

200728019A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

non-coding RNAを用いた新たな慢性C型肝炎制御による
治療法開発に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 村上善基

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
non-coding RNAを用いた新たな慢性C型肝炎制御による治療法開発に関する研究-----	1
村上善基	
II. 分担研究報告	
1. 網羅的遺伝子発現解析に基づくマイクロRNA標的遺伝子同定法の開発に関する研究	----- 9
井ノ上逸朗	
2. マイクロRNAによる自然免疫機能の修飾とインターフェロン信号伝達機能解析に関する研究	----- 13
下遠野邦忠	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 19

厚生労働省難治性疾患対策研究事業
肝炎等克服緊急対策研究事業に関する調査研究班

non-coding RNA を用いた新たな慢性 C 型肝炎制御による治療法開発

主任研究者 村上善基 京都大学・ゲノム医学センター 産学官連携准教授

研究要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は高率に慢性化し、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。日本人に多い遺伝子型 1b 感染で高ウイルス量による慢性 C 型肝炎はインターフェロン治療効果が低い。我々は塩基配列特異的に遺伝子発現を制御するマイクロ RNA を利用して、HCV ゲノム複製が抑制される事を示した。その結果をもとに (1) ウイルス感染防御、(2) 感染細胞のウイルス遺伝子排除、(3) 肝線維化の抑制の 3 点から包括的、体系的な慢性肝炎新規治療への基盤を構築する。

A. 研究目的

我が国の HCV 感染者は全人口の約 2%と推定されており、HCV は感染すると高率に慢性化しその結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する事が知られている。現在 C 型慢性肝炎治療はペグインターフェロンとリバビリン併用療法が主であるが、奏効率が 50%程度である事、副作用が強く治療中断例が少ない事が問題となっている。さらに本邦における慢性肝疾患の年間死亡者数は約 5 万人に上り感染対策は急務である。このため HCV の感染防止、慢性 C 型肝炎の制御は保険、医療の向上に直結し、医療費の削減をもたらす。しかし現状では満足いく HCV 感染者に対する治療結果が得られていない。この原因としてウイルスの増殖メカニズムが十分に解明されていないことがある。そのた

めに直接ウイルス遺伝子の制御を行なう因子、感染細胞においてウイルス遺伝子を排除する因子、慢性感染が成立した後の肝線維化進展防止因子、肝発癌因子を新規に明らかにし、それぞれの病態における新たな治療方法の確立が必要である。従来はその機能が不明であった non-coding RNA の中で、19-24bp の小分子 RNA で塩基配列特異的に遺伝子の発現を制御するマイクロ RNA と呼ばれる遺伝子集団があり、ウイルス感染、発癌との関連が注目されている。我々はマイクロ RNA 発現を包括的に解析できるマイクロアレイを開発し、C 型肝炎、肝硬変、肝細胞癌、各疾患特異的なマイクロ RNA 発現プロファイルを得る事ができた。これらのデータを基盤として、本研究では HCV 感染制御の研究を 4 つの観点から行なう。(1) 抗ウイ

ルス活性のあるマイクロ RNA を用いた、HCV 増殖制御の分子メカニズムの解析、(2)細胞の持つ抗ウイルス活性のある因子を賦活するマイクロ RNA を用いた、感染細胞におけるウイルス排除のメカニズムの解析、(3)肝発癌の母体となる肝線維化を進行させる分子メカニズムの解析、(4)肝発癌の際にみられるマイクロ RNA 発現異常のメカニズムとターゲット遺伝子の機能解析。これらのアプローチによってウイルス側因子、宿主側因子の全体像が明らかにする事を試みる。従来検討されていなかった各疾患におけるマイクロ RNA 情報基盤を組み合わせる事によって、本研究の今までとはまったく異なったアプローチで HCV ウイルス感染、慢性感染、線維化の進行、発癌の制御、と一連の慢性ウイルス性肝炎の各ステージにおける新規 RNA 創薬研究につながり、社会的貢献度は大きく、研究の意義、必要性は高いと考えられる。

B. 研究方法

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (ウイルス側因子の検討)

塩基配列上 HCV ゲノムをターゲットとするにするマイクロ RNA 2 種を用いて HCV の複製モデルであるレプリコン細胞 2 種、SN1a (遺伝子型 1b)、JFH1 (遺伝子型 2a) を用いた。マイクロ RNA の発現変化は、発現ベクターを用い過剰発現、antisense oligonucleotide (ASO) を用い機能抑制をそれぞれ行った。HCV レプリコン活性は細胞から RNA を抽出し real-time PCR を用いて行った。マイクロ RNA のレプリコンの作用が

