラビル活性体であるファビピラビル RTP

(ribofuranosyl-5'triphosphate) 量を LC/MS/MS 解析で測定した。その結果、6-メルカプトプリン併用により、ファビピラビル RTP の増加効果が確認された。

## 総括

ファビピラビルの抗ウイルス活性は、RNA ウイルスの RdRp の Pre-Motif A のリジン残基との相互作用が必要であることが示唆された。このリジン残基は、RdRp の活性維持のために必要不可欠であることから、ファビピラビルは *in vitro* で耐性化誘導しにくいことが示唆された。また、ファビピラビルが多くの RNA ウイルスで保存されている RNA ポリメラーゼモチーフを標的とする機序を有することで、RNA ウイルスに対してブロードスペクトラムを示すことにつながっていることが考えられた。さらに、ファビピラビルの標的作用部位を標的とした薬剤開発をすることで、新規のブロードスペクトラム性を持つ薬剤が開発できることが期待される。

ファビピラビルをモデルに、他方の薬剤の活性を高める目的での併用薬スクリーニング方法を確立した。本研究で見出された 6-メルカプトプリンによるファビピラビル RTP 量を増加させる効果は、*in vitro* で検証しただけではあるが、ファビピラビルのブロードスペクトラム性にも反映され、汎用性が高いと考えられることから、ファビピラビル単剤ではインフルエンザウイルスに比べて効果が不十分かつ治療薬のない致死性ウイルス疾患への臨床応用が期待された。本研究結果を踏まえ、ファビピラビルを新たな RNA ウイルス治療薬として結びつけるための更なる研究開発が望まれる。さらに、今回確立した併用薬スクリーニング方法で、他の承認薬や開発薬剤との併用をすることで新たなファビピラビルとの併用薬を見出せる可能性を示すとともに、他の核酸アナログ薬剤の活性を高める薬剤をスクリーニングする目的に応用されることが期待される。

## 第 1 章 序論：本研究の目的と背景

ウイルスによる新興・再興感染症が世界的問題になっている。1997 年から東南アジアを中心に継続的に発生している鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染 (1), 2014 年に西アフリカで発生した大規模なエボラウイルス集団感染 (2), そして, 2019 年 12 月より中国湖北省武漢市で発生し, またたく間に世界に流行した新型コロナウイルス感染症に現在も直面している (3)。これらの要因としては, エンデミックでしか確認されなかったウイルス疾患が人口の増加や行動範囲の拡大, 新型コロナウイルス感染症のように交通機関の発達により短時間で世界に広がるのが大きいと考えられる。また, 地球温暖化要因により, デング熱, ジカ熱, SFTS (severe fever with thrombocytopenia syndrome; 重症熱性血小板減少症候群) 等の原因ウイルスを媒介する昆虫やラッサ熱, エボラ出血熱, 狂犬病等の原因ウイルスを媒介する動物の生息地域が拡大していることが影響していると考えられる。

このように多くのウイルス感染症が報告されているが, 細菌感染症とは異なり, 未だに薬剤による治療法やワクチンによる予防法が確立されておらず, 対症療法に依存せざるを得ない状況である。

ファビピラビル (T-705, 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazine carboxamide) は, 富山化学工業株式会社 (現:富士フイルム富山化学株式会社) で開発された抗インフルエンザウイルス剤である (4, 5, 6)。細胞内に取り込まれたファビピラビルが HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) を含む細胞内酵素により糖付加・リン酸化されて, ファビピラビル-ribofuranosyl-5'triphosphate (ファビピラビル RTP) に変換され, これが ATP/GTP と競合的にウイルス RNA ポリメラーゼの基質となり, ウイルス鎖 RNA 伸長時に取り込まれ, チ

エーターミネーションを引き起こすことが明らかとなっている (Fig. 1) (7)。一方で、遺伝子複製に関連するポリメラーゼは哺乳類細胞等で知られているが、ファビピラビル RTP はヒト DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) 並びに DNA 依存性 RNA ポリメラーゼに対してはほとんど阻害作用を示さない (8, 9)。

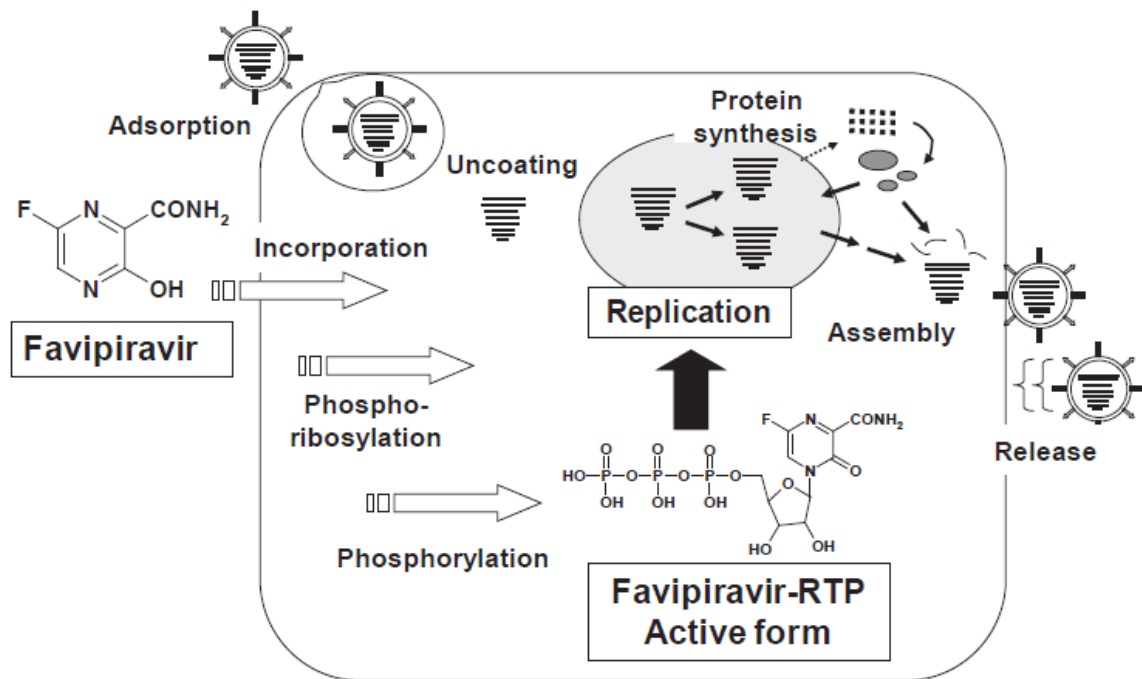
また、ファビピラビルはインフルエンザウイルス以外の様々な RNA ウイルスに対しても *in vitro* 及び *in vivo* で薬効を示す (ブロードスペクトラム) が、この要因としては、ウイルス RNA ポリメラーゼが RNA ウイルス間で共通保存されているためと考えられる。そのため治療法の確立されていない RNA ウイルス感染症の薬剤として期待され、SFTS や新型コロナウイルス感染症を対象とした臨床研究や臨床試験が進められている。

しかしながら、ファビピラビルがブロードスペクトラムを示す詳細な機序は不明である。また、インフルエンザウイルス以外のウイルスに対しては、抗ウイルス活性がインフルエンザウイルスよりも劣ることから、治療薬のない致死性ウイルスへの臨床応用を考えた場合に、ファビピラビルの活性を高めるアプローチを見出すことが急務であると私は考えた。

本研究では、ファビピラビルがブロードスペクトラムを示す作用機序の詳細を明らかにすることを目的に、**ファビピラビルの標的作用部位の解析 (第 2 章)** 及びそのブロードスペクトラムを活かすことを目的とした併用薬剤を見出すため、**ファビピラビルの活性増強薬の探索 (第 3 章)** を各種 *in vitro* 試験系で評価を実施した。

なお、本学位論文の **2 章** 及び **3 章** は、それぞれ学術雑誌にて公表された原著論文 (参考文献 1) 及び国際出願番号 WO2020138067 A1 (参考文献 2) の内容を基礎として作成した。





**Figure 1. Schematic representation of the activation mechanism of favipiravir.**

Favipiravir is incorporated into cells and converted to favipiravir ribofuranosyl phosphates by host cell enzymes. The triphosphate form, favipiravir-RTP, inhibits the influenza viral RNA polymerase activity.

## 第 2 章 ファビピラビルの標的作用部位の解析

### 第 1 節 目的

ファビピラビル (T-705) は、富山化学工業株式会社 (現:富士フイルム富山化学株式会社) によって開発された抗インフルエンザウイルス剤である (4, 5, 6)。ファビピラビルは A 型から C 型のインフルエンザウイルスの複製を強力に阻害し、アレナウイルス科、ブニヤウイルス科、フラビウイルス科、ピコルナウイルス科、フィロウイルス科、ラブドウイルス科等の様々な RNA ウイルスに対して抗ウイルス活性を示す (4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17)。さらに、ファビピラビルはノイラミニダーゼ阻害剤よりも、薬剤除去後のウイルスの再増殖を許容する可能性が低い (6)。

これまでに寒川及び私は、ファビピラビルの活性体であるファビピラビル RTP が、プリンアナログとして ATP/GTP の代わりに競合的に組み込まれ、ファビピラビル RTP の 1 分子が新生 RNA 鎖に組み込まれることを示した (7)。インフルエンザウイルスの RdRP (RNA-dependent RNA polymerase; RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) は、3 つのサブユニットタンパク質 (PB1, PB2, 及び PA) で構成されている。これらのタンパク質は、ポリメラーゼ活性に必要であり、インフルエンザウイルスの RNA 重合に関わる多機能を持つ (18)。インフルエンザウイルス RdRP のうち、PB1 サブユニットには 2 つの NTP 架橋領域が存在する (19)。

富士フイルム富山化学株式会社において、ファビピラビル存在下で Influenza A/PR/8/34 (H1N1) を *in vitro* で最大 30 継代まで行ったが、ファビピラビル耐性ウイルスの獲得ができなかった (4, 9)。

一方で、2018年にGoldhillらは2009 H1N1 パンデミック (pdm09) からの初期分離株である Influenza A/England/195/2009 (H1N1) を用いてファビピラビル存在下で *in vitro* で 10 継代することで、PB1 K229R 変異を持つウイルスを獲得し、ポリメラーゼ活性を犠牲にしながらもファビピラビルに対して感受性低下を示したと報告した。このウイルスは、PA P653L の変異を同時に獲得することで、ポリメラーゼ活性を回復した (20)。また、K229R 変異は、pdm09 (H1N1)、A (H3N2) 及び A (H7N9) 株においてファビピラビル感受性を低下させることを示した。

上記の富士フイルム富山化学株式会社の研究グループと Goldhill らのグループの相反する知見に基づいて、本研究では私は K229R 変異と PB1 の K229 隣接領域に焦点を当て、実験株として長きに渡りバリデートされている株である Influenza A/PR/8/34 において K229R 変異がファビピラビル耐性をもたらすかどうかを確認した。

PB1 K229 は、NTP 架橋領域の最初のアミノ酸に位置していた。このことは、インフルエンザウイルス RdRP のファビピラビル標的作用部位が PB1 の NTP 架橋領域に存在する可能性が高いことを示唆した。そこで私は NTP 架橋領域の部位特異的変異誘導によって作成された 30 の PB1 変異体を、Influenza A/PR/8/34 レプリコンシステムを使用して評価した。

## 第 2 節 実験材料ならびに実験方法

### 2-1 使用細胞

ヒト胎児腎臓 293T 細胞（名古屋医療センター臨床研究センターから入手）は、10%ウシ胎児血清（FBS）、100 µg/mL ストレプトマイシン及び 100 ユニット/mL ペニシリン（Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA）を添加した DMEM（Sigma-Aldrich Inc.）を使用し、37°C、5%二酸化炭素条件下で培養した。

### 2-2 被験化合物

ファビピラビルは、富士フイルム富山化学（富山、日本）で合成された。リバビリンは、Sigma-Aldrich Inc.から購入した。

### 2-3 系統樹解析

RdRP 遺伝子に関する系統樹解析を実施するにあたり、本遺伝子がコードするタンパク質名が RNA ウイルス種間で異なるものの、いずれもポリメラーゼ活性をもつタンパク質であるという共通項があることを考慮し、塩基配列ではなく、アミノ酸配列を対象とした系統樹解析を実施した。

様々な RNA ウイルスの RdRP 遺伝子のアミノ酸配列は、ClustalW を用いてアライメント後（21）、近接結合法を用いた系統樹作成（22, 23）、及び系統樹の信頼性を確認するために 1000 回のリサンプリングを行う Bootstrap 解析を実施した（24）。その後、取得した ClustalW output data を Genetyx ソフトウェア（Genetyx Corporation, 日本）を用いて系統樹を表示させた。使用した RNA ウイルス配列は、以下のウイルス（accession

number) を使用した (25)。

WestNile (NC\_003908); Yellow Fever (NC\_002031); Punta Toro (DQ363408); Rift Valley Fever (X56464); Sandfly Fever Naples (HM566172); Western Equine Encephalitis (NC\_003908); Influenza A (J02151); Influenza B (M20479); Influenza C (M28060); Junin Candid (AY8190707); Machupo (NC\_005079); Tacaribe (J04340); Guanarito (NC\_002554); Pichinde (NC\_006439); Polio (NC\_002058); Rhino (NC\_009996); FMDV (NC\_002554); LaCrosse (U12396); Human Respiratory Syncytial Virus (M75730)

## 2-4 インフルエンザレプリコンシステムによるレプリコン活性及び薬剤による阻害活性測定

### 2-4-1 PB1 タンパク質変異体の作製

PB1 タンパク質をコードする遺伝子は, Influenza A/PR/8/34 (H1N1) 株から逆転写 PCR (RT-PCR) 法により増幅し, pcDNA3.1 ベクター (インビトロジェン社製) のマルチクローニングサイトにクローニングした。構築した pcDNA3.1/PR8\_PB1 プラスミド DNA を野生型 PB1 DNA と命名した。また, PB1 タンパク質の 229 位, 230 位, 232 位, 233 位, 237 位, 239 位, 256 位, 305 位, 308 位, 309 位, 444 位, 445 位, 446 位, 491 位 又は 492 位のアミノ酸残基をアラニン残基へ置換するために, PCR 法により野生型 PB1 DNA に変異を導入した。得られた DNA をそれぞれ, K229A DNA, D230A DNA, E232A DNA, R233A DNA, K237A DNA, R239A DNA, E256A DNA, D305A DNA, K308A DNA, W309A DNA, S444A DNA, D445A DNA, D446A DNA, E491A DNA, 及び F492A DNA と命名した。

また, アラニン残基へ置換した変異体と同じ位置について, 野生型のアミノ酸パターンと性質の近いアミノ酸 1 種類へ置換 (保存的アミノ酸置換) するために変異を導入した。得

