The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The Pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor afatinib inhibits multiple steps of the mammarenavirus life cycle
Author(s)	水間, 奎太
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92076
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	水間　奎太
論文題名 Title	The Pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor afatinib inhibits multiple steps of the mammarenavirus life cycle (汎ErbBチロシンキナーゼ阻害剤アファチニブは哺乳類アレナウイルス生活環の複数の過程を抑制する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

アレナウイルス科哺乳類アレナウイルス属に分類されるLassa virus (LASV) は、ヒトに感染して致死性の急性熱性疾患であるラッサ熱を引き起こす。ラッサ熱の流行地である西アフリカでは、年間数十万人がラッサウイルスに感染していると推定され、感染者数、罹患率および致死率が高く公衆衛生上問題となっている。しかしながら、現在のところ治療法はリバビリンの適応外使用に限られ、さらにリバビリンの効果は限定的で、かつ重篤な副作用を引き起こすことがあるため、新規治療薬の開発が必要とされている。本研究では、FDA承認薬ライブラリーを用いてLASVの遺伝子転写・ゲノム複製を阻害する化合物のスクリーニングを行い、LASVの治療薬候補化合物を同定することを目的とした。さらに、その作用機序を明らかにすることとした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

哺乳類アレナウイルスの転写・複製過程は、ウイルスのゲノムRNA、ヌクレオプロテイン (NP) 、RNA依存性RNAポリメラーゼLが構成するウイルスリボ核タンパク質 (viral ribonucleoprotein, vRNP) 複合体によって制御される。我々は、LASV遺伝子の代わりに蛍光タンパク質ZsGreen遺伝子をコードしたミニゲノムRNA、NP、Lからなるvrnpを恒常発現する細胞を用いて、FDA承認薬ライブラリーのスクリーニングを行った。化合物がLASVの転写・複製活性に与える影響をZsGreenの蛍光強度により評価し、ErbBチロシンキナーゼ阻害剤AfatinibをLASVの転写・複製を強く阻害する化合物として同定した。

LASVと遺伝学的に近縁なlymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) を用いてウイルス増殖への効果を調べたところ、Afatinibは濃度依存的にLCMV増殖を抑制した。次に、Afatinibが哺乳類アレナウイルス生活環のうち細胞侵入過程および粒子産生過程に作用するかを調べるために、fusion assayおよびbudding assayを行った。AfatinibはLASVおよびLCMVの糖タンパク質依存的な膜融合を抑制し、Zタンパク質依存的なウイルス様粒子産生を抑制したことから、AfatinibがLASVおよびLCMVの細胞侵入過程および粒子産生過程を抑制することが分かった。

ErbBの下流シグナル経路の阻害剤を用いて、各経路がLASVおよびLCMVの転写・複製過程に寄与するかをミニゲノムアッセイにより検証した。PI3K/Akt経路の阻害剤はLASVの転写・複製を抑制した一方で、LCMVの転写・複製は抑制しなかった。対照的に、MEK/Erk経路の阻害剤はLCMVの転写・複製を選択的に抑制した。また、JAK/STAT経路の阻害剤はLASVおよびLCMVの転写・複製を抑制した。これらの結果から、LASVやLCMVの転写・複製に寄与するErbB下流シグナル経路には違いがあることが明らかになった。

Afatinibが、LASVやLCMV以外の哺乳類アレナウイルス増殖を抑制するか調べるために、哺乳類アレナウイルスのうち、LASVとは遺伝学的に遠縁なJunin virus (JUNV) を用いて解析を行った。JUNVのワクチン株であるCandid#1株を用いてウイルス増殖への影響を調べたところ、AfatinibはCandid#1株の増殖を抑制した。また、Candid#1株に対してもLASVと同様にAfatinibを用いて細胞侵入、転写・複製、および粒子産生過程に対する阻害効果を調べたところ、Afatinibはこれら全ての過程を抑制した。

〔総　括(Conclusion)〕

ErbB阻害薬Afatinibが広汎な哺乳類アレナウイルスの増殖を抑制することを明らかにした。Afatinibは哺乳類アレナウイルス生活環の複数の過程を抑制するため、耐性ウイルスが出現しにくいと考えられる。Afatinibにはいくつかの重大な副作用が報告されているが、ErbBより下流でアレナウイルス増殖に寄与する経路を特定することで、その経路を特異的に阻害する、より安全な抗アレナウイルス薬開発につながることが期待される。また、ErbBシグナル経路およびその関連因子がアレナウイルス増殖に果たす役割のさらなる解析によって、アレナウイルス生活環の各過程の新たな分子メカニズム解明が進むことが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）水間　奎太

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学特任准教授	岩崎 正治
	副　査	大阪大学教授	塩田 達雄
	副　査	大阪大学教授	岡本 徹

論文審査の結果の要旨

ラッサ熱を引き起こすラッサウイルス（LASV）は毎年西アフリカで数十万人に感染する公衆衛生上重要な病原体だが、確立された治療法や予防法は存在しない。本研究では、LASV転写・複製活性をレポーター遺伝子の発現量で定量できるウイルスフリー評価系を用いて、米国食品医薬品局承認薬ライブラリーのスクリーニングを実施した。ウイルスライフサイクル各過程の再構築系を用いた実験により、ヒット化合物の一つafatinibが転写・複製だけではなく、細胞侵入及び粒子形成も抑制することを明らかにした。さらにafatinibはLASVと近縁のリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスや遠縁のフニンウイルス弱毒生ワクチン株Candid#1の増殖も抑制する、抗汎哺乳類アレナウイルス活性を有することを明らかにした。これらはafatinibが抑制するErbBシグナル経路を標的とする新規機序抗LASV薬開発に資する研究成果であり、博士（医学）の学位授与に値する。