

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19106

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスの増殖と発がん病原性に関する宿主リン酸化酵素の解析

研究課題名(英文) Analysis of a host kinase for multiplication and oncopathogenesis of hepatitis C virus

研究代表者

後藤 覚 (Goto, Kaku)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：80523513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルスの複製・病原性責任宿主因子であるリン酸化酵素を標的とした、新規抗ウイルス・肝癌戦略開発に従事した。新規*in vitro*酵素活性測定系を樹立し米国食品医薬品局承認薬ライブラリを用いた探索の結果、最も顕著な抑制効果を示した抗酒剤を解析した。酵素反応速度論・構造化学的検討から予測された阻害様式と、培養細胞系で観察された抗線維化シグナル効果、選択的抗癌作用、抗ウイルス効果を国際誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：New strategies against hepatitis C virus (HCV) and hepatocellular carcinoma (HCC) were developed, targeting the kinase identified to be a host cellular factor for the viral replication and pathogenesis. An anti-alcoholism drug, the top hit in our *in vitro* screen for inhibitors of the kinase using a Food and Drug Administration-approved drug library, was investigated. We reported the modes of inhibition indicated by the chemical kinetics and structures, and the suppression of fibrotic signaling, HCC cell proliferation, and HCV replication in the international journal.

研究分野：分子腫瘍ウイルス学

キーワード：Kinase HCV HCC

1. 研究開始当初の背景

ゲノムワイドスクリーニングにより、C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) の複製を支持する宿主因子としてストレス誘導性リン酸化酵素が見出された。続く解析で本酵素活性による HCV 複製促進分子機構のみならず、シグナル伝達経路を介したウイルス発癌病原性の促進が明らかになった。

2. 研究の目的

本酵素の分子・生病理特性を解明し、その活性・作用を標的とした新規抗ウイルス・肝癌戦略を開発する。

3. 研究の方法

組み換え酵素の基質ペプチドリソ酸化に伴う ATP 消費をルシフェラーゼにより検出する *in vitro* 酵素活性測定系を樹立した。ライブラリ等市販の薬剤を利用した。細胞培養系では肝癌細胞株である HepG2 細胞、PLC/PRF/5 細胞、Huh7 細胞、ヒト肝臓キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞である PXB 細胞を用いた。HCV 増殖評価には JFH1 感染系を用いた。mRNA 発現は qRT-PCR により評価した。タンパク質発現はウエスタンブロットにより評価した。細胞増殖性はテトラゾリウム塩還元法により、細胞傷害性は乳酸脱水素酵素活性比色測定系により評価した。

4. 研究成果

〔研究の主な成果〕

新たに *in vitro* リン酸化酵素活性測定系を樹立した。組み換え酵素と基質ペプチド共存下でのリン酸転移反応に伴う ATP 消費をルシフェラーゼにより定量するレポータ系にて、酵素・基質量や反応液・温度・時間等の条件最適化後、既知の酵素阻害剤による特異的酵素活性低下を検出し、系の有効性を確認した。そこで FDA 承認薬ライブラリに含まれる 636 種類の化合物による酵素活性への影響を検討したところ、最も顕著な阻害効果を示したものは抗酒剤であった (図 1)。

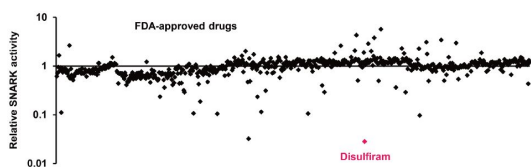


図 1 一次スクリーニング

本剤は用量依存的 (図 2) かつ ATP 非拮抗的に (図 3) 酵素活性を阻害した。

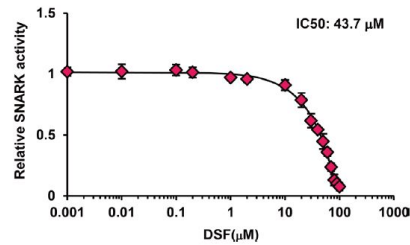


図 2 用量依存的酵素阻害効果

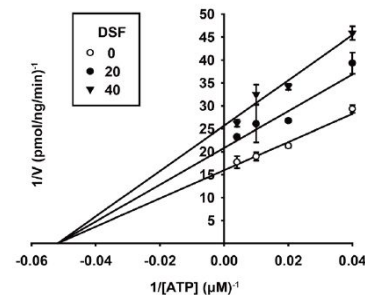


図 3 ATP 非拮抗的酵素阻害効果

また類縁体との比較解析から、分子構造中心に存在するジスルフィド結合の重要性が示唆された。培養細胞を用いた解析では、本酵素の線維化経路促進効果の本剤による抑制が観察された (図 4)。