られた DNA を、それぞれ、K229R DNA, D230E DNA, E232D DNA, R233K DNA, K237R DNA, R239K DNA, E256D DNA, D305E DNA, K308R DNA, W309F DNA, S444T DNA, D445E DNA, D446E DNA, E491D DNA, 及び F492Y DNA と命名した。

## **2-4-2 レプリコン活性の評価**

インフルエンザウイルスの RdRP タンパク質のレプリコン活性に対する PB1 タンパク質変異体の影響は、細胞を用いたレポーターアッセイ系で検出した。このアッセイ系では、レプリコン活性をレポータータンパク質であるルシフェラーゼ (Luc) の活性が増加することを指標に検出した。インフルエンザウイルスの RdRP のレポーターアッセイ系は、公知の方法 (26) を参考に構築した。

### **2-4-2-1 PA, PB2, 及び NP タンパク質のプラスミド DNA 構築**

上記 2-4-1 に記載の方法で、PA, PB2, NP タンパク質をコードする遺伝子は、Influenza A/PR/8/34 (H1N1) 株及び Influenza A/Osaka/1480/96 (H3N2) から RT-PCR 法により増幅し、pcDNA3.1 ベクターにクローニングした。得られた pcDNA3.1/PR8\_PA プラスミド DNA, pcDNA3.1/PR8\_PB2 プラスミド DNA 及び pcDNA3.1/PR8\_NP プラスミド DNA は、それぞれ野生型 PA DNA, 野生型 PB2 DNA 及び野生型 NP DNA と命名した。

### **2-4-2-2 レポーター遺伝子のプラスミド DNA 構築**

レポーター遺伝子を含むプラスミド DNA を作製した。具体的には、5'末端から 3'末端にかけて、ヒト由来ポリメラーゼ I プロモーターをコードする領域 (27), Influenza A/PR/8/34

(H1N1) 株の N-terminal region (NTR) で挟まれた Luc 遺伝子, マウス由来ポリメラーゼ I ターミネーターをコードする領域 (28) でつなげた DNA を作製し, pcDNA3.1 ベクターにクローニングし, レポータープラスミド pcDNA3.1/poII\_NTR\_RhLuc を得た。

### 2-4-2-3 レプリコン活性の測定

レプリコン活性の評価のために, SV40 large T 抗原を発現しているヒト胎児腎細胞 293T 細胞 (以下, 293T 細胞とする) に, インフルエンザウイルスの RdRP, NP 及びレポータープラスミドを形質導入し, Luc 活性を測定した。以下の 1) ~ 3) の流れで実施した。

#### 1) 293T 細胞の培養

10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地中, 5%二酸化炭素条件下, 37°Cで継代培養されている 293T 細胞は, エチレンジアミン四酢酸トリプシン法によって剥離され, 同培地で 100  $\mu$ L に  $2 \times 10^4$  個の細胞を含むように調製した。得られた懸濁液を 96 ウェルプレート (white) に播種し, 5%二酸化炭素条件下, 37°Cで 1 夜培養し, 単層の 293T 細胞を得た。

#### 2) DNA の導入

DNA 導入のために, 1 ウェルあたり, 野生型 PA DNA 2 ng, 野生型 PB2 DNA 20 ng, 野生型 NP DNA 20 ng, レポータープラスミド 20 ng 及び野生型 PB1 DNA 又は PB1 変異 DNA を含むプラスミド DNA 液 0.2  $\mu$ L, DNA の導入試薬 TransIT-LT1 (タカラバイオ社製) 0.3  $\mu$ L を DMEM に添加し, トータルで 10  $\mu$ L とし, ピペットで穏やかに混合後, 室温で 30 分放置した。上記混合液を 1) で調整した各ウェルへ 10  $\mu$ L/ウェル添加した。ブランクウェルには, レポータープラスミド 20 ng のみを添加した。

### 3) レプリコン活性の測定及びその評価

Luc 活性の測定には、Renilla-Glo Luciferase Assay System (プロメガ社製) を用いた。2~3 夜培養後に、培養上清を吸引除去後、当該 System に添付の Assay Buffer を各ウェルへ 50  $\mu$ L/ウェル添加し、10 分以上室温で作用させ、細胞を溶解した。その後、当該 System に添付の Assay substrate (Assay Buffer で 100 倍希釈) を 50  $\mu$ L/ウェル添加し、攪拌後、マイクロプレートリーダー (Tecan 社製, infinite M200) で発光度を測定した。例数は 2 で実施し、平均値を用いてブランクウェルの値を差引いた数値を発光度とした。また、各 PB1 タンパク質変異体の野生型に対するレプリコン活性を下記数式で算出した。

レプリコン活性 (%) = [(PB1 タンパク質変異体の平均発光度) - (ブランクウェルの平均発光度)] / [(野生型の平均発光度) - (ブランクウェルの平均発光度)]  $\times$  100

#### 2-4-3 レプリコン阻害活性測定

各 PB1 タンパク質変異体のうち、野生型に対して 10%以上のレプリコン活性を保持した変異体について、下記方法で、ファビピラビルに対する感受性を測定した。

##### 2-4-3-1 DNA の導入及び薬剤添加

1 ウェルあたり、野生型 PA DNA 2 ng, 野生型 PB2 DNA 20 ng, 野生型 NP DNA 20 ng, レポータープラスミド 20 ng 及び野生型 PB1 DNA 又は PB1 変異 DNA を含むプラスミド DNA 液 0.2  $\mu$ L, DNA の導入試薬 TransIT-LT1 0.3  $\mu$ L を DMEM に添加し、トータルで 10  $\mu$ L とし、ピペットで穏やかに混合後、室温で 30 分放置した。上記混合液を 10



μL/ウェルで 2-4-2-3 1) で調整した各ウェルへ添加した。その後、薬剤添加ウェルに 12 倍濃度の薬液を 10 μL/ウェルで添加し、5%二酸化炭素条件下、37℃で 2~3 夜培養した (薬液の最終濃度:2, 4, 8, 16, 32, 64 μg/mL)。ブランクウェルには、レポータープラスミド 20 ng のみを添加した。

### 2-4-3-2 Luc 活性の測定及びレプリコン活性の評価

Luc 活性の測定には、Renilla-Glo Luciferase Assay System (プロメガ社製) を用いた。2~3 夜培養終了後に、培養上清を吸引除去後、当該 System に添付の Assay Buffer を 50 μL/ウェル添加し、10 分以上室温で作用させ、細胞を溶解した。その後、当該 System に添付の Assay substrate (Assay Buffer を 100 倍希釈) を 50 μL/ウェル添加し、攪拌後、マイクロプレートリーダー (Tecan 社製, infinite M200) にて発光度を測定した。例数は 2 で実施し、平均値を用いてブランクウェルの値を差引いた数値を発光度とした。

レプリコン反応率 (%) = [(薬剤添加ウェルの平均発光度) - (ブランクウェルの平均発光度)] / [(薬剤非添加ウェルの平均発光度) - (ブランクウェルの平均発光度)] × 100

EC<sub>50</sub> (50% effective concentration ; 50%有効阻害濃度) の算出には、Microsoft Office Excel 2003 の FORECAST 関数 (一次回帰法) を用いた。

### 2-5 リバビリンの交差耐性の確認試験

抗 HCV 剤であるリバビリンは、抗インフルエンザ作用を示すことが知られている。そこで、野生型及びファビピラビルに対して感受性が低下した変異体に対するリバビリンの交差耐性

を確認するため、2-4-3に記載の方法で試験を実施した。

## **2-6 ファビピラビル RTP のポリオウイルス 3Dpol への結合の 3D モデル**

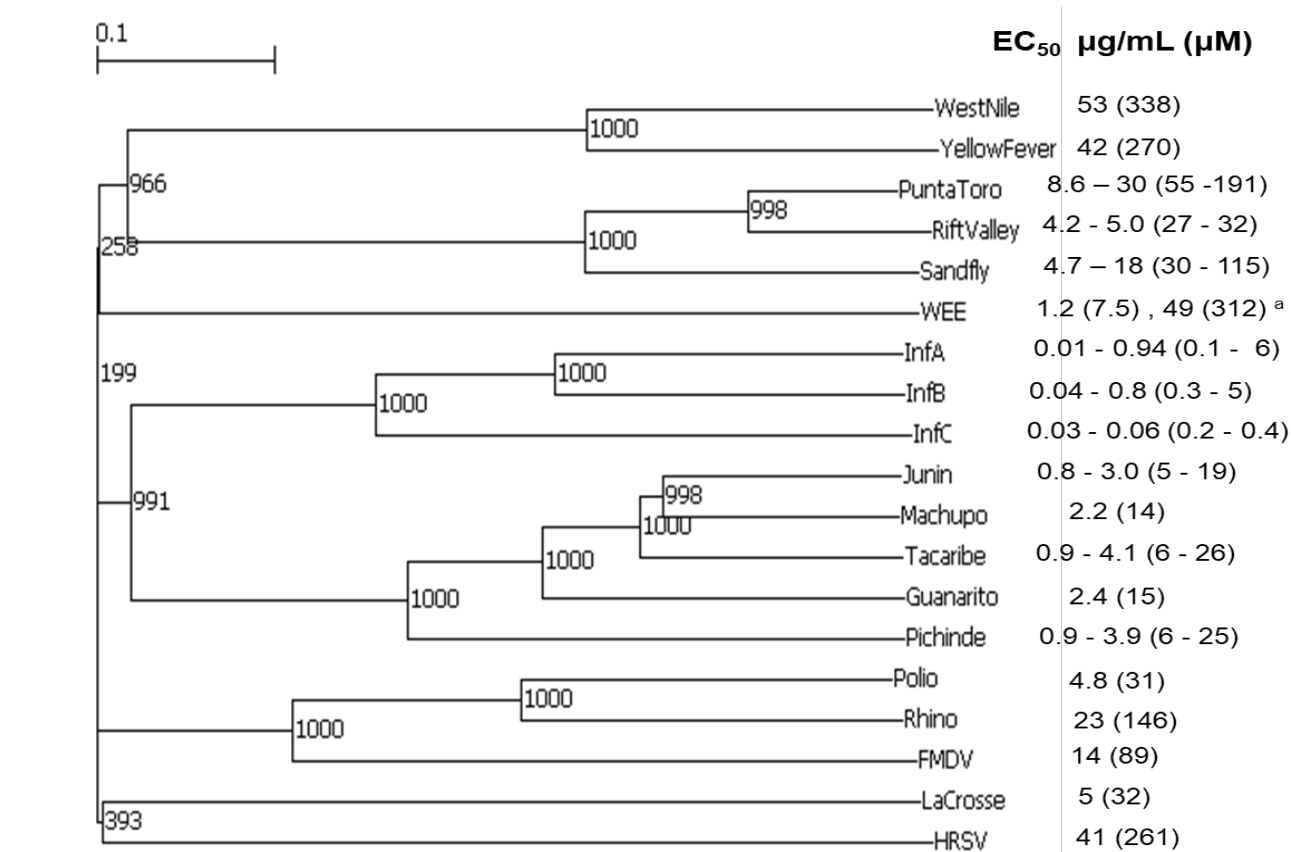
ポリオウイルス 3Dpol と RNA との複合体の立体構造である poliovirus polymerase elongation complex with CTP (PDB 3OL7) をベースとして、Schrodinger suite の Maestro を用いてファビピラビル RTP を作成し、Gilde を用いて活性中心に配置するようにドッキングモデルを作成した。その後、Discovery Studio Viewer を使用して表示用モデルを作成した。

## 第 3 節 実験結果

### 3-1 各種 RNA ウイルスに対するファビピラビル感受性とその RNA ポリメラーゼの系統樹解析

インフルエンザウイルス RdRP の PB1 配列とファビピラビル感受性ウイルスの RdRP の系統樹を分析した (Fig. 2)。各ウイルスのファビピラビルに対する感受性データの  $EC_{50}$  値又は  $EC_{90}$  (90% effective concentration ; 90%有効阻害濃度) は、図中の右端に記載した。

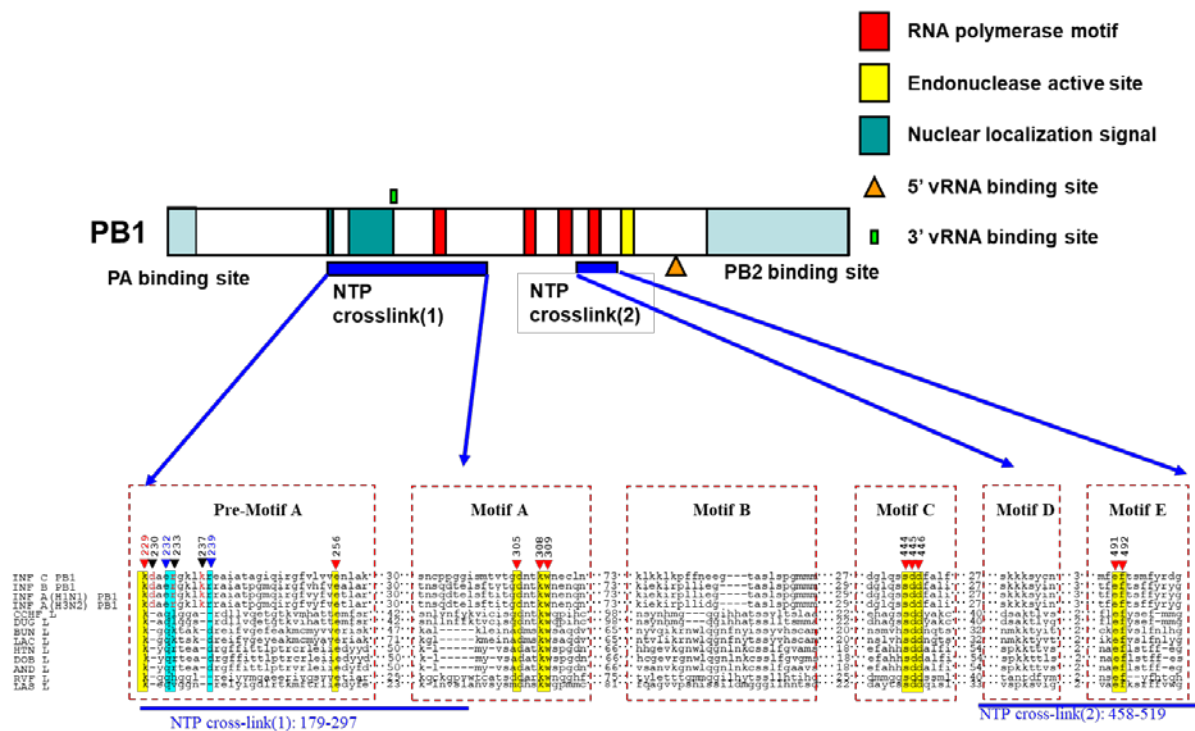
その結果, RNA ウイルスのファビピラビルに対する感受性は, 系統的にインフルエンザウイルスに密接に関連するウイルス, 特にアレナウイルス科とブニヤウイルス科の中で高かった (Fig. 2)。さらに, ポリメラーゼモチーフは NTP 架橋領域の近くに存在し, 13 のウイルス間で保存されており (29), Fig. 3 に示したとおりである。その中には, 15 個の高度に保存されたアミノ酸があることが確認された。ファビピラビル RTP の標的部位はこれらのアミノ酸の中にあることが推測された。



<sup>a</sup>: EC<sub>90</sub>

**Figure 2. Sequence-based relationship among favipiravir-sensitive RNA viruses.**

Phylogenetic relationships among RNA viruses analyzed with RdRP genes trees were generated by the neighbor-joining method. Bootstrap support values are indicated at the respective branches. Virus abbreviations are as follows: WEE, Western Equine Encephalitis; INFA, Influenza A; INFB, Influenza B; INFC, Influenza C; FMDV, Foot-and-mouth disease virus; HRSV, Human Respiratory Syncytial Virus. The EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> values of favipiravir against the evaluated RNA viruses are indicated and are cited in the paper following Furuta, 2002 (4) , 2017 (17); Gowen, 2007 (11); Julander, 2009 (12); Mendenhall, 2010 (13); Morrey, 2008 (14); Sakamoto, 2011 (30).



