

## 主 論 文

Daunorubicin, a topoisomerase II poison, suppresses viral production of hepatitis B virus by inducing cGAS-dependent innate immune response

(トポイソメラーゼ II 阻害剤であるダウノルビシンは cGAS 依存的な自然免疫応答を誘導することにより、B 型肝炎ウイルスの產生を抑制する)

### 【緒言】

B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染は自然免疫応答や炎症応答を誘導し、慢性肝炎を引き起こす。慢性肝炎から最終的に肝硬変や肝がんへと肝病態が進展することから、肝発がんを阻止するためには、HBV の持続感染や、それに伴う慢性肝炎を抑制することが最も重要である。しかし、B 型慢性肝炎の治療に用いられているインターフェロン (IFN) - $\alpha$  は著効率が 30%程度と低く、核酸アナログ製剤は耐性ウイルスの出現や薬の中止が肝炎の急性増悪を引き起こすなどの問題がある。そのため、B 型慢性肝炎の治療のための新たな治療法や治療薬の開発が求められている。

宿主因子トポイソメラーゼ II は DNA の一時的な DNA 鎮の切断や再結合を触媒し、DNA 超らせん構造を修復する機能を持つことから、真核生物のみならずウイルスのゲノム DNA の複製にも重要である。トポイソメラーゼ II 阻害剤にはダウノルビシン、ドキソルビシンあるいはテニポシドなどが存在し、抗がん剤として広く使われている。正常細胞の場合、これらの薬剤により細胞内に蓄積した異常 DNA は、DNA 損傷チェックポイント機構の一つである ataxia telangiectasia mutated (ATM)-Chk2 経路を活性化し、一時的に細胞周期を停止させる。一方、多くのがんでは DNA 損傷チェックポイント機構に異常があることから、がん細胞の場合、これらの薬剤は分裂期細胞死を誘導する。

最近、ダウノルビシンは宿主因子 cyclic GMP-AMP synthetase (cGAS)による異常 DNA の認識を介して、インターフェロン (IFN) - $\beta$ の產生を誘導し、RNA ウィルスであるエボラウィルスの複製を抑制することが報告された。cGAS はウイルス DNA などの外因性 DNA を認識する細胞内センサーとして機能しており、IRF-3 の活性化を介して IFN- $\beta$ の產生を誘導する。我々は以前、cGAS が HBV のウイルス DNA を認識し、自然免疫応答の誘導を介して、ウイルス会合を抑制することを報告した。本研究では、内在性 cGAS を発現しているヒト不死化肝 NKNT-3/NTCP 細胞を用いて、トポイソメラーゼ II 阻害剤が cGAS 依存的な自然免疫応答を誘導し、抗 HBV 活性を示すかどうか検討した。

## 【材料と方法】

### 細胞

HBV の感染受容性である sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を強制発現しているヒト不死化肝 NKNT-3 細胞 (NKNT-3/NTCP 細胞) を使用した。NKNT-3/NTCP 細胞は内在性 cGAS を発現し、HBV 感染受容性を示す (副論文)。

### HBV 感染法

HBV 感染に用いる接種源は HBV の培養上清中への產生が確認されているヒト肝がん HepG2.2.15 細胞から準備した。HepG2.2.15 細胞の培養上清をポリエチレングリコール処理することにより、HBV を回収した。

### NKNT-3/NTCP 細胞へのダウノルビシン処理

NKNT-3/NTCP 細胞を播種した翌日に、各種濃度 (0  $\mu$  M から最大 1  $\mu$  M まで) のダウノルビシンを 12 時間処理した。ダウノルビシン処理後、0 時間から 48 時間まで経過した細胞を経時的に回収した。回収後の細胞を、以下の実験に用いた。また、その他のトポイソメラーゼ II 阻害剤であるドキソルビシンやテニポシドも同様の方法により、NKNT-3/NTCP 細胞に処理した。

### ダウノルビシン処理後の NKNT-3/NTCP 細胞の細胞生存率及び細胞増殖能の測定

細胞生存率は、ダウノルビシン処理後の NKNT-3/NTCP 細胞をトリパンブルー染色法により測定した。また、細胞増殖能は WST-1 アッセイキット (タカラバイオ社) を用いて測定した。