直接結合して行われているかにつき、変異体マイクロ RNA を作成し、レプリコン活性を real time PCR で観察した。また PCR にてレプリコンに変異を作成しレポーター遺伝子を結合し、マイクロ RNA の作用をレポーター遺伝子の活性をみる事で行った。マイクロ RNA はターゲット遺伝子の翻訳を抑制する際に RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成する。構成成分の一つの Ago2 を利用した。該当するマイクロ RNA を過剰発現させ、細胞の lysate を ago2 にて免疫沈降し、そこから RNA を抽出した。マイクロ RNA が HCV レプリコンをターゲットとしているのであれば、この lysate から抽出した RNA にはレプリコンの含有量はコントロール群に比較し多く検出されると考えられる。インターフェロン活性は Interferon alpha stimulated response element (ISRE) にレポーター遺伝子を結合してレポーター遺伝子活性を観察する事と、代表的な IFN 関連遺伝子である 2' 5' -OAS、MXA、PKR の発現を定量的 PCR にて確認した。in vivo 実験としてマウス (Jcl, ICR) (4w) 尾静脈よりハイドロダイナミック法とアテロコラーゲンを用いてマイクロ RNA を投与した。ガイドラインにそって得られたマウス肝より RNA を抽出し real time PCR にてマイクロ RNA の発現を解析した。同時に得られたマウス肝に HE 染色を行いマイクロ RNA の発現を変化させた事による形態学的な変化を確認した。

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (宿主側因子の検討)

レプリコン細胞に IFN またはサイクロスポ

リン A(CyA)を3週間投与しそれぞれレプリコンが検出できなくなった細胞(cured細胞)を作成した。薬剤投与を行わず、G418にてレプリコンの維持をしたものと2種の薬剤で作製したそれぞれのcured細胞のマイクロRNA発現プロファイルをマイクロRNAマイクロアレイにて解析した。発現の変化したマイクロRNAについてはそのマイクロRNA自身がレプリコンに対する影響があるか否かを、マイクロRNAの発現を前述の方法で解析をした。また該当するマイクロRNAは塩基配列を利用したターゲット検索アルゴリズムを用いてターゲット候補遺伝子を絞り込み、その中から6種の遺伝子を選んで発現ベクターとsiRNAを作成しこれらの遺伝子がレプリコンに対する影響を検討した。

肝線維化の制御についての検討

IFN投与前の慢性C型肝炎患者より肝生検を行い組織学的に炎症と線維化の程度を評価した。肝組織よりRNAを抽出しマイクロRNAマイクロアレイを用い線維化の程度別のマイクロRNA発現プロファイルを行った。

肝細胞癌にてマイクロRNA発現異常を規定している因子の同定

マイクロアレイ解析により肝細胞癌と非癌部(慢性肝炎、肝硬変)特異的なマイクロRNA発現プロファイルを得た。マイクロRNAのターゲット遺伝子の同定のために、ターゲット検索アルゴリズムを用いた。さらに候補遺伝子を絞り込むために15ペアの癌部と非癌部より抽出したRNAを用いcDNAマイクロアレイ解析を行い、癌部で発現が多くなった遺伝子、減少した遺伝子を分類した。さ

らに肝癌の細胞株(Huh-7)に過剰にマイクロRNA発現を行い、その際に変化したcDNAを解析した。以上の情報を元にマイクロRNAのターゲット遺伝子を数個に絞り込みアポトーシス誘導能をミトコンドリア膜電位をFACSで解析し、細胞増殖能をXTTアッセイにて行った。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成19-21)。[京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成18年、G-188「肝発癌に関与しているmiRNAをコードしている領域のSNP解析」承認]、平成19年、G-219「miRNA発現プロファイルを利用したC型肝炎ウイルス遺伝子型別治療法の新規開発」、組み換えDNA実験計画平成19年、070102「マイクロを用いたHCV複製制御の試み」

肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得る。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報に適正に管理保存する。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」及び「大学等における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に

行われるよう配慮する。当該所属機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後、実施する。

C. 結果

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御（ウイルス側因子の検討）

(1) 塩基配列上 C 型肝炎ウイルス (HCV) をターゲットとする 2 種類のマイクロ RNA を HCV の複製モデルである HCV レプリコン細胞に過剰発現するとレプリコンの活性が低下し、マイクロ RNA の機能を低下させると複製が亢進する事を示した。この現象はマイクロ RNA と HCV レプリコンそれぞれに変異を起こし、お互いに認識できないようにすると、この機能は低下した。マイクロ RNA はターゲット遺伝子の翻訳を抑制する際に RISC と呼ばれる複合体を形成するがこの中に該当するマイクロ RNA を過剰発現させたマイクロ RNA とともにレプリコン遺伝子も有為に検出された。以上の事よりマイクロ RNA はターゲットの HCV レプリコンに直接結合し HCV レプリコンの複製を抑制することをしめた。また代表的な抗ウイルス活性を示す IFN の発現をこれらのマイクロ RNA が誘導しない事を、マイクロ RNA を過剰発現しても ISRE 活性が上昇しない事、また 2' 5' -OAS、MXA、PKR の発現を定量的 PCR にて発現が上昇しないことを確認した。