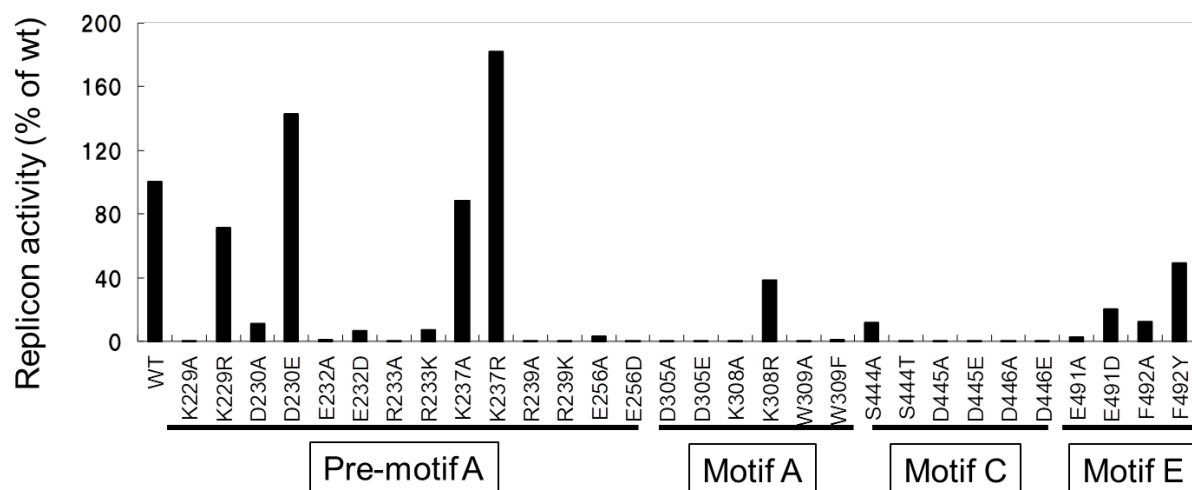
**Figure 3. Sequence-based relationship among favipiravir-sensitive RNA viruses.**

Structure-based sequence alignment of RdRP motifs pre-motif A and A to E. Amino acid sequence alignments of RdRP modules of selected segmented negative-sense RNA viruses. Yellow highlights refer to identical residues among all compared viruses, and blue highlights refer to identical residues among almost all viruses. Virus abbreviations are as follows: INFC, Influenza C; INFB, Influenza B; INFA (H1N1), tested Influenza A/PR/8/34; INFA (H3N2), tested Influenza A/Osaka/1480/96; CCHF, Crimean–Congo Hemorrhagic Fever; DUG, Dugbe; BUN, Bunyamwera; LAC, La Crosse; HTN, Hantaan; DOB, Dobrava; AND, Andes; RVF, Rift Valley Fever; LAS, Lassa. The distances between each motif are highly conserved. This figure is partially modified with reference to Kinsella, 2004 (29).

### 3-2 各 PB1 変異体のインフルエンザウイルスレプリコン活性

本研究では、高度に保存されたアミノ酸 (Fig. 3) に焦点を当て、インフルエンザウイルスのレプリコン活性を評価した。簡潔に言えば、PB1 タンパク質の 229, 230, 232, 233, 237, 239, 256, 305, 308, 309, 444, 445, 446, 491, 及び 492 位 (15 か所)

が選択された。15 か所のアミノ酸残基をアラニン残基で置換（アラニンスキャニング）するか、同様の性質を持つアミノ酸残基に置換し、PB1 の 30 変異体を評価した。評価した 30 の PB1 変異体のうち、K229R, D230A, D230E, K237A, K237R, K308R, S444A, E491D, F492A, 及び F492Y を含む PB1 の 10 変異体は、WT PB1 に対して 10%以上のレプリコン活性を維持したが、他の 20 の PB1 変異体はレプリコン活性を失った（Fig. 4）。以上のことから、NTP 架橋領域の近傍がウイルスポリメラーゼ活性を維持するための重要な活性部位であることが示唆された。

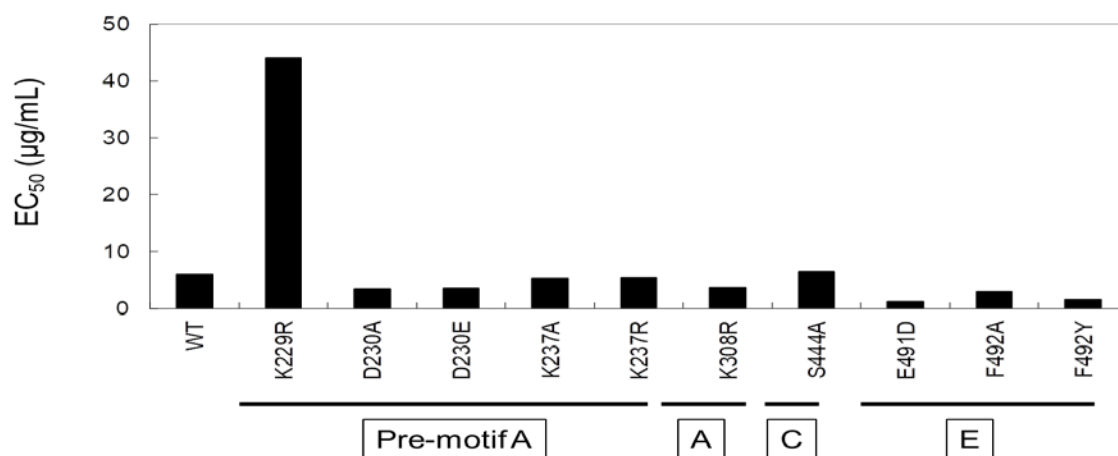


**Figure 4. Influenza virus relative replicon activity by site-directed mutagenesis.**

The polymerase activity of each PB1 mutant was assessed in 293T cells by quantifying the luciferase activity in cell lysates transfected with PB1 (WT or mutant), PB2, PA, and NP protein expression plasmids along with a reporter plasmid expressing an influenza virus-like RNA construct for luciferase. Luciferase activity levels were expressed as the percentages of WT PB1.

### 3-3 ファビピラビルのインフルエンザウイルスのレプリコン阻害活性

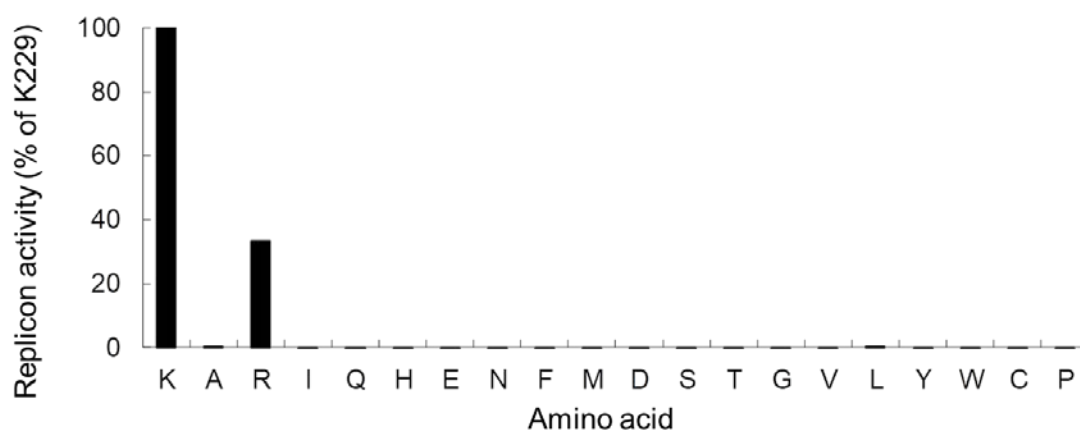
WT PB1 に対して 10%以上のレプリコン活性を維持した PB1 の 10 変異体について、ファビピラビルの  $EC_{50}$  値が評価された。WT と比較して、9 つの PB1 変異体は、ファビピラビルに対して同等又は高感受性を示した (Fig. 5)。特に、PB1 E491D 変異体は WT よりも約 5 倍感受性が高かった [Fig. 5; WT の  $EC_{50} = 5.98 \mu\text{g/mL}$  ( $38.1 \mu\text{M}$ ) 及び E491D の  $EC_{50} = 1.19 \mu\text{g/mL}$  ( $7.57 \mu\text{M}$ ) ]。しかし、PB1 K229R 変異体のみが、ファビピラビルに対する感受性を有意に低下した [Fig. 5, Table 1; WT の  $EC_{50} = 5.98 \mu\text{g/mL}$  ( $38.1 \mu\text{M}$ ) 及び K229R の  $EC_{50} = 44.1 \mu\text{g/mL}$  ( $281 \mu\text{M}$ ) ]。この結果は、Goldhill らの報告と一致した (20)。



**Figure 5. Inhibitory activity of favipiravir against influenza virus replicon of mutant PB1.**

The inhibitory activity of favipiravir against each PB1 mutant was assessed in 293T cells by quantifying the luciferase activity in cell lysates transfected with PB1 (WT or 10 PB1 mutants, which maintained  $\geq 10\%$  replicon activity of WT PB1), PB2, PA, and NP protein expression plasmids along with a reporter plasmid expressing an influenza virus-like RNA construct for luciferase.  $EC_{50}$  of favipiravir against mutant PB1 was calculated using the FORECAST function (linear regression) of Microsoft Office Excel 2003.

次に、インフルエンザウイルスのレプリコン活性における 229 位のアミノ酸の役割を明らかにするために、229 位のアミノ酸を変化させた 19 種のレプリコン活性 (K229A/R/I/Q/H/E/N/F/M/D/S/T/G/V/L/Y/W/C/P) を評価した。相対活性が 33.2%であった K229R を除いたすべての変異体は、レプリコン活性を完全に喪失した (Fig. 6)。これらのデータは、インフルエンザウイルスの PB1 の 229 位のアミノ酸がポリメラーゼ活性において極めて重要な役割を果たすことを示唆した。



**Figure 6. Relative replicon activity of each mutant on the 229th amino acid in the PB1 region of influenza virus.**

Relative replicon activity was calculated by comparing the activity of the WT replicon in influenza virus (set as 100%). The labels of the x-axis indicate the mutants on 229th amino acid in PB1.

さらに、Influenza A/PR/8/34 (H1N1) 株に加えて、別のサブタイプである Influenza A/Osaka/1480/96 (H3N2) 株について K229R 変異体を作成し、感受性を評価した。その結果、A/PR/8/34 株の場合と同様に、ファビピラビルに対する感受性の低下が K229R 変異体で確認された [Table 1; WT の  $EC_{50} = 4.83 \mu\text{g/mL}$  ( $30.7 \mu\text{M}$ ) 及び K229R の  $EC_{50} = 53.9 \mu\text{g/mL}$  ( $343 \mu\text{M}$ ) ]。この結果は、K229R 変異が少なくとも 2 つのインフルエンザウイルスのファビピラビルに対する感受性を低下させることを示した。



**Table 1. Inhibitory activity of favipiravir against influenza virus replicon of WT and mutant PB1.**

Influenza Virus	EC <sub>50</sub> µg/mL (µM)		Ratio (WT/K229R)
	PB1 WT	PB1 K229R	
A/PR/8/34 (H1N1)	5.98 (38.1)	44.1 (281)	× 7.37
A/Osaka/1480/96 (H3N2)	4.83 (30.7)	53.9 (343)	× 11.16

### 3-4 PB1 K229R 変異体に対するリバビリンの交差耐性の評価

インフルエンザウイルスは抗 HCV 剤であるリバビリンに感受性を示し、リバビリン三リン酸体はインフルエンザウイルス RdRP に対して阻害活性を示す (31)。リバビリンがファビピラビルと同じ標的部位を介してインフルエンザウイルス RdRP を阻害するかどうかを調べるために、WT 及び K229R PB1 変異体に対するリバビリンに対する感受性を評価した。その結果、リバビリンの EC<sub>50</sub> 値は、WT 及び PB1 K229R 変異体でそれぞれ 14.84 及び 16.45 µg/mL (60.8 及び 67.4 µM) であった。これは、リバビリンがファビピラビルに対して交差耐性を示さず、別の作用部位で RdRP を阻害したことを示唆した。Goldhill らは PB1 K229R / PA P653L 二重変異を含む A/England/195/2009 (H1N1) に対してリバビリンは交差耐性を示さないことを報告しており (20)、これらの結果は、本研究における A/PR/8/34 K229R 変異体の結果と一致した。

以上より、リバビリンは、ファビピラビルとは異なるメカニズムでインフルエンザウイルス RdRP を阻害することが示された。

## 第 4 節 考察

本研究は、ファビピラビルの作用機序の知識に基づいて Influenza A/PR/8/34 レプリコンシステムを使用して標的作用部位を体系的に特定した最初の報告である。この研究により、私は以下の 3 つのポイントを明らかとした。

- (1) ウイルス RNA ポリメラーゼの NTP 結合領域の近傍は、ウイルスのポリメラーゼ活性を維持するための重要な活性部位の 1 つであること
- (2) Influenza A/PR/8/34 の PB1 の K229 はファビピラビルの標的作用部位であり、K229R 変異体のみがファビピラビルに対する感受性が低かったが、他の変異体ではそのレプリコン活性が失われたこと
- (3) K229R 単一変異体はリバビリンに対して交差耐性を示さないこと

これまで、ファビピラビルの作用機序として、ファビピラビル RTP はプリン塩基との競合的拮抗作用を示し、インフルエンザウイルスの新生 RNA 鎖に組み込まれることでウイルス RNA の伸長阻害を示すことを明らかにしてきた (7)。本研究では、K229R 変異と PB1 の NTP 結合領域の近くに焦点を当て、K229R 変異が Influenza A/PR/8/34 株に対してファビピラビル耐性をもたらすかどうかを確認した。