### 定量的リアルタイム PCR 法やウエスタンプロット法による各種 IFN や IFN 誘導遺伝子群の発現誘導レベルの解析

ダウノルビシン処理後の NKNT-3/NTCP 細胞から、RNeasy Mini キット (Qiagen 社) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA を用いて、定量的リアルタイム PCR 法により、各種 IFN や IFN 誘導遺伝子群 (ISG) の mRNA レベルを測定した。

IFN 誘導遺伝子である ISG15 や ISG56 の発現レベルはウエスタンプロット法により調べた。

## 遺伝子ノックダウン法によるダウノルビシンが誘導する各種 IFN や IFN 誘導遺伝子群の発現誘導における cGAS の役割の検討

NKNT-3/NTCP 細胞に cGAS 遺伝子に対する siRNA を導入後、 $1\mu M$  のダウノルビシンを 12 時間処理した。ダウノルビシン処理後 48 時間経過した細胞を用いて、IFN- $\beta$ 、ISG15 および ISG56 の発現誘導レベルを定量的リアルタイム PCR 法やウエスタンプロット法により解析した。

また、Luciferase や Cyclophilin 遺伝子に対する siRNA を導入した細胞を陰性コントロールとして用いた。

## 定量的 PCR 法による細胞内および細胞外の HBV DNA 量の検討

ダウノルビシン処理後 48 時間を経過した HBV 感染 NKNT-3/NTCP 細胞およびその培養上清から、DNeasy Blood & Tissue キット (Qiagen 社) を用いて total DNA を抽出した。抽出した total DNA を用いて、定量的 PCR 法により、細胞内あるいは培養上清中の HBV DNA 量を測定した。

## 【結果】

### NKNT-3/NTCP 細胞において、ダウノルビシンは DNA 損傷チェックポイント機構を活性化し、細胞増殖を抑制する

ダウノルビシンはトポイソメラーゼ II 阻害剤の一つであり、抗がん剤として汎用されている。最初に、ダウノルビシン処理が NKNT-3/NTCP 細胞の細胞生存率に影響するか検討した。ダウノルビシン処理後の NKNT-3/NTCP 細胞をトリパンブルー染色したところ、細胞生存率に有為な差は認められなかった。次に、ダウノルビシン処理が NKNT-3/NTCP 細胞の DNA 損傷チェックポイント機構を活性化するか検討した。その結果、DNA 損傷チェックポイント機構の一つである ATM-Chk2 経路に含まれる宿主因子 Chk2 がリン酸化（活性化）されることがウエスタンプロット解析により分かった。また、ダウノルビシン処理後の NKNT-3/NTCP 細胞の細胞増殖能が停止していることも分かった。これらの結果から、NKNT-3/NTCP 細胞において、ダウノルビシンが DNA 損傷チェックポイント機構を活性化し、細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

### NKNT-3/NTCP 細胞において、ダウノルビシンは自然免疫応答を誘導する

最近、ダウノルビシンは cGAS による異常 DNA の認識を介して、IFN- $\beta$ の産生を誘導することが報告された。そこで、NKNT-3/NTCP 細胞において、ダウノルビシンが IFN- $\beta$ の発現をはじめとする自然免疫応答を誘導するか、定量的リアルタイム PCR 法やウエスタンプロット法により検討した。その結果、ダウノルビシンの処理濃度や処理後の経過時間に依存して IFN- $\beta$ の発現が誘導されることが分かった。I 型 IFN である IFN- $\beta$ と同様に、II 型 IFN である IFN- $\gamma$ や III 型 IFN である IFN- $\lambda$ の発現も誘導されていた。また、ISG15 及び ISG56 もダウノルビシン処理後の NKNT-3/NTCP 細胞において発現が誘導されていた。さらに、ダウノルビシンだけでなく、他のトポイソメラーゼ II 阻害剤であるドキソルビシンやテニポシドでも ISG15 や ISG56 の発現を誘導することが分かった。これらの結果から、NKNT-3/NTCP 細胞において、トポイソメラーゼ II 阻害剤が自然免疫応答を誘導することが明らかとなった。

