

20083/01/A

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 20 年度 総括研究報告書

主任研究者 村上善基
平成 20 (2009) 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—2
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——8
井ノ上逸朗
2. HCV 感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御———12
下遠野邦忠

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・印刷物

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。(1) HCV ゲノム複製を抑制するマイクロ RNA を利用して、慢性 C 型肝炎の制御、(2) ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療効果別と肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、患者個人の遺伝子情報に応じたテーラーメイド治療の確立、(3) 肝発癌と、肝癌悪性度に関連したマイクロ RNA の発現プロファイルを用いた肝癌の制御を目指し、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年余をへて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く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のいく 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。そのため慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌においてそれぞれ疾患の進展を規定する宿主、ウイルス側因子を明らかにし、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。マイクロ RNA の発現異常と疾患について様々な報告があり、とくにウイルス感染、発癌との関連が注目されている。我々はマイクロ RNA チップを利用し、C 型慢性肝炎、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 を用いた新たな慢性 C 型肝炎治療を目指した in vivo 実験の確立、(2) インターフェロン、サイクロ

スポリンを HCV レプリコン細胞に用いた時に見られるマイクロ RNA の発現変化を利用した、抗ウイルス活性をもつ新規宿主因子の同定、(3)慢性 C 型肝炎の抗ウイルス治療効果別のマイクロ RNA 発現プロファイルの作成、と肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを利用した、新規バイオマーカの作成と患者の状態に応じたテーラーメイド医療の確立、(4)肝発癌の際にみられるマイクロ RNA 発現異常と肝線維化別のマイクロ RNA 発現プロファイルを用いた、慢性肝炎からの肝発癌制御を試み、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病態解析を行ない、この結果を用いて新規 RNA 創薬研究に結びつけることを目標とする。このことは依然肝細胞癌での死亡者数が本邦では第 5 位を占めることより、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用いるマイクロ RNA 1 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) を用いて、マイクロ RNA の過剰発現は HCV レプリコンの複製を抑制することを示した。またこの

ときレプリコン細胞にマイクロ RNA を発現させた時に発現か変化する遺伝子をマイクロアレイにて解析し、意図しない遺伝子への影響 (オフターゲット) を解析した。

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)

レプリコン細胞に抗ウイルス剤 (インターフェロン (IFN) またはサイクロスポリン A (CyA)) を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。この際に共通してレプリコンが検出できなくなった時に発現の変化したマイクロ RNA を 1 種同定し、そのターゲット候補遺伝子を得た。ターゲット候補遺伝子がレプリコンに与える影響過剰発現、発現抑制実験を行ない、real-time PCR にてレプリコン RNA の発現を観察した。またペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織 99 例よりからマイクロ RNA 発現プロファイルを治療効果別に作成した。同じサンプルを用いインターフェロン関連遺伝子約 180 の解析をマイクロアレイにて行ない解析した。

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 106 例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。また組織学的悪性度別にマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。

さらに末梢血に循環しているマイクロ RNA の発現をマイクロアレイ解析にて行なった。

(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を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 が直接 HCV レプリコンに作用することによって起こるか否かを示すために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。またマイクロ RNA が機能を発揮する際に RISC complex を形成するがこの構成成分の一つである argonaute2 にて免疫沈降して該当するマイクロ RNA を過剰発現した時に HCV レプリコン RNA が集積すること、に依って示した。

マイクロ RNA は塩基配列上非常に多くのターゲット遺伝子をもつ可能性があり、このため意図しない表現系の変化がある可能性がある (オフターゲット効果)、このことを検証するために、レプリコン細胞の SN1a とヒト肝細胞を不死化した HuS-E2 細胞を用い HCV レプリコンの機能を抑制するマイクロ RNA を過剰発現した時にみられる遺伝子変化をマイクロアレイにて解析した。発現変化のみられた遺伝子は塩基配列上該当するマイクロ RNA のターゲットではなかった、HCV に関連した報告のある遺伝子は 3 種同定できたが、マイクロ RNA の発現パターンと

これらの遺伝子発現パターンが異なっているために、直接HCVレプリコンに影響しているとは考えにくかった。またマイクロRNA過剰発現で発現の変化している遺伝子は現在知られている範囲では細胞毒性、別のウイルス活性を有しているとの報告はない。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の一つ見いだされた。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の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15種のうち1はマイクロRNAの発現パターンと一致した。

