



Title	Akt活性抑制ペプチド "Akt-in" を用いたインフルエンザウイルス感染の病態修飾効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	平田, 徳幸
Description	配架番号 : 1686
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6964号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60035
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Noriyuki_Hirata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 平 田 徳 幸

学 位 論 文 題 名

Akt 活性抑制ペプチド“*Akt-in*”を用いたインフルエンザウイルス感染の病態修飾効果
(Inhibition of Akt kinase activity impacts on influenza virus infection by using “*Akt-in*”, a peptide Akt inhibitor.)

【背景と目的】

近年、H5N1 型もしくは H1N1 型の鳥インフルエンザウイルスによる、高病原性のインフルエンザが出現してきている。この高病原性インフルエンザウイルスは、これまでヒトへの感染例が非常に少ないうえに、変異性が非常に高い。そのため、この高病原性インフルエンザウイルスに感染した場合、現在季節性のインフルエンザで用いている免疫学的な治療法が間に合わない。例えば、ヒトが感染した後でなければワクチンの作成もできず、さらにウイルス粒子に対する治療薬(タミフルやリレンザ等)も感染から 48 時間以内に投与しないと効果が得られない。そして、飛行機によるヒトの高速輸送が可能な時代となった今、その感染が世界中へ拡大するのは時間の問題である。

インフルエンザウイルスの増殖には、ヒトの宿主細胞における様々な因子が必要なことが知られている。特に、細胞内の PI3K-Akt シグナル伝達経路は、感染早期のウイルス侵入の段階だけでなく、感染終期におけるアポトーシス誘導の抑制、そしてウイルス RNA の発現や RNP の局在などの制御に不可欠である。ウイルス感染した細胞は感染宿主細胞の、PI3K-Akt シグナル伝達経路をはじめとする様々な宿主因子を利用しその増殖や感染の増大に関与していることが知られている。したがってこの感染宿主細胞内の PI3K-Akt シグナル伝達機構を制御することにより、インフルエンザウイルス感染のコントロールができる可能性がある。

本研究では細胞死制御の要のセリンスレオニンキナーゼ Akt に対する活性化抑制ペプチド“*Akt-in*”を用いて、インフルエンザウイルス感染に際し、その活性が上昇する感染宿主細胞中の Akt シグナル伝達経路の制御を試みた。そして、インフルエンザウイルス感染の細胞への侵入、増殖、炎症性サイトカインの変化やオートファジー誘導などのパラメーターを検証し、感染宿主細胞の Akt シグナル伝達系の制御による治療法への可能性について検討した。

【材料と方法】

1. 培養細胞株、インフルエンザウイルス、活性抑制剤

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞由来の A549 細胞株と、イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞株を用いた。この実験で用いた PR8 ウイルスは北大大学院獣医学研究科の喜田宏教授より供与された。活性抑制剤については、PI3K-Akt 活性抑制剤である LY294002 は Sigma より購入した。下記の Akt 活性抑制ペプチド“*Akt-in*”は MBL に作成依頼を行い購入した。

TAT-FLAG (Control peptide): YGRKKRRQRRR-DYKDDDDK

TAT-TCL1-*Akt-in*: YGRKKRRQRRR-AVTDHPDRLWAWЕКF

TAT-TCL1b-*Akt-in*: YGRKKRRQRRR-RLGVPPGRLWIQRPQ

2. インフルエンザウイルスの感染とプラークアッセイ

A549 細胞株に、PR8 ウイルスを MEM で希釈し MOI = 0.1 に合わせ、37 °C、5% CO₂ で 1 時間感染させた。感染後、ウイルス上清を RPMI-1640-0.3% BSA-0.0005% trypsin に交換し、37 °C、5% CO₂ で培養した。プラークアッセイは、各図に表記された時間で感染と抑制反応を行った後に培養上清を回収し、その培養上清を用いて MDCK 細胞株に 1 時間感染させた後、アガロスを載せ、そのプラークの数を測定した。