評価対象とした NTP 結合領域の中で、K229 を含む領域は Pre-motif A と呼ばれ、Fig. 3 に示すように他の RNA ウイルスでも保存されている (29)。K229R 以外の K229X 変異体は、レプリコン活性を失った。一般に、ウイルスのレプリコン活性が失われると、ウイルスの複製能力が失われることから、ウイルスにとっては致命的であると推測される。

SDD motif は PB1 の Motif C にあり、Fig. 3 に示すように NTP 架橋領域 1 と 2 の間に

あり、S444、D445、及びD446で構成されている。SDD motifはタンパク質の安定性と機能性のために重要である(32)。S444Aを除く5つの変異体(S444T、D445A、D445E、D446A、及びD446E)は、レプリコン活性を完全に失ったことから、ポリメラーゼ活性を維持するためにはSDD motifが重要であることを示した。

Pre-motif Aは、NTPトンネルの入り口を形成する高度に保存されたモチーフである。負に帯電したNTPがトンネル内に入ろうとする際に、正に帯電したアミノ酸と順次相互作用することで、HCV NS5BポリメラーゼのNTPトンネル内の活性部位に到達する(33)。インフルエンザウイルスPB1のPre-motif A内には、本研究の変異解析の対象となったK229、R233、K237、R239等の正に帯電したアミノ酸が豊富な領域が存在する。K229R、K237A、及びK237R変異体のみが、WTの10%以上のレプリコン活性を維持しており、この領域のわずかなアミノ酸変異のみがポリメラーゼ活性を維持できることを示唆した。

興味深いことに、229位のアミノ酸がアルギニン置換の場合を除く19の変異体は、レプリコン活性を完全に失ったことから、ファビピラビル耐性を達成するには、ウイルスの生存戦略に大きな影響を与える選択枝がほとんどない変異獲得が必要であることが示唆された。

Goldhillらは、PB1 K229R変異体は、A/England/195/2009(H1N1)と比較してレプリコン活性が30分の1に減少したと報告した(20)。しかし、本研究の結果は、PB1 K229R変異体がA/PR/8/34(H1N1)WTの30%以上のレプリコン活性を維持していることを示した。このことから、レプリコン活性に対するK229R変異の影響はウイルス株に依存することが示唆された。

3000人以上が参加したファビピラビルの臨床試験では、ファビピラビル耐性ウイルスは検出されていない。高下らは、季節性インフルエンザを対象とした日本国内第3相臨床試験において、ファビピラビル投与の前後に患者から分離された57対のインフルエンザウイルスは、

ファビピラビルに対する感受性に変化がなかったと報告している (34)。さらに、インフルエンザウイルスデータベース (<https://www.fludb.org/brc/home.spg?decorator=influenza>) を使用して SNP (single nucleotide polymorphism) 解析を実施したが、これまでに PB1K229R 変異をもつウイルスは登録されていない。PB1 K229R 及び PA P653L を保有する A/England/195/2009 (H1N1) は、ファビピラビルの存在下で増殖するウイルス集団全体の中で優勢にはならないが、フェレットに感染する可能性がある (35)。これらのことから、ファビピラビルの臨床使用において、ファビピラビル耐性ウイルスの出現動向に注意を払う必要がある。

インフルエンザウイルス PB1 K229R に対応するウイルス変異に関する多くの知見が、他ウイルスでは次のように報告されている。

Hass らは、PB1 の K229R に対応するラッサウイルス RdRP の K1127R 変異体でレプリコンアッセイを実施したところ (36)、レプリコン活性は減少したと報告している。また、Iglesias らは、PB1 の K229 に対応するデング熱ウイルス RdRP の K456A 変異体は、K456 (WT) 変異体と同等のポリメラーゼ活性を持っていたが、K456A の鑄型特異性は大幅に変化することを報告している (37)。さらに、Delang らはチクングニアウイルスの RdRP K291R 変異は、ファビピラビルに対する低レベルの耐性化の原因であると報告している (38)。逆に、Abdelnabi らはコクサッキーウイルス B3 RdRP K159R 変異がポリメラーゼ活性を有意に減弱させ、A239G 変異を導入することで回復し、K159R/A239G 二重変異体は、WT ウイルスに比べてファビピラビルに対して感受性が高まった (39) と報告している。

ポリオウイルスはファビピラビルに感受性を示し (Fig. 2)、ポリオウイルス RdRP (3D pol) の 3 次元 (3D) 構造が明らかとなっている。そこで、K229 に対応する部位に、ファビピラビ

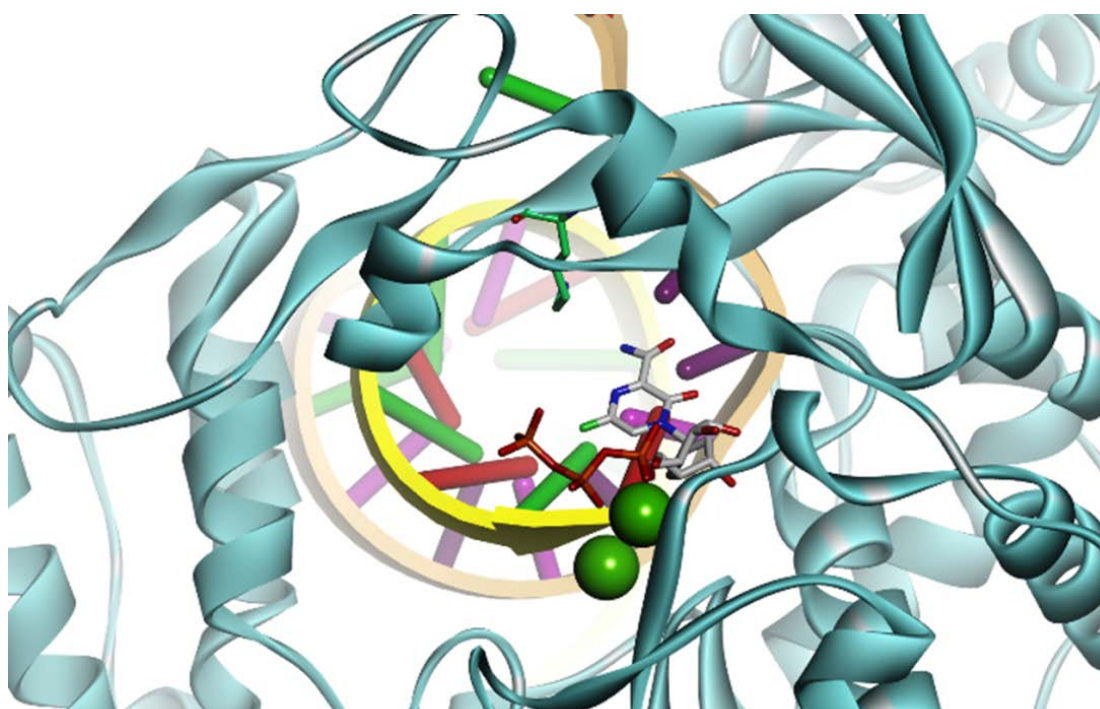
ル RTP を使用してポリオウイルス 3D pol に挿入したドッキングモデルを構築した (Fig. 7) 。その結果、インフルエンザウイルス PB1 の K229 に対応する K159 が NTP トンネル入口に配置することが確認された。したがって、この部位に変異が生じることで、ファビピラビル RTP の NTP トンネルへの入りやすさに変化が生じ、ファビピラビル RTP と RdRP 間の親和性にも影響を与える可能性があることが示唆された。このことは、他の RNA ウイルスの K229 相当部位での変異が、インフルエンザウイルスの場合のように、ファビピラビルへの親和性を変化させることによってウイルスポリメラーゼ活性とファビピラビルに対する感受性を著しく変化させる極めて重要な部位であることを示唆した。さらに、ファビピラビルは様々な RNA ウイルスで保存されたポリメラーゼモチーフ内の活性部位を阻害することにより、ブロードスペクトラムの抗ウイルス活性を示すことが考えられた。

近年、新たなウイルスによる感染が報告されている。ブニヤウイルス科に属する SFTS ウイルスを起因とする SFTS が、2013 年に日本で確認された。ファビピラビルは、SFTS ウイルスに対して *in vitro* 及び *in vivo* で抗ウイルス活性を示す (40, 41) 。興味深いことに、インフルエンザウイルス RdRP の PB1 の K229 に該当する SFTSV RdRP の K913 でもリジン残基が保存されている。

また、新規の重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2) の流行は、2019 年 12 月に武漢で最初に発生し、中国全土及び世界中に広がった。このパンデミックは、まだ進行中である。ファビピラビルは、*in vitro* 及び *in vivo* で SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス活性を有することが確認されている (42, 43, 44) 。SARS-CoV-2 RdRP のアミノ酸配列に注目すると、Pre-motif A に相当する motif F は SARS-CoV-2 RdRP に存在し、SARS-CoV-2 の K545 の位置は、インフルエンザウイルス RdRP の PB1 の K229 に対応すると推定された (45) 。この保存性のために、ファビピラビルは抗 SARS-CoV-2 活性を

示すと考えられる。

本研究ではインフルエンザウイルスのレプリコンシステムのみを使用しており，Influenza A/PR/8/34 PB1 K229R 変異体によるウイルスの感染動態とウイルス特性は評価していないことから，リバーズジェネティクスによって生成された組換えウイルスを使用した研究が，将来的に期待される。最後に，本研究の知見は将来のポリメラーゼ阻害を標的とする核酸ベースの「ブロードスペクトル」を示す抗ウイルス薬の開発に役立つと考える。



Polio virus 3D pol structure (PDB:3OL7) with favipiravir RTP (docked).

**Figure 7. 3D model of the binding of favipiravir RTP to Poliovirus 3D pol.**

The Docked model of the structure of the predicted complex between favipiravir RTP and poliovirus 3D pol (PDB code 3OL7). Favipiravir RTP is represented as sticks. 3D pol is represented as light blue ribbons. The magnesium ion is represented as green balls. The residues predicted to form an amino acid bond with favipiravir RTP are also shown as ball-and-stick models. This model was constructed using a Schrodinger suite and processed using a DS visualizer.

## 第 5 節 小括

本章では、Influenza A/PR/8/34 のレプリコンシステムを用いて、ファビピラビルのウイルス RNA ポリメラーゼの標的作用部位を確認した。その標的作用部位はポリメラーゼの活性中心であり、変異獲得によりポリメラーゼ活性を喪失すること、この部位は多くの RNA ウイルスに共通で保存されていることが確認された。以上のことから、ファビピラビルの標的作用部位は、薬剤耐性を誘導しにくい、かつ幅広い RNA ウイルスに対して効果を期待できる魅力的な薬剤標的であることが示唆された。本研究が、将来的にポリメラーゼの活性中心を標的とした核酸アナログ薬開発等のツールとなることが期待される。

## 第 3 章 ファビピラビルの活性増強薬の探索

### 第 1 節 目的

ファビピラビルは、RNA ウイルスに共通保存されている RNA ポリメラーゼを選択的に阻害する薬剤であり、既存薬の効果が不十分の場合の新型・再興型インフルエンザの治療薬として日本国内で承認されている。また、SFTS 等のインフルエンザ以外の致死性ウイルス感染症への適応拡大が期待されている。インフルエンザウイルス以外の RNA ウイルスに対するファビピラビルの *in vitro* 活性及び *in vivo* 治療効果は、インフルエンザウイルスに比べ弱く、現行の処方のみでは不十分の可能性がある。その場合、他の作用機序を有する抗ウイルス剤との併用をすることにより対応することも一案として考えられるが、致死ウイルス感染症を対象に承認された薬剤はない。ファビピラビルは細胞内酵素によりファビピラビル RTP に変換されるが、その過程のうち、細胞内酵素の HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) によるファビピラビルからファビピラビル糖一リン酸体への変換が律速であることが分かっていることから (46)、私は、この律速過程を克服する施策を見つけることができれば、ファビピラビルの薬効向上に寄与すると考えた。

本研究では、ブロードスペクトラムを示すファビピラビルの活性を高めること及びその効果を速やかに臨床応用につなげることを目的とし、私は FDA 承認薬ライブラリーのうち、ファビピラビルの活性体への変換に影響が出ると考えられる複数の代謝拮抗剤を用いてインフルエンザウイルスレプリコンシステムによりファビピラビルの薬効を高める併用薬をスクリーニングした。また、ヒット薬剤との併用下での抗インフルエンザウイルス活性評価及びその活性増強機序について検証した。



## 第 2 節 実験材料ならびに実験方法

### 2-1 使用細胞

#### 2-1-1 293T 細胞

細胞は、ヒト胎児腎細胞 293T 細胞 (以下 293T 細胞とする) を用いた。10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地中, 5%二酸化炭素条件下, 37°Cで継代培養されている 293T 細胞を, エチレンジアミン四酢酸トリプシン法によって剥離し,  $2.4 \times 10^7$  cells/225cm<sup>2</sup> フラスコとなるように播種した。その後, 5%二酸化炭素条件下, 37°Cで一夜培養し, 単層の 293T 細胞を得た。

#### 2-1-2 MDCK 細胞

培養液 10%ウシ胎児血清添加イーグル MEM 培地中, 5%二酸化炭素条件下, 37°Cで継代培養されているマージンダービー イヌ腎 (Madin-Darby Caine Kidney; 以下, MDCK 細胞とする) 細胞をエチレンジアミン四酢酸トリプシン法によって剥離し, 同培地で 100  $\mu$ L に  $2 \times 10^4$  個の細胞を含むように調製した懸濁液を 96 ウェルプレートに播種した。5%二酸化炭素条件下, 37°Cで一夜培養し, 単層の MDCK 細胞を得た。

### 2-2 被験化合物

ファビピラビルは, 富士フイルム富山化学 (富山, 日本) で合成された。代謝拮抗剤として葉酸拮抗剤のメトトレキサート (MTX; Methotrexate) 及びプララトレキサート (PTX; Pralatrexate) を, チオプリン系代謝拮抗剤として 6-メルカプトプリン (6-MP; 6-mercaptopurine) , アザチオプリン (AZA; Azathioprine) 及びチオグアノシン (TG;

Thioguanosine) を選択し、富士フイルム株式会社所有の FDA 承認薬ライブラリー及び東京化成工業からの購入品を用いた。

## 2-3 インフルエンザレプリコンシステムによるレプリコン阻害活性評価

### 2-3-1 293T 細胞への形質導入

Opti-MEM (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 3 mL に対し野生型 PA DNA を 0.96 µg, 野生型 PB1 DNA を 9.6 µg, 野生型 PB2 DNA を 9.6 µg, 野生型 NP DNA を 9.6 µg 及び 2 種のレポータープラスミド pcDNA3.1/polI\_NTR\_RhLuc を 9.6 µg, DNA 導入の成否を確認するための pGL4.54 (プロメガ社製, #E5061) を 9.6 µg となるように調整し, Lipofectamine LTX Reagent with PLUS Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) に添付の PLUS Reagent 49 µL を添加した。また Opti-MEM 2.9 mL に Lipofectamine LTX Reagent 0.23 mL を添加し 5 分間放置した。その後, 二液を体積比で 1 対 1 となるように混ぜ合わせ, 室温で 15 分放置した。上記混合液を, 6 mL / 225 cm<sup>2</sup> フラスコとなるように 293T 細胞の培養フラスコへ添加し, 約 6 時間放置してインフルエンザウイルスの RdRP (PA, PB1, PB2), NP 及びレポータープラスミドを細胞に導入した。

