

博士学位論文審査要旨

2019年1月24日

論文題目：インフルエンザ感染を制御する液胞状オルガネラの発見と
その性状解明

学位申請者：近江 純平

審査委員：

主査：生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査：生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査：生命医科学研究科 教授 小林 聰

要旨：

A型インフルエンザウイルス (IAV) は呼吸器感染症であるインフルエンザの主要な原因ウイルスであり、毎年インフルエンザの世界的大流行を引き起こす。現在、オセルタミビルに代表される neuraminidase (NA) 阻害剤が治療薬として広く用いられているが、薬剤耐性株の出現が現実の問題となっており、新たな作用機構を有する抗 IAV 薬の創製は喫緊の課題である。本研究では、IAV の標的細胞への侵入を担う hemagglutinin (HA) を標的とし、1) 多価型ペプチド構造を有する HA 阻害薬を同定し、新規インフルエンザ治療薬として確立すること、2) その作用機構を解明し、新たな創薬コンセプトの創出へと発展させること、を目的とした。

研究項目 1) では、クラスター効果に基づく強力な相互作用を阻害する分子を同定する技術、多価型ペプチドライブラー法を用い、HA の受容体結合部位に特異的かつ高親和性に結合する分子、PVF-tet を同定した。PVF-tet は、MDCK 細胞における IAV の細胞傷害活性を強力に阻害すること、さらにマウスを用いた IAV 感染実験においても顕著な治癒効果を示すことを見出した。これまでに、ペプチド性 HA 阻害薬として感染実験で有効性が示されたものではなく、PVF-tet は化合物としての独自性が高い。

研究項目 2) では、PVF-tet の抗インフルエンザ作用機構の詳細を明らかにした。予想に反し、PVF-tet は親ウイルスの HA には結合せず、感染後細胞内で新たに合成された新生 HA に結合し、その後液胞様構造体の中に新生 HA を選択的に隔離し、新生ウイルスの増殖を抑制することを見出した。さらにこの液胞様構造体は、オートファジー系を介してその形成が誘導される新たな生体防御オルガネラであることを明らかにし、「誘導性アンフィソーム」と呼称することを提唱した。この生体が潜在的に保有している新たな抗ウイルス機構の存在を明らかにしたことで、これまでにない抗 IAV 戦略の創出につながることが期待される。

よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2019年1月24日

論文題目：インフルエンザ感染を制御する液胞状オルガネラの発見と
その性状解明

学位申請者：近江 純平

審査委員：

主査：生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査：生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査：生命医科学研究科 教授 小林 聰

要旨：

総合試験は、2019年1月18日午後2:00から、口頭発表（45分）、質疑応答・口頭試問（1時間）の構成で実施した。申請者は総合試験において、感染症領域、細胞生物学領域、タンパク質構造領域等様々な方面からの質問に関して的確に回答しており、幅広い分野で十分な専門知識を有していることが確認できた。また、各実験について、その目的、意義、研究全体の中での位置付けが十分に理解できていること、各々が慎重に組み合わされて結論が導き出されていること、など博士に相応しい研究スタイルを習得していることが確認できた。さらに、得られた実験結果をベースとして、これまでの文献情報に習熟した上で説得力のある独自性の高いモデルへと発展させる能力を備えていることが確認できた。特に、現在インフルエンザ治療で問題となっている薬剤耐性の問題に答えるべく、HAを標的とした新たな阻害薬を開発することに成功し、さらに新たな創薬コンセプトの創出へと発展させた点は高く評価できる。

申請者は、博士課程（後期）入学時の語学試験（英語）に合格していることから、十分な語学能力を有していると判断される。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目：インフルエンザ感染を制御する液胞状オルガネラの発見とその性状解説

氏名：近江 純平

要旨：

A型インフルエンザウイルス (IAV) は呼吸器感染症であるインフルエンザの主要な原因ウイルスである。IAV は毎年インフルエンザの世界的大流行を引き起こすと共に、時に致死的なパンデミックを引き起こすことから、その感染制御法の確立は重要課題である。