マイクロアレイ解析によりペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果別のsustained virological responder (SVR)、relapse (R)、non-virological responder (NR)のマイクロRNA発現プロファイルを作成し、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果予測を試みた所SVRとNRの分別は76.1%、SVRとTRは56.6%、TRとNRは71.1%であった。validation setを用いた所SVRとNRの分別は63.0%であった。この際に必要なプローブ数は14であった。肝線維化の低いものと、そうでないものに分けてSVRとNRを分別したところその正確性は差がみられなかった。SVR、TR、NRになるにつれ発現が有意に上昇しているマイクロ

RNAが20種、低下しているものが8種あった。

肝線維化の制御についての検討

抗ウイルス療法を行っていない慢性C型肝炎患者106名より肝の線維化の軽度なものを順にF0:7例、F1:56例、F2:24例、F3:17例を解析しそれぞれにマイクロRNA発現プロファイルを作成した。これを用いて二群間分別を行なった所F0/F1 84.3%、F1/F2 82.7%、F2/F3 87.8%の確率で分別できた。また線維化の程度が進行するにつれて発現の亢進しているマイクロRNAは22種、低下しているマイクロRNAは16種であった。

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

肝細胞癌を外科的に切除する際に、治療全と治療一ヶ月後の血清を利用し、末梢血に存在しているマイクロRNAの発現解析をマイクロアレイ解析にて行なった。2種のマイクロRNAの比(miR-A/miR-B)は術後に有意に低下していることが分かった。またこのマイクロRNAは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種とは異なっており、末梢血に循環しているマイクロRNAは腫瘍が崩壊する時に血中に放出されているのではなく、何らかの意義があるものではないかと推定している。

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昨年度開発したマイクロRNA標的候補遺伝子同定法を用いて、HCVレプリコン量関連マイクロRNAの標的候補遺伝子(1種)を見いだした。この候補遺伝子とHCVとの相互作用は既に報告されてお

り、次年度は本遺伝子による抗 HCV 活性などを検討し、マイクロ RNA の発現制御を介した新たな C 型肝炎制御法の開発可能性を見極める。

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。HCV 感染により宿主細胞の細胞質に脂肪滴が高頻度にみられるがこの脂肪滴が感染性粒子を形成しウイルス複製に重要であることを示した、また脂肪輸送に関連している酵素 MTP の HCV 感染下でのメカニズム解析を行ない、感染性の付与には、VLDL、アポリポタンパクなどがウイルス粒子の構築ばかりではなく、感染性粒子の産生にも深く関与していることが示唆された。

D. 考察

in vitro 実験で HCV の複製を制御するマイクロ RNA を同定し、in vivo の予備実験を行ない、マイクロ RNA を用いた HCV 制御の遺伝子治療開発への布石を作った。インターフェロン治療とサイクロスポリン治療に共通して発現が変化したマイクロ RNA を同定し、宿主の抗ウイルス機能を解析する予備データが得た。インターフェロン効果予測のためのマイクロ RNA プロファイル解析は SVR と NR にて高い正確性をもった分別ができるため、治療効果予測アルゴリズムの作成を試みる。またターゲット遺伝子を同

定し、宿主因子の同定、インターフェロン関連遺伝子マイクロアレイ結果を合わせて、インターフェロン治療の際に起こる宿主遺伝子の情報を利用して、患者個別の臨床情報に基づいたテーラーメイド医療の開発を試みる。線維化別に慢性肝炎のマイクロ RNA 発現プロファイルを構築した事により、肝線維化進行のメカニズム解析の有用な情報となった。また肝線維化の評価を専門の病理診断に頼っている所が大きいが、今回 F0, 1, 2, 3 のそれぞれ二群間分別で高い正確性をもった分別ができることを示したため、客観的に診断できる新たな線維化マーカーの実現への布石を示した。興味のあることにインターフェロンの反応性が悪い症例で発現亢進しているマイクロ RNA と線維化の亢進している時に発現の亢進しているマイクロ RNA が共通しているもの存在し、逆にインターフェロン反応性のよい時に発現の亢進しているマイクロ RNA と線維化の程度が軽度である時に発現の亢進しているマイクロ RNA が存在しており、マイクロ RNA の発現異常は肝疾患の増悪と密接に関係していることが示唆された。マイクロ RNA の発現プロファイルを用いることにより、診断、治療への新たなアプローチができる可能性を示した、またこの手法は他の薬剤効果予測に対しても応用する事が期待され、治療のシミュレーションとして利用できる。包括的に肝疾患の進展メカニズムを理解することにより国民の衛生、保険、医療の向上や、医療費削減に有用である。

