



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 平 田 徳 幸

審査担当者	主査	教授	村 上 正 晃
	副査	教授	廣 瀬 哲 郎
	副査	教授	近 藤 亨
	副査	教授	野 口 昌 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.)

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することが明らかとなった。

審査にあたり、まず副査の廣瀬教授から、論文の導入部分、特に TCL1 を発見した経緯等を記載すべきという提案があり、申請者は TCL1 が Akt2 の yeast-two hybrid 法を用いて得た結合分子で、2000 年の Molecular Cell に詳細が記載されており、それを学位論文に記載すると回答した。また、共焦点レーザー顕微鏡の写真について、どのような目的で検討したか質問があり、申請者は、感染初期から Akt の活性がインフルエンザウイルス感染に必要であると回答した。また、リン酸化 NS1 と NS1 の発現が比例しているように見えるが、これは比率の計算等をしたかという質問と、NS1 と Akt もしくはその他の RNA 結合蛋白との競合分析をしたかという質問があったが、申請者は検討を行っておらず、今後の検討課題と回答した。次に、副査の近藤教授から、*Akt-in* を処理した宿主細胞の生存状態はどうか質問があったが、この *Akt-in* は元々腫瘍細胞の拡大を抑制する目的で作成されたが、今回の実験で用いた A549 細胞では、*Akt-in* 処理による細胞傷害は認められなかったと回答した。また、インフルエンザウイルス蛋白である Nucleoprotein にどのような機能があるのか質問があったが、申請者は、いくつかの機能を答え、それらを学位論文に記載すると回答した。次に、副査の野口教授から、*in vivo* の感染実験を行ったかという質問があり、申請者はプロバイオティクス・免疫学・免疫学研究部門の宮崎先生に相談をして、マウスへの感染実験の方法を教わったが、感染効率が安定せず、実験に時間がかかることから、今回は *in vitro* のデータのみで論文を書いたと回答した。また、炎症性サイトカインについて、Type I IFN が検出できなかった原因も質問されたが、申請者は、2012 年の Science Signaling における高病原性鳥インフルエンザウイルスの病原性の報告のデータの中の A549 細胞についても、Type I IFN の検出が同様に検出限界以下であったため、今回も細胞の特性として検出できなかったと回答した。最後に、主査の村上教授から、TCL1 と TCL1b を基にした *Akt-in* の抑制効果の差異について質問があり、申請者は、実際の学位論文では TCL1b 由来の *Akt-in* において、Akt のセリン 473 のリン酸化がほとんど抑制されず、スレオニン 308 のリン酸化が抑制されている図を示

しているが、これは実験系が異なるために生じた現象であり、申請者はこれまでの実験の経験から、TCL1 由来と TCL1b 由来の *Akt-in* はセリン 473 とスレオニン 308 のリン酸化のどちらも抑制すると考えていると回答した。また、TCL1 由来と TCL1b 由来の *Akt-in* の親和性の検討を行ったかという質問があり、申請者は TCL1b については検討していないが、TCL1 由来の *Akt-in* は K_d が $18 \pm 4.8 \mu\text{M}$ であると回答した。そして、MTCP1 由来の *Akt-in* を作成したかという質問があったが、申請者はこれについては作成していないと回答した。また、*Akt-in* 以外の Akt 活性抑制剤について検討したかという質問があり、申請者は丁度今回の学位論文と同じ時期に化学抑制剤である MK-2206 がインフルエンザウイルスの増殖を抑制するという報告が 2014 年の Antimicrobial Agents and Chemotherapy にあり、感染 24 時間において、IL-1 α , IL-6, CCL5 の発現は抑制されていたが、IL-8, CXCL10, MIF, GRO α の発現は変化していなかった。この現象はペプチド抑制剤と化学抑制剤を用いた場合の実験条件の違いによる可能性が考えられると回答した。

この論文は、これまでに報告されているインフルエンザウイルス治療薬がウイルスを標的としているのに対し、宿主細胞のシグナル伝達、特に Akt を標的としたキナーゼ活性抑制剤であり、感染細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑制しないことから、新規のインフルエンザウイルス治療法の開発において高く評価され、今後、インフルエンザウイルス以外のエボラウイルスやデング熱ウイルス等の RNA ウイルスについても、新たな治療法の開発の可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。