

## 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)

## 学位論文内容の要旨

【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-I (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) とパイサルファイト・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 I 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, 従来の 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.

# 学位論文審査の要旨

主査	准教授	松本	美佐子
副査	准教授	森松	組子
副査	教授	志田	壽利
副査	教授	坂本	直哉

## 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)

本研究は IRF-7 の DNA メチル化に着目し、DNA メチル化酵素阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) を用いることで IRF-7 の発現を回復し、C 型肝炎ウイルス (HCV) の抑制効果を示唆するに至った。

学位審査は 4 名の審査員により非公開で行われ、申請者の発表後、質疑応答が行われた。森松准教授より IRF-7 DNA メチル化のメカニズムについて、また 5-aza-dC 投与を終了後に予想される DNA メチル化の変化について質問がなされた。申請者は、現時点では特定の分子が DNA メチル化されるメカニズムの詳細は解明されておらず、IRF-7 も例外では無いこと、一方、ある特定の環境下で発現が抑制された分子は、抑制状態が続くことで epigenetic な変化に至る点についてはコンセンサスが得られており、慢性炎症や HCV 感染により IRF-7 が抑制された状態が続き、メチル化に至るプロセスは十分に考えられる旨を説明した。DNA メチル化は非可逆的な変化であり、一旦解除された場合、メチル化を誘導する環境下に無い限りは、非 DNA メチル化状態が維持される旨を説明した。志田教授より Newcastle disease virus (NDV) の複製量を測定する際に、F protein 遺伝子量を用いた妥当性についての質問がなされた。申請者は *in vitro* での NDV 感染実験において、F protein 遺伝子量と培地中のウイルス量に相関を認めた既報を用い、今回 F protein 遺伝子量を計測した点、しかし、正確な NDV 複製量の検討を行う際には HAU の測定が必要と考えられ、積極的に追加実験を検討する旨を述べた。また、IRF-7 の DNA メチル化と癌化の関連性について、IRF-7 の抗腫瘍効果の有無について質問がなされ、申請者は Hepatitis B virus (HBV) を背景とする HCC 検体を用いた既報において、IRF-7 のメチル化は非癌部に比して癌部で頻度が上昇したことから、癌化のプロセスに IRF-7 メチル化が関わる可能性、IRF-7 の発現を回復させることで細胞増殖が抑制された既報も鑑み、抗腫瘍効果を有する可能性を述べた。坂本教授より 5-aza-dC の効果に関し転写レベルでの検討について質問がなされ、申請者、DNA メチル化はプロモーター領域における転写因子のリクルートに影響することから、Luciferase assay 等の実験系の有用性を

理解し、今後実験系に追加する旨を述べた。また HCC 治療への応用性についても質問が成され、申請者は IRF-7 の細胞増殖抑制効果の既報も鑑みて、従来の IFN 動注療法との併用等において効果が期待できる可能性について説明した。さらに *in vivo* で 5-aza-dC を用いた実験系の可能性についての質問や、IRF-7 KO マウスを用いた実験系の提案が成され、これに対し申請者は、5-aza-dC はすでに血液疾患で臨床応用されており、その開発の経緯からマウスでの実験系は可能である点と、IRF-7 KO マウスを用いた実験系について積極的に考慮する旨の返答を行った。松本准教授より 5-aza-dC を用いた実験系における positive control の必要性について提案がなされ、申請者は positive control の必要性を十分に理解し、今後実験系に追加する旨の返答を行った。また IRF-7 以外の遺伝子に対する検討、HCV 以外の微生物に対する検討について質問がなされ、申請者は IRF-7 以外の遺伝子が DNA メチル化修飾を伴う可能性は十分に考えられ、今後、解析対象を広げることで 5-aza-dC の応用範囲が広がる可能性、また HCV 以外にも HBV、Epstein-Barr virus、Helicobacter pylori 等による DNA メチル化促進の報告があり、これら微生物への応用も十分検討可能である旨を述べた。最後に *in vivo* の実験系についての質問がなされ、申請者よりキメラマウスの系を用いた検討が考えられる旨の説明が成された。

申請者はすべての質問に対してその主旨を理解し、自らの研究内容と文献的考察を交えて適切に回答した。この論文は、重要な感染症である HCV の治療において、新たに epigenetics な観点からのアプローチで検討し、5-aza-dC の抗 HCV 効果と、さらにはインターフェロンとの併用の可能性を示した点で高く評価され、今後の抗 HCV 治療の開発に寄与することが期待される。審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。