### 2-3-2 ファビピラビルと代謝拮抗剤の組み合わせによるレプリコン阻害活性の測定

#### 2-3-2-1 細胞への薬剤添加及び培養

形質導入した 293T 細胞をエチレンジアミン四酢酸トリプシン法によって剥離し, 以下 (A) ~ (D) いずれかの試験液を 10 µL/ウェルで添加した 384 ウェルプレート (コーニング社製, #3707) に  $1.5 \times 10^4$  cells/ 10 µL/ウェルとなるように播種した。また, 細胞を添加しない

ブランクとして、以下(A)又は(D)の液をウェルに添加したブランクウェルを設けた。その後、5%二酸化炭素条件下、37℃で約 20 時間培養した。

(A) 10  $\mu$ M ファビピラビル及び 0.1%DMSO 含有培地

(B) 代謝拮抗剤単剤(最終濃度:10  $\mu$ M~0.08  $\mu$ M, 10  $\mu$ M から公比 5 で 5 段階希釈) 及び 0.1% DMSO 含有培地

(C) ファビピラビル(最終濃度:10  $\mu$ M), 代謝拮抗剤 (最終濃度:10  $\mu$ M~0.08  $\mu$ M, 10  $\mu$ M から公比 5 で 5 段階希釈) 及び 0.1% DMSO 含有培地

(D) 0.1% DMSO 含有培地

(A)~(D)のいずれも、10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地で希釈及び混合した。

#### **2-3-2-2 Luc 活性の測定及びレプリコン阻害活性の評価**

Luc 活性の測定には、Dual-Glo Luciferase Assay System (プロメガ社製) を用いた。約 20 時間の培養後に、当該 System に添付の Dual-Glo Reagent を 20  $\mu$ L/ウェル添加し、10 分以上室温で攪拌させ、細胞を溶解した。その後、マイクロプレートリーダー (パーキンエルマー社製, 2104 EnVision) にて発光強度を測定した。続いて、当該 System に添付の Stop & Glo Reagent を 20  $\mu$ L/ウェル添加し、10 分以上室温で攪拌後、マイクロプレートリーダーにて発光強度を測定した。例数は 1 で実施した。以下に示す式から、レプリコン反応率 (%)及びレプリコン阻害率 (%) を算出した。

[ファビピラビル非添加時レプリコン反応率 (%) ] = [(代謝拮抗剤添加ウエルの平均発光強度) - (0.1% DMSO 含有培地添加ウエルの平均発光強度)] / [(薬剤非添加ウエルの平均発光強度) - (0.1% DMSO 含有培地添加ウエルの平均発光強度)] × 100

[ファビピラビル添加時レプリコン反応率 (%) ] = [(代謝拮抗剤とファビピラビル添加ウエルの平均発光強度) - (10 μM ファビピラビル及び 0.1% DMSO 含有培地添加ウエルの平均発光強度)] / [ファビピラビル添加ウエルの平均発光強度) - (10 μM ファビピラビル及び 0.1% DMSO 含有培地添加ウエルの平均発光強度)] × 100

レプリコン阻害率 (%) = 100 - [レプリコン反応率(%)]

### **2-3-2-3 ファビピラビルと代謝拮抗剤の組み合わせによるレプリコン 50%阻害濃度の測定**

2-3-2-1 と同様に、以下(E)~(H)の試験液を用いて、細胞への薬剤添加と培養を行った。2-3-2-2 と同様に、レプリコン阻害活性を評価した。

(E) ファビピラビル単剤 (最終濃度:1.4 μM ~ 1000 μM, 1000 μM から公比 3 で 8 段階希釈)及び 0.1% DMSO 含有培地

(F) 代謝拮抗剤単剤 (最終濃度:0.03 μM~200 μM, 200 μM から公比 3 で 10 段階希釈, 又は 20 μM から公比 2 で 10 段階希釈) 及び 0.1% DMSO 含有培地

(G) ファビピラビル (最終濃度:1.4 μM ~ 1000 μM, 1000 μM から公比 3 で 8 段階希釈), 代謝拮抗剤 (最終濃度:0.03 μM ~ 200 μM, 200 μM から公比 3 で 10 段階希釈, 又は 20 μM から公比 2 で 10 段階希釈)及び 0.1% DMSO 含有培地

(H) 0.1% DMSO 含有培地

IC<sub>50</sub> (50% inhibition concentration; 50%阻害濃度) の算出には, XLfit (version 5.3.1.3) の Dose Response One Site (Sigmoidal Dose-Response Model; [fit = (A+((B-A)/(1+((C/x)^D))))]) を用いた。

## 2-4 抗インフルエンザウイルス活性評価

### 2-4-1 インフルエンザウイルス感染及び薬剤添加

試験培地として, カナマイシン 60 µg/mL を加えたイーグル MEM 培地に 1 µg/mL となるよう L-1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン (TPCK) 処理トリプシンを加えた培地を用いた。2-1-2 で得られた MDCK 細胞の培養上清を取り除き, イーグル MEM 培地ですすいだ後, 各ウェルに, 以下(A)~(C)を加えた。薬剤添加後, 5%二酸化炭素条件下, 35℃で 3~4 日間培養した。

(A) カナマイシン 60 µg/mL を加えたイーグル MEM 培地を 100 µL

(B) 試験培地の 4 倍濃度の TPCK 処理トリプシンを含むイーグル MEM 培地で

4.0×10<sup>3</sup> PFU/mL に調整したインフルエンザウイルス A/PR/8/34 (H1N1) 液を 50 µL

(C) 設定濃度の 4 倍濃度のファビピラビル及び 6-MP の各設定濃度の組み合わせを含むイーグル MEM 培地を 50 µL

ファビピラビル設定濃度 (µM): 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30

6-MP 設定濃度 (µM): 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10

## 2-4-2 細胞変性効果 (CPE) の判定

インフルエンザウイルスの増殖に伴って認められる細胞変性効果 (cytopathogenic effect; CPE) を、以下の方法で判定した。

培養終了後、各ウェルに 100%ホルマリン液を 50  $\mu$ L 加え、ウイルスの不活性化及び細胞固定した。2 時間以上室温で静置後、0.005%メチレンブルー液を 100  $\mu$ L/ウェルを加え 1 時間室温で静置した。0.005%メチレンブルー液を除去し、水で軽く洗浄した後、風乾させた。その後、マイクロプレートリーダー (Tecan 社製, infinite M200) にて吸光度 (660 nm) を測定した。非感染コントロールは、インフルエンザウイルス液の代わりに試験培地の 4 倍濃度の TPCK 処理トリプシンを含むイーグル MEM 培地 50  $\mu$ L を加え、試験群と同様の操作を行い、吸光度を測定した。ブランクには、MDCK 細胞を播種しないウェルに非感染対照と同様の操作を加え、吸光度を測定した。

試験は例数 1 で 3 回 (感染コントロールは例数 8) 実施した。平均値を用い、ブランクの値を差引いた数値を吸光度とした。非感染コントロールの吸光度から感染コントロールの吸光度を差引いた値をウイルス増殖の完全抑制値とし、以下に示す式から各試験の CPE 阻害率を算出した。

$$\text{ウイルス増殖抑制率} = \frac{[(\text{単剤及び併用作用時の吸光度}) - (\text{感染コントロールの吸光度})]}{[(\text{非感染コントロールの吸光度}) - (\text{感染コントロールの吸光度})]}$$

IC<sub>50</sub> の算出には、Microsoft Office Excel 2007 の FORECAST 関数 (一次回帰法) を用いた。

## 2-5 抗 PuntaToro ウイルス活性評価

インフルエンザ以外のウイルスの細胞感染モデルとして、ブニヤウイルス科のウイルスである Punta Toro ウイルスを用いて、6-MP 又はそのプロドラッグとして知られている AZA との併用効果を検証した。

### 2-5-1 293T 細胞の培養

細胞は、293T 細胞を用いた。10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地中、5%二酸化炭素条件下、37℃で継代培養されている 293T 細胞を、エチレンジアミン四酢酸トリプシン法によって剥離し、同培地で 1 mL に  $1 \times 10^5$  個の細胞を含むように調製した懸濁液を 24 ウェルプレートに播種し、5%二酸化炭素条件下、37℃で一夜培養した。

### 2-5-2 Punta Toro ウイルス感染及び薬剤添加

2-5-1 で得られた 293T 細胞の培養上清を取り除き、イーグル MEM 培地ですすいだ後、各ウェルに  $1.0 \times 10^3$  PFU/mL に調整した Punta Toro ウイルス液を 0.1 mL ずつ添加し、5%二酸化炭素条件下、37℃で 1 時間培養した。ウイルス液を除去後、ファビピラビル単剤 (最終濃度:20  $\mu$ M)、代謝拮抗剤単剤 (最終濃度:10  $\mu$ M) 又はファビピラビル単剤 (最終濃度:20  $\mu$ M) と代謝拮抗剤 (最終濃度:10  $\mu$ M) を混合した 1%ウシ胎児血清添加イーグル MEM 培地を加え、5%二酸化炭素条件下、37℃で 3 日間培養した。また、感染コントロールとして、薬剤を含む培地の代わりに、1%ウシ胎児血清添加イーグル MEM 培地を加えた。

## 2-5-3 Punta Toro ウイルスの定量

### 2-5-3-1 Vero 細胞の培養

培養液 10%ウシ胎児血清添加イーグル MEM 培地中, 5%二酸化炭素条件下, 37℃で継代培養されているサル腎 Vero 細胞をエチレンジアミン四酢酸トリプシン法によって剥離し, 2%ウシ胎児血清添加イーグル MEM 培地で 100  $\mu$ L に  $2 \times 10^4$  個の細胞を含むように調製した懸濁液を 96 ウェルプレートに播種した。5%二酸化炭素条件下, 37℃で一晩培養し, 単層となった Vero 細胞を得た。

### 2-5-3-2 ウイルスの定量

2-5-3-1 で得られた Vero 細胞に 2-5-2 で取得したウイルス培養液をイーグル MEM 培地で公比 10, 5 段階に希釈し, 原液及び希釈液を 50  $\mu$ L ずつ添加した (n=4)。5%二酸化炭素条件下, 37℃で 3~4 日間培養した。

### 2-5-3-3 ウイルス量の計算

培養終了後, 各ウェルに 100%ホルマリン液を 50  $\mu$ L 加え, ウイルスの不活性化及び細胞固定した。2 時間以上室温で静置後, 0.005%メチレンブルー液を 100  $\mu$ L/ウェルを加え 1 時間室温で静置した。0.005%メチレンブルー液を除去し, 水で軽く洗浄した後, 風乾させた。その後, 各サンプルの 50%感染量の対数値 (Log TCID<sub>50</sub>) を以下の Bohrens-Karber 法の式を用いて算出した (47)。

感染コントロールに対するウイルス量低下効果を  $\Delta$ LogTCID<sub>50</sub> で示した。

$$\text{LogTCID}_{50} = D + h \times d + 0.5 \times d$$

D: 全ウェル (n = 4)が CPE 陽性 (陽性率 = 1)であった最高希釈倍率の常用対数



h: 各ウェルの CPE 陽性率 (<1 の場合)

d: 試料の希釈倍率の常用対数

## 2-6 代謝物解析

### 2-6-1 293T 細胞における 6-MP 処理下でのファビピラビル RTP 量測定

#### 2-6-1-1 細胞内ファビピラビル RTP の抽出

6 ウェルプレートの各ウェルに  $5 \times 10^5$  cells 播種した 293T 細胞を vehicle (0.3% DMSO) 又は様々な濃度の 6-MP, ファビピラビル, 又は両薬剤存在下で 5% 二酸化炭素条件下, 37°C で 24 時間培養した。

培養後, 2 mL PBS で洗浄した後に, 300  $\mu$ L トリプシンを入れて 37°C, 5 min 静置して細胞を剥がした。次に細胞に 400  $\mu$ L トリプシンインヒビターを加えて懸濁し, 1.5 mL チューブに回収した。細胞懸濁液を 1,000rpm, 4°C, 2 min (MX-301, TOMY) 遠心し, 500  $\mu$ L 上清を除いた。次に細胞に 1mL PBS を加えて再懸濁し, このうち 60  $\mu$ L を 1.5 mL チューブに取り分け細胞数測定用のサンプルとした。残りの細胞懸濁液から 1 mL をファビピラビル RTP 抽出用に 1.5mL チューブに取り分けた。取り分けた細胞懸濁液を 2,000 $\times$ g, 4°C, 2 min 遠心し上清 900  $\mu$ L を除いた。次にファビピラビル RTP を抽出するために, 懸濁液に 500  $\mu$ L メタノールを加えてよく懸濁した。遠心エバポレーター (CVE-3100, EYELA) を用いて 37°C で蒸発乾固させた。サンプルはその後 LC/MS/MS 分析に用いた。