### ダウノルビシンが誘導する自然免疫応答に内在性 cGAS は重要である

我々は NKNT-3/NTCP 細胞において、内在性 cGAS が発現していることを既に報告している。そこで、ダウノルビシンが誘導する自然免疫応答に内在性 cGAS が関与しているかどうか、遺伝子ノックダウン法により検討した。cGAS 遺伝子に対する siRNA を導入したところ、ダウノルビシンにより誘導される IFN- $\beta$ 、ISG15 及び ISG56 の発現が減少した。これらの結果から、ダウノルビシンによる自然免疫応答の誘導に、内在性 cGAS が重要であることが分かった。

### ダウノルビシンは cGAS 依存的な自然免疫応答を誘導することにより、HBV 産生を抑制する

NKNT-3/NTCP 細胞が HBV 感染受容性を示すことは既に報告している(副論文)。そこで、ダウノルビシンによる HBV 感染増殖への影響を、細胞内および細胞外の HBV DNA 量を定量することにより評価した。その結果、ダウノルビシン処理後 48 時間経過した HBV 感染 NKNT-3/NTCP 細胞では、細胞内の HBV DNA 量は増加していた。しかし、その一方で、培養上清中の HBV DNA 量が減少していることが分かった。これらの結果から、ダウノルビシンは HBV に対して、ウイルス DNA の複製ではなく、ウイルス産生を抑制することが示唆された。

## 【考察】

宿主因子トポイソメラーゼ II は DNA 超らせん構造を修復する機能を持つことから、真核生物のみならずウイルスのゲノム DNA の複製にも関与していることが報告されている。例えば、シミアンウイルス 40、単純ヘルペスウイルス 1 型、アデノウイルス、あるいはヒトサイトメガロウイルスなどの DNA ウィルスは、ウイルスのゲノム DNA の複製にトポイソメラーゼ II を利用する。そのため、これらのウイルスに対して、トポイソメラーゼ II 阻害剤が抗ウイルス活性を示す。本研究では、トポイソメラーゼ II 阻害剤の一つであるダウノルビシンは、HBV 感染後の NKNT-3/NTCP 細胞において、細胞内 HBV DNA 量を抑制しなかったことから、HBV のゲノム DNA の複製は阻害しないことが示唆された。

最近、ダウノルビシンの新たな機能として、cGAS による異常 DNA の認識を介して、IFN- $\beta$  の産生を誘導し、RNA ウィルスであるエボラウイルスの複製を抑制することが報告された。本研究では、ダウノルビシンは内在性 cGAS を介する自然免疫応答を誘導し、HBV 感染後の NKNT-3/NTCP 細胞において、培養上清中の HBV DNA を減少させることを明らかにした。これらの結果から、ダウノルビシンは細胞内での HBV のゲノム DNA の複製を抑制しないが、細胞外へのウイルス産生を抑制するものと考えられる。

トポイソメラーゼ II 阻害剤は抗がん剤として臨床的に使用されているが、その副作用として、心毒性が大きな問題となっている。その中でダウノルビシンはドキソルビシンよりも小児がん患者の心毒性が少ないことが報告されている。また、ドキソルビシンのリポソーム製剤はドキソルビシンの血中濃度を低下させることによる副作用の軽減を期待できることから、卵巣がんやエイズ関連カポジ肉腫にも適用されている。このように、ダウノルビシンによる副作用を軽減することができれば、将来的に、ダウノルビシンを HBV が引き起こす肝疾患の治療に適用することも期待できる。

## 【結論】

本研究では、トポイソメラーゼ II 阻害剤の一つであるダウノルビシンが、HBV が感染したヒト不死化肝 NKNT-3 細胞において、cGAS を介する自然免疫応答を誘導し、HBV のウイルス産生を抑制することを明らかにした。本研究は cGAS の抗ウイルス機能や HBV が引き起こす肝疾患の治療を考える上で、重要な知見になるものと思われる。