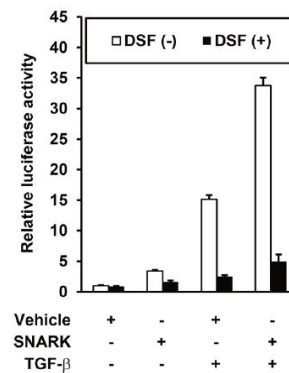


図 4 線維化経路阻害効果

また本酵素が促進する肝癌細胞増殖も本剤により抑制されたが (図 5)、正常ヒト肝細胞においてその効果は観察されなかった (図 6)。

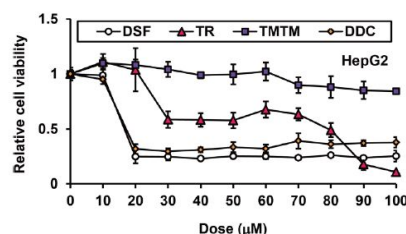


図 5 肝癌細胞増殖抑制効果

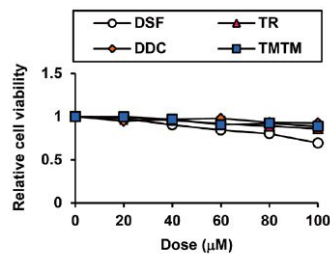


図 6 正常肝細胞増殖

また本剤による細胞傷害性も (図 7) 肝癌細胞特異的に (図 8) 観察された。

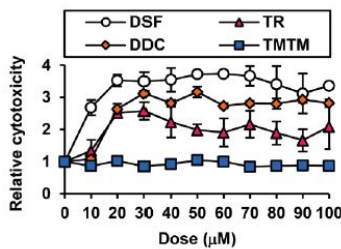


図 7 肝癌細胞傷害性

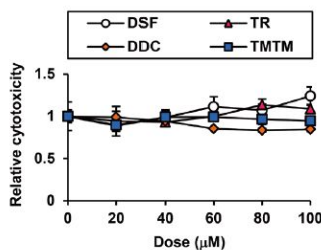


図 8 正常肝細胞傷害性

加えて JFH1 感染系では本酵素が支持する HCV 増殖も本剤により抑制された (図 9)。

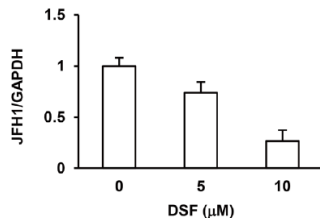


図 9 HCV 抑制効果

〔得られた成果の国内外における位置づけとインパクト〕

本研究にて標的としたリン酸化酵素は代謝

やがんに関与する AMP-activated protein kinase の関連酵素であり、真核生物における役割や疾患との関連が報告されていることから生体作用に一層の注目が集まっているが、機能的には未解明な部分が多い。本解析では本酵素の肝癌関与を観察し、実際にその阻害剤による抗肝癌作用を認めた。また酵素のアロステリックに制御され得る機能的特性が明らかになった。また同阻害剤により、本酵素が促進する線維化シグナル伝達や HCV 増殖の抑制がもたらされ、本酵素を標的とした抗ウイルス・病原性有効性がさらに示唆された。

また酵素阻害効果が見出された当治療薬は長年にわたり使用されてきた抗酒剤である。それゆえ本研究結果の示唆は、経済性や安全性において抗ウイルスまた抗肝癌戦略構築の一助となると期待される。

〔今後の展望〕

動物実験により当剤の抗肝癌・抗ウイルス実用性評価が可能になる。また一次スクリーニングで単離された当剤以外の治療薬による効果の検証は、一層の酵素機能解明と治療戦略開発につながる。加えて分子生物学的酵素特性のさらなる解析が病態の理解と制御を促進する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Goto K, Kato N, Chung RT. Anti-hepatocellular carcinoma properties of the anti-alcoholism drug disulfiram discovered to enzymatically inhibit the AMPK-related kinase SNARK *in vitro*. **Oncotarget.** 査読有, 7 巻, 2016, 74987-99. DOI: 10.18632/oncotarget.11820.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

後藤 覚 (GOTO, Kaku)
東京大学・医科学研究所・特任研究員
研究者番号：80523513

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし