

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 745 号	学位申請者	李 佳洲
審査委員	主査	久保田 龍二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	西 順一郎	副査 前田 賢次
	副査	中畑 新吾	副査 田中 正和
<p>主査および副査の5名は、令和6年4月11日、学位申請者 李 佳洲 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 宿主因子を標的とした抗インフルエンザの薬は他に何があるか? (回答) 現在日本で市販されている宿主因子を標的とした抗インフルエンザの薬はない。北海道大学のグループが抗インフルエンザウイルス活性を示す宿主 RNA メチル基転移酵素 MTR1 阻害化合物トリフルオロメチルツベルシジン (TFMT) を同定したことを報告している (PMID: 36758070)。</p> <p>質問2) インフルエンザウイルス以外のウイルスで宿主因子を標的とした抗ウイルス薬はあるか? (回答) インフルエンザウイルス以外のウイルスに対しても、宿主因子を標的とした抗ウイルス薬が研究されている。たとえば HIV 感染症の治療には、CCR5 阻害薬としてシーエルセントリなどが使用されている。</p> <p>質問3) 人に対して臨床応用を考えた場合、ウリジンやシチジンは血管を通して常に循環している状態なので、今回同定した化合物の抗ウイルス効果がキャンセルされる可能性があるか? (回答) キャンセルされないと思う。今回外部から加えたウリジン、シチジンの濃度は 100μM~400μM で検討した。100μM の場合は Vidofludimus の抗ウイルス効果が減弱したが、軽度であった。また生体内の場合は血中で循環しているウリジンの濃度は約 3~8μM で、シチジンの濃度は最大でも約 60μM である。よって今回実験で使う最低濃度よりかなり低いことから、大きく変わらないと考えられる。</p> <p>質問4) Vidofludimus は H5N1、H1N1 と IBV に対する EC₅₀ は同じであるか? (回答) Vidofludimus は野生型の H5N1 と H1N1 に対する EC₅₀ はそれぞれ 2.10μM と 1.75μM である。今回の実験では Vidofludimus の IBV に対する EC₅₀ を検討しなかった。</p> <p>質問5) H1N1 の RdRp assay 実験で Baloxavir marboxil と Vidofludimus の抗ウイルス効果に差があった理由は何が考えられるか? (回答) 今回の H1N1 RdRp assay を実施した目的は自然感染の結果を反映できるかどうかである。そのため自然感染と同じように低濃度の化合物で実験を行った。このため Baloxavir marboxil と Vidofludimus の抗ウイルス効果に差が生じたと考えられる。</p> <p>質問6) DHODH は全ての細胞に発現しているか? (回答) Pyrimidine の合成回路に重要な酵素の一つであるから、全ての細胞に発現している。しかし細胞の種類や臓器などの違いによって、発現のレベルが違ふ。</p> <p>質問7) 既存薬と Vidofludimus は併用できるか? (回答) 現在、一般的に使用されているインフルエンザ治療の多剤併用療法はないが、作用点が違う Oseltamivir などの治療薬や対症療法薬の解熱剤などとの併用は考えられる。しかし事前に検討が必要である。</p> <p>質問8) PB2 の変異によって、H5N1 がミンク間に広がった理由は何が考えられるか? (回答) PB2 の変異は、インフルエンザウイルスの宿主特異性や病原性に影響を与えることが報告されている。PB2 の変異によって、H5N1 がミンクでの増殖力の増加や伝播する能力を獲得できたと考えられる。これによって H5N1 がミンク間に広がったと考えられる。</p> <p>質問9) Vidofludimus をスクリーニングで選んだ理由は何が考えられるか? (回答) 今回スクリーニングを実施した Phase II drop Screening Libraries には 350 種類の化合物がある。設定したゴー</p>			

