

## 受賞対象論文

Dansako H, Ueda Y, Okumura N, Satoh S, Sugiyama M, Mizokami M, Ikeda M, Kato N : The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly. FEBS J (2016) 283, 144-156.

## 團 迫 浩 方

Hiromichi Dansako



## 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学

Department of Tumor Virology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

## &lt;プロフィール&gt;

昭和46年生まれ

平成5年3月 佐賀大学農学部応用生物科学科卒業

平成7年3月 佐賀大学大学院農学研究科修士課程 (応用生物科学専攻) 修了

平成9年4月 岡山大学医学部 内科学第二 技官

平成16年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生物学 助手

平成16年9月 岡山大学博士 (医学)

平成17年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生物学 助手

平成19年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学 助教

平成21年4月 テキサス大学医学部ガルベトン校 Stanley M. Lemon 研究室へ  
研修渡航平成22年4月 ノースカロライナ大学チャペルヒル校 Stanley M. Lemon 研究室へ  
研修渡航

平成23年11月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学 助教

平成28年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍ウイルス学 准教授  
現在に至る

## 研究の背景と経緯

B型肝炎ウイルス (HBV) はヘパドナウイルス科に属し、血液を介して肝臓に感染するウイルスである。HBVの持続感染者の多くは無症状で経過する無症候性キャリアであり、我が国では約150万人存在すると推定されている。しかし、そのうち約10%は将来的に肝炎を引き起こすとされ、慢性肝炎に移行する可能性がある。慢性肝炎やそれから発症した肝硬変において、高確率に肝がんが発症するとされている。我が国の肝がんによる犠牲者は毎年約3万人であり、そのうち約15%がHBVの持続感染に起因しているものと考えられている。しかし、HBVが肝臓内に存在しているだけでは肝炎は起きないとされ、宿主がHBVを「非自己」として認識し、過剰に自然免疫応答を起こすために肝炎が起きると考えられている。肝がんを予防するためには、HBVを肝臓から排除し、慢性肝炎から脱することが最も重要である。現在、HBV感染者に対する治療において、インターフェロン (IFN)- $\alpha$  や核酸アナログ製剤が主に用いられている。しかし、IFN- $\alpha$  の著効率は30%程度と低く、核酸アナログ製剤は耐性ウイルス

の出現や投薬治療の中断が肝炎の急性増悪を引き起こす等、問題が多い。

HBVはDNAウイルスに分類され、部分的に一本鎖構造である不完全二本鎖DNAをウイルスゲノムとして持つ。HBVは肝トランスポーターとして機能するナトリウムタウロコル酸共輸送ポリペプチド (NTCP) を受容体として、肝臓の主要な構成細胞である肝細胞に侵入する。ウイルス外殻の脱殻と共に核内へ移行した不完全二本鎖DNAは宿主のポリメラーゼにより、閉環状二本鎖DNA (cccDNA; covalently closed circular DNA) に修復される。HBV排除が難しい原因の一つとして、このHBV cccDNAが構造的に極めて安定であり、核内に長期に残存することが挙げられる。その後、HBV cccDNAはプレゲノムRNAをはじめとする4種類のウイルスRNAに転写される。これらのウイルスRNAの一部はmRNAとして、ウイルス蛋白質の翻訳に関わるが、プレゲノムRNAはHBVのコア蛋白質に取り込まれた後、逆転写による不完全二本鎖DNA合成のための鋳型として使用される。これらの過程の後、新たなHBV粒子が形成され、細胞外に放出される。このように、HBVは自身のゲノムDNAが

RNA に転写された後、再度 DNA に逆転写することにより、ウイルスゲノムを複製している。

宿主はウイルスの複製産物を「非自己」として認識した後、自然免疫応答によりウイルスを排除する機構を備えている。最近まで、宿主による HBV 感染認識機構は不明であったが、2015年に、細胞質内の外来 RNA を認識する宿主因子である RIG-I が HBV のプレゲノム RNA を認識することが報告された<sup>1)</sup>。一方、細胞質内の外来 DNA を認識する宿主因子は DAI や AIM などが既に報告されていたが、2013年に、cyclic GMP-AMP synthetase (cGAS) が新たな候補として同定された<sup>2,3)</sup>。cGAS は細胞質内の外来 DNA を認識後、STING シグナル経路の活性化を経て、IFN さらには ISG15や ISG56などの IFN 誘導遺伝子群 (ISGs) の発現誘導といった自然免疫応答を示す。これら一連のシグナル経路は cGAS-STING シグナル経路と呼ばれるが、HBV 感染の認識に関与しているかどうかは不明だった。本研究では、cGAS-STING シグナル経路が機能するヒト肝細胞株の探索から研究を開始し、最終的に、HBV 感染が cGAS により認識されるという興味深い研究成果が得られたので紹介する。