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。この情報を利用して患者ごとの肝疾患の程度に応じたテーラーメイド治療を行なう可能性と、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. *Hum Mutat*. 2008;29:703-8

3. Murakami Y, Ali HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Novel approach for HCV regulation by miR-199a*. *Journal of Hepatology*. 50: 453-460, 2009

2) 学会発表

1. Murakami Y, Okanoue T and Shimotohno K. Aberrant expression of miR-224 has a potential for hepatocarcinogenesis. *JCA* 67th Annual meeting, Nagoya October 3-5, 2008

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。一方、マイクロ RNA がどの遺伝子を標的とするかについての知見は十分ではなく、昨年度は、マイクロ RNA により mRNA レベルで発現制御され得る遺伝子の網羅的同定法開発に取り組んだ。本年度は、その手法の改良を行うとともに、本手法を C 型肝炎ウイルス (HCV) の細胞内発現量と発現関連するマイクロ RNA により制御され得る標的遺伝子候補の検索・同定に応用した。結果、HCV リプリコン量関連マイクロ RNA の標的候補として、1 遺伝子を同定した。この標的遺伝子の翻訳産物は HCV と相互作用することが知られており、次年度は、この遺伝子による抗 HCV 活性などを検討し、マイクロ RNA の発現制御を介した新たな C 型肝炎制御法の開発可能性を見極める

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。昨年度、肝癌をモデル疾患として、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。本年度は、その応用として、C 型肝炎ウイルス(HCV)の細胞内発現量と高度に発現関連するマイクロ RNA (1 種) により制御され得る標的遺伝子候補を検索・同定し、そのマイクロ RNA による HCV 量

制御の可能性を考察する。また、開発した手法から見いだされる標的遺伝子候補には偽陽性が少なからず含まれることから、その改良にも取り組み、効率的な研究推進につなげる。

B. 研究方法

B-1. HCV リプリコン量関連マイクロ RNA 標的遺伝子候補の同定

昨年度、主任研究者 (村上) により同定された HCV リプリコン量関連マイクロ RNA (1 種) の標的遺伝子候補を見いだす

ために、マイクロアレイ(Agilent Whole Human Genome Microarray [4×44K])を用いた遺伝子転写物量解析を行った。HCV リブリコン SN1a 株感染 Huh7 細胞において、インターフェロン、あるいはサイクロスポリン処置3週間後の遺伝子発現量を、実験対照(G418処理)におけるそれと比較分析した。また、対象マイクロ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た感染 Huh7 細胞において、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)および PicTar(Krek et al., *Nat Genet* 37, 495-500, 2005)アルゴリズムを用い、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. マイクロRNA 標的候補遺伝子同定法の改良

網羅的遺伝子発現解析に基づく遺伝子同定法では、マイクロRNA による直接的な制御を受けている遺伝子以外にも、間接的な発現変化遺伝子(疑陽性遺伝子)も候補に含まれ、このことが効率的な研究推進の妨げとなることが考えられる。疑陽性率の低減を目的として、RNA-induced silencing complex(RISC)の主要コンポーネントである Argonaute2(AGO2)タンパク質に対する抗AGO2モノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により、研究対象とするマイクロ

RNA を強制発現させた細胞の溶解液からマイクロRNA-AGO2複合体を回収し、その画分に含まれるmRNAの発現プロファイリングを行った。発現解析には、Agilent Whole Human Genome Microarray [4×44K]を用いた。

C. 結果および考察

C-1. HCV リブリコン量関連マイクロRNA 標的遺伝子候補の同定

抗ウイルス作用を有するインターフェロン、サイクロスポリン処置により、細胞内HCV消失に伴い、発現低下するマイクロRNA(1種)により発現制御されている可能性を有する宿主側標的遺伝子の同定を試みた。

上記HCVリブリコン量関連マイクロRNAの標的候補遺伝子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(miRanda, PicTar 推定)、(ii)インターフェロン、サイクロスポリン処置 Huh7 細胞での発現レベルが、対照細胞のそれよりも高く、(iii)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た感染 Huh7 細胞における発現レベルが、対象マイクロRNAのそれと逆相関する。結果、1遺伝子がこの3条件すべてを満たし、HCVリブリコン量関連マイクロRNAの標的候補と考えられた。

ここで見いだされた遺伝子の翻訳産物は、HCVとの直接的な相互作用を有することが報告されており、対象マイクロRNAを介

した HCV 量制御の可能性を提示することができた。マイクロ RNA 自身、および同定された遺伝子の機能解析 (H21 年度実施予定) から、標的遺伝子の抗 HCV 活性などを見極める計画である。

C-2. マイクロ RNA 標的候補遺伝子同定法の改良

マイクロ RNA 強制発現細胞溶解液より、2 種類の精製条件でマイクロ RNA-AGO2 複合体を回収し、この画分に含まれる RNA に関するプロファイリングを行った。

通常の前製条件では、複合体画分から抽出した total RNA には rRNA (18S, 28S) は含まれず、目的とするマイクロ RNA-AGO2 複合体を特異的に取得することができたと考えられた。しかしながら、この画分中の mRNA 量は微量であり、マイクロアレイによる網羅的発現解析には十分ではないことが明らかになった。

一方、rRNA (18S, 28S) が少量残存する程度の精製条件で取得した複合体画分には、mRNA も網羅的発現解析に十分量含まれた。この画分 RNA を用いて、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイリングを行ったところ、標的候補遺伝子が複合体画分に濃縮存在することを示唆する知見は得られなかった。

標的候補遺伝子が複合体画分に濃縮存在する免疫沈降・精製条件を見いだした上で (H21 年度実施予定)、同定法の改良を進める。

D. 結論

昨年度開発したマイクロ RNA 標的候補遺伝子同定法を用いて、HCV リプリコン量関連マイクロ RNA の標的候補遺伝子 (1 種) を見いだした。この候補遺伝子と HCV との相互作用は既に報告されており、次年度は本遺伝子による抗 HCV 活性などを検討し、マイクロ RNA の発現制御を介した新たな C 型肝炎制御法の開発可能性を見極める。

E. 健康危険情報

特記事項なし。

F. 研究発表

1) 論文発表

4. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a*. *J Hepatol* 50, 453-460, 2009.
5. 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* 29, 703-708, 2008.
6. 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

- | | |
|---|--|
| <p>inference of genetic divergence between <i>M. fascicularis</i> and <i>M. mulatta</i>. <i>BMC Genomics</i> 9, 90, 2008.</p> <p>7. 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 (<i>Macaca fascicularis</i>): A systematic identification of drug-metabolizing enzyme genes. <i>FEBS Lett</i> 582, 351-358, 2008.</p> | <p>G. 知的財産権の出願、登録状況</p> <p>1.特許取得
なし。</p> <p>2.実用新案登録
なし。</p> <p>3.その他
なし。</p> |
|---|--|

2) 学会発表

なし。

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

HCV感染複製による細胞の異常増殖機構の解明とその人為的制御
分担研究者 下遠野 邦忠 慶應義塾大学 医学部

研究要旨： HCV 複製において細胞内の脂質蓄積に異常が生じること、それがウイルス産生に重要であることを明らかにした。特に、ウイルスタンパク質が会合する脂肪滴は感染性ウイルス粒子の産生に重要な働きをしている。一方、ウイルス粒子産生が細胞外への脂質輸送とも関連している可能性を明らかにした。すなわち、very low density lipoprotein (VLDL) の細胞外への輸送を阻害すると感染性ウイルス粒子の産生も低下した。これらのことから、ウイルス粒子産生には、細胞内の脂肪滴そのものに加えて細胞から脂肪を放出する経路が重要である可能性が示された。

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。このような疾患発症の背景には、免疫機構による感染細胞の監視機構が働き、その結果炎症と肝細胞の再生が絶え間なく起こることが、肝疾患の増悪化を招くと考えられる。さらに、免疫による炎症に加えてウイルス自身が感染細胞の増殖を変化させる結果、細胞の変化を促進させるとも考えられる。本研究では、HCV 感染と増殖が細胞に与える効果を調べ、ウイルス複製と細胞の異常増殖との関連を分子レベルで明らかにして、その情報をもとにした治療および予防に役立てる研究を行う。

B. 研究方法

(1) ウイルス複製を制御する細胞側要因の解析。

感染性 HCV ゲノムが複製する細胞を用いて、ウイルス複製と細胞内変化を明らかにする。これまでに明らかにしてきた HCV 感染による脂肪代謝の意義をウイルス複製との関

連で解明する。

(2) ウイルスゲノム自立複製細胞を用いたウイルス蛋白質の細胞増殖に及ぼす効果の解析。

ウイルスタンパク質の中で、非構造タンパク質 NS5A に注目して、そのタンパク質と齟齬作用する細胞側因子を明らかにする。とくに昨年度本研究の一環として進め、アポリポタンパク質 E が NS5A と会合することを見いだしたので、ウイルス複製におけるその意義を明らかにする。