IAV は一本鎖 RNA をゲノムとして有するエンベロープウイルスであり、そのエンベロープ上には IAV の標的細胞への侵入を担う hemagglutinin (HA)、新生 IAV の細胞からの放出を担う neuraminidase (NA) が存在する。IAV 感染を制御する臨床薬として、現在はオセルタミビルに代表される NA 阻害剤が広く用いられている。NA 阻害剤は感染細胞からの新生 IAV の放出を阻害することにより、強力な抗 IAV 活性を示す。しかしながら、NA 阻害剤に耐性を示す IAV が国内においても毎年 1%程度の割合で検出されており、2008 年には全世界で 90%以上の IAV が耐性化した過去がある。したがってインフルエンザの治療基盤は十分であるとは言い難く、既存薬とは異なる作用機構を有する新規抗 IAV 薬の創製は喫緊の課題である。

そこで本研究では、新たな標的分子として HA に着目した。HA はホモ 3 量体構造をとる 1 回膜貫通タンパク質であり、標的細胞膜上のシアル酸を受容体として結合することで IAV の細胞への吸着を担う。その後 IAV がエンドサイトーシスにより取り込まれると、HA はエンドソーム内の酸性化に伴って構造変化を起こし、IAV 膜とエンドソーム膜を融合させることで、ウイルス RNA を細胞質中へと放出させる。HA が担うこれらの機能は IAV の增幅サイクルにおいて不可欠であり、したがってその創薬標的としての重要性は十分に確立されている。その一方で、これまでに HA を標的として、臨床応用に耐えうる HA 結合能力と阻害能力を持った薬剤の開発例はほとんど存在していない。この最大の理由は、HA とシアル酸との間で形成される強力な相互作用にある。三量体構造をとる HA は一度に 3 分子のシアル酸と結合するが、その際に形成される多価型の結合は一価の結合と比較して親和性が数千倍亢進する。この現象はクラスター効果と呼ばれ、このためファージディスプレイ法等の従来技術によるスクリーニングでは、クラスター効果に基づく強力な相互作用を阻害する分子の同定は困難であった。

本研究室ではこれまでに、クラスター効果に基づく強力な相互作用を阻害する分子を同定する技術として、多価型ペプチドライブラリー法を開発している。多価型ペプチドライブラリーは分岐核構造に 4 本のランダムペプチドが結合した構造をとり、それ自体がクラスター効果を発揮して標的分子と強力に結合する。本法を用いて、本研究室ではこれまでに、クラスター効果を発揮して機能する分子に対する様々な阻害ペプチドの創製に成功している。そこで本研究では、本法を用いた HA 特異的かつ高親和性結合能を有するペプチド性 HA 阻害薬の開発を目的として研究を行った。

バキュロウイルス発現系により調製した組換え HA を用いて、多価型ペプチドライブラリー法に基づく多段階のスクリーニングを行った結果、最終的に 5 種の 4 価型 HA 結合ペプチドを同定することに成功した。これらのペプチドは HA と高親和性結合を示すと共に、HA とその受容体モデルであるシアル酸ポリマーとの相互作用を競合的に阻害する優れた HA 阻害活性を示した。そこで、IAV 感染のモデル細胞として確立されている MDCK 細胞を用いて、IAV の細胞傷害活性

性に対するこれらのペプチドの阻害活性を検討したところ、最も優れた活性を示すペプチドとして PVF-tet を同定した。

次に、PVF-tet の抗 IAV メカニズムについて検討を行った。PVF-tet は HA とシアル酸ポリマーの相互作用を競合的に阻害することから、IAV の細胞内侵入を阻害していることが予想された。そこで、感染後ごく初期に合成される NP の発現を指標として IAV の細胞内侵入に対する PVF-tet の効果を解析したところ、予想に反して、PVF-tet は IAV の細胞内侵入を全く阻害しないことを見出した。さらに、PVF-tet は IAV の細胞内侵入後に添加した場合においても依然として抗 IAV 活性を示したことから、その作用点は感染後期にあることが示唆された。

そこで次に、感染後期における新生 IAV タンパク質の発現量を解析した。通常、細胞内の新生 HA 量は感染 9 時間後をピークとして、その後 IAV の産生に伴って減少する。その一方で、興味深いことに、PVF-tet 存在下ではむしろ新生 HA が細胞内に蓄積することを見出した。そこで、蓄積の様態を明らかにする目的で、新生 HA の細胞内局在について解析を行った。通常、新生 HA は輸送小胞に局在を示し、細胞膜表面まで輸送されたのち、IAV 粒子へと取り込まれる。一方で、PVF-tet 存在下においては、新生 HA は PVF-tet と共に細胞内の液胞状オルガネラへと異常局在化し、細胞膜表面にはほとんど検出されないを見出した。他の新生 IAV タンパク質については PVF-tet による局在変化は観察されないことから、本現象は液胞状オルガネラによる新生 HA の選択的隔離であると考えた。興味深いことに、本現象は PVF-tet 非存在下においても、少量ではあるが観察された。このことから、本現象は細胞が元来有する機構であり、PVF-tet は本機構を増強していることが示唆された。

