

氏名（本籍）	月本 あつ子（千葉県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 253 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	C 型肝炎の治療における生理活性物質の利用とその作用機序の解析
論文審査委員	(主査) 教授 滝口 泰之 (副査) 教授 黒崎 直子 教授 坂本 泰一 教授 寺本 直純 准教授 橋本 香保子

学位論文の要旨

C 型肝炎の治療における生理活性物質の利用とその作用機序の解析

本論文は「C 型肝炎の治療における生理活性物質の利用とその作用機序の解析」と題し、4 章 15 節より構成されている。

本論文第 1 章では、HCV 複製と HCV 複製を制御する宿主因子について記述した。

近年、死亡率の第一位となっているがんは 2 人にひとり罹患するとされ、約 3 人にひとりは何らかのがんにより死に至る疾患である。このうち肝臓がんは常に上位 6 番目以内に位置しており年間約 2.5 万人が肝臓がんで死亡しているが、この肝臓がんの原因の 70~80%が C 型肝炎によるものである。当初は大変副作用の大きいインターフェロン治療を 1 年間続けても、ウイルスを排除できる可能性は 5%未満であった。これには、HCV の遺伝子タイプ (genotype) が 7 種類存在し、変異しやすいということが大きくかかわっている。2014 年から開始されたインターフェロンフリー経口剤治療は、血液中の RNA が長期にわたり陰性化となる率が 95%以上という画期的な治療である。しかし、この治療法は慢性肝炎と初期の肝硬変（代償性肝硬変）の患者さんに限られており、肝機能に負担がかかることがあるため、肝機能の良くない人では使用できず、また HCV 遺伝子に変異があると治療効果が低下することがわかっている。これらのことから、耐性株出現の問題や genotype の違いに起因する効果の減弱など、さまざまな問題が克服できることが期待される宿主因子を標的にする治療法や治療薬剤が注目されている。そこで本研究では、HCV 複製に関与する宿主因子及び生存シグナリングを標的にした新たな HCV 治療薬の研究開発を目的とした。

本論文第2章では、宿主内因子、プロスタグランジン A1 (PGA1) による抗 HCV 活性と作用機序の解明について検討した。

PGA1 は生体内に存在する生理活性物質であり、その作用は多岐にわたっている。膜リン脂質では細胞壁を健全に保ち、炎症、痛み、腫れの調整やアレルギー反応、各種ホルモンの産生などに関係しており、近年では熱タンパク質である Hsp70 を誘導し、HIV の抑制作用（我々のグループ, Sugiyama et al. J.Biol.Chem.2012）やインフルエンザウイルスの抑制作用を有することが報告されている。これらのことから、PGA1 が HCV の翻訳制御にかかわる機能を有するかを検討した。その結果、PGA1 は細胞毒性を伴うことなく HCV 株の JFH1 感染細胞で抗 HCV 活性を示し、その抗 HCV 活性は翻訳開始となる HCV-IRES 依存的な翻訳制御をするを見出した。さらに、HCV 翻訳に関わる翻訳開始因子への影響を検討したところ、PGA1 は HCV の翻訳開始に重要な宿主因子、eIF3s, r40S と結合することを見出した。この結合は HCV-IRES RNA 上において PGA1/eIF3s-r40S/HCV-IRES RNA 複合体を形成することで、HCV-IRES 依存的な翻訳阻害が起きることを初めて明らかにした。

本論文第3章では、天然色素であるビオラセインによる抗 HCV 及び抗腫瘍活性とその作用機序の解明について検討した。

上記の研究において宿主内因子である PGA1 が HCV-IRES RNA 依存的な抗ウイルス活性を有し、従来の作用機序とは異なる HCV-IRES 依存的な翻訳阻害が起こることを初めて明らかにした。一方、天然色素であるビオラセインは、微生物が産生する鮮やかな青紫の色素として知られ、天然の青色素では数少ない染料として繊維に吸着する性質を有している。この青紫色素は通常2種類の物質の混合物として存在し、主成分がデオキシビオラセイン、少量含まれる物質がビオラセインと名付けられて化学構造が決定されている。デオキシビオラセインは生物活性や生理的活性は確認されていないが、ビオラセインは抗菌活性などの幅広い生理的活性を持っており機能性色素として注目されている物質である。近年、当研究室は茨木県の土壌から青紫色のコロニーを形成する細菌 *C. violaceum* VP2 株を分離発見した。その *C. violaceum* VP2 株から抽出した青紫色素を、溶出時間や分子量の違いから数種類のサンプル分離を行って得られた分画について構造決定を行った結果、デオキシビオラセインとビオラセインであることを報告した。そこで本章では、細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインの抗 HCV ならびに抗腫瘍活性とその作用機序について検討した。

はじめに、抗ウイルス剤としてのビオラセインによるウイルス増殖抑制機能について HCV を標的に検討した。その結果、ビオラセインは翻訳機を介した HCV たんぱく質の増殖抑制機能を有することを初めて見出した。次に、上記の結果を基にその作用機序の解析を行った。ビオラセインの細胞毒性について培養標的細胞である Huh7 細胞（ヒト肝癌由来細胞株）、NNC#2 細胞（HCVRNA 持続感染 Huh7 細胞）を用いて行ったところ、両細胞で細胞死を誘導することを見出した。すなわち、Violacein は Huh7 細胞に対して抗腫瘍効果、一方、NNC#2 細胞は抗 HCV 効果を示した。

細胞死には、大きくアポトーシスとネクローシスの2種がある。アポトーシスは、発生の過程

などで起こるプログラム死と呼ばれる細胞死の形態であり、レセプターから始まる経路とミトコンドリアから始まる2つの経路が存在している。このいずれにもカスパーゼというシステインプロテアーゼが関与している。ビオラセインによる細胞死がアポトーシスの関与によるものかを検証するため、細胞内での活性化カスパーゼの出現を観察した。ビオラセイン処理細胞を生細胞染色色素、及び死細胞染色色素を同時に用いることにより蛍光顕微鏡下での観察を行った結果、死細胞はビオラセイン濃度依存的にアポトーシスを誘導していることを明らかにした。さらに、アポトーシスを起こしている細胞で特異的に活性化される蛋白質分解酵素のカスパーゼ検出を試みたところ、TNFRファミリーに誘導されるカスパーゼ3によりアポトーシス誘導が明らかとなった。細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインは、抗 HCV 活性と抗腫瘍活性を有することを明らかにした。

以上、PGA1 は HCV の翻訳開始に重要な宿主因子、eIF3s, r40S と結合することを見出した。この結合は HCV-IRES RNA 上で PGA1/eIF3s-r40S/HCV-IRES RNA 複合体を形成し、この複合体は HCV-IRES 依存的な翻訳阻害であることを初めて明らかにした。次に細菌 *C. violaceum* VP2 株が産生するビオラセインは Huh7 細胞（ヒト肝癌由来細胞株）に対して抗腫瘍効果、一方、NNC#2 細胞（HCV RNA 持続感染 Huh7 細胞）では抗 HCV 効果を示すことを見出した。その作用機序としては TNFR ファミリーに誘導されるカスパーゼ3によりアポトーシスを誘導しその機能を発揮することを明らかにした。

これらの知見は、宿主因子及び生存シグナリングを標的とするような新たな肝炎ウイルス治療の開発につながると期待される。

審査結果の要旨

本論文は2種類の生理活性天然物、プロスタグランジン A1 およびビオラセインの C 型肝炎に対する治療効果とその作用機序を記述したものであり、全4章より構成されている

第1章では、C型肝炎とそれを引き起こす C型肝炎ウイルス(HCV)に関する知見および現行の C型肝炎の治療法とその問題点、HCV の複製と HCV 複製を制御する宿主因子について記述した。現在、耐性株出現の問題や genotype の違いに起因する効果の減弱など、さまざまな問題が克服できることが期待される宿主因子を標的にする治療法や治療薬剤が注目されている。そこで本研究では、HCV 複製に関与する宿主因子及び宿主の生存シグナリングを標的にした生理活性物質の利用と、その作用機序の解析を目的とした。

第2章では、宿主内因子、プロスタグランジン A1 (PGA1)による抗 HCV 活性と作用機序の解明について検討した。PGA1 は生体内に存在する生理活性物質であり、その作用は多岐にわたっている。宿主となるヒト細胞の膜リン脂質は細胞壁を健全に保ち、炎症、痛み、腫れの調整やアレルギー反応、各種ホルモンの産生などに関係しており、近年では、APOBEC3G(apolipoprotein B

mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G;アポリポプロテイン BmRNA 編集酵素) という、一本鎖 DNA に作用してシチジンをウリジンに変換 (脱アミノ化) する反応を触媒する酵素の活性化により、HIV を抑制することが報告されている。これらのことから、PGAI が HCV の翻訳制御にかかわる機能を有するかを検討した。その結果、PGAI は細胞毒性を伴うことなく HCV 株の JFH1 感染細胞で抗 HCV 活性を示し、その抗 HCV 活性は翻訳開始となる HCV-IRES 依存的な翻訳制御をすることを見出した。さらに、HCV 翻訳に関わる翻訳開始因子への影響を検討したところ、PGAI は HCV の翻訳開始に重要な宿主因子、eIF3s, r40S と結合することを見出した。この結合は HCV-IRES RNA 上において PGA1/eIF3s - r40S/HCV-IRES RNA 複合体を形成することで、HCV-IRES 依存的な翻訳阻害が起きることを明らかにした