(3) 宿主因子の中で、脂肪代謝、脂肪輸送に関連するものの中から、HCV 複製を制御する因子を明らかにする。

(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。

C. 研究結果

(1) ウイルス複製を制御する細胞側要因の解析。

感染性 HCV ゲノムが複製する細胞を用いて、これまでの研究成果をさらに深めるために、細胞内脂肪代謝に焦点を当てて解析した。HCV 感染者の血流中を流れる粒子は very low density lipoprotein (VLDL) と会合しているという報告がある。しかし、その会合の意義は不明である。報告者はウイルスと VLDL の会合がウイルス感染あるいは複製と何らかの関連があると考え、HCV 感染増殖系を用いて VLDL 産生との関連を調べた。

VLDL 産生は脂肪としてトリグリセリド、コレステロールエステルがアポリポタンパク質 B と会合して小胞体ルーメンに放出され VLDL 前駆体を産生する。この際に microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の働きが重要である。前駆体 VLDL にはさらにトリグリセリドとアポリポタンパク質 E が会合して成長型 VLDL となり、最終的に細胞外に放出される。この過程でも MTP が重要な働きをしている。従って MTP 阻害剤で細胞を処理することにより、VLDL の細胞外への放出を制御することが可能である。HCV 感染複製細胞を異なる濃度の MTP 阻害剤で処理した後に感染性粒子の細胞外への放出を調べると、0.001 マイクロモル濃度の阻害剤で感染性粒子の産生は抑制された。このときにアポリポタンパク質 B の細胞外放出は抑制され、さらには VLDL の放出も抑制された。このことから、感染性粒子の放出はアポリポタンパク質あるいは VLDL の細胞外放出と関連することが示唆された。

(2) ウイルスゲノム自立複製細胞を用いたウイルス蛋白質の細胞増殖に及ぼす効果の解析。

脂肪代謝と感染性ウイルス粒子の産生が関連することが明らかになったので、脂肪の

放出に関連するタンパク質、特にアポリポタンパク質とウイルスタンパク質との会合を調べた。その結果、アポリポタンパク質 E が NS5A と会合することを見いだした。また、アポリポタンパク質の NS5A との会合領域も決めた。

(3) 宿主因子の中で、脂肪代謝、脂肪輸送に関連するものの中から、HCV 複製を制御する因子の探索。

これまでの研究から細胞の脂肪代謝および脂肪輸送に関わる因子がウイルスの感染性の付与に重要であることを明らかにしてきた。そこでこの機能に重要な細胞側因子を明らかにするために、脂肪輸送に関係する遺伝子の siRNA で処理した時に感染性ウイルス粒子産生に影響を与えるものを追求した。これまでにアポリポタンパク質 E を siRNA で一過性にノックダウンすると感染性粒子の産生が強く抑制されることを見いだした。(2) で明らかにしたアポリポタンパク質 E と NS5A との会合を考慮に入れると、アポリポタンパク質 E がウイルスの感染性獲得に重要な働きをしていると考えられた。

D. 考察

HCV 感染者には糖尿病あるいは脂肪代謝異常が見られるが、これらの代謝異常がウイルス感染とどのように関連しているのかについては不明な点が多い。本研究では脂肪輸送に重要な働きをしている酵素 MTP を阻害したときの感染性粒子産生を調べ、MTP 活性が感染性粒子産生に重要な働きをしていることを明らかにした。この阻害剤処理により、細胞外へのアポリポタンパク質 B の放

出、VLDLの放出が強く阻害されることから、感染性の付与には、これらの細胞性因子が強く関わっていることが示唆された。また、アポリポタンパク質 E1 のノックアウト細胞でも感染性粒子産性は強く阻害されていることから、脂肪代謝機構が、ウイルス粒子の構築ばかりではなく、感染性粒子の産生にも深く関与していることが示唆された。

E. 結論

HCV 感染細胞では油滴の量が増える。コアタンパク質が油滴の増加に重要な働きをする。

HCV タンパク質は油滴周辺に局在し、そのことが感染性粒子産生に重要であることに加え

感染性粒子の産生にも脂肪代謝が重要な働きをしていることが明らかになりつつある成果を得た。

このことは HCV 感染者に多い脂肪代謝異常が、実は HCV 自身を効率よく複製させ、増殖させるための戦略であり、その結果として感染個体においては脂肪症などの対処以上を引き起こすと考えられる。つまり、感染者が長期にわたり被る異常は、ウイルス感染と密接に関連しており、従ってウイルスを遮断することにより、疾患からも解放される可能性が高い。今後は、やはりウイルスを除去することも視野に入れつつ、感染細胞の中で引き起こされる種々の変化を分子レベルで明らかにして、それに対処できる体制の確立が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(*). Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. *J Hepatol.* 50(3):453-460, 2009.
- (2) 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):330-334, 2009.
- (3) Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. Isono O, Ohshima T, Saeki Y, Matsumoto J, Hijikata M, Tanaka K, Shimotohno K. *J Biol Chem.* 283(49):34273-34282, 2008.
- (4) Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K. *Virology.* 379(2):306-313, 2008.
- (5) Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(16):4638-4641, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

