

氏 名 (生年月日)	いしまる はなこ 石丸 華子 (1990 年 9 月 10 日)
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	博 薬 第 211 号
学位授与の日付	2022 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	プロテアソーム阻害剤は HSV-1 感染が惹起する ERK シグナル抑制を阻害することで抗ウイルス活性を発揮する
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 藤 室 雅 弘 (副査) 教 授 中 山 祐 治 (副査) 教 授 八 尋 錦之助

論文内容の要旨

序章

単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1:Herpes simplex virus 1)は α ヘルペス亜科に属す DNA ウイルスである。日本における成人健常人の 5 割以上が HSV-1 感染者であるといわれている。HSV-1 は、宿主細胞に吸着・侵入した後、細胞内でウイルス遺伝子を発現する。細胞内でウイルスゲノムが複製されウイルスタンパク質が産生されると、子孫ウイルス粒子が組立てられ細胞から出芽する。HSV-1 は三叉神経に潜伏感染するが、宿主の免疫低下や紫外線暴露により再活性化し様々な病態を引き起こす。HSV-1 は口唇ヘルペスや角膜ヘルペス、ヘルペス脳炎の原因となる。現在、HSV-1 感染症に対する治療薬としてアシクロビル、バラシクロビルなどが使用されているが、腎毒性や精神神経症状などの副作用や薬物耐性ウイルスの出現などの問題を有している。

多くのウイルスは感染成立や複製のために宿主やウイルス性のプロテアーゼを利用することが知られている。ウイルスカプシドやスパイクなどの構造タンパク質の成熟や活性化にプロテアーゼ活性は必須とされている。事実、HIV や C 型肝炎ウイルス感染ではこれらのプロテアーゼ阻害剤が抗ウイルス薬として用いられている。しかし、HSV-1 感染におけるプロテアーゼの役割は不明な点が多く残されていた。本研究ではプロテアソーム阻害剤が HSV-1 の増殖を抑制することを見出し、その作用機序解析を行った。

第 1 章 プロテアソーム活性は HSV-1 の感染に必要である。

HSV-1 の感染や増殖にプロテアーゼを利用するか否かプロテアーゼ阻害剤を用いて解析した。プロテアーゼ阻害剤としてキモトリプシン様酵素阻害剤 TPCK、トリプシン様酵素阻害剤 TLCK、システインプロテアーゼ阻害剤 E64d、プロテアソーム阻害剤 MG132 およびボルテゾミブを使用した。HSV-1 感染および増殖阻害効果をプラークリダクションアッセイにより評価した。その結果、MG132 およびボルテゾミブが感染により形成されるプラーク数を減少させた。ポリペプチド性阻害剤の MG132 は 20S プロテアソームの活性部位である Thr 残基に結合しプロテアソーム活性を阻害する。これら結果からプロテアソーム活性がウイルス感染、または増殖に必要であることが示唆された。次に、MG132

が感染の初期ステップであるウイルスの吸着・侵入を阻害するか解析した。その結果、MG132 は吸着、侵入ともに影響を与えなかった。そこで、MG132 がウイルス性遺伝子の発現に影響を与えるか否か、RT-qPCR にて解析した。その結果、ウイルスの前初期遺伝子(Us12)および後期遺伝子(UL19)の発現を MG132 が阻害した。次に、ウイルスゲノムの複製量とウイルス産生量を qPCR 法により評価した。その結果、MG132 を処理した感染細胞内でウイルスゲノムの複製量は 20%減少し、細胞上清中のウイルス産生量を 10%以下に抑制した。さらに、MG132 処理によりウイルス前初期遺伝子産物(ICP27)および後期遺伝子産物(ICP5)の発現が抑制した。これら結果から、MG132 はウイルスの侵入以降、かつウイルス前初期遺伝子発現の間のプロセスを阻害することでウイルス増殖を抑制することが示された。すなわち、ウイルスは細胞に侵入後遺伝子発現に至るまでの過程で宿主のプロテアソームを利用することが示唆された。