#### 2-6-1-2 細胞数の測定及び LC/MS/MS 分析

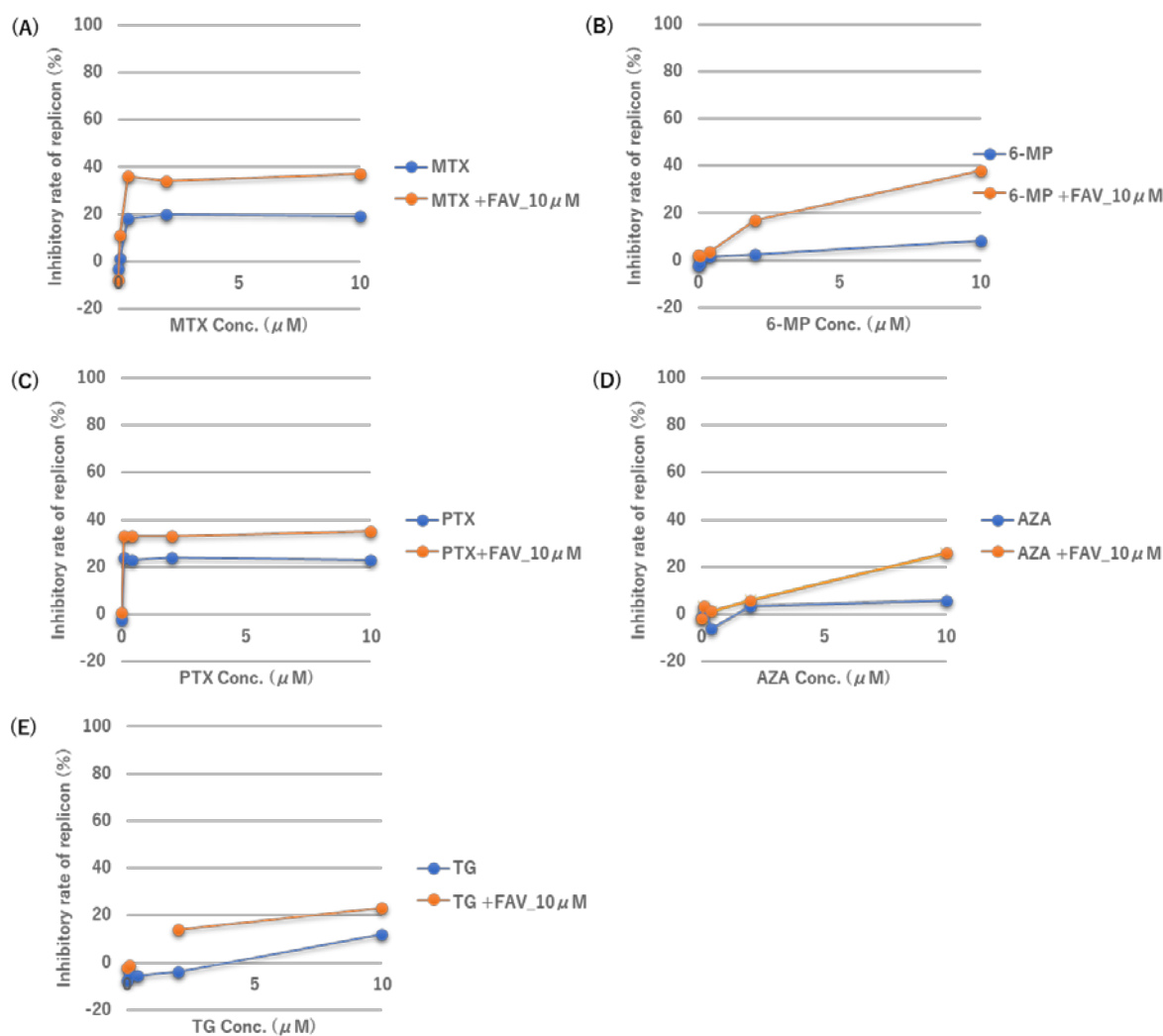
細胞数の測定及び LC/MS/MS 分析を行い, 各サンプル中のファビピラビル RTP 量を測定した。試験方法は, 松田らの報告に従って実施した (48)。

## 第 3 節 実験結果

### 3-1 代謝拮抗剤との併用薬スクリーニング解析

インフルエンザウイルスレプリコンシステムを用いてファビピラビル濃度が 0 又は 10  $\mu\text{M}$  存在下における各種代謝拮抗剤のレプリコン阻害活性を確認した。評価に用いた代謝拮抗薬として、葉酸拮抗剤の MTX 及び PTX を、チオプリン系代謝拮抗剤として 6-MP, AZA 及び TG を選択した。

その結果, Fig. 8 で示すように, ファビピラビル単剤では阻害しない濃度であっても葉酸拮抗剤もしくはチオプリン製剤を添加することにより, ファビピラビルのレプリコン阻害率を向上させることが確認された。なお, TG は 6-チオグアニンにリボース環が結合した化合物である。細胞内で, 6-チオグアニンは TG (又はチオグアニンの代謝産物) に代謝されると考えられるので, 6-チオグアニンも TG と同様, ファビピラビルのレプリコン阻害率を向上させると考えられた。

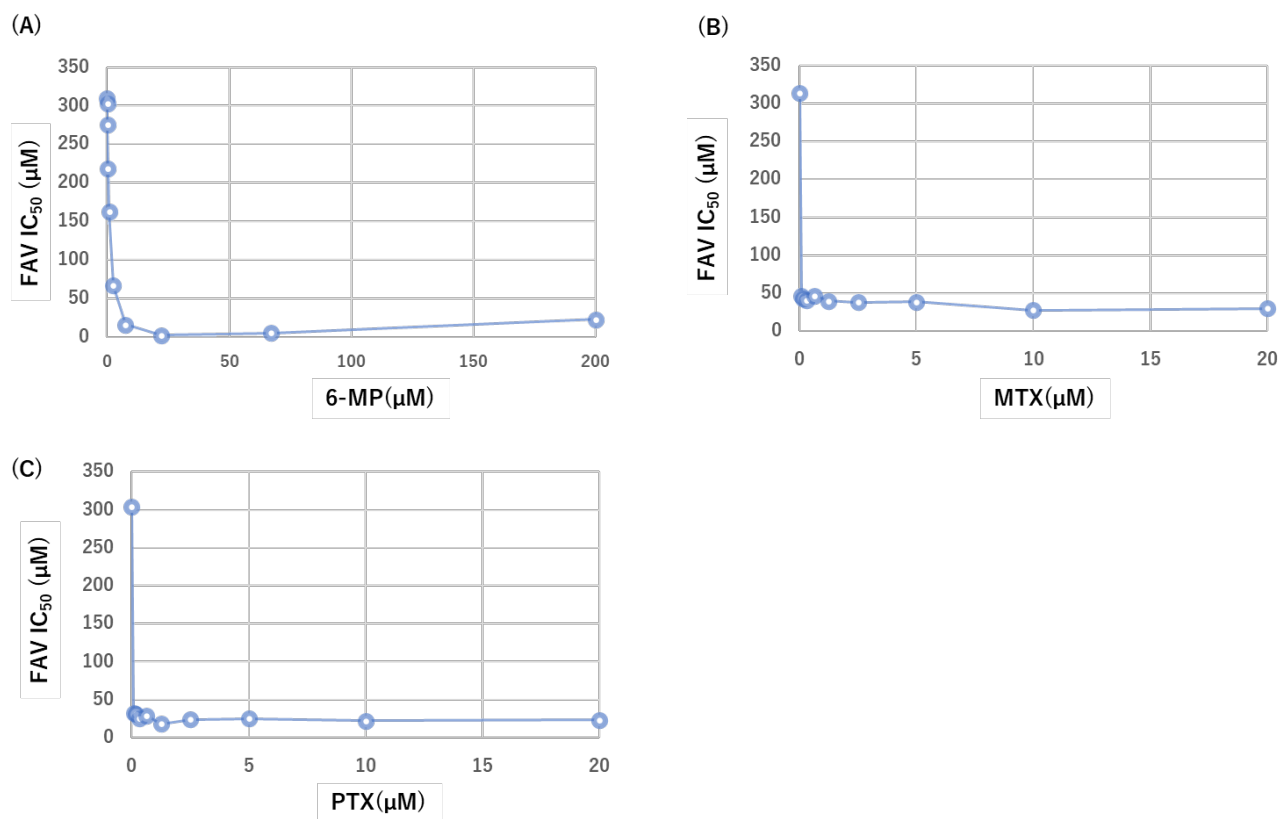


**Figure 8. Replicon inhibition rate (%) of favipiravir in combination with Antimetabolites.**

The change in inhibition rate of influenza replicon under (A)MTX, (B)6-MP, (C)PTX, (D)AZA or (E)TG treatment is indicated by the blue line. The change of the inhibition rate under the combination of favipiravir 10 μM is indicated by the orange line. FAV: favipiravir

次に、代謝拮抗剤の MTX, PTX 又はチオプリン製剤の 6-MP と併用した際のファビピラビルの IC<sub>50</sub> を Fig. 9 及び Table 2 に示す。ファビピラビルと代謝拮抗剤の組み合わせにより、ファビピラビル単剤より低い IC<sub>50</sub> を示すことが分かった。3 剤のうち、6-MP において、 22

$\mu\text{M}$  の 6-MP 併用時のファビピラビルの  $\text{IC}_{50}$  は、 $2.3 \mu\text{M}$  であり、ファビピラビルの単剤時より 135 倍低値となった。



**Figure 9. Change in 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of favipiravir against influenza replicon in combination with antimetabolites.**

Changes in  $\text{IC}_{50}$  values in combination with of (A)6-MP, (B)MTX, or (C)PTX are shown. FAV: favipiravir

**Table 2. Change in IC<sub>50</sub> of favipiravir against influenza replicon in combination with antimetabolites (calculated value).**

6-MP (μM)	0	0.03	0.09	0.27	0.82	2.5	7.4	22	67	200
FAV IC <sub>50</sub> (μM)	310	303	275	219	163	67	16	2.3	5.1	23

MTX (μM)	0	0.08	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5	10	20
FAV IC <sub>50</sub> (μM)	314	46	43	41	47	40	38	39	28	30

PTX (μM)	0	0.08	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5	10	20
FAV IC <sub>50</sub> (μM)	304	32	31	25	29	18	24	25	22	23

FAV: favipiravir

本試験系では、6-MP 単剤 (<200 μM), MTX 単剤 (<20 μM), PTX 単剤 (<20 μM) では、レプリコン阻害率が 50%に至らず、阻害活性が認められなかった。ファビピラビル及び代謝拮抗剤の組み合わせにより、ファビピラビル単剤の場合に比べ、レプリコン阻害活性が著しく増強された。

### 3-2 ヒット薬剤との併用下での抗インフルエンザウイルス活性評価

6-MP, MTX 及び PTX のうち、もっとも増強効果が強かった 6-MP に着目し、インフルエンザウイルスレプリコンシステムではなく、インフルエンザウイルスを用いた抗インフルエンザウイルス活性評価系を用いて併用効果を評価した。

6-MP 添加時のファビピラビルの 50% CPE 阻害濃度変化を Table 3 に示す。ファビピラビル単剤と比較し、6-MP との組み合わせにより、ファビピラビルの IC<sub>50</sub> は低値となった。6-MP 10 μM 併用下では、ファビピラビルの IC<sub>50</sub> は 0.38 μM であり、単剤時に比べ 5.2 倍の活性向上が確認された。なお本試験系では、6-MP (10 μM) 単剤で、CPE 阻害効果は全く示さなかった (-3% 阻害)。

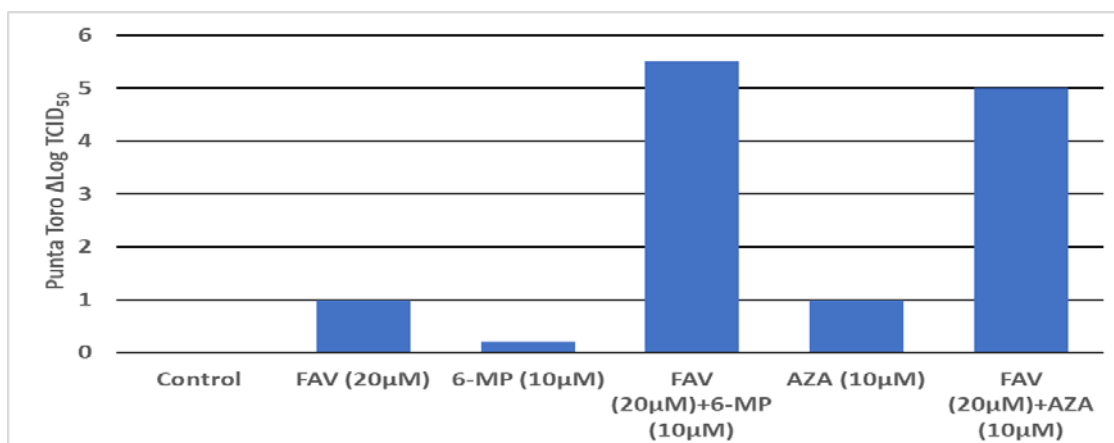
**Table 3. Change in IC<sub>50</sub> of favipiravir by 6-MP addition in anti-influenza virus activity evaluation.**

6-MP Concentration. ( $\mu\text{M}$ )	0	0.1	0.3	1	3	10
FAV IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	1.97	1.83	1.32	0.73	0.70	0.38

FAV: favipiravir

### 3-3 抗 Punta Toro ウイルス活性評価

次に、インフルエンザウイルス以外のウイルスで、ファビピラビルが感受性を示すことが知られているブニヤウイルス科の Punta Toro ウイルスを用いて 6-MP 及び AZA 添加時のファビピラビルの抗ウイルス活性を Yield Reduction 法で評価した。結果を Fig. 10 及び Table 4 に示す。ファビピラビルと 6-MP 又は AZA を併用することで、 $\Delta\text{LogTCID}_{50}$  が単剤時に比べ大幅に増加しており、抗ウイルス活性の増強が認められた。



**Figure 10. Changes in  $\Delta\text{LogTCID}_{50}$  in combination of favipiravir with 6-MP or AZA against Punta Toro virus.**

The virus loads (Log TCID<sub>50</sub>/mL) of the FAV 20  $\mu\text{M}$  treatment, 6-MP 10  $\mu\text{M}$  treatment, FAV (20  $\mu\text{M}$ ) and 6-MP (10  $\mu\text{M}$ ) treatment, AZA 10  $\mu\text{M}$  treatment group, FAV (20  $\mu\text{M}$ ) and AZA (10  $\mu\text{M}$ ) treatment were calculated as  $\Delta\text{Log TCID}_{50}$  compared with the amount of virus (TCID<sub>50</sub>/mL) when not treated with the drug. FAV: favipiravir

**Table 4. Changes in  $\Delta$ LogTCID<sub>50</sub> in combination of favipiravir (FAV) with 6-MP or AZA against Punta Toro virus (calculated value).**

	FAV	6-MP	AZA
Monotherapy	1.0*	0.2	1.0
Combination with FAV	—	5.5	5.0

\* The  $\Delta$ LogTCID<sub>50</sub> value, which indicates the viral load-lowering effect against infected controls, is shown.