(2) 我々の研究室で樹立しヒト不死化肝細胞にあらかじめ該当するマイクロ RNA 過剰発現し *in vitro* で HCV を感染させたところ感染性が低下し、あらかじめ ASO で内因性のマイクロ RNA の活性を低下させておく

と HCV の感染性は上昇した。

(3) *in vivo* 実験でマウス肝にハイドロダイナミック法、アテロコラーゲン法とも投与 2 日目にマイクロ RNA の発現が亢進したが、アテロコラーゲン法の方が発現量が多かった。他臓器でのマイクロ RNA の発現は心、脾、精巣でわずかにマイクロ RNA の発現がみられたが、腎、肺では検出できなかった。HE 染色による肝細胞毒性はハイドロダイナミック法で強く、アテロコラーゲン法では軽微であった。

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御（宿主側因子の検討）

cured 細胞を作成した際に 2 種の薬剤を用いて共通に発現の低下した、マイクロ RNA を一つ見いだされた。このマイクロ RNA はターゲット検索アルゴリズム上 HCV そのものをターゲットにしない事を確認した。このマイクロ RNA を ASO を用い機能抑制したところレプリコン活性が低下し、cured 細胞にレプリコンを導入したところこのマイクロ RNA の発現が上昇した。またターゲット候補遺伝子 6 種のうち 3 種は過剰発現するとレプリコン活性は低下し、1 種は siRNA を用いて機能抑制したらレプリコン活性は低下した。

肝線維化の制御についての検討

肝の線維化の比較的軽度な (F1) 17 例と重度な (F3) 11 例を用い、マイクロ RNA 発現プロファイル作成を試みたところ。発現量の差が 2 倍以上で $p < 0.001$ のものが 3 種得られた、このうち線維化が進行した際に発現の亢進したマイクロ RNA は 1 種、線維化の進行とともに発現量の低下したマイクロ RNA

は2種あった。

肝細胞癌にてマイクロ RNA 発現異常を規定している因子の同定

従来の解析にて癌部で発現の亢進しているマイクロ RNA は2種、発現の低下しているマイクロ RNA は5種同定した。この中から癌部で発現の最も亢進しているマイクロ RNA について肝発癌のメカニズム解析のためにターゲット遺伝子の同定を試み、その遺伝子の機能解析を行った。マイクロ RNA のターゲット検索アルゴリズムの miRanda を用いると、ターゲット遺伝子は数百得られた。15ペアの癌部と非癌部組織から得られた RNA を用い cDNA マイクロアレイを用い癌部で発現の多くなかった遺伝子は 2738 得られた。Huh-7 に該当するマイクロ RNA の機能を特異的に阻害するために ASO を導入しそのときに発現の亢進した遺伝子は 7482 得られた。各群で得られた遺伝子はそれぞれマイクロ RNA のターゲット遺伝子の候補であり、このふるい分けで残った遺伝子は 6 個あった。これらの遺伝子について発現ベクターと siRNA をそれぞれ作成し、発現を変化させたときの機能解析を行ったところ、過剰発現させたときに細胞増殖能が低下するものが 2 種、アポトーシス誘導能が亢進する物が 3 種、発現低下した際に、細胞増殖能が上昇するものが 1 種あり、機能解析からもマイクロ RNA の発現パターンに応じて発癌ポテンシャルを有する事がわかった。

マイクロ RNA のターゲット遺伝子同定につき井ノ上班員は肝細胞癌をモデルとして肝癌をモデル疾患とし、機能解析から発癌ポ

テンシャルを有すると考えられたマイクロ RNA について、情報学的解析とマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析の組み合わせから、その標的候補として 6 遺伝子を同定した。この方法を利用した、マイクロ RNA の機能的ターゲットとオフターゲットの同定の解析を行っている。

下遠野班員は研究に必要な資材などを整備し研究環境を整えると同時に、HCV 複製を制御し、あるいは感染の結果生じる細胞増殖変化を規定している細胞側因子を明らかにして、本研究課題による non coding RNA による新たな治療薬の開発に貢献することを目的とした。今年度は、HCV 感染による自然免疫機構の修飾について解析を進め、HCV 蛋白質の NS5A がインターフェロニングナル伝達に重要な働きを示すシグナル蛋白質の機能を抑制することを見いだした。

D. 考察

HCV をターゲットとするマイクロ RNA を過剰発現した際にウイルスの複製を抑制する可能性、新規に HCV が感染する事に対して予防的に作用する事が今回の実験で示された。またマウス肝で該当するマイクロ RNA を有為に発現する事が出来、組織学的にその安全性が確認できた事より、慢性 C 型肝炎治療の臨床応用への道筋の一端になると考えられる。また現在感染予防法のない HCV に対し、感染の危険性のある医療従事者等にあらかじめ投与しておくワクチン類似の薬剤の開発への期待が持てる。慢性 C 型肝炎治療に用いられている薬剤の反応に関与しているマイクロ RNA はそれ自身 HCV をターゲット持たないため、何らかの抗ウイル

ス活性を持つ宿主因子との関連が示唆される。このマイクロ RNA のターゲット遺伝子は HCV レプリコンの活性を制御するため、慢性 C 型肝炎治療に応用できる可能性があると同時に、十分に解明されていないインターフェロンの機能を明らかにできる事も期待される。慢性 C 型肝炎は適切な治療を行われないと、持続炎症の後に肝線維化が進行し慢性肝炎から肝硬変に進行し、肝硬変は高率に肝発癌を起こす。現在のところ肝線維化そのものをターゲットとした治療法はなく、肝硬変に至ってしまった場合、腹部エコー、CT 等による画像診断や、肝癌の腫瘍マーカーなどを用い肝癌を出来るだけ早期に発見する事が主に行われている。今回の解析で肝線維化の程度に応じたマイ

クロ RNA 発現プロファイルが予備実験で得られた事より、これら発現の変化したマイクロ RNA が肝細胞や、肝線維化の中心となっている肝星細胞のどのような影響を示すか、またマイクロ RNA がターゲットとしている遺伝子を同定し、ターゲット遺伝子の機能解析を行う事により、肝線維化をターゲットとした遺伝子治療への応用が期待される。さらに肝癌においても発現の差がみられた、マイクロ RNA のターゲット遺伝子はマイクロ RNA の発現に応じた発癌ポテンシャルを持つ事がわかり、肝発癌解明のメカニズム解析、肝癌をターゲットとした遺伝子療法、の開発の一助となるものと考えられる。

E. 結論

各種の肝疾患においてマイクロRNA発現プロファイルを得る事により、疾患発現メカニズムの解明の一端となる事がわかった。またこの情報を利用して肝疾患の程度に応じた遺伝子治療の開発に期待を持つ事が出来る。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y. Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients. *Journal of Hepatology*. 48: 43-50, 2008
2. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I. Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (*MLL4*) Gene and Rearrangements of *MLL4* in Human

Hepatocellular Carcinoma. Human mutation ePub 2008

3. 村上善基、安田 剛 マイクロアレイを用いた miRNA の大規模発現解析 RNA 実験ノート 羊土社 2008

2) 学会発表

1. Murakami Y, Ali HH, Hijikata M, and Shimotohno K. Novel approach for HCV regulation by using miRNA. JCA 66th Annual meeting, Yokohama October 3-5, 2007

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働省肝炎等克服緊急対策研究事業

non-coding RNA を用いた新たな慢性 C 型肝炎制御による治療法開発

網羅的遺伝子発現解析に基づくマイクロ RNA 標的遺伝子同定法の開発

分担研究者 井ノ上 逸朗 東海大学医学部 基礎医学系 教授

研究要旨

マイクロ RNA とよばれる機能性低分子 non-coding RNA は、塩基配列の相補性に基づき標的 RNA に結合し、その発現量の転写後調節を行う。マイクロ RNA は部分的相補性をもつ複数の標的 RNA を同時に制御することが可能であり、この特性は、高変異率のウイルスや表現型が多様な癌などを標的とした新規治療法の開発に役立つものであると考えられる。本年度は、マイクロ RNA により mRNA レベルで発現制御され得る遺伝子を網羅的に同定するための手法を開発することを目的とした。肝癌をモデル疾患とし、機能解析から発癌ポテンシャルを有すると考えられたマイクロ RNA について、情報学的解析とマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析の組み合わせから、その標的候補として 6 遺伝子を同定した。そのうちの 3 遺伝子は、マイクロ RNA 自身の効果とは反対に、癌抑制ポテンシャルを有することが明らかになった。従って、本研究で開発した方法は、マイクロ RNA の機能的ターゲット（あるいはオフターゲット）候補を同定するために有効であると考えられる。来年度以降、抗 C 型肝炎ウイルス活性を示すマイクロ RNA の宿主側標的遺伝子などの検索に応用し、新たな C 型肝炎制御法開発につながる成果を得ることを目指す。

A. 研究目的

マイクロ RNA とよばれる機能性低分子 non-coding RNA は、塩基配列の相補性に基づき標的 RNA に結合し、その発現量の転写後調節を行う。この標的への結合には塩基配列の完全相補性は必要なく、したがって、マイクロ RNA は部分的相補性をもつ複数の標的 RNA に対して同時干渉することが

可能である。本研究では、肝癌をモデル疾患とし、マイクロ RNA により mRNA レベルで発現制御され得る遺伝子を網羅的に同定するための手法を開発することを目的とする。開発した標的遺伝子候補同定法は、抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)活性を示すマイクロ RNA により制御され得る遺伝子の検索に応用し、抗 HCV 薬としての有効性（機

能的ターゲット) および安全性 (機能的オフターゲット) の評価につなげる。

B. 研究方法

B-1. マイクロ RNA 標的遺伝子候補同定法の開発

肝癌関連マイクロ RNA (Murakami et al., *Oncogene* 25, 2537-2545, 2006) の標的遺伝子候補網羅的同定のために、マイクロアレイ (Agilent Human 1Av2 Oligo microarray) を用いて遺伝子転写物量解析を行った。肝癌およびその周辺非癌部組織 (15 ペア) からの RNA を用いて、発癌に伴う遺伝子発現変化を分析した。ヒト肝癌細胞株である Huh7 細胞に肝癌関連マイクロ RNA あるいはマイクロ RNA アンチセンスオリゴを強制発現させ、発現細胞由来 RNA を用いて、マイクロ RNA と発現逆相関する遺伝子を分析した。マイクロアレイデータからの対象遺伝子の抽出には、GeneSpring GX ソフトウェア (Agilent) を用いた。加えて、miRanda (John et al., *PLoS Biol* 2, e363, 2004) ソフトウェアを用いて、進化的視点を加味した情報学的手法によるマイクロ RNA 標的遺伝子も抽出し、遺伝子の絞り込みに供した。

B-2. 抗HCV活性を有するマイクロ RNA の宿主側ターゲット遺伝子の探索

HCV ゲノムに相補結合領域をもつ 2 種類のマイクロ RNA が、それぞれ単独で HCV レプリコン複製および HCV 感染を抑制することを、主任研究者を中心とした研究グループが見いだした。それらのマイクロ RNA により制御され得る宿主側遺伝子の

検索のために、HCV レプリコン SN1a 株感染 Huh7 細胞およびヒト不活化肝細胞 HuSE2 に各マイクロ RNA を強制発現し、発現 4 日後の細胞由来 RNA を用いたマイクロアレイ解析から、マイクロ RNA ごとに、両細胞系で共通して発現変化する遺伝子を分析した。

(倫理面への配慮)

京都大学倫理審査委員会にて患者肝臓組織の採取および組織 RNA を用いた研究について承認を得ている。個人情報管理者による適切な情報管理のもと研究を遂行しており、研究実施施設 (東海大学医学部) には個人情報は一切存在しない。

C. 結果および考察

C-1. マイクロ RNA 標的遺伝子候補同定法の開発

本年度は、肝癌関連マイクロ RNA として報告されている 6 種のマイクロ RNA のうち (Murakami et al. 2006)、癌部で発現レベルが高く、機能解析から「発癌」ポテンシャルを有すると考えられた 1 種に焦点を絞り、同定法の開発を進めた。

上記肝発癌関連マイクロ RNA の標的遺伝子候補が満たすべき条件として、以下の 3 項目を設定した: (i) 生物種間で配列保存性が高い 3' 非翻訳領域にマイクロ RNA ターゲット部位をもち、(ii) 癌部での発現レベルが、周辺非癌部よりも有意に低く、(iii) マイクロ RNA アンチセンスオリゴ処置 Huh7 細胞での発現レベルが、対照細胞のそれよりも高い。その結果、6 遺伝子がこの 3 条

件すべてを満たし、肝発癌関連マイクロ RNA の標的候補と考えられた。この 6 遺伝子のうち、肝臓での発現レベルが高い 3 遺伝子について機能解析を進めたところ、細胞増殖およびアポトーシスという観点からみて、いずれの遺伝子も「癌抑制」ポテンシャルを有すると考えられた。

以上のことから、本手法により見いだされた標的遺伝子候補は、その 3'非翻訳領域にマイクロ RNA 結合サイトを有し、mRNA 発現レベルがマイクロ RNA のそれと逆相関するのみならず、機能的にもマイクロ RNA と正反対の効果を有することが明らかになった。従って、本研究で開発した方法は、マイクロ RNA の機能的ターゲット（あるいはオフターゲット）候補を同定するために有効であると考えられる。

C-2. 抗HCV活性を有するマイクロ RNA の宿主側ターゲット遺伝子の探索

HCV に直接的に働きかけ複製抑制作用を発現すると考えられた 2 種類のマイクロ RNA につき、本年度は、それらにより発現制御され得る宿主側遺伝子を予備的に検索した。

2 種のマイクロ RNA を異なる 2 つの細胞 (SN1a, HuSE2) に強制発現させたところ、それぞれ 10 および 99 遺伝子の発現レベルが、対照のそれと比較して、両細胞のいずれにおいても 2 倍以上低下、あるいは上昇した。これらの中に、抗 HCV 活性を有する既知遺伝子や、インターフェロン経路に関わる遺伝子は含まれず、両マイクロ RNA の

抗 HCV 活性は、宿主遺伝子を介した間接的なものではなく、HCV ゲノムとの直接的な相互作用を介したものである可能性が高いと考えられた。一方、これら発現変化遺伝子の機能的オフターゲットとしての可能性については、マウスを用いた *in vivo* 実験において、各マイクロ RNA を強制発現させた肝臓組織での遺伝子発現変化パターン of 分析結果 (H20 年度実施予定) を加味して、見極める計画としている。

D. 結論

肝臓をモデル疾患として、研究対象とするマイクロ RNA の標的遺伝子候補を網羅的に同定するための手法を開発した。

E. 健康危険情報

特記事項なし。

F. 研究発表

- 1) 論文発表
4. Uno Y, Suzuki Y, Wakaguri H, Sakamoto Y, Sano H, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Inoue I. Analysis of expressed sequence tags from liver in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A systematic identification of drug-metabolizing enzyme genes. *FEBS Lett* 582, 351-358, 2008.
5. Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K,

- Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics* 9, 90, 2008.
- 2) 学会発表
なし。
6. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, Inoue I. Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia (*MLL4*) gene and rearrangements of *MLL4* in human hepatocellular carcinoma cells. *Hum Mutat* in press.
- G. 知的財産権の出願、登録状況
- 1.特許取得
なし。
- 2.実用新案登録
なし。
- 3.その他
なし。
7. 田嶋敦、井ノ上逸朗：網羅的 SNP 解析による疾患感受性遺伝子の同定。「分子消化器病」, 先端医学社, 4(3): 24-28, 2007.

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

マイクロ RNA による自然免疫機能の修飾とインターフェロン信号伝達機能解析
分担研究者 下遠野 邦忠 慶應義塾大学 医学部 総合医科学研究センター

研究要旨 本研究では、HCV 複製および HCV 感染により変化する non-coding RNA を明らかにし、その機能を解明すること、および明らかにされた RNA を標的にした抗 HCV および HCV 関連の疾患の治療あるいは予防に向けた研究を行うことを目標にした。そのため、研究に必要な資材などを整備し研究環境を整えると同時に、HCV 複製を制御し、あるいは感染の結果生じる細胞増殖変化を規定している細胞側因子を明らかにして、本研究課題による non coding RNA による新たな治療薬の開発に貢献することを目的とした。今年度は、HCV 感染による自然免疫機構の修飾について解析を進め、HCV 蛋白質の NS5A がインターフェロンシグナル伝達に重要な働きを示すシグナル蛋白質の機能を抑制することを見いだした。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝炎発症、および肝がん発症の危険因子である。HCV 感染によるこれらの疾患を予防するにはウイルス複製を効率よく阻害する薬剤の開発が急務である。そのためには、HCV 複製機構を理解して、その基本的なメカニズムを標的にした抗ウイルス剤の開発が必要である。

HCV 複製において細胞側因子がどのように関わっているかを明らかにできれば、その因子の機能を明らかにして、複製の機構を解明出来る。また、それらの因子の働きからウイルス複製による肝疾患の機構を解明出来ると期待される。そこで、HCV 複製および HCV 感染により変化する non-coding RNA を明らかにし、その機能を解明すること、および明らかにされた RNA を標的にした抗 HCV お

よび HCV 関連の疾患の治療あるいは予防に向けた研究を行うことを具体的な目標にした。一方、研究に必要な資材などを整備し研究環境を整えると同時に、HCV 複製を制御し、あるいは感染の結果生じる細胞増殖変化を規定している細胞側因子を明らかにして、本研究課題による non coding RNA による新たな治療薬の開発に貢献することを目的とした。

B. 研究方法

(1) HCV 感染増殖を評価する培養細胞系の開発。

HCV の感染を簡便に定量的に評価する系の開発は、本研究課題を円滑に進める上で必須である。現在の所、限られた培養細胞と限られた HCV ゲノムの分子クローンにおいてのみで感染実験およびその評価が行えない。そこで、異なる細胞に対しても HCV 感染が試験管内で観察され評価出来る系の開発が望まれる。

分担者はそのような目的のためにすでに開発していたヒト肝臓由来の培養細胞を改良して、ウイルスの感染性を高め、定量実験をしやすくする試みを行った。そのために、本細胞 (HuS) を三次元培養系に移して、その状態における HCV 感染性と感染の持続性を評価した。

(2) HCV の持続感染を規定している細胞側要因の探索とその機能解析

HCV 感染が慢性化することが、その後の肝疾患を悪性化する最も重要な要因のひとつになっている。これまでに持続感染者にインターフェロンとリバビリン療法を行うと、約半数からウイルスを排除することができる。このことは、自然免疫機能を惹起させ、感染による内在性のインターフェロン産生を高めることができれば、HCV 感染の持続性を予防することができるかと期待される。一方、HCV 感染により、内在的なインターフェロン産生機構が抑制されている可能性が考えられるために、その原因を明らかにする。すなわち、HCV 蛋白質によるインターフェロンシグナル抑制の分子機構を明らかにするために、インターフェロンシグナル経路に関与する細胞側因子の機能変化を HCV ゲノムが自立的に複製している細胞を用いて解析する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まないので、倫理への配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