第2章 MG132 は HSV-1 感染による ERK 抑制をキャンセルし抗ウイルス活性を発揮する。

HSV-1 の感染時には、様々な細胞内シグナル伝達が活性化・不活化することが報告されている。そこで、MG132 存在下での HSV-1 感染におけるシグナル伝達の変動を解析した。その結果、細胞増殖や分化に関与する ERK シグナルの ERK のリン酸化が HSV-1 感染により抑制され、さらに MG132 処理によりこの ERK 抑制がキャンセルされた。さらに、NF- κ B シグナルの抑制分子である I κ B が HSV-1 感染により不安定化し、MG132 によりこの I κ B 不安定化がキャンセルされた。次に、感染による ERK シグナル抑制および NF- κ B シグナル活性化が HSV-1 感染に必要なか否か、ERK シグナル阻害剤 (PD98059)および NF- κ B シグナル阻害剤(BAY11-7082)を用いてブラークアッセイにより検証した。その結果、BAY11-7082 処理は HSV-1 感染でのブラーク数およびブラーク径に影響を与えなかったが、PD98059 処理は HSV-1 感染のブラーク径を増大した。さらに PD98059 処理により、感染細胞内のウイルスゲノム複製量は約 10 倍増加した。つまり、HSV-1 感染時の ERK シグナル抑制はウイルス増殖に必要であることが示された。

第3章 MG132 は HSV-1 感染により誘導される Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を抑制することで抗 HSV-1 活性を発揮する。

HSV-1 感染が ERK シグナルのどの因子に作用して、シグナルを抑制するのか明らかにするため、ERK シグナルの上流分子である EGFR、FGFR、Ras-GRF2 の発現量および下流分子である c-Raf、MEK1/2、ERK1/2、p90RSK のリン酸化について解析した。その結果、HSV-1 感染前後で EGFR、FGFR の発現量に変化はなかったが、Ras-GRF2 (Ras-グアニンヌクレオチド放出因子 2) が HSV-1 感染により発現量が低下し、MG132 処理によりこの Ras-GRF2 発現低下がキャンセルされた。さらに、HSV-1 は Ras-GRF2 の下流分子である c-Raf、MEK1/2、ERK1/2、p90RSK のリン酸化を抑制した。そして MG132 はこれらウイルスによる一連のリン酸化抑制をキャンセルした。GEF (Guanine ヌクレオチド交換因子) に属す Ras-GRF2 は Ras の活性化因子であり、ERK シグナルを活性化する。また、Ras-GRF2 はポリユビキチン化修飾を受けプロテアソームで分解されることが知られている。そこで Ras-GRF2 のポリユビキチン化修飾を免疫沈降法により解析した結果、HSV-1 は感染時に Ras-GRF2 のポリユビキチン化修飾を惹起した。以上より、HSV-1 は感染時にプロテアソーム分解に必要なポリユビキチン化修飾を Ras-GRF2 に付与し、Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を亢進させることで ERK シグナルを抑制することが示唆された。

総括

本研究により、HSV-1 感染時の ERK シグナル抑制は HSV-1 の増殖に必要であること、また、HSV-1

は感染時に ERK シグナルの活性化因子 Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を誘導することが示された。さらに、HSV-1 感染時の MG132 処理は Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を阻害することで ERK シグナルを活性化し、抗 HSV-1 活性を発揮することが示された。以上の研究結果から、プロテアソーム阻害剤はアシクロビルなどの核酸代謝拮抗剤とは作用機序の異なる新しい抗 HSV-1 化合物になり得ることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