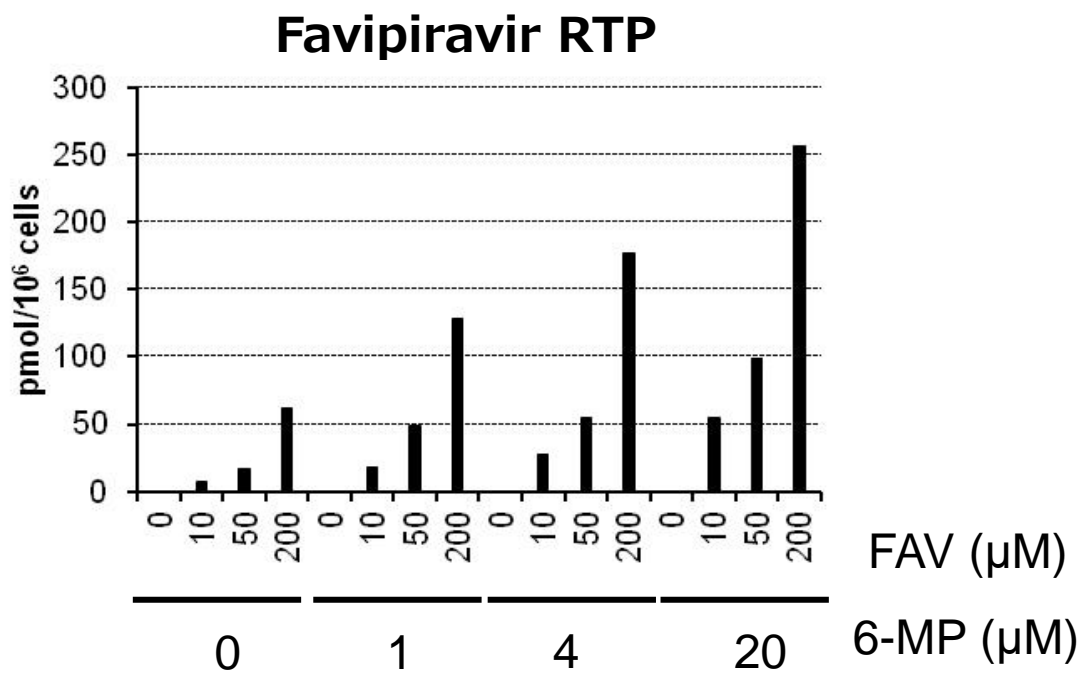
FAV: favipiravir

インフルエンザウイルスに加え, Punta Toro ウイルスにおいても, ファビピラビルと 6-MP 又は AZA との併用で抗ウイルス活性が増強されることを確認できた。

### 3-4 6-MP との併用下での細胞内代謝物解析

ファビピラビルは細胞内で糖付加・リン酸化され, 得られたファビピラビル RTP がウイルスの RdRP タンパク質を阻害することによって抗ウイルス作用を示すことが知られている (17, 46)。6-MP によるファビピラビルの活性増強効果は, ファビピラビル RTP 量の変化によるものかどうかを確認するため, 293T 細胞における 6-MP 処理下でのファビピラビル RTP 量を測定した。ファビピラビル RTP 量の変化を Fig. 11 に示す。6-MP により, ファビピラビル処理後の細胞内ファビピラビル RTP 量が増加した。

特に, 細胞内のファビピラビル RTP 量が, ファビピラビル 200  $\mu$ M 単剤処理の場合とファビピラビル 10  $\mu$ M +6-MP 20  $\mu$ M 併用下で同等であることから, 6-MP 処理により 20 倍のファビピラビル RTP の増加効果があることが確認された。



**Figure 11. Changes in the amount of favipiravir RTP in 293T cells in combination of favipiravir with 6-MP**

293T cells were incubated with 0, 10, 50, and 200 μM. Favipiravir alone or in combination with 1, 4, and 20 μM 6-MP for 24 hours, and intracellular favipiravir RTP was analyzed by LC/MS/MS. The measured value of favipiravir RTP was expressed as pmol per 10<sup>6</sup> cells. FAV: favipiravir



## 第 4 節 考察

本研究では、すぐに使用可能な承認薬剤の中からファビピラビルの活性を高める作用のある薬剤を取得することを目的に、FDA 承認薬の代謝拮抗剤を用いたスクリーニングを行い、複数の薬剤候補を取得することに成功した。

特に、6-MP について単剤では抗インフルエンザウイルス活性を示さなかったが、ファビピラビルとの併用により、ファビピラビルの活性を高めることに成功した。6-MP は、1948 年にジョージ・ヒッチニグスらが発見し、1952 年にはエリオンらが、ヒポキサンチンから合成に成功した薬剤であり、急性骨髄性白血病治療薬として現在も、維持療法に使用されている。また、適応外処方ではあるが、炎症性大腸炎にも使用されている。薬剤の作用機序としては、HPRT 及び IMPDH (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase) により代謝された活性代謝物が、白血病細胞の DNA/RNA 合成を阻害することが言われている (49)。また、HPRT 及び TPMT (Thiopurine methyltransferase) により代謝された活性代謝物が、*de novo* プリン合成を阻害することが知られている (Fig. 12) (49, 50)。この代謝活性化に使用される細胞酵素のうち、HPRT はファビピラビルの代謝活性化の律速酵素であり (46)、細胞内でファビピラビルと 6-MP が競合することが考えられたため、当初は 6-MP によるファビピラビルの活性増強効果は、6-MP によるプリン合成阻害による影響でファビピラビルの競合相手を減少させることで相対的に抗ウイルス活性が増強したものであり、6-MP によるファビピラビル RTP 量の減少のリスクを上回ったものと考えていた。ところが、予想に反して、6-MP 併用下では、ファビピラビル RTP の増加効果が確認された。本研究では、このファビピラビル RTP の増加効果のメカニズムの特定には至らなかったが、私は以下 2 つの仮説を考えた。

**仮説 1** : 6-MP との併用により, 両薬剤が共通して代謝活性化に必要であり, かつサルベージ経路に関わる HPRT の酵素活性あるいはその基質のホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) が増大することにより, 通常時より相対的な HPRT の活性が高まり, 結果として, ファビピラビル RTP の生成能が高まった。

**仮説 2** : ファビピラビル RTP の細胞内の半減期が 5 時間程度であることが知られているが (51) , その分解に関わる酵素活性が, 6-MP による細胞内の代謝酵素活性に影響を与えた, 又は, 6-MP の代謝活性体のうち, リン酸化体が, ファビピラビル RTP の“身代わり”となって優先的に分解酵素の基質となったことにより, ファビピラビル RTP が分解抑制され, 結果として細胞内のファビピラビル RTP 濃度が維持された。

2021 年の Soto-Acosta R らによる報告によれば, 6-MP の類縁物質である 6-メチルメルカプトプリン (6-MMP<sub>r</sub>) との併用により, ファビピラビルの脱フツ素体である T-1105 の抗ウイルス活性が増強すること, そのメカニズムとして, 6-MMP<sub>r</sub> が phosphoribosyl pyrophosphate amino transferase (PPAT) を阻害することで, その基質となる PRPP の蓄積を誘導する (52) 。PRPP は HPRT の基質であることから, T-1105 の糖リン酸化を促進したと考察している。

上記知見を踏まえると, 6-MP の活性代謝物の一部が 6-MMP<sub>r</sub> と一致することから, 本研究におけるファビピラビルと 6-MP 併用時のファビピラビル RTP 増加効果は, PRPP 蓄積による HPRT の活性増加によるものであることが推察され, **仮説 1** を支持するものと考えられる (Fig. 13)。

本研究で確認された 6-MP によるファビピラビル RTP の増加効果は、ファビピラビルの活性体の増加をもたらすことで、ファビピラビルの薬効効果の増強に直接的に寄与することを合理的に説明できる。

今回、インフルエンザウイルスや Punta Toro ウイルスについて 6-MP によるファビピラビルの活性増強効果を検証したが、ファビピラビルの効果がこれら以外の RNA ウイルスで確認されることが期待される。

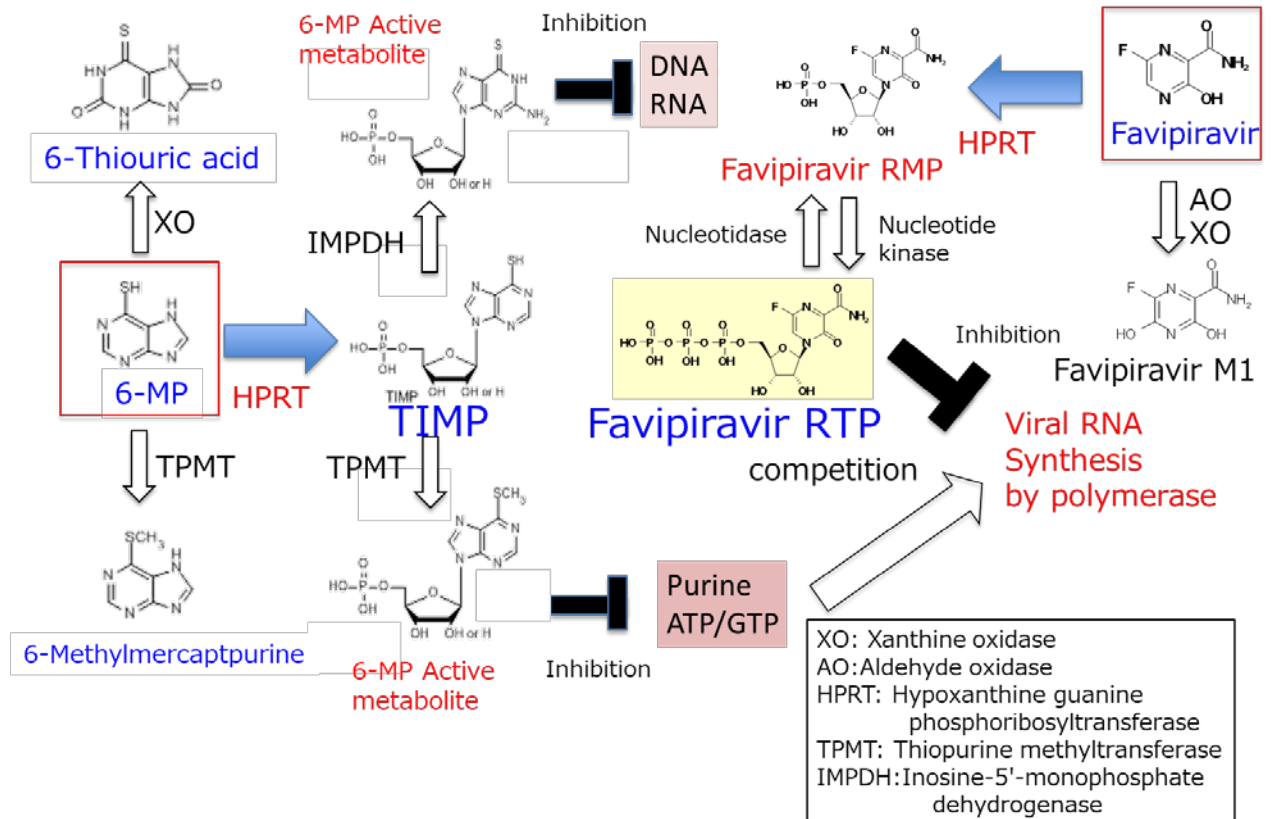
例えば、狂犬病ウイルスについて、山田らの報告では、狂犬病ウイルス感染マウスモデルで感染直後にファビピラビル 300 mg/kg/day で限定的な治療効果を示しているとの報告があり (16) , さらに投与量を高めることで治療効果が改善するとの報告がある (53) 。しかしながら、現在のファビピラビルのヒト臨床での最高用量 (初日 1800 mg BID, 2 日目以降 800 mg BID) 相当のマウス投与量は、フリー-AUC ベースで 200 mg/kg/day とされており (41) , 狂犬病ウイルス感染マウスモデルで薬効が確認されたファビピラビルの投与量は臨床投与量を大幅に上回っている。

これらのファビピラビル単剤での治療効果が不十分と考えられるウイルスで、他に治療薬がないウイルス疾患での効果の検証が望まれる。

また、注意すべき点としては、6-MP はその薬効が示すように、副作用として骨髄抑制による免疫低下作用が挙げられる。6-MP の併用によるファビピラビルの増強効果が、6-MP による免疫低下による感染増悪リスクを上回るかどうかの精査も併せて必要である。

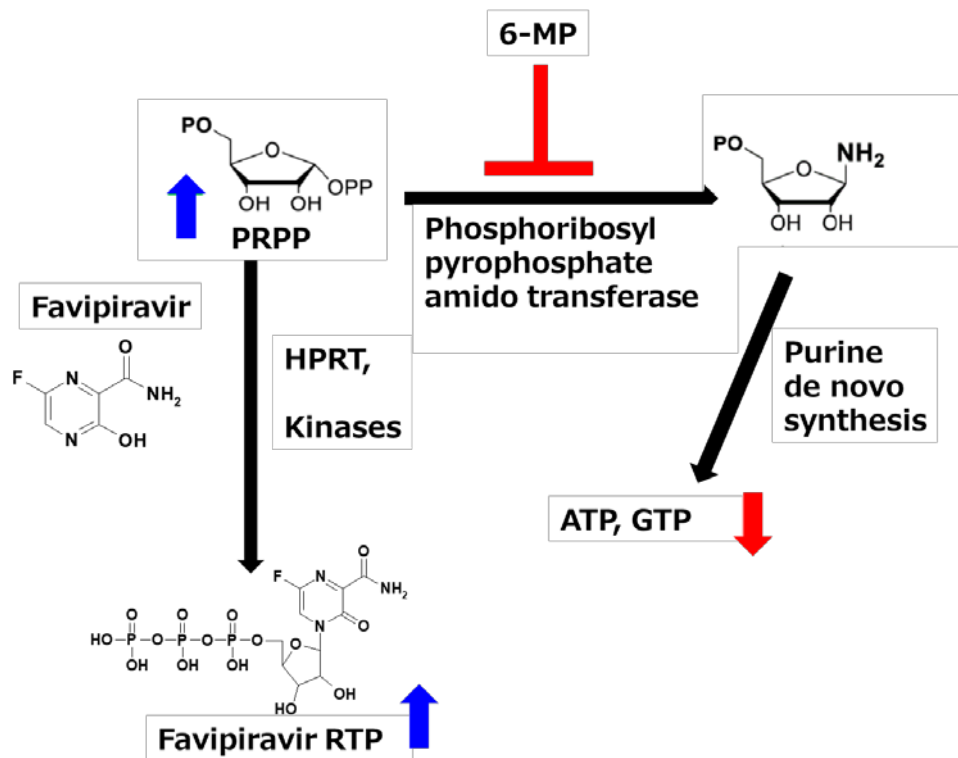
今後、これらの課題を明らかにすることで、ファビピラビルと 6-MP による併用療法により、治療薬の致死ウイルス疾患に新たな治療オプションを提供することが期待される。

また、本研究で確認されたファビピラビルと 6-MP によるファビピラビル RTP 量増加効果の詳細メカニズムを明らかにすることで、他の核酸アナログへの応用や新規核酸アナログ薬の創製に貢献することが期待された。



**Figure 12. Metabolic pathway of 6-MP and Favipiravir.**

Favipiravir is converted to Favipiravir RMP by HPRT and then to favipiravir RTP by nucleotide kinase. Favipiravir RTP inhibits viral RNA synthesis by polymerase. Favipiravir RTP is also degraded to favipiravir RMP by nucleotidase. Favipiravir is metabolized to Favipiravir M1 by AO and XO. 6-MP is converted to TIMP by HPRT. TIMP is converted to 6-MP Active metabolite by IMPDH or TPMT and inhibits host cell DNA/RNA or Purine (ATP/GTP) synthesis. 6-MP is metabolized by XO or TPMT to 6-Thiouric acid or 6-methylmercaptapurine.



