



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the identification of antiviral lipid molecules against dengue virus using lipidomics [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐名木, 孝央
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7088号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78524
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takao_SANAKI_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（獣医学）

氏名：佐名木 孝央

学位論文題名

Studies on the identification of antiviral lipid molecules against dengue virus using lipidomics

（リピドミクスを活用した抗デングウイルス活性を有する脂質分子の同定に関する研究）

生体内において細胞膜の構成成分、エネルギー源、生理活性物質として機能する脂質は肥満症、糖尿病、高血圧、気管支喘息、疼痛、ウイルス感染症等の病原性の発現に関連する。これまでに、脂質代謝関連酵素や脂質受容体をターゲット分子とした治療薬や脂質分子自体をリード化合物とした脂質アナログが開発され、実際に複数の医薬品が臨床活用されている。

構造や生体内濃度の異なる多様な脂質分子の測定には、高感度かつ高選択的な分析法が求められる。脂質分子の分析法は、抗体法とクロマトグラフィー法の2つに大別されるが、多成分のプロファイル分析にはクロマトグラフィー法が適する。ガスクロマトグラフィーの場合、誘導体化が必須であるため、脂質分子の分離には液体クロマトグラフィー (LC) が適する。LC用の検出器には構造情報の得られる質量分析 (MS) の利用が最適である。MSを用いた脂質測定系は、不特定の分子を網羅的に測定するglobal lipidomicsと特定の分子を選択的に測定するtargeted lipidomicsの2つに大別される。これまでに、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質に関するglobal lipidomicsの適用例は多数報告されているが、酸化脂肪酸に関する報告例はほとんど無い。Targeted lipidomicsは生理活性脂質メディエーターの分析に汎用される。私は以前に、酸化脂肪酸を対象としたtargeted lipidomicsを構築しているが、生体試料中の極微量な酸化脂肪酸を効果的に分析するためには、更なる高感度化が必要である。

第 I 章では、global lipidomicsの構築およびtargeted lipidomicsの高感度化を実施した。高分解能MSを用いて、マウス肺ホモジネート中の酸化脂肪酸を測定した結果、精密質量測定により12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸や14-ヒドロキシドコサヘキサエン酸 (HDoHE) 等の12-リポキシゲナーゼ (LOX) 代謝物が主代謝物として検出された。さらに、複数の未知分子イオンピークも検出され、高分解能データ依存型タンデム質量分析法 (dd-MS²) により、12-ヒドロキシエイコサトリエン酸や

14-ヒドロキシドコサペンタエン酸等の12-LOX代謝物、21-HDoHEや22-HDoHE等のドコサヘキサエン酸代謝物が同定された。特に、21-HDoHEの構造解析では、50 mDa未満の分子量の違いをdd-MS²により明確に識別することができた。次いで、マウス肺ホモジネート中のグリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質を測定した結果、正イオンモードでは2,467 個の分子、負イオンモードでは1,070 個の分子が同定された。興味深いことに、トリアシルグリセロールやセラミド等は正イオンモードで、ホスファチジン酸 (PA) や血小板活性化因子 (PAF) 等は負イオンモードで主に検出され、極性の異なる脂質分子種の分析において、測定モードの選択が重要であることが示された。次に、targeted lipidomicsの高感度化を実施した。従来法では、分析物の保持を安定させるために酢酸アンモニウムを移動相に添加していたが、大量の塩は感度低下の要因であるため除外した。また、酸化脂肪酸のイオン化効率を改善するために、ギ酸をより高い酸解離定数を持つ酢酸に変更した。移動相条件の変更により、従来法と比較してロイコトリエンB₄、プロスタグランジンE₂、5,6-エポキシエイコサトリエン酸等の定量下限は10 倍以上改善された。

デング熱は蚊媒介性ウイルスであるデングウイルス (DENV) の感染により惹起される急性熱性感染症である。全世界で年間約1 億人がデング熱を発症し、この内約50 万人が重症化すると推定されている。現在、効果的な抗DENV薬は存在せず、抗DENV薬の創製には宿主におけるDENV感染機構のより良い理解が必要である。これまでに、DENV感染細胞における脂質合成・代謝経路の活性化が報告されているが、抗DENV活性を有する脂質分子の報告はない。第 II 章では、抗DENV活性を有する脂質分子を探索した。始めに、134 種類の脂質分子を対象としてスクリーニングした結果、ウシ肝臓由来ホスファチジルイノシトール (PI) が抗DENV2 型 (DENV2) 活性を示した。一方、大豆由来PIは抗DENV2 活性を示さず、これらの活性の違いは、分子内の脂肪酸組成の違いに起因することが示唆された。次に、脂肪酸組成の異なる5 つのPI分子種の抗DENV2 活性を評価した結果、1-ステアロイル-2-アラキドノイル-PI (SAPI) のみが抗DENV2 活性を示し、50% 有効濃度は4.03 μMであった。DENV感染細胞を用いて細胞内ウイルスRNA量をリアルタイムRT-PCRにより測定した結果、SAPI未処置群と比較して、全ての血清型においてSAPI処置による10 倍以上のウイルスRNA量の減少が認められた。次に、第 I 章で構築した脂質測定系を用いてSAPIの局在を解析した結果、添加したSAPIの約95% が細胞上清中に存在することが明らかとなった。このことから、SAPIの抗DENV活性は細胞外からの効果であると考えられた。DENV2 粒子に対するSAPIの結合能およびDENVの細胞への侵入効率に対するSAPIの効果を検討した結果、SAPIとDENV2 との直接的な結合およびDENVの細胞への侵入効率に対するSAPIの阻害効果は認められなかった。最後に、DENV2 感染誘発炎症応答に対するSAPIの効果を検討した。非感染群と比較し、DENV2 感染によるCCL5、CCL20、IL-6、IL-8 およびIFN-β等のサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子およびタンパク質発現の亢進が認められた。一方、DENV2 感染群と比較し、SAPI処置群では、DENV2 感染による前述の遺伝子およびタンパク質発現の亢進に対する抑制効果が認められた。以上より、SAPIはDENV感染に対する宿主防御因子の機能を持つことが示唆された。

以上より、第 I 章ではglobal lipidomicsの構築およびtargeted lipidomicsの高感度化を実施し、第 II 章では抗DENV活性を有する脂質分子としてSAPIを見出した。本論文に記載した研究成果は、脂質生化学を起点とした疾患メカニズム解析や疾患特異的なバイオマーカーの探索に貢献するものと思われる。第 I 章で構築した脂質測定系は肥満、疼痛、遺伝性掌蹠角化症であるオルムステット症候群およびDENV感染症のメカニズム解析にすでに適用されており、今後、解析対象となる疾患や脂質分子の拡大が期待される。また、第 II 章で得られた知見を基にしたSAPIの更なる作用メカニズムの解明は、DENV感染に対する宿主防御機構についての新たな側面を明らかにすると共に、SAPIの標的分子の同定により新たな抗DENV薬開発の発展に寄与することが期待される。