

村岡 徹 論文内容の要旨

主 論 文

Insulin-induced mTOR activity exhibits anti-hepatitis C virus activity

インスリン誘導性の mTOR 活性による抗 C 型肝炎ウイルス活性の検討

村岡 徹 市川 辰樹 田浦 直太 宮明 寿光 竹下 茂之 秋山 祖久
三馬 聡 小澤 栄介 磯本 一 竹島 史直 中尾 一彦

(Molecular Medicine Reports 5 巻 2 号 331 - 335, 2012 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：中尾一彦教授)

緒 言

C 型慢性肝炎に対して現在広くインターフェロン (IFN) による治療が行なわれているが、peg-IFN とリバビリン併用療法でも HCV genotype 1 の症例においては SVR (sustained virological response) 率は 5 割程度である。SVR 率に影響する因子としては様々なものが明らかになっているが、宿主側の因子の一つとしてインスリン (INS) 抵抗性の関与が指摘されている。INS により活性化される細胞内シグナルの一つとして Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-Mammalian target of rapamycin (mTOR) 系がある。IFN により mTOR 活性が上昇し、それが IFN の抗 HCV 作用の一端を担っている事も報告されている (松本ら, J Gastroenterol. 44 巻 8 号 856-63 頁 2009 年)。

今回の研究では INS が mTOR を介して抗 HCV 効果を示すかどうかを HCV レプリコンシステムを用いて検討した。HCV レプリコンシステムは培養細胞内で HCV-RNA が高効率に複製されており、抗 HCV ウイルス剤のスクリーニングなどに近年利用されている。

対象と方法

肝癌細胞株 HuH-7 に全ゲノム長 HCV レプリコンを導入した OR6 細胞を用い検討した。OR6 細胞ではレプリコンにレニラルシフェラーゼ遺伝子が導入されており、レニラルシフェラーゼ活性を測定することにより HCV レプリコン量の変化を見ることが出来る。OR6 細胞は I 型コラーゲンでコートされたディッシュを用いて培養した。

24穴ディッシュに1穴あたり約 3×10^4 の細胞を播種し、約24時間後に0-50 IU/mlのIFN、0-300 nmol/lのINSを負荷し、48時間後にレニラルシフェラーゼ活性を測定した。またIFNあるいはINS負荷12時間前に $1 \mu\text{mol/l}$ のLY294002(PI3K阻害剤)あるいはラパマイシン(mTOR阻害剤)で前処置を行い、IFNやINSによるルシフェラーゼ活性の変化に与える影響を検討した。またIFNやINS負荷前にmTORに対するsiRNAをOR6細胞に導入し、同様にルシフェラーゼ活性の変化を測定した。

次にウエスタンブロットによりSTAT-1のリン酸化が誘導されるか否かについて検討した。10cmディッシュにOR6細胞を約 1×10^6 播種し、約90%コンフルエントの状態となった所で300 nmol/lのINSあるいは50 IU/mlのIFNを負荷し30分後に細胞溶解しSTAT-1あるいはリン酸化STAT-1(Tyr701)に対する抗体を一次抗体としてウエスタンブロットを行った。またリン酸化p70s6K(Thr386)を抗体としたELISA法を用いmTOR活性の変化を測定した。INS、IFN負荷12時間前に $1 \mu\text{mol/l}$ のラパマイシンで前処置を行いmTOR活性の変化を観察した。

結 果

HCVレプリコン量はINS負荷によって用量依存的に減少し、300 nmol/lの負荷時はHCVレプリコンは約6割程度に減少した。その効果はIFNと相加効果が認められた。IFN負荷によりSTAT-1のリン酸化が誘導されたが、INS負荷では誘導されなかった。INS負荷によりmTOR活性の上昇が認められ、ラパマイシンによりその効果は阻害された。INSによる抗HCV効果はLY294002、ラパマイシンおよびmTOR siRNAの導入により阻害された。

考 察

OR6細胞を用いた実験系においてはINS負荷によりHCV減少効果が認められ、その効果はIFNと相加効果を示した。一方INS負荷によってSTAT-1リン酸化は誘導されず、INSによる抗HCV効果はmTORの活性化によるものと考えられた。インスリン刺激におけるmTOR活性化はSTAT-1経路とは独立していると考えられた。IFNによってmTORが活性化され抗HCV作用を示すこと、低栄養状態においてIFNによるmTOR活性化が低下し抗HCV効果が減弱すること、分岐鎖アミノ酸(BCAA)の補完によりmTOR活性および抗HCV効果が上昇することなども報告されている(本田ら *Gastroenterology* 141巻1号128-140頁2011年)。mTORはHCVの生活環に何らかの干渉をしているものと考えられmTORに注目することでIFN治療成績の向上や新たな抗HCV薬の発見につながることを期待される。