3. インフルエンザウイルスの免疫共沈法

PR8 ウイルスを MOI = 1 で 18 時間感染した A549 細胞を回収し、細胞溶解を行って、免疫共沈を図に示した抗体で行い、抗 NS1 抗体でイムノブロッティングを行った。

4. 間接蛍光抗体染色法

A549 細胞に 30 分間、図に示した活性抑制剤を反応させ、その後 PR8 ウイルスを MOI = 0.1 で 90 分間感染させた。感染後、染色用の細胞固定を行い、図に示した抗体と蛍光標識抗体、DAPI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で解析を行った。

5. サイトカイン産生の測定

PR8 を感染させた A549 細胞の培養上清中の IL-6 もしくは IL-8 の蛋白濃度は、ELISA を用いて行った。

【結果】

1. Akt 活性抑制ペプチドである TCL1-Akt-in または TCL1b-Akt-in が、A549 細胞株 Akt 活性を抑制する。
2. インフルエンザウイルスの感染が A549 細胞株の Akt 活性を促進する。
3. Akt-in による Akt 活性の抑制が、PI3K 抑制剤である LY294002 と同様に、A549 細胞株におけるインフルエンザウイルスの増殖を効果的に抑える。
4. Akt-in による Akt 活性の抑制は、濃度および時間依存的に、A549 細胞株におけるウイルス増殖抑制効果を示す。
5. Akt-in は、宿主細胞のサイトカイン産生に影響を与えなかった。
6. Akt-in は、Akt の基質の 1 つでありウイルス増殖を制御する GSK3 のリン酸化を抑制した。また、オートファジーを亢進する傾向があった。

【考察】

インフルエンザウイルス感染におけるウイルス増殖には、PI3K-Akt シグナル伝達経路に代表される、様々な宿主由来の因子が必要となる。従って、感染宿主細胞の Akt 活性の抑制は、ヒトのウイルス感染症の治療への効果が期待できる。Akt の活性抑制剤は、主として抗がん剤としてその開発が進んできた。私たちが以前に Akt 活性化補助因子 TCL1 の構造に基づいて同定し、国際特許を取得している "Akt-in" は、Akt と特異的に結合し、キナーゼ活性を抑制する。本研究で用いた TCL1 もしくは TCL1b を基にした抑制剤である "Akt-in" は、PR8 ウイルス感染宿主細胞の Akt 活性を抑制し、その結果として、炎症性サイトカインの産生を減少させることなく、ウイルスの増殖を抑制した。また、この Akt 活性抑制ペプチドは、Akt の活性化によって抑制されることが知られているオートファジーの誘導を亢進する傾向を示した。従って、本研究で使用した Akt-in は、インフルエンザウイルス感染宿主細胞に対して、これまでウイルス粒子を標的とした治療薬とは異なり、ウイルス感染の宿主細胞におけるシグナル伝達経路を利用した治療法の適用への可能性が考えられた。様々なウイルスがその感染に際して、感染宿主細胞の PI3K-Akt シグナル伝達因子を利用していることが知られている。今回、細胞内の生存因子である Akt 制御することにより、インフルエンザウイルス感染症を制御できる可能性を示した。最近よく報道されているエボラ出血熱ウイルスやデング熱ウイルスなどの RNA ウイルス感染症においても、インフルエンザウイルスと同様、この Akt-in が新たな治療法となる可能性を秘めている。これから、Akt に特異的な抑制剤の構築に関する研究開発が、さらに促進されることが望まれる。

【結論】

本研究において、インフルエンザウイルス感染時に TCL1-Akt-in または TCL1b-Akt-in で細胞を処理しておくことで、Akt 活性を抑制し、NS1 のリン酸化を効果的に減少することが可能で、炎症性サイトカインの産生に関係なく、細胞へウイルスの侵入と増殖を抑制していることが明らかとなった。