

## 論文の内容の要旨

論文題目 長時間作用型インフルエンザ薬ラニナミビルオクタノエイト (CS-8958)の研究  
—その発見と特性—

氏 名 久保 淑

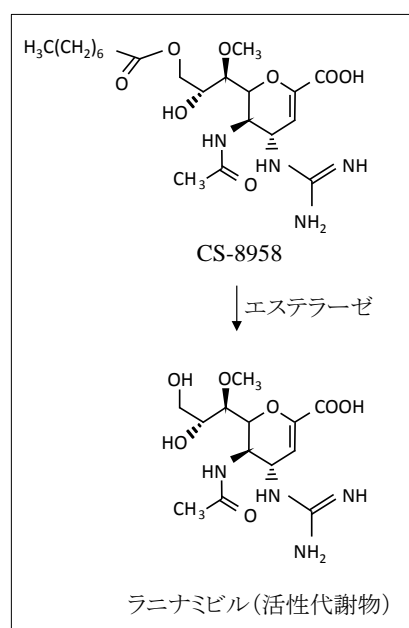
### 【序文】

インフルエンザはインフルエンザウイルスが飛沫感染や接触感染して起きる急性呼吸器感染症である。ウイルスは非常に速い増殖スピードで複製し、高齢者や基礎疾患を有する人を中心に時として致死的ともなる決して侮れない感染症であり、抗ウイルス薬の必要性は高い。

インフルエンザウイルスはゲノムとしてRNAを持つ被膜ウイルスで、膜上には細胞への吸着・侵入と感染の拡大に重要な働きをするヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)がある。ウイルスはHAを介して細胞上の糖鎖末端シアル酸を受容体として認識し細胞に吸着し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、ゲノムの複製やウイルスタンパク質合成過程を経て感染細胞から多数の子ウイルスコピーが出芽する。HAを有する子ウイルスも細胞膜やウイルス膜の糖鎖末端シアル酸に結合するので、ウイルス凝集体を形成する。そこにNAが働き受容体シアル酸が切断されるとHAを介した結合は不可となり、子ウイルスは凝集体から遊離し次の感染へと向かう。

NA活性を阻害するとウイルスの感染拡大が阻害されるため、抗インフルエンザ薬となる。NA阻害剤としては、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルオクタノエイト(以下、CS-8958)が国内で承認されている。オセルタミビルは経口剤、ザナミビルは吸入剤で、いずれも1日2回5日間(10回)の投与が治療に必要である。ペラミビルは静注が必要な1回投与の薬剤である。CS-8958はラニナミビルを活性体とするプロドラッグ体であり、1回吸入で治療が完結する長時間作用型の薬剤である。

本論文ではラニナミビルの発見とその*in vitro*での評価、CS-8958発見の経緯とその動物感染モデル系での薬効評価、CS-8958の長時間作用の要因とその機構の仮説を提示、最後にCS-8958が耐性ウイルス産生に抑制的に作用する薬剤であることについて記載した。



## 【結果】

### ① 新規 NA 阻害剤ラニナミビルの発見と *in vitro* 活性

ザナミビルをリード化合物として合成した種々化合物から NA 阻害活性を指標に探索を行ない、新規 NA 阻害剤ラニナミビルを見出した。NA 阻害活性はウイルスを NA 酵素源、蛍光標識シアル酸を基質として、切断により生じる蛍光を測定することにより調べた。ラニナミビルは、ヒトで流行中の A 型ウイルス H1N1 亜型(ソ連型、この型の流行は 2010 年には終息)、H1N1pdm09 亜型(2009 年のパンデミックウイルス)、H3N2 亜型(香港型)及び B 型ウイルス、加えて NA の既知の全血清型(N1~N9 亜型)および高病原性 H5N1 トリインフルエンザウイルスの各 NA に対し、他薬剤と同様に強い阻害活性を有していた。また、各種オセルタミビル耐性ウイルスの NA に対しても阻害活性を維持していた。

さらに、ブランク減少アッセイを用いてインフルエンザウイルス培養細胞感染系でウイルス増殖抑制作用を検討することにより、ラニナミビルが N1~N9 の全亜型に対し増殖抑制作用を示すことを明らかにした。

### ② プロドラッグ化による長時間作用性の付与

ラニナミビルは先行薬と同様に強い *in vitro* 阻害活性を有していたが、先行薬に比べ優れた特長を有する薬剤になるとまでは言えなかった。そこで、先行薬が 10 回の反復投薬が必要な点に着目し、1 回投与で有効な化合物であれば治療薬として大きなメリットがあると考えた。ラニナミビルのプロドラッグ化により 1 回投与でも有効な化合物となるのではないかと考え、ラニナミビルの各種プロドラッグ体を感染動物モデル系で評価した。その結果、最も優れた効果を示す化合物として 9 位水酸基にオクタン酸を付加した CS-8958 を見出した。

### ③ CS-8958 の動物感染モデル系での評価

インフルエンザウイルス感染マウスに CS-8958 を経鼻投与し、延命効果あるいは肺中のウイルス量の測定により薬効評価を行なった。ウイルスとしては A 型ウイルスの H1N1、H1N1pdm09、H3N2、オセルタミビル耐性 H1N1 の各亜型および B 型ウイルスを使用した。その結果、CS-8958 は 1 回投与でも、反復投与の先行薬と同等ないしそれ以上のウイルス産生抑制作用やマウス延命作用を示した。次に感染前の予防的投与実験を行ったところ、感染の 10 日前の 1 回投与でも有意な延命効果を示した。以上のことから、CS-8958 は長時間作用型薬剤であることが明らかとなった。