(1) HCV 感染増殖を評価する培養細胞系の開発。

すでにヒト肝細胞を不死化して培養細胞を得た。この細胞においては、自然免疫の中でも特にインターフェロン産生を抑制する

細胞側因子を導入することにより、HCV 複製が増加することを見いだした。このことは樹立した細胞自身、インターフェロンシグナル系が正常に動いていることを示唆する。

本細胞の中で HCV 複製がさらに高まる様にするために、細胞の立体培養を試みた。東洋紡株式会社が、中空系に細胞を入れて培養することに成功しているので、その系を本細胞に導入した。HuS 細胞を中空系内で培養しても、死なずに培養維持されることを確かめた。その細胞に HCV を感染させ、経時的にウイルス量を測定すると、普通の平面培養時に比べウイルスの複製時間が 5 倍以上に延びることが分かった。したがってこの培養系を用いることにより、HCV 感染初期、中期および後期における細胞内の non coding RNA を解析することが可能になった。

(2) HCV の持続感染を規定している細胞側要因の探索とその機能解析

HCV 複製がインターフェロンに感受性であること、これまでの報告から HCV 感染がインターフェロン経路を抑制することが報告されているので、本研究では、HCV がインターフェロンシグナルに積極的に関与する分子を明らかにする試みをした。

まず、HCV ゲノムが自立的に複製する細胞を、低濃度のインターフェロン (10 IU/ml) で処理した。それらの細胞を HCV ゲノム複製が高い細胞を選択する遺伝子 (neo) の発現を指標にしてインターフェロン添加によっても HCV ゲノムが自立的に複製を続ける細胞を選択した。

約 1 ヶ月の培養後に薬剤抵抗性を示す細胞クローンを単離し、それらの細胞に対してさらに高濃度のインターフェロン処理を行っ

た。それでも生育してくる細胞をコロニーとして単離し、その細胞においても HCV が複製出来る理由を調べた。その結果、HCV の NS5A 蛋白質に変異が入っており、その様な HCV ゲノムではインターフェロンに対して抵抗性を示すようになると考えられた。そこで、変異した HCV ゲノムを細胞から単離して、新たな細胞に導入したときのインターフェロン抵抗性を調べた。その結果、変異した HCV を導入した細胞においてもインターフェロン抵抗性が見られた。HCV NS5A 内にあったために、NS5A の変異がインターフェロン抵抗性を示すことが分かった。

さらに、インターフェロン抵抗性の機構を調べるために、インターフェロンシグナルに関係する因子の中で、STAT1 に注目して、そのリン酸化状態を調べた。その結果インターフェロン抵抗性を示した変異 HCV レプリコン細胞においては、STAT1 のリン酸化が著しく阻害されている事が分かった。

D. 考察

近年、microRNA がインターフェロンシグナルの調節に関与していることが報告されているが、そのような成果を検証するには、種々の細胞を用いて種々の HCV 感染実験をすることにより可能になる。しかし現状では限られた細胞と、限られた HCV ゲノムを用いた実験系しか動いていないので、正確な評価が難しい。この点を克服するために、新たな培養細胞を樹立した。この細胞は他の細胞に比べて HCV 感染・複製効率が低い。さらに、インターフェロンシグナル系は正常に反応している。本細胞を異なる培養条件下に置き、HCV 感染・複製がさらに高くなる環境を構築するのに成功した。この系を用いることによ

り、別の実験で見いだした non coding RNA の機能を検証可能になり、治療剤としての開発にも有効な手段になると期待される。

一方、持続感染を阻止するための方策として、HCV は STAT1 の機能を阻害していることが明らかになった。この阻害が果たして他の培養細胞を用いた感染・複製系においても観察されるか否かについては、本研究で樹立した培養細胞系が有用である。さらには、STAT1 の発現を制御している non coding RNA の探索にも道を開くと期待される。

E. 結論

HCV の複製および感染細胞の増殖を制御する non coding RNA の解析を容易にし、かつ、検証実験をする系として新たな培養細胞の樹立と培養方法の確立は、今後 HCV 複製を制御する non coding RNA の研究および HCV により変化する細胞側要因の解析に有用である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol. 9(9):1089-9710, 2007
2. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K., Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. J Biol Chem. 282 (45) 32765-32772, 2007
3. Watashi K, Shimotohno K., Chemical genetics approach to hepatitis C virus

- replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. Rev Med Virol. 17: 245-252, 2007
4. El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K., . In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. Microbiol Immunol. 2007;51(1):127-133, 2007
5. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K., Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. J Hepatol. 46(1):26-36, 2007.
6. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K., Helper

virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome.

Biochem Biophys Res Commun. 352(1):170-176, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明の名称「肝炎ウイルスの増殖法、および肝炎ウイルス感染細胞を培養するための中空糸並びにその利用」

発明者：下遠野 邦忠、土方 誠、山口達哉

国際出願番号：PCT/JP2007/068611

出願日：2007年9月26日

別紙2

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
村上善基、 安田 剛	マイクロアレイを用いた miRNA の大規模発現解析	稲田利文、 塩見春彦	RNA 実験ノート	羊土社	東京	2008	71-76
田嶋敦、井 ノ上逸朗	網羅的 SNP 解析による疾患 感受性遺伝子の同定		分子消化器病	先端医学社	東京	2008	24-28

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y.	Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients.	<i>J hepatology</i>	48	43-50	2008
Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I..	Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (<i>MLL4</i>) Gene and Rearrangements of <i>MLL4</i> in Human Hepatocellular Carcinoma.	<i>Human mutation</i>		ePub	2008
Uno Y, Suzuki Y, Wakaguri H, Sakamoto Y, Sano H, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Inoue I.	Expressed sequence tags from cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) liver: A systematic identification of drug-metabolizing enzymes.	<i>FEBS Lett</i>	582	351-358	2008

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I.	Large-scale analysis of <i>Macaca fascicularis</i> transcripts and inference of genetic divergence between <i>M. fascicularis</i> and <i>M. mulatta</i> .	<i>BMC Genomics</i>	9	90	2008
Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K	The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production	Nat Cell Biol	9 17	1089-9710 245-250	2007 2007
Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K.	Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B	J. Biol. Chem.	282	32765-32772	2007
Watashi K, Shimotohno K.	Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy	Rev Med Virol.	17	245-252	2007
Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K	Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes	J Hepatol	46	26-36	2008
Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K.	Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome	Biochem Biophys Res Commun.	352	170-176	2007
El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K.	In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin	Microbiol Immunol	51	127-133	2007

Impact of hepatitis B virus (HBV) X gene integration in liver tissue on hepatocellular carcinoma development in serologically HBV-negative chronic hepatitis C patients[☆]

Hidenori Toyoda¹, Takashi Kumada¹, Yuji Kaneoka², Yoshiki Murakami^{3,*},†

¹Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, 4-86 Minaminokawa, Ogaki, Gifu 503-8502, Japan

²Department of Surgery, Ogaki Municipal Hospital, 4-86 Minaminokawa, Ogaki, Gifu 503-8502, Japan

³Laboratory of Human Tumor Virus, Institute for Viral Research, Kyoto University, Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Background/Aims: We analyzed hepatitis B virus (HBV) X gene integration in hepatocytes of HBV-negative, chronic hepatitis C (CH-C) patients with mild fibrosis, and prospectively followed these patients for the development of hepatocellular carcinoma (HCC).

Methods: The study included 39 HBV-negative CH-C patients with mild fibrosis. HBV-X integration was determined by Alu-PCR analysis of liver specimens obtained by fine-needle biopsy.

Results: Integration of HBV-X gene sequence into liver genome occurred in 9 of the 39 patients. Six of the 39 patients developed HCC during the 12-year follow-up period. No significant difference was found in the incidence of HCC between patients with and without HBV-X integration. However, the two patients with HBV-X integration who developed HCC did not have cirrhosis at the time when HCC was diagnosed, whereas the four patients without HBV-X integration who developed HCC did have cirrhosis.

Conclusions: Our findings suggest that HBV-X integration detected at the mild fibrosis stage might not indicate a high risk for HCC. HBV-X integration may be associated with HCC development in the absence of cirrhosis. However, we did not find evidence that HBV-X integration directly plays a role in hepatocarcinogenesis in CH-C patients. Further studies will be needed to clarify this point.

© 2007 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HBV-X integration; Chronic hepatitis C; Hepatocellular carcinoma

Received 28 March 2007; received in revised form 5 August 2007; accepted 8 August 2007; available online 24 October 2007

Associate Editor: K. Koike

* The authors declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

† Corresponding author. Tel.: +81 75 751 4034; fax: +81 75 751 3998.

E-mail addresses: ymurakam@virus.kyoto-u.ac.jp, ymurakami@genome.med.kyoto-u.ac.jp (Y. Murakami).

† Present address: Unit of Human Disease Genomics, Center for Genomic Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshida-Konoe cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. Tel.: +81 75 753 9313; fax: +81 75 753 9314.

1. Introduction

Chronic viral hepatitis is a leading cause of hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide [1–4]. Occult hepatitis B virus (HBV) infection, characterized by the absence of circulating HBV surface antigen [HBsAg] but presence of the HBV genome in serum or liver tissue, has been identified in hepatitis C virus (HCV)-infected patients. HBV may affect the clinical course of chronic hepatitis C (CH-C) [5] and increase the risk of hepatocarcinogenesis [6]. Pollicino reported that both integrated and free HBV-DNA sequences were highly prevalent in the liver tissue of CH-C patients with HCC compared to CH-C patients without HCC [7].