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
Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.	Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(*)	<i>J Hepatology</i>	50	453-460	2009
Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M.	3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	379	330-334	2009
Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H.	Heat-shock Protein 90 Is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3.	<i>J Biol Chem.</i>	284	6841-6846	2009
Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K, Maruyama T.	Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents.	<i>Bioorg Med Chem Lett.</i>	18	4638-4641	2008
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 (<i>Macaca fascicularis</i>): A systematic identification of drug-metabolizing enzyme genes.	<i>FEBS Lett</i>	582	351-358	2008
Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y,	Large-scale analysis of <i>Macaca fascicularis</i>	<i>BMC Genomics</i>	9	90	2008

Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I.	transcripts and inference of genetic divergence between <i>M. fascicularis</i> and <i>M. mulatta</i> .				
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>	29	703-708	2008
Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K.	Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome.	<i>Virology.</i>	375	424-432	2008
Isono O, Ohshima T, Saeki Y, Matsumoto J, Hijikata M, Tanaka K, Shimotohno K.	Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination.	<i>J Biol Chem.</i>	283	34273-34282	2008

Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a[☆]

Yoshiki Murakami^{1,*}, Hussein H. Aly¹, Atsushi Tajima², Ituro Inoue²,
Kunitada Shimotohno^{3,4}

¹Center for Genomic Medicine, Kyoto University, Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

²Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1192, Japan

³Center for Integrated Medical Research, Keio University, Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

⁴Chiba Institute for Technology, Tsudanuma, Chiba 275-0016, Japan

See Editorial, pages 441–444

Background/Aims: Hepatitis C virus (HCV) infection causes chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. Current anti-HCV therapies are based on interferon therapy, which is insufficiently effective. microRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that regulate gene expression, and they have recently been shown to play an important role in viral replication.

Methods: An algorithm-based search for miRNAs that target the HCV genome yielded one miRNA, miR-199a^{*}, with a sequence similar to the HCV genome that is conserved among HCV genotypes.

Results: Overexpression of miR-199a^{*} inhibited HCV genome replication in two cells bearing replicons (replicon cell) HCV-1b or -2a, however, miRNA inhibition by specific antisense oligonucleotide (ASO) accelerated viral replication. Prior transfection of immortalized hepatocytes which were infected with serum of HCV genotype 1b and 2a-infected patients, with miR-199a^{*} reduced HCV RNA replication activity. Mutation in the miR-199a^{*} target site in the replicon reduced the effect of the miR-199a^{*}. HCV replicon RNA is accumulated to the RNA-induced silencing complex (RISC) when miR-199a^{*} was overexpressed to the replicon cell. This antiviral effect by miR-199a^{*} was independent of the interferon pathway.

Conclusions: The results of this study suggest that miR-199a^{*} directly regulates HCV replication and may serve as a novel antiviral therapy.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HCV; microRNA; Viral replication; Replicon cell; RISC

Received 9 April 2008; received in revised form 29 May 2008; accepted 3 June 2008; available online 9 July 2008

Associate Editor: F. Zoulim

[☆] The authors declare that they do not have anything to disclose regarding funding from industries or conflict of interest with respect to this manuscript.

* Corresponding author. Tel.: +81 75 753 4661; fax: +81 75 753 9314.

E-mail address: ymurakami@genome.med.kyoto-u.ac.jp (Y. Murakami).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; miRNA, microRNA; IRES, the internal ribosomal entry site; RISC, RNA-induced silencing complex; CP, Ceruloplasmin.

1. Introduction

Infection by hepatitis C virus (HCV) infection is a cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. Pegylated interferon (IFN)- α /ribavirin combination therapy is currently the most effective treatment for chronic hepatitis C [2]. However, only 50% of treated HCV-infected patients clear HCV infection [3], and novel approaches are urgently needed.

