



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_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（獣医学）

氏名：佐名木 孝央

審査委員	主査 教授	澤 洋文
	副査 教授	迫田 義博
	副査 講師	松野 啓太
	副査 講師	大場 靖子

学位論文題名

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

（リポ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、高血圧、気管支喘息や疼痛等の病原性の発現に関連する。現在、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医薬品として臨床活用されている。

多様な構造を有する脂質分子の分析には液体クロマトグラフィーと質量分析 (MS) との組み合わせが汎用され、分析法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、**global lipidomics** の適用例は多数報告されているが、微量な酸化脂肪酸の適用例はほとんど無い。一方、**targeted lipidomics** は酸化脂肪酸等の微量成分の分析に汎用されるが、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。本研究では、**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、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) 代謝物が主に検出された。また、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等の 12-LOX 代謝物や 21-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、極性の異なる脂質分子種の分析には、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。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 やプロスタグランジン E₂ 等の定量下限は 10 倍以上改善された。以上、本研究で構築した global lipidomics および高感度化した targeted lipidomics は、脂質を target とする感染症の創薬に利用可能である。

デング熱はデングウイルス (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 感染の詳細な機構を理解することが必要である。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。本研究では、抗 DENV 活性を有する脂質分子を探索した。初めに、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 DENV 2 型 (DENV2) 活性を示した。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 μ M 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、前述の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り、SAPI の抗 DENV 活性は細胞外からの効果であると考えられた。また、SAPI と DENV2 との直接的な結合や 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 の効果を検討した結果、SAPI は、DENV2 感染による CCL5 や IL-6 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に対して抑制効果を示した。

以上の研究成果は、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。構築した脂質測定系は肥満や疼痛等のメカニズム解析にすでに適用されおり、今後の適用拡大が期待される。また、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る新たな抗 DENV 薬の開発に繋がることが期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 佐名木 孝央 氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。