**Figure 13. Presumed mechanism for 6-MP effects on nucleobase and purine nucleoside conversion to favipiravir RTP**

6-MP inhibits phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (PPAT) resulting in an inhibition of de novo purine synthesis. PPAT inhibition causes PRPP accumulation and increases nucleobase conversion to the ribonucleoside-5<sup>1</sup>-monophosphate form by cellular phosphoribosyl transferases and kinases. Blue arrows pointing upwards indicate an increased accumulation and red arrows pointing downwards a decreased accumulation.

## 第 5 節 小括

私は本章で、インフルエンザウイルスレプリコンシステムを用いて、FDA 承認された代謝拮抗剤から、ファビピラビルの活性体であるファビピラビル RTP 増加効果を示し、抗インフルエンザウイルス活性及び抗 Punta Toro ウイルス活性を増強する承認薬の 6-MP を取得したことを示した。

6-MP 併用によるファビピラビル RTP の増加効果は、汎用性が高く、ファビピラビルのブロードスペクトラムをそのまま活かせる可能性がある。

今後は、6-MP による骨髄抑制による免疫低下作用リスクも考慮しつつも、このリスクを上回るファビピラビル活性増加効果を示すかを精査する必要があるが、その課題を乗り越え、治療薬のない致死ウイルス疾患に新たな治療オプションを提供することにつながる事が期待される。

また、今回、ファビピラビルをモデルに、他方の薬剤の活性を高める目的での併用薬スクリーニング方法を確立した。今回確立した併用薬スクリーニング方法で、他の承認薬や開発薬剤との併用をすることで 6-MP に続くファビピラビルとの新たな併用薬を見出せる可能性を示したとともに、他の核酸アナログ薬剤の活性を高める薬剤をスクリーニングする目的にも応用可能と考える。

なお、本知見に関しては、富士フイルム富山化学株式会社として特許出願済みで、  
2020年7月2日に公開済みである（以下に示す）。

**WO2020138067A1 WIPO (PCT)**

ピラジン誘導体と細胞内におけるピラジン誘導体リボース三リン酸体の量を増加させる化合物とを組み合わせる RNA ウイルス感染症治療剤

Priority 2018-12-25 • Filed 2019-12-24 • Published 2020-07-02

## 総括

ファビピラビルのブロードスペクトラム性は、RNA ウイルスの RNA ポリメラーゼの Pre-Motif A (Motif F とも言われる) のリジン残基が共通保存されていることが一因であることが示唆された。また、このリジン残基は、RNA ポリメラーゼ活性維持のために必要不可欠であるために、ファビピラビルは *in vitro* で耐性化誘導しにくいことが示唆された。さらに、ファビピラビルがこの保存されている部位を阻害する機序を有することで、各種 RNA ウイルスに対してブロードスペクトラムを示すことにつながっていることが考えられた。

ファビピラビルをモデルに、他方の薬剤の活性を高める目的での併用薬スクリーニング方法を確立した。本研究で見出された 6-メルカプトプリンによるファビピラビル RTP 量を増加させる効果は、*in vitro* で検証しただけではあるが、ファビピラビルのブロードスペクトラム性にも反映され、汎用性が高いと考えられることから、ファビピラビル単剤ではインフルエンザウイルスに比べて効果が不十分かつ治療薬のない致死性ウイルス疾患への臨床応用が期待された。本研究結果を踏まえ、ファビピラビルを新たな RNA ウイルス治療薬として結びつけるための更なる研究開発が望まれる。さらに、今回確立した併用薬スクリーニング方法で、他の承認薬や開発薬剤との併用をすることで新たなファビピラビルとの併用薬を見出せる可能性を示すとともに、他の核酸アナログ薬剤の活性を高める薬剤をスクリーニングする目的に応用されることが期待される。



## 参考文献

### 参考文献 1

**Komono T.**, Furuta Y., Nakajima N., Tani H., Morinaga Y.

Analysis of the responsible site for favipiravir resistance in RNA-dependent RNA polymerase of influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) using site-directed mutagenesis

Antiviral Res. 2022, Volume 205, 105387

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105387>

### 参考文献 2

**Komono T.**, Nakatani T., Kurimoto Y., Matsuda S., Ban T. July 2020. Therapeutic agent for RNA viral infection obtained by combining pyrazine derivative and compound increasing amount of pyrazine derivative ribose triphosphate bodies in cell.

WO2020138067A1 (参考特許)

## 引用文献

1. Poovorawan Y, Pyungporn S, Prachayangprecha S, Makkoch J: Global alert to avian influenza virus infection: From H5N1 to H7N9. *Pathog Glob Health* 2013; 107: 217-23
2. WHO Ebola Response Team: Ebola virus disease in West Africa—the first 9 months of the epidemic and forward projections. *N Engl J Med* 2014; 371: 1481-95
3. WHO Statement regarding cluster of pneumonia cases in Wuhan, China <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>
4. Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Minami S, Watanabe Y, Narita H, Shiraki K. 2002. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:977-981.
5. Furuta Y, Takahashi K, Kuno-Maekawa M, Sangawa H, Uehara S, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Shiraki K. 2005. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:981-986.
6. Takahashi K, Furuta Y, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, Nomura N, Egawa H, Minami S, Shiraki K. 2003. In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 14:235-241.
7. Sangawa H, **Komeno T**, Nishikawa H, Yoshida A, Takahashi K, Nomura, Furuta Y. 2013. Mechanism of action of T-705 ribosyl triphosphate against influenza virus RNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:5202-8.
8. Kiso M, Takahashi K, Sakai-Tagawa Y, Shinya K, Sakabe S, Le QM, Ozawa M, Furuta Y, Kawaoka Y. 2010. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:882–887.
9. Takahashi K. 2011. Anti influenza viral drugs and pharmacological effect of favipiravir (Japanese). *Jon Med Pharm Sci.* 66:429-441.
10. Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, Gowen BB, Julander JG, Morrey JD. 2009. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 82:95-102.
11. Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mendenhall M, Bailey KW, Furuta Y, Sidwell RW. 2007. In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3168-3176.
12. Julander JG, Shafer K, Smee DF, Morrey JD, Furuta Y. 2009. Activity of T-705 in a hamster model of yellow fever virus infection in comparison with that of a

- chemically related compound, T-1106. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:202-209.
13. Mendenhall M, Russell A, Juelich T, Messina EL, Smee DF, Freiberg AN, Holbrook MR, Furuta Y, de la Torre JC, Nunberg JH, Gowen BB. 2010. T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:782-787.
  14. Morrey JD, Taro BS, Siddharthan V, Wang H, Smee DF, Christensen AJ, Furuta Y. 2008. Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents. *Antiviral Res.* 80: 377-379.
  15. Oestereich L, Lüdtke A, Wurr S, Rieger T, Muñoz-Fontela C, Günther S. 2014. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res.* 105:17–21.
  16. Yamada K, Noguchi K, **Komeno T**, Furuta Y, Nishizono A. 2016. Efficacy of Favipiravir (T-705) in rabies postexposure prophylaxis. *J. Infect. Dis.* 213:1253–1261.
  17. Furuta Y, **Komeno T**, Nakamura T. 2017. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 93:449-463.
  18. Honda A, Mizumoto K, Ishihama A. 1999. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells.* 4:475-85
  19. Asano Y, Ishihama A. 1997. Identification of two nucleotide-binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem.* 122:627-34.
  20. Goldhill DH, Te Velthuis AJW, Fletcher RA, Langat P, Zambon M, Lackenby A, Barclay WS. 2018. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115:11613-18.
  21. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-82.
  22. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-25.
  23. Kimura M. 1991. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn J Genet.* 66:367-86.
  24. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
  25. Vieth S, Torda AE, Asper M, Schmitz H, Günther S. 2004. Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology.* 318:153-68
  26. Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. 2000. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. *J Virol.* 74:547-51.
  27. Jones MH, Learned RM, Tjian R. 1988. Analysis of clustered point

- mutations in the human ribosomal RNA gene promoter by transient expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:669-73.
28. Grummt I, Rosenbauer H, Niedermeyer I, Maier U, Ohrlein A. 1986. A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell.* 45:837-46.
  29. Kinsella E, Martin SG, Grolla A, Czub M, Feldmann H, Flick R. 2004. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. *Virology.* 321:23-8
  30. Sakamoto K. 2011. In vitro activities of antiviral agents against foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase. *Jpn. J. Anim. Hyg.* 37:45-9
  31. Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, Larsson A, Misiorny A, Norén JO, Philipson L, Stenberg K, Stening G, Stridh S, Oberg B. 1977. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob Agents Chemother.* 11:946-51.
  32. Chu C, Fan S, Li C, Macken C, Kim JH, Hatta M, Neumann G, Kawaoka Y. 2012. Functional analysis of conserved motifs in influenza virus PB1 protein. *PLoS One.* 7:e36113.
  33. Labonté P, Axelrod V, Agarwal A, Aulabaugh A, Amin A, Mak P. 2002. Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 277:38838-46
  34. Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. 2016. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. *Antiviral Res.* 132:170-7
  35. Goldhill DH, Yan A, Frise R, Zhou J, Shelley J, Gallego Cortés A, Miah S, Akinbami O, Galiano M, Zambon M, Lackenby A, Barclay WS. 2021. Favipiravir-resistant influenza A virus shows potential for transmission. *17:e1008937.*
  36. Hass M, Lelke M, Busch C, Becker-Ziaja B, Günther S. 2008. Mutational evidence for a structural model of the Lassa virus RNA polymerase domain and identification of two residues, Gly1394 and Asp1395, that are critical for transcription but not replication of the genome. *J Virol.* 82:10207-17.
  37. Iglesias NG, Filomatori CV, Gamarnik AV. 2011. The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis. *J Virol.* 85:5745-56.
  38. Delang L, Segura Guerrero N, Tas A, Quérat G, Pastorino B, Froeyen M, Dallmeier K, Jochmans D, Herdewijn P, Bello F, Snijder EJ, de Lamballerie X, Martina B, Neyts J, van Hemert MJ, Leyssen P. 2014. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *J Antimicrob Chemother.* 69:2770-84.
  39. Abdelnabi R, Morais ATS, Leyssen P, Imbert I, Beaucourt S, Blanc H, Froeyen M, Vignuzzi M, Canard B, Neyts J, Delang L. 2017. Understanding the

- mechanism of the broad-spectrum antiviral activity of Favipiravir (T-705): Key role of the F1 motif of the viral polymerase. *J Virol.* 91:e00487-17.
40. Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. 2016. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *mSphere.* 1:e00061-15.
  41. Tani H, **Komeno T**, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Shimojima M, Uda A, Morikawa S, Nakajima N, Furuta Y, Saijo M. 2018. Therapeutic effects of favipiravir against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a lethal mouse model: Dose-efficacy studies upon oral administration. *PLoS One.* 13:e0206416.
  42. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W, Xiao G. 2020. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 30:269-271.
  43. Kaptein SJF, Jacobs S, Langendries L, Seldeslachts L, Ter Horst S, Liesenborghs L, Hens B, Vergote V, Heylen E, Barthelemy K, Maas E, De Keyzer C, Bervoets L, Rymenants J, Van Buyten T, Zhang X, Abdelnabi R, Pang J, Williams R, Thibaut HJ, Dallmeier K, Boudewijns R, Wouters J, Augustijns P, Verougstraete N, Cawthorne C, Breuer J, Solas C, Weynand B, Annaert P, Spriet I, Vande Velde G, Neyts J, Rocha-Pereira J, Delang L. 2020. Favipiravir at high doses has potent antiviral activity in SARS-CoV-2-infected hamsters, whereas hydroxychloroquine lacks activity: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117:26955-26965.
  44. Driouich JS, Cochin M, Lingas G, Moureau G, Touret F, Petit PR, Piorkowski G, Barthélémy K, Laprie C, Coutard B, Guedj J, de Lamballerie X, Solas C, Nougairède A. 2021. Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun.* 12:1735.
  45. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, Leist SR, Schäfer A, Dinnon KH 3rd, Stevens LJ, Chappell JD, Lu X, Hughes TM, George AS, Hill CS, Montgomery SA, Brown AJ, Bluemling GR, Natchus MG, Saindane M, Kolykhalov AA, Painter G, Harcourt J, Tamin A, Thornburg NJ, Swanstrom R, Denison MR, Baric RS. 2020. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med.* 12:eabb5883.
  46. Naesens L, Guddat LW, Keough DT, van Kuilenburg AB, Meijer J, Vande Voorde J, Balzarini J. 2013. Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir). *Mol Pharmacol.* 84:615-29.
  47. Karber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* 162:480-483.

48. Matsuda S, Kasahara T. 2018. Simultaneous and absolute quantification of nucleoside triphosphates using liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Genes Environ.* 40:13.
49. Lim SZ, Chua EW. 2018. Revisiting the Role of Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease Through Pharmacogenomics and Use of Novel Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Front Pharmacol.* 9:1107.
50. Weigel G, Griesmacher A, DeAbreu RA, Wolner E, Mueller MM. 1999. Azathioprine and 6-mercaptopurine alter the nucleotide balance in endothelial cells. *Thromb Res.* 94:87-94.
51. Smee DF, Hurst BL, Egawa H, Takahashi K, Kadota T, Furuta Y. 2009. Intracellular metabolism of favipiravir (T-705) in uninfected and influenza A (H5N1) virus-infected cells. *J Antimicrob Chemother.* 64:741-6.
52. Soto-Acosta R, Edwards TC, Dreis CD, Krishna VD, Cheeran MC, Qiu L, Xie J, Bonnac LF, Geraghty RJ. 2021. Enhancing the Antiviral Potency of Nucleobases for Potential Broad-Spectrum Antiviral Therapies. *Viruses.* 13:2508.
53. Yamada K, Noguchi K, Kimitsuki K, Kaimori R, Saito N, **Komeno T**, Nakajima N, Furuta Y, Nishizono A. 2019. Reevaluation of the efficacy of favipiravir against rabies virus using in vivo imaging analysis. *Antiviral Res.* 172:104641.

## 謝辞

御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました富山大学学術研究部医学系微生物学講座 教授 森永 芳智先生に深く感謝の意を表します。

本研究における富山県衛生研究所ウイルス部 部長 谷 英樹先生の御指導・御鞭撻に深甚なる謝意を表します。

また、御協力を頂きました富山大学学術研究部医学系微生物学講座の方々、古田 要介 博士をはじめとする富士フイルム富山化学株式会社 研究所の関係者の皆様には厚くお礼申し上げます。

## 略語表

AZA; Azathioprine

CPE; cytopathogenic effect

EC<sub>50</sub>; 50% effective concentration

EC<sub>90</sub>; 90% effective concentration

HPRT; Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

IC<sub>50</sub>; 50% inhibition concentration

IMPDH; Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase

MTX; Methotrexate

PTX; Pralatrexate

RdRP; RNA-dependent RNA polymerase

SFTS; severe fever with thrombocytopenia syndrome

SNP; single nucleotide polymorphism

TG; Thioguanosine

TPMT; Thiopurine methyltransferase

6-MP; 6-mercaptopurine