

氏名（本籍）	小西 秀幸		
学位の種類	博 士（ 生物科学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7329	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Molecular Mechanisms of Antiviral Effect of Interferon and Host Response to Hepatitis C Virus Infection (インターフェロンによるC型肝炎ウイルス複製阻害及び宿主応答の分子メカニズム)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学教授	理学博士	町田 龍一郎
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	農学博士	宮崎 均

## 論 文 の 要 旨

慢性 C 型肝炎は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染による疾患で、肝細胞癌や肝硬変の主たる素因の一つである。C 型肝炎の治療にはインターフェロン (IFN) やリバビリン併用療法が施行されているが、治療奏効率は約 50% 程度で、治療の副作用や費用を考慮すると効果は十分ではない。IFN は、IFN 誘導性遺伝子 (ISG) 群のプロモーター配列 ISRE を活性化し、ISG の遺伝子発現を誘導することにより抗ウイルス活性を示す。IFN 治療前の HCV 感染者の肝臓中では ISG が高レベルで発現しており、IFN 治療の効果が得られない。最近、インターロイキン (IL) 28B 遺伝子近傍の一塩基遺伝子多型 (SNP) 解析により、IFN 治療効果が予測できるようになった。しかし、ISG 発現量と IL28B SNP の関連性の詳細については不明である。近年、HCV ゲノム RNA の複製を再現する HCV レプリコン細胞が樹立されて以来、培養細胞を用いた HCV 関連研究が著しく進展してきた。HCV ウイルスタンパク質阻害薬の開発にも HCV レプリコン細胞が有効利用されるようになり、IFN と HCV タンパク質阻害剤を加えた併用療法が益々注目されつつある。しかしながら、IFN は注射剤でありまたタンパク質製剤であるため医療費が高額となり、大きな障害であった。本研究は、IFN 様活性をもつ飲用可能な新規治療薬を探索し、さらに IL28B SNP と ISG 発現の関係性を解明することを目的とした。

まず HCV レプリコン細胞と ISRE レポーター遺伝子を用いて、IFN 様物質の探索を行った。その結果、ISRE 活性化と HCV 複製阻害を示す新規化合物 R04948191 (R08191) を発見した。この R08191 は、*in vitro* ウイルス感染細胞系において、IFN と同様に顕著な抗ウイルス活性を示した。HCV レプリコン細胞を用いて ISG の発現を調べたところ、R08191 が ISRE を活性化し、ISG の発現を誘導した。また、R08191 により JAK/STAT 分子のリン酸化も誘導された。siRNA により IFN 受容体 IFNAR2 または JAK1 キナーゼをノックダウンしたところ、R08191 による抗 HCV 複製阻害活性が顕著に抑制された。また、IFNAR2 欠失細胞では R08191 は ISG を誘導せず、IFNAR2 の強制発現により ISG 誘導は回復した。さらに Biacore 解析により、R08191 が IFN 受容体アゴニストであることが示唆された。また、R08191 と IFN の間では HCV 複製阻害シグナル伝達経路が異なることが分かった。*In vivo* での作用を検討したところ、R08191 経口投与のマウスでは、ISG の発現が誘導された。

HCV 感染モデルマウス (uPA-Scid) に R08191 経口投与を行った結果、抗 HCV 活性が認められた。以上のことから、新規に同定された R08191 は経口利用可能な IFN 様抗 HCV 治療薬候補であることが示された。

次に、HCV 関連肝細胞癌切除後の肝線維化に着目し、IL28B SNP と ISG (IP-10) 遺伝子の発現量の関連を解析した。IL28B SNP と肝組織内における ISG 発現量の関連を検討した結果、治療不応 IL28B SNP を有する症例において、IP-10 の高発現を認めた。一方、IP-10 遺伝子発現量は IL28B SNP の別に関わらず有意な差を認めなかった。さらに、肝線維化の進展に伴い IP-10 発現量が増加した。そこで肝線維化の程度に応じて解析を行ったところ、軽度線維化症例においては IP-10 発現量と IL28B SNP との有意な関連を認めた。肝組織内の TNF 及び TGF- $\beta$  発現量を検討したところ、肝線維化の程度と TNF 及び TGF- $\beta$  発現量の関連を認めた。次に IFN、IL28B、TNF または TGF- $\beta$  を肝癌細胞株 HuH-7 に投与した結果、IP-10 の発現は TNF により強く誘導され、TGF- $\beta$  では誘導されないことが分かった。以上のことから、肝線維化の進展により TNF と IP-10 の発現が強く誘導されるため、肝線維化進展例では IL28B SNP と ISG 発現の関連が認められなくなることが示された。

本研究により、経口利用可能な IFN 様抗 HCV 治療薬候補 R08191 が発見・同定され、その作用機序と *in vivo* における抗ウイルス作用とが明らかになった。また、HCV 感染患者の肝線維化における IL28B SNP と ISG 遺伝子の発現の関連が明らかになった。臨床においては、より簡便、安価で、しかも治療効果の高い治療法の開発が望まれる。本研究により、R08191 を用いた利便性が高くしかも抗ウイルス作用の高い新規治療法の開発が可能になり、さらに C 型肝炎に対するより効率的な治療法の開発が可能になったもので、その意義は極めて大きい。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、C 型肝炎ウイルス感染に対するインターフェロンのウイルス複製阻害および宿主応答の分子メカニズムを解析したものである。本研究により、(1) IFN と同様に HCV 複製阻害活性をもつ経口利用可能な新規化合物が発見・解析され、さらに (2) HCV 感染患者の肝組織繊維化における IL28B SNP と ISG 発現との関連が明らかになった。経口利用可能な IFN 様の新規抗 HCV 薬剤の発見とその作用機序の解明は、より簡便で抗ウイルス効果の高い治療薬の開発に直接結びつくもので、臨床応用への道を大きく開拓した。また、HCV に起因する肝組織の繊維化の応答メカニズムの解明は、HCV 感染患者に対するより効果的な治療法や新規薬剤の開発を可能にしたもので、その功績は極めて大きい。

平成 27 年 2 月 2 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。