

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	阿部 雄一
論文題目	感染性C型肝炎ウイルス粒子形成を制御する新規宿主因子トロンボキサンA2合成酵素の機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変から肝癌の原因ウイルスである。既にHCV感染者数は世界人口の約3%におよぶことから、このウイルス感染を排除するための効果的な方策を構築する必要がある。そのために、このウイルスの生活環の詳細を明らかにし、その情報をもとに抗HCV薬開発がおこなわれている。これまでに、不死化ヒト肝細胞 (HuS-E/2細胞) を立体培養することで、平面培養では認められなかった患者由来天然型HCVの生活環を再現することが可能であることが示されている。そこで立体培養したHuS-E/2細胞に特徴的な細胞内の変化を同定し、そのHCV生活環との関連を検証した。まず、平面と立体という二つの培養方法で培養した細胞間における遺伝子発現様式の相違をマイクロアレイ法によって解析した。次に、この結果をもとに、その相違に関連する細胞内シグナル経路を候補として選択した。そのシグナル系とHCV生活環との関連について肝がん由来HuH-7細胞を用いた組換え体HCV粒子産生系を用いて検討をおこなった。まず、発現様式が異なる遺伝子群としてアラキドン酸カスケードを構成する酵素の遺伝子群が候補の一つとして見出された。そこで、アラキドン酸カスケードの初発酵素シクロオキシゲナーゼ(COX)-1の阻害剤を用いて、その組換え体HCV粒子産生系に対する影響を検討した。その結果、COX-1阻害剤処理は細胞内および培養上清中に産生されるHCV RNA量には対照群と比較して著しい変化を与えなかったが、培養上清中の組換え体HCVの感染性を濃度依存的に低下させることがわかった。次にアラキドン酸カスケードにおいてCOX-1の酵素反応産物であるプロスタグランジン(PG)Hを培地に加えたところ、上記とは逆に組換え体HCVの感染性を有意に上昇させることがわかった。そこで次に上記立体培養HuS-E/2細胞で発現が上昇しており、HuH-7細胞で発現が認められたトロンボキサンA2合成酵素(TXAS)に着目した。TXASの発現量を低下させるsiRNAやshRNA処理、またその酵素活性を阻害する阻害剤Ozagrel処理によって、上記同様に、培養上清中組換え体HCVの感染性が低下することがわかった。このことからTXAS活性が感染HCV産生に関与していることが明らかになった。次にTXASの作用がHCV粒子産生のどの過程に関与するのかを検討した。まず、感染性HCV粒子の細胞内から細胞外への輸送に関与するか否かについて検討したところ、Ozagrel処理による感染性HCV粒子の細胞内蓄積は認められず、逆に細胞内においても感染性HCV粒子量は低下していた。このことからTXASは細胞内における感染性HCV粒子産生に関与することがわかった。次にTXASがどのようにして感染性HCV粒子産生に効果を及ぼすのか、その作用機序について検討をおこなった。アラキドン酸カスケードにおけるTXASの酵素反応産物として知られるTXA₂はその受容体分子TPを介して種々の生理活性を示すため、TXASの効果がTPを介して行われるか否かを検討した。しかしながら、組換え体HCV粒子産生系においてTPアゴニストならびにTPアンタゴニストは共になんら効果を示さなかった。このことからTXASはTPを介さない、未知のシグナル系を介して感染性HCV粒子産生に関与することが示唆された。</p> <p>上記の結果を基に、TXAS阻害剤とTXA₂と相反する活性を示すPGI受容体(IP)アゴニストの抗HCV活性について、ヒト肝細胞キメラマウスによる抗HCV薬評価システムを用いて検討した。その結果、それぞれの薬剤投与により、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるHCV感染伝播を効果的に抑制されることがわかった。このことから、これらの薬剤が、新たな作用機序をもつ新規抗HCV薬の候補であることが示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染性粒子産生に関与する新たな細胞内因子の解析を行なったものである。申請者は患者血由来 HCV の感染増殖を再現することができる不死化ヒト肝細胞立体培養系を基に、HCV 生活環を再現できない平面培養との相違に着目し、両者の遺伝子発現様式の比較をおこなった。その結果、立体培養で発現の異なる遺伝子群としてアラキドン酸カスケード関連遺伝子群を同定した。このアラキドン酸カスケードと HCV 生活環との関連をこのカスケードの律速酵素である COX1 の阻害剤と組換え体 HCV 産生培養系を用いて検証したところ、この阻害剤により培養上清に産生される HCV の感染性が低下することを見出し、初めてアラキドン酸カスケードが HCV の感染増殖に関与することを示した。また、さらにアラキドン酸カスケード中のトロンボキサン A2 合成酵素(TXAS)がその感染性 HCV 粒子産生に機能することを siRNA や TXAS 阻害剤を用いて明らかにしている。TXAS のこの機能が TXAS の酵素反応産物である TXA2 の受容体(TP)に依存しないことから、TXAS からの未知なシグナル系がこの現象に関わっている可能性を示唆している。

さらに、TXAS阻害剤である Ozagrel と TXA₂ と拮抗する機能を有するプロスタグランジン(PG)I受容体(IP)アゴニストについて、その抗HCV薬剤効果について HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬剤評価系を用いて検討した。その結果、これらの薬剤は有意にHCVの感染伝播を抑制することを見出した。これらの結果から、TXAS 阻害剤や IP アゴニストが HCV の感染伝播を抑制する、新規の作用機序を持つ抗 HCV 薬の候補である可能性が示された。

以上の結果は従来不明であったHCV感染粒子産生がアラキドン酸カスケードによって制御されるという新たな機構を初めて示したものであり、この制御系が新規の抗HCV薬の標的になりうることを示したものである。

以上の成果はHCVの生活環、特に細胞との相互作用の理解に関して新たな知見を加えるものである。従って本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

平成25年6月6日、論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日