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNAs that control gene expression by degrading or suppressing the translation of target mRNAs [4,5]. miR-122 is an abundant miRNA in the liver, where it comprises 70% of the miRNA in the liver [6]. Both the

5'- and 3'-UTRs of the HCV genome contain sequences that are partially complementary to miR-122. Administration of miR-122 accelerates HCV replication [7]. Several factors related to the RNAi machinery were recently found to reduce HCV production and HCV RNA level [8]. Targeting multiple viral and cellular elements with RNAi may increase the potency of antiviral gene therapies [9–12]. siRNA-based antiviral strategies are expected to have clinical applications as a means of eradicating persistent infection. It has been hypothesized that several miRNAs play pivotal roles in viral replication and proliferation and it is possible that miRNAs control HCV replication.

In this study, we used a miRNA target search algorithm and succeeded in identifying a miRNA that targets the HCV genome. We demonstrated that specific miRNA effectively acts as an RNA silencing-based antiviral response during HCV replication with miRNA specific machinery. The present study suggests that miRNA-mediated HCV inhibition and it may be possible to apply to novel anti-HCV therapies.

2. Materials and methods

2.1. Cell preparation, plasmid construction, liver tissue and transfection

Huh-7, HepG2, and cured MH14 cells [13] were cultured in DMEM (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum and nonessential amino acids (Invitrogen). SN1a [14] and JFH1 cells [15], which carry the full genome replicon of HCV genotype 1b and 2a, respectively, (Fig. 1A) were cultured in the above medium supplemented with 0.5–1.0 mg/ml G418 (Invitrogen). HuS-E/2 immortalized hepatocytes were cultured as described previously [16]. We obtained normal liver tissue from the Liver Transplantation Unit of Kyoto University after receiving the approval of the Ethical Committee of Kyoto University. To express miRNAs, plasmids containing the miR-199a*, miR-122, miR-19a, or a control sequence were constructed by ligating annealed oligonucleotides encoding each miRNA into the pSilencerH1-puro vector (Ambion) (Table 1). Cells were plated the day before transfection and grown to 50% confluence in 6-well plates. miRNA expression constructs (2 µg) were transfected into cells with FuGENE 6 (Roche). Cells were selected by puromycin (1.25 µg/ml) two days after transfection, and they were harvested more than two or four days later. For miRNA suppression, 50 pmol of 2'-O-methylated antisense oligonucleotide (ASO) (Hokkaido System Science) and Silencer® negative control siRNA (Ambion) were transfected with SilentFect (Bio-Rad).

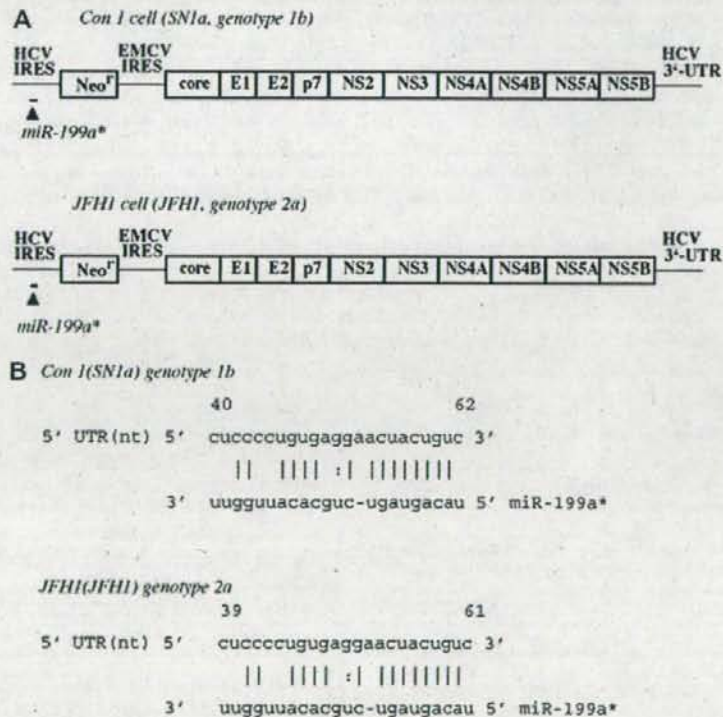


Fig. 1. (A) Schematic representation of the HCV genome-length replicon. The replicon comprised the HCV 5'-UTR, the HCV IRES, neomycin phosphotransferase gene (Neo^r), EMCV IRES, and the coding region from the core to NS5B and 3'-UTR. An arrowhead points to the target site. (B) miRNA target site sequences in the IRES of HCV genotype 1b and 2a. Numbers above sequences of 5'-UTR show nucleotide from 5' end. Vertical bars indicated the complementary bases between the HCV replicon genome and miRNA. The G:U wobble pair also was shown as colon.

