

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学)

氏 名 太宰 昌佳

### 学 位 論 文 題 名

#### Induction of antiviral activity enhanced by epigenetic reactivation of IRF-7

(エピジェネティックな修飾によるIRF-7の再活性化に伴う抗ウイルス活性の検討)

【背景と目的】 Hepatitis C virus (HCV)感染症は、世界中で約1億7000万人の患者がいるとされており、慢性肝炎から肝硬変と進展し最終的には肝臓癌に至ることから、HCV感染症に対する治療は社会的に重要な問題となっている。HCV感染に対する自然免疫応答の重要性は広く知られており、ウイルスが細胞に感染した際には、ウイルス RNA は細胞質型核酸認識受容体である retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)等に認識され、その下流にシグナルが伝達され、転写因子である interferon-regulatory factor-3 (IRF-3)/IRF-7を介し Interferon (IFN)が発現誘導する。産生された IFN は IFN レセプターに結合し Janus kinase (JAK) – Signal transducer and activator of transcription (STAT)の系を介し、Interferon Stimulated genes (ISGs)を誘導する。ISGs には直接的な抗ウイルス作用を発揮する 2'-5'-oligoadenylate synthetase (2'-5'OAS) や、Protein kinase R (PKR), Myxovirus resistance gene A (MxA)などが良く知られており、また、Viperin, ISG56, IFITM は特に抗 HCV 効果を有する ISGs であるとされている。また、IFNs の転写に関与している IRF-7 は、IFN シグナルの下流で発現誘導される ISGs であることから、IFN 産生において Positive feedback 機構を担う自然免疫応答において重要な転写因子として認識されている。HCV に対する抗ウイルス療法は、従来の Interferon 療法に始まり、その後リバビリンが併用されるようになり、さらに現在はプロテアーゼ阻害剤が加わり治療効果の改善が成されている。しかしながら、耐性獲得株の出現や治療難治例の存在などの問題があり、現在も新たな局面からの治療法の開発が必要とされている。近年、エピジェネティクスに関する知見が積み重なり、癌腫を始めとした様々な疾患に関与することが報告されている。慢性肝炎や肝細胞癌においても、異常なエピジェネティクスの修飾がおきていることが報告されている。エピジェネティクスの修飾機構には、主に DNA のメチル化とヒストンの修飾があり、遺伝子のプロモーター領域の CpG island にメチル化が起こることで、その遺伝子の発現が抑制される。癌細胞では特に癌抑制遺伝子の DNA メチル化修飾が起こることで、遺伝子の発現が抑制され、遺伝子が欠損した場合と同じ状態になると考えられている。近年、異常な DNA メチル化に対し、DNA メチル化酵素阻害剤が臨床に応用する試みが成されており、実臨床ではすでに血液疾患において使用されている。過去の報告において、慢性炎症下ではエピジェネティックな修飾、特に DNA メチル化が促進されることが報告されており、加えて、HCV を含む微生物由来の分子による直接的な DNA メチル化の作用も示唆されている。そこで今回我々は、DNA のメチル化と感染症という観点から治療への応用を検討するに至り、慢性 HCV 肝炎下では DNA メチル化が促進することで自然免疫関連遺伝子が抑制されている可能性と、その場合、DNA メチル化酵素阻害剤を用いることで、抑制された遺伝子の発現を回復させ、抗ウイルスに有効である可能性を検証するに至った。

【対象と方法】 DNA メチル化酵素阻害剤は 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)を使用した。5-aza-dC

の抗 HCV 効果を HCV レプリコン細胞: Huh7.5.1/Rep-Feo-1b を用いて解析した. HCV レプリコン複製量はルシフェラーゼ活性により測定し, 自然免疫関連遺伝子の発現は qRT-PCR 法を用いて解析した. DNA のメチル化解析目的で, 各種ヒト肝細胞癌由来の細胞株や肝細胞癌組織検体に対し, Methylation-specific PCR (MSP) とバイサルファイト・パイロシーケンス法を施行した. さらに 5-aza-dC による自然免疫の活性化を調べるために, 肝細胞癌由来の細胞株に 5-aza-dC 処理を行い, 3pRNA による核酸刺激や Newcastle disease virus (NDV) を用いたウイルス感染の系を行い, 自然免疫関連遺伝子の発現を qRT-PCR 法を用いて解析した. また, NDV F 遺伝子量を測定し, 抗ウイルス効果を確認した. IRF-7 の IFN シグナルに非依存的な作用を解析するために, IFN シグナルの入らない細胞である Stat1 KO MEFs を用い, IRF-7 活性化変異体発現ベクターをトランスフェクションし, ISGs の発現誘導を qRT-PCR 法を用いて解析した.

【結果】 上記の仮説を検証すべく, 5-aza-dC を HCV replicon 細胞に投与したところ, replicon 複製量の減少を認め, さらに複数の自然免疫関連遺伝子の発現が上昇していた. そこで, 各ヒト肝細胞癌由来細胞株において DNA メチル化を解析したところ, 幾つかの細胞株において自然免疫の重要な分子である IRF-7 の DNA メチル化が確認された. このことから, IRF7 が 5-aza-dC により DNA メチル化が解除され, 発現が回復することで自然免疫が活性化されている可能性が考えられた. 肝細胞癌の組織検体においても, 15%程に IRF-7 の DNA メチル化が存在した. これらの細胞株において, 5-aza-dC 処理を行うことで IRF-7 の発現上昇が可能であり, 核酸刺激後やウイルス感染後の口型 IFNs や IFN 誘導遺伝子 (ISGs); 2'-5'OAS, PKR, Viperin の発現誘導が増強した. 続いて, これら自然免疫の活性化が抗ウイルス効果を示すか, RNA ウイルスである NDV を用いた感染実験を行ったところ, 5-aza-dC 処理によりウイルスの複製量を抑制可能であった. さらに, 抗ウイルス目的での IFN 処理に 5-aza-dC を併用することで, 抗ウイルス効果を増強することが可能であったことから, IFN シグナルに非依存的な ISGs の誘導メカニズムを推察し IRF-7 の機能を検討したところ, Stat1 KO MEFs に活性化型 IRF-7 を発現させることで ISGs が発現誘導された. これらより, IFN 投与下においても 5-aza-dC により IRF-7 の発現を回復させる意義があるものと考えられ, 抗 HCV 療法において IFN と 5-aza-dC を併用する有用性が示唆された.

【考察】 近年, エピジェネティクスの修飾を対象とした薬物療法が, 主に癌腫を対象に進められている. 今回我々は, エピジェネティクスの修飾を感染症の治療に生かすという観点から検討した. HCV 慢性肝炎下では IRF-7 の DNA メチル化修飾が起きている可能性が示唆され, その場合, 5-aza-dC 処理を行うことで IRF-7 を再活性化し, ISGs の誘導を含め自然免疫応答の増強が可能と考えられた. さらに IFN に 5-aza-dC を併用する有効性を示唆するに至った. 今後の課題としては, 5-aza-dC による抗 HCV 効果をさらに普遍的に確認すべく, 異なる genotype のレプリコン細胞での検討や, 由来する細胞株が異なるレプリコン細胞での検討, さらに感染実験が可能な HCV ウイルスである JFH-1 株を用いた感染実験を行う必要がある. また, 今回は肝細胞癌の組織検体を用いて検討したが, 今後は正常肝や, HCV 慢性肝炎 (非肝硬変/肝硬変) 症例など幅広いサンプルを用いて IRF-7 の DNA メチル化状態を検討し, また, 臨床経過と照らし合わせることで治療への効果予測因子になり得るか等の検討が必要である. 近年, HCV に対する IFN 治療効果予測因子として, ジェネティックな解析で IL28B の一塩基多型が有用とされているが, エピジェネティクスの観点からの解析も今後有用となる可能性があり大変興味深い.

【結論】 IRF-7 の DNA メチル化修飾が存在する場合, 従来 of IFN 療法に加え 5-aza-dC を併用することで, 抗 HCV において有効な治療法になり得る可能性が示された.