## 研究成果の内容

### 1. ヒト肝がん細胞株 Li23細胞において、cGAS は Z 型二本鎖 DNA を認識し、cGAS-STING シグナル経路を活性化する

DNA は様々な形状の二重らせん構造をとることが知られている。生体内では、右巻きである B 型構造が最も一般的であるが、左巻きである Z 型構造をとる DNA も一部に存在する。HBV の二本鎖 DNA がどのような二重らせん構造をとるか不明であるため、B 型及び Z 型二本鎖 DNA の両方に自然免疫応答を示すヒト培養肝細胞株の探索から研究を開始した。市販されている人工二本鎖 DNA は B 型二本鎖 DNA 及び Z 型二本鎖 DNA の二種類がある。これらの人工二本鎖 DNA を種々のヒト培養肝細胞内に導入し、ISG56の発現誘導レベルをリアルタイム PCR 法により測定した。その結果、ヒト肝がん細胞株 Li23細胞において、これらの人工二本鎖 DNA の導入は ISG56を発現誘導し、自然免疫応答を示すことがわかった。一方、代表的な肝がん細胞株である HepG2 細胞や HuH-7 細胞では、B 型二本鎖 DNA に対して応答性を示したが、Z 型二

本鎖 DNA には示さなかった。興味深いことに、Z 型二本鎖 DNA に応答性を示す Li23細胞では内在性 cGAS が発現しており、応答性を示さない HepG2 細胞や HuH-7 細胞ではその発現を確認することができなかった。また、cGAS をノックダウンした Li23細胞での Z 型二本鎖 DNA に対する応答性は顕著に減少した。Z 型二本鎖 DNA に対する応答性の減少は STING や IRF-3 のノックダウンでも同様に確認されたことから、Li23細胞において、cGAS は Z 型二本鎖 DNA を認識し、下流の STING シグナル経路を活性化していることが示唆された。

### 2. cGAS は HBV 感染を認識し、cGAS-STING シグナル経路を活性化する

HBV と同様に、ワクシニアウイルス (VACV) や I 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) も DNA ウイルスに属する。最近の研究により、VACV や HSV-1 由来の二本鎖 DNA は cGAS により認識されることが明らかにされている<sup>2,3)</sup>。そこで、ある領域の HBV DNA 配列と同じ配列を持つ二本鎖 DNA を人工的に作成し、cGAS-STING シグナル経路を活性化するかどうか検討した。Li23細胞に、これらの人工二本鎖 DNA を導入したところ、VACV や HSV-1 はもちろんのこと HBV 由来の人工二本鎖 DNA も ISG56を発現誘導した。また、HBV 由来の人工二本鎖 DNA に対する応答性は cGAS あるいは STING のノックダウンにより減少したことから、HBV DNA は cGAS-STING シグナル経路を活性化していることが示唆された。

次に、HepG2.2.15細胞 (HBV の細胞内複製及び感染性ウイルス粒子の産生が報告されている細胞株) を用いて、cGAS が HBV の複製産物を認識しているかどうか検討した。HepG2.2.15細胞は親株である HepG2 細胞と同様に、cGAS を発現していない。そこで、cGAS 及び STING を恒常的に発現する HepG2.2.15 細胞 (HepG2.2.15 cGAS/STING 細胞) を作成し、ISG15や ISG56の発現誘導を調べた。その結果、HepG2.2.15 cGAS/STING 細胞では、ISG15や ISG56が発現誘導されていた。一方、cGAS の活性欠失変異体及び STING を恒常的に発現する HepG2.2.15細胞や cGAS 及び STING を恒常的に発現する HepG2 細胞では、ISG15や ISG56の発現誘導を確認することができなかった。

さらに、cGAS を恒常的に発現する HepG2/NTCP-myc 細胞に HBV を感染させたところ、ISG56の発現誘導が確認された。また、親株である Li23/NTCP-myc

細胞より内在性 cGAS の発現量が高いサブクローン細胞,あるいは低いサブクローン細胞にそれぞれ HBV を感染させたところ,前者では ISG56 の発現誘導の亢進が確認されたが,後者では確認されなかった.これとは逆に,HBV RNA レベルは前者では親株より低くなり,後者では高くなった.これらの結果から,HBV 感染は cGAS により認識され,cGAS-STING シグナル経路を活性化することが示唆された.

### 3. cGAS-STING シグナル経路の活性化は,新たな HBV 粒子の形成を抑制する

上述のように,cGAS-STING シグナル経路の活性化は IFN や抗ウイルス作用を示す ISGs を発現誘導する.そこで,cGAS-STING シグナル経路の活性化が,HBV の生活環にどのような影響を与えるか検討した.HepG2.2.15 cGAS/STING 細胞の HBV RNA レベルを調べたところ,有意に減少していた.一方,細胞内の HBV DNA レベルは変化がなかったにもかかわらず,細胞内の感染性 HBV 粒子量は顕著に減少していた.これらの結果を裏付けるように,細胞外(培地中)の HBV DNA や感染性 HBV 粒子量も同様に減少していた.これらの結果により,cGAS-STING シグナル経路の活性化は HBV 感染細胞内での新たな HBV 粒子の形成を抑制していることが示唆された.

以上の結果から,cGAS は HBV 感染を認識し,cGAS-STING シグナル経路の活性化を経て,新たな HBV 粒子の形成を抑制しているものと考えられる.

## 研究成果の意義

cGAS を起点とする自然免疫系は,2013年に初めて DNA センサーとしての cGAS の機能が報告されたように,新しい研究領域である.その後相次いで,HIV などのレトロウイルス(2013年),アデノウイルス(2014年)や HBV (2016年,本研究成果)といったその他の DNA ウイルスも cGAS により認識されることが報告された.本研究成果は,cGAS による DNA ウイルスの感染認識機構の解明に大きく貢献しているものと思われる.HBV 感染を引き金とする cGAS-STING 経路の活性化が新たな HBV 粒子形成の抑制にも関与することから,cGAS を基盤とする HBV 治療法や治療薬の開発など新たな研究分野の創出にもつながることが期待される.

## 今後の展開や展望

本研究成果により,DNA ウイルスに属する HBV 感染に対する宿主の防御機構の一つとして,cGAS が重要な役割を担っていることを示唆する新たな知見が得られた.近年の自然免疫分野における活発な研究により,RNA ウイルスや DNA ウイルスに対する宿主の防御機構が解明されつつあるが,同時にウイルスはそれを回避する手段を持っていることも明らかにされている.cGAS を起点とする宿主の防御機構もその例外で

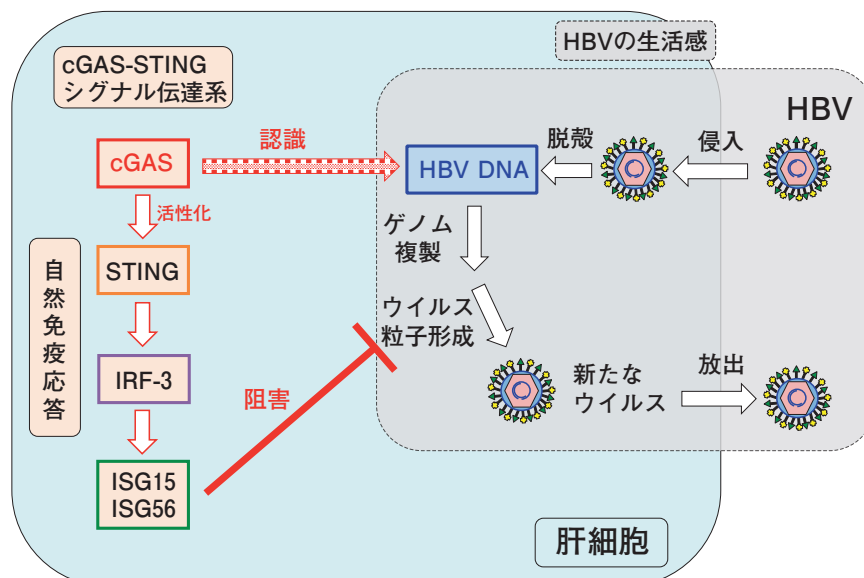


図 cGAS-STING シグナル伝達系による HBV 感染粒子形成の阻害機構

はなく、他のウイルスにおいて cGAS-STING 経路を抑制するウイルス蛋白質の同定が活発に行われている。今後は、cGAS-STING 経路を抑制する HBV 蛋白質の同定を試み、HBV の持続感染機構の解明などウイルス学的に研究を進展させたいと考えている。また、ヒト肝細胞株間で cGAS の発現量に大きな差異があったことから、生体内において cGAS はエピジェネティックな遺伝子発現の制御を受けている可能性がある。このような cGAS の遺伝子発現の制御が慢性肝炎の進展などの B 型肝炎の自然経過に関連しているのかもしれない。宿主内の cGAS の遺伝子発現の制御機構を明らかにすることは、慢性肝炎発症機構や HBV の持続感染機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。このような分子生物学的な研究と同時に、その発現量を人為的に亢進しうる薬剤の探索など医学的な研究もさらに進展させたいと考えている。

## 文 献

- 1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, et al. : The RNA sensor dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* (2013) 42, 123-132.
- 2) Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ : Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* (2013) 339, 786-791.
- 3) Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ : Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* (2013) 339, 826-830.

---

平成28年5月受理  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7390 FAX：086-235-7392  
E-mail：dansako@md.okayama-u.ac.jp