### ④ CS-8958 の長時間作用性の理由

ラニナミビルの NA 結合安定性について検討した。ウイルス(H1N1、H1N1pdm09、H3N2、B)を NA 源として過剰量の NA 阻害剤と混合し、遊離の NA 阻害剤をゲルろ過で除去して調製した NA-NA 阻害剤複合体に基質を添加し切断反応を追跡した。その結果、ラニナミビルは他の 3 薬剤と比べいずれの型のウイルスに対しても NA に安定な結合をしていることが明らかとなった。経鼻投与した CS-8958 は速やかにラニナミビルに変換して長時間貯留するという別途明らかとなっている薬物動態的特性に加え、ここで明らかとなった NA と安定な結合をし解離が遅いことが、CS-8958 が長時間作用をもたらす要因のひとつと考えられた。

### ⑤ CS-8958 が肺で長時間残留する機構の解明

放射標識 CS-8958 やラニナミビルを用いた動物実験から、CS-8958 は切断酵素(エステラーゼ)でオクタン酸が切断され、ラニナミビルとして細胞内に長く貯留することが示唆されていた。そこで貯留機構を解明する目的でそのエステラーゼの同定を試みた。

粗精製した CS-8958 の電気泳動バンドの質量分析により、活性と挙動を同じにする分子量約 60kd のバンドがカルボキシエステラーゼ 3(CES3)と同定された。CES3 遺伝子をクローニングし細胞で発現さ

せると、細胞画分に CS-8958 切断活性が回収され、CES3 が小胞体／ゴルジ体局在シグナルを持つ酵素であることと合致した。mRNA 発現データベースから、CES3 は肺、肝、腎で高発現しており、また、抗 CES3 抗体を用いてマウス呼吸器を免疫染色すると、上皮細胞に CES3 が発現していることが確認された。この細胞はインフルエンザウイルスの標的細胞そのものである。

以上のことから、CS-8958 の長時間貯留機構について次のような仮説を立てた。CS-8958 はその脂溶性を利用して気道上皮細胞膜にアソシエイトし、小胞体／ゴルジ体内に移行し、その内腔側に活性中心を持つ CES3 により切断される。小胞体／ゴルジ体内に生じた活性体ラニナミビルはその高水溶性のため、膜構造体外への排出が制限され貯留するようになる。一方、膜タンパク質である NA は、小胞体／ゴルジ体の内腔側にその活性中心を向けた状態で、糖鎖修飾や多量体形成の成熟過程を経る。NA はその過程でラニナミビルと安定な結合をして細胞膜に移動し、ウイルス粒子形成を行なう。他剤が細胞外(気管側)から NA に結合し、貯留することのできない薬剤である点が CS-8958 との大きな違いと考えられる。

#### ⑥ 低感受性ウイルス産生の抑制

抗ウイルス薬に不可避の問題として薬剤耐性ウイルスの出現がある。*In vitro*において、ラニナミビル添加培地中で培養細胞にウイルスを感染させ、増殖してくるウイルスを再度感染させるという継代操作を繰り返しても、NA に耐性変異は導入されなかった。ラニナミビルは化合物の構造上の特性として耐性化を起しづらい化合物であると示唆された。

*In vivo*においては CS-8958 はラニナミビルとして呼吸器に長時間貯留するため、ウイルス増殖の場に持続的に高濃度で存在する。このことは薬剤耐性ウイルス産生に抑制的に働くことが期待される。そのことを薬剤投与の感染マウスを用いて次のような実験で確認した。感染マウスに CS-8958 を 1 回またはオセルタミビルを 1 日 2 回 5 日間投与を行い、感染 7 日後のそれぞれの肺からウイルスを約 2300 個分離し薬剤感受性を調べた。その結果、オセルタミビル投与マウスからオセルタミビル活性体への感受性が減弱した低感受性ウイルスが 4 株分離できたが、CS-8958 投与マウスからは低感受性ウイルスは 1 株も分離できなかった。

以上のことから CS-8958 は、ラニナミビルの構造的特性および CS-8958 の持続的かつ高濃度にラニナミビルが存在するという薬物動態的特性で耐性ウイルス産生に抑制的に働くことが示唆された。

#### 【まとめ】

本研究において、新規 NA 阻害剤ラニナミビルを発見し、さらにそのオクタン酸付加プロドラッグ体 CS-8958 が感染動物を用いた評価により長時間作用の性質を獲得することを見出した。長時間作用をもたらす要因として CS-8958 の長時間貯留という薬物動態的特性の他にラニナミビルの NA への結合安定性があることを示唆した。CS-8958 切断酵素として CES3 を同定し、NA がその成熟過程で通過する小胞体／ゴルジ体に長時間貯留する機構を提示した。また、ラニナミビルの構造的特性とウイルス増殖部位にラニナミビルが高濃度で継続して存在する動態的特性を利用して、CS-8958 は耐性ウイルス出現に抑制的に働くこと示した。CS-8958 は 1 回で治療が完結する吸入剤イナビル®(10 歳以上 40mg、10 歳未満 20mg)として 2010 年 10 月に上市された。