《緒言》

単純ヘルペスウイルス 1 型 (Herpes simplex virus 1; HSV-1) は α ヘルペス亜科に属す DNA ウイルスである。初感染後、HSV-1 は三叉神経に潜伏感染し、宿主の免疫低下や紫外線暴露により再活性化して、口唇ヘルペスや角膜ヘルペス、ヘルペス脳炎を引き起こす。現在、HSV-1 感染症の治療薬としてアシクロビル等の核酸代謝拮抗剤が使用されるが、腎毒性や薬物耐性ウイルスの出現などの問題を有していることから、新しい抗 HSV-1 薬の開発が期待されている。本研究ではプロテアソーム阻害剤 MG132 が HSV-1 の増殖を抑制することを見出しその作用機序を明らかにした。

《審査結果の要旨》

第 1 章では、プロテアソーム活性は HSV-1 の感染に必要であることを見出した。HSV-1 の感染や増殖にプロテアーゼを利用するか否か、各種プロテアーゼ阻害剤を用いて解析した。その結果、プロテアソーム阻害剤の MG132 およびボルテゾミブが感染により形成されるプラーク数を減少させた。MG132 は感染の初期ステップであるウイルスの吸着および侵入に影響を与えなかったが、感染以降のウイルス遺伝子の転写やウイルスタンパク質発現、ウイルスゲノムの複製を抑制した。これら結果から、HSV-1 は細胞に侵入後遺伝子発現に至るまでの過程で宿主のプロテアソームを利用することが示唆された。

第 2 章では、MG132 は HSV-1 感染による ERK 抑制をキャンセルし、抗ウイルス活性を発揮することを明らかにした。HSV-1 は感染時に様々な細胞内シグナル伝達が活性化（または不活化）することが報告されている。そこで、MG132 存在下での HSV-1 感染におけるシグナル伝達の変動を解析した。その結果、ERK シグナルの ERK のリン酸化が HSV-1 感染により抑制され、さらに MG132 処理によりこの ERK 抑制がキャンセルされた。次に、ERK シグナル阻害剤 PD98059 や ERK シグナル活性化剤 EGF 処理による HSV-1 感染への影響を解析した。その結果、HSV-1 感染時の ERK シグナル抑制はウイルス増殖を亢進させることを見出した。

第 3 章では、HSV-1 感染が ERK シグナルのどの因子に作用して、ERK シグナルを抑制するのかの解明を試みた。そして、MG132 は HSV-1 感染により誘導される Ras の活性化因子 Ras-GRF2 (Ras-グアニンヌクレオチド放出因子 2) のプロテアソーム分解を抑制することで抗 HSV-1 活性を発揮することを解明した。すなわち、HSV-1 感染後に、Ras-GRF2 のポリユビキチン化修飾を惹起し、プロテアソーム依存的分解により Ras-GRF2 の発現量を低下させた。さらに、MG132 処理はこの Ras-GRF2 不安定化をキャンセルした。以上より、感染時、HSV-1 は Ras-GRF2 にポリユビキチン化修飾を付与し、Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を亢進させることで ERK シグナルを抑制することが示された。

なお、副査と主査からのコメントと質疑に対して、申請者は本論文に補足説明や新たな考察を加える、図表の訂正、適切な表現への訂正、過大解釈や過大表現の訂正、詳細な実験条件を追記する等に

より、本論文を適切に修正した。

《審査の結論》

本研究により、HSV-1 感染時の ERK シグナル抑制は HSV-1 の増殖に必要であること、また、HSV-1 は感染時に ERK シグナルの活性化因子 Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を誘導することが示された。さらに、HSV-1 感染時の MG132 処理は Ras-GRF2 のプロテアソーム分解を阻害することで ERK シグナルを活性化し、抗 HSV-1 活性を発揮することが示された。これらの研究結果は、HSV-1 研究領域における新知見であり学術的重要性を有しているだけでなく、プロテアソーム阻害剤は既存の核酸代謝拮抗剤とは作用機序の異なる新しい HSV-1 治療薬開発のためのリード化合物に成りうることを示され、臨床的にも意義のある研究成果だと言える。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。