第 3 章では、天然色素であるビオラセインによる抗 HCV 及び抗腫瘍活性とその作用機序の解明について検討した。天然色素であるビオラセインは、微生物が産生する鮮やかな青紫の色素として知られ、天然の青色素では数少ない染料として繊維に吸着する性質を有している。この青紫色素は通常 2 つの物質の混合物として存在し、主成分がビオラセイン、少量含まれる物質がデオキシビオラセインと名付けられて化学構造が決定されている。デオキシビオラセインは生物活性や生理的活性は確認されていないが、ビオラセインは抗菌活性などの幅広い生理的活性を持っており機能性色素として注目されている物質である。2013 年、茨城県の土壌から青紫色のコロニーを形成する細菌 *Chromobacterium violaceum* VP2 株を分離することに成功した。その *C. violaceum* VP2 株から抽出した青紫色素を、溶出時間や分子量の違いから数種類のサンプル分離を行って得られた分画について構造決定を行った結果、デオキシビオラセインとビオラセインであることを報告した。そこで本章では、細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインの抗 HCV ならびに抗腫瘍活性とその作用機序の解析を試みた。はじめに、ビオラセインの HCV に対する抗ウイルス作用の有無について検討を行った。その結果、ビオラセインは HCV-IRES と HCV タンパク質の NS5A タンパク質の増殖を抑制した。ビオラセインが HCV-IRES と NS5A タンパク質を抑制したことからその作用機序の解析を行うこととした。ビオラセインの細胞毒性について、培養標的細胞である Huh7 細胞 (ヒト肝癌由来細胞株) と NNC#2 細胞 (HCV RNA 持続感染 Huh7 細胞) を用いて行ったところ、両細胞で細胞死を誘導することを見出した。すなわち、ビオラセインは Huh7 細胞に対して抗腫瘍効果、一方、NNC#2 細胞に対しては抗 HCV 効果を示した。細胞死には、大きくアポトーシスとネクローシスの 2 種があり、システインプロテアーゼであるカスパーゼが関与している。ビオラセインによって誘導される細胞死がこの 2 種類のどちらかを検証するため、細胞染色と細胞内での活性化カスパーゼの出現について解析した。ビオラセイン処理細胞を生細胞染色色素、及び死細胞染色色素を同時に用いることにより蛍光顕微鏡下での観察を行った結果、細胞死はビオラセイン濃度依存的なアポトーシスの誘導によって起こることを明らかにした。さらに、活性化カスパーゼの検出では、TNFR ファミリーが誘導するカスパーゼ 3 によるアポトーシスであることを証明した。以上のことから細菌 *C. violaceum* VP2 株の産生するビオラセインは、抗 HCV 活性と抗腫瘍活性を有することを明らかにした。以上本研究において、PGAI は HCV の翻訳開始に重要な宿主因子である eIF3s, r40S と結合することを

見出した。この結合は HCV・IRES RNA 上で PGA1/eIF3s⁻ r40S/HCV-IRES RNA 複合体を形成し、この複合体は HCV・IRES 依存的な翻訳阻害であることを明らかにした。さらに、細菌 *C. violaceum* VP2 株が産生するビオラセインは Huh7 細胞に対して抗腫瘍効果を、NNC#2 細胞においては抗 HCV 効果を示すことを見出した。その作用機序は TNFR ファミリーに誘導されるカスパーゼ 3 によりアポトーシスを誘導して、その機能を発揮することを明らかにした。これらの知見は、宿主因子及び宿主細胞の生存シグナリングを標的とするような、新たな肝炎ウイルス治療の開発につながると期待される。

第 4 章では、総括として、本研究で得られた知見と今後の展望について述べた。

以上のように、本論文では副作用の少ない 2 種類の生理活性物質、プロスタグランジン A1 およびビオラセインが C 型肝炎の治療に有効であることを発見し、それらの作用機序を解明したことは今後の肝炎治療に大きく貢献し、さらなる発展が期待される業績である。したがって、学位申請者の月本あつ子は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。