そこで本研究では、新生 HA を隔離する液胞状オルガネラを新規抗 IAV オルガネラとして捉え、その実体の解明を試みた。その糸口として、液胞状オルガネラにおける種々のオルガネラマーカー分子の局在を検討し、その結果、液胞状オルガネラは内腔に脂質を含有する酸性オルガネラであることを見出した。このような性状と合致するオルガネラを文献的に検索し、II 型肺胞上皮細胞（AT-II 細胞）で高発現するラメラボディに着目した。

ラメラボディは肺サーファクタントの分泌を担うオルガネラであり、その形成には限界膜に存在する ABCA3 が必須であることが報告されている。そこで、液胞状オルガネラの実体がラメラボディであるという仮説を立て、その検証を行った。まず、ABCA3 を安定的に高発現し、高いラメラボディ形成能を示す MDCK 細胞を樹立した。この細胞を IAV に感染させた際には、新生 HA は極めて高い効率でラメラボディへと隔離された。この際、IAV の細胞傷害活性、ならびに子孫 IAV の産生量は著減することから、本機構が IAV 感染に対して防御的であるを見出した。そこで次に、ABCA3 をノックアウトした MDCK 細胞を樹立し、IAV 感染時における PVF-tet の効果を検討した。その結果、意外なことに、PVF-tet は ABCA3 ノックアウト細胞においても親株と同等の抗 IAV 活性を示すこと、またサイズは小さくなるものの、依然として液胞状オルガネラの形成を促進することを見出した。これらのこととふまえ、ABCA3 はそれ自体が液胞状オルガネラの形成誘導に十分であるが、必須ではないと結論した。

そこで、液胞状オルガネラの実体を明らかにするために、電子顕微鏡観察を行った。その結果、液胞状オルガネラはラメラ状膜を部分的に有するものの、その内腔には高電子密度構造体や小胞を多数含んでおり、これらの形態的性状はむしろアンフィソームと一致することを見出した。アンフィソームはエンドソームとオートファゴソームの融合により形成され、その後オートリソームへと成熟する一過性のオルガネラである。そこで、オートファゴソームのマーカーである LC3 の局在解析を行ったところ、液胞状オルガネラには LC3 の局在が観察された。このことを詳細に検証するために、オートファゴソーム形成に必須の分子である ULK1 ならびに PIK3C3 をそれぞれノックアウトした MDCK 細胞を樹立し、解析を行った。その結果、PVF-tet はこれらのノックアウト細胞では液胞状オルガネラの形成を誘導できず、また抗 IAV 活性も示さないことを見出した。以上の知見をふまえて、HA を隔離する液胞状オルガネラの実体はアンフィソーム

ムであり、PVF-tet あるいは ABCA3 によりその形成を誘導できることから、通常のアンフィソームと区別して、誘導性アンフィソームと命名した。

このような抗 IAV 機構を有する PVF-tet について、個体感染に対する有効性を評価するためには、配列中の Arg を一部 D 体に置換することで生体内安定性を向上させた(D)PVF-tet を開発した。マウスの致死感染モデルでは、感染 6 日後から 8 日後にかけて全例が死亡する。本モデルにおいて、感染 6 時間以内に 2.5 mg/kg の(D)PVF-tet を経鼻投与することにより、半数の個体が生存した。そこで、(D)PVF-tet の個体感染時における作用標的の解析を行ったところ、(D)PVF-tet は AT-II 細胞内において HA ならびに ABCA3 と共に局在を示し、この際、IAV 感染による AT-II 細胞の細胞傷害が減弱していることを見出した。すなわち、IAV 感染時の AT-II 細胞では(D)PVF-tet と ABCA3 の両分子によってアンフィソーム形成が誘導され、IAV 感染制御に機能していることが示唆された。

本研究では、HA を標的とする新規抗 IAV 薬として PVF-tet を開発し、さらにその作用機構の解明を通じて、新規抗 IAV オルガネラとして誘導性アンフィソームを見出した。今後、本オルガネラの形成を制御する分子機構を解明することで、新たな抗 IAV 戦略の創出につながることが期待される。