最終試験の結果の要旨

ルは抗ウイルス効果が 80%以上で細胞毒性が 10%以下である。このゴールを達成し、さらに報告されていない化合物は唯一 Vidofludimus しかなかった。

質問 1 0) Phase II drop 以外に化合物ラブラリーがあるが、スクリーニングを実施するときどう選択すれば良いか？

(回答) 目的に応じて選択すれば良いと思う。今回の場合は患者に早く提供できる目的でスクリーニングを実施したため、臨床に近い Phase II drop を選択した。他には例えば、ウイルスのあるタンパク質をターゲットにして、スクリーニングを実施する場合は、データベース上の化合物ラブラリーの情報とウイルスのタンパク質の相互作用をコンピューター上でシミュレーションし、最も適切な化合物ラブラリーを選べば良いと考える。

質問 1 1) Transfection 後に plasmids は細胞での発現がバラツキが多くなるので、安定した評価系の方が良いのではないか？

(回答) Plasmids を利用した一過性の評価系はバラツキが多いため、今後は安定した細胞レプリコン発現評価系を構築する予定である。

質問 1 2) H1N1 の感染粒子を作成するにあたり、RdRp assay 系の transfection 時に導入した DNA の比率は同じか？

(回答) RdRp assay 系の transfection 時は DNA の比率は 1 : 1 である。感染粒子を作成する際は、効率良くウイルス粒子を作成するために、先行文献を調べて、粒子合成に最適な DNA 比率で実施した。

質問 1 3) Pyrimidine の生物合成経路は全臓器共通しているか？

(回答) Pyrimidine の生物合成経路は全臓器共通である。しかし Pyrimidine の生物合成経路に重要な酵素 DHODH は臓器や細胞によって発現が異なる。

質問 1 4) DHODH inhibitor はどの臓器をターゲットにしているか？

(回答) DHODH inhibitor は全ての臓器をターゲットにしているが、DHODH の発現量によって、与える影響が違うと考えられる。

質問 1 5) RdRp PA(138T)、PB2(T271A)や PA(138T)+PB2(T271A)変異株の実験で、化合物処理群の有意差ほどの群と比較して得られたか？

(回答) 化合物が変異株の H5N1 に対する抗ウイルス効果の実験では、各変異株の化合物処理グループはその変異株の化合物フリーのグループと比べて、有意差を出している。

質問 1 6) 今後のプランとして、Vidofludimus をどう現実的に応用していくか？

(回答) 今回の in vitro の実験結果を用いて、動物実験などでさらに in vivo の効果を検討し、臨床応用に進めていきたいと思う。

質問 1 7) インフルエンザウイルスについて高病原性と低病原性は何が決めているか？

(回答) インフルエンザウイルスについて高病原性と低病原性を決める原因はウイルスの複製速度、増殖能力や宿主特異性などがあるが、最も重要な原因はウイルスの表面に存在するヘマグルチニンである。ヘマグルチニンは宿主細胞への侵入に関わって、細胞侵入力が高いヘマグルチニンを持つウイルスは通常、高病原性を示している。

質問 1 8) Fig4 C の Favipiravir 投与実験で RT-qPCR と PCR 産物電気泳動の結果に違いがあるのは何故か？

(回答) 今回の RT-qPCR は 30 サイクルで実施したため、指数関数的に増加した Favipiravir の PCR 産物の電気泳動の結果はコントロールの結果との違いが見にくいですが、実際のデータを見ると大きな差がある。

質問 1 9) Pyrimidine の合成が下がると、何故ウイルスの増殖を抑えるか？

(回答) Pyrimidine は RNA 合成に対して、とても重要な原料の一つである。インフルエンザウイルスは RNA ウィルスであるため、Pyrimidine の合成を抑えると、ウイルスの転写と複製を抑えることによって、ウイルスの増殖を抑えたと考えられる。

質問 2 0) 今回は Vidofludimus が DHODH の inhibitor であることを前提に実験を行ったが、Vidofludimus が直接にウイルスのポリメラーゼや他の細胞因子を抑制することによって抗ウイルス活性を示す可能性について検討したか？

(回答) 今回は Vidofludimus が DHODH を抑制して、抗ウイルス活性を示すことだけを検討したが、今後はシングルセル RNA-seq などの方法を利用して、Vidofludimus が他の経路を介して抗ウイルス活性を示す可能性についても検討していきたいと思う。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。