Table 1

Part of list of oligonucleotide of miRNA expression vector from as to miR-199a* as from as to miR-19 as from as to Control as.

(a) Primer sequence	
MxA-s	5'-GCTACACACCGTGACGGATATGG-3'
MxA-as	5'-CGAGCTGGATTGGAAAGCCC-3'
PKR-s	5'-GCCTTTTCATCCAAATGGAATTC-3'
PKR-as	5'-GAAATCTGTTCTGGGCTCATG-3'
2'-5'-OAS-s	5'-TCAGAAGAGAAGCCAACGTGS-3'
2'-5'-OAS-as	5'-CGGAGACAGCGAGGGTAAAT-3'
(b) List of oligonucleotide for miRNA expression vector	
miR-199a* s	5'-GATCCGTACAGTAGTCTGCACATTG GTTTCAAGAGAAACCAATGTGCAGACT ACTGTATTCAAGAGTTTTTGGAAA-3'
as	5'-AGCTTTCCAAAAAATACAGTAGTCTGCA CATTGGTTTCTCTTGGAAAACCAATGTGCAGA CTACTGTAGG-3'
miR-19a s	5'-GATCCTGTGCAAAATCTATGCAAACTGAT TCAAGAGATCAGTTTTCATAGATTGG CACAGGAAA-3'
as	5'-AGCTTTCCAAAAAATGTGCAAACTATGC AAAACCTGATCTCTGAATCAGTTTTCATAG ATTTGCACAG-3'
Control s	5'-GATCCCCTTTTTTTGGAAA-3'
as	5'-AGCTTTCCAAAAAAGGG-3'

2.2. Quantitative real-time PCR

The 5'-UTR of HCV genomic RNA was measured by using the ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems) as described previously [17].

2.3. Immunoblot analysis

Immunoblot analysis was performed as described previously [18] using the following primary antibodies: anti-NS3 antibody (a generous gift from Takamizawa A, Osaka University), anti-core antibody (32-1; kindly provided by Kohara M, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science), and anti α -tubulin (Oncogene).

2.4. In vitro HCV infection

HuS-E/2 cells were transfected with miRNA expression vector by Effectene transfection reagent (Qiagen) and control siRNA or ASO was electroporated into HuS-E/2 cells 24 h prior to infection (Bio-Rad). *In vitro* HCV infection was performed as described previously [19]. HuS-E/2 cells were inoculated with serum prepared from an HCV positive blood donor or with concentrated JFH1 medium (in a titer equivalent to 10^5 HCV RNA copies). Twenty-four hours post-infection, the cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and then maintained in growth medium.

2.5. Quantification of miRNA expression level

On day 4 after transfection the TaqMan[®] microRNA assay (Applied Biosystems) was used to quantify miR-199a* expression by using U18 as an internal control.

2.6. Transfection type of miRNA in experiments of effects of mutated miRNA sequences

SN1a cells were plated in 6-well plates the day before transfection and grown to 50% confluence. Cell were transfected with 50 pmol of miR-199a* (Hokkaido System Science), two types of mutated miR-199a* (PROLIGO), and control siRNA, by using SilentFect. Cells were harvested at day 4.

2.7. Transient transfection and luciferase assay

A luciferase assay monitored HCV replicon-luciferase as described previously [13]. Briefly, cured MH14 cells (5×10^3 cell/well) were transfected into 48-well dishes with DMR1E-C (Invitrogen), 0.25 μ g HCV replicon-luciferase RNA, 0.5 μ g miRNA expression vector, and 10 ng Renilla expression vector (internal control) after 96 h later the transfected cells were harvested and lysed, and their luciferase activity was measured with a Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega). The experiments were repeated at least three times. An IRES retaining the conserved secondary structure but lacking the miR-199a* recognition site was generated by PCR-based mutagenesis as described elsewhere [20]. HCV replicon-luciferase RNA was transcribed *in vitro* by using a MEGAscript T7 kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Interferon-related gene response test by luciferase assay and RT-PCR

pISRE (IFN α -stimulated response element)-Luciferase was based on the pGL3-Promoter Vector [13]. After seeding cured MH14, HepG2, and Huh-7 cells (3×10^5 each) in a 6-well plate 24 h before transfection then 2 μ g of pISRE-Luc, 2 μ g of miR-199a* expression plasmid, and 10 ng of Renilla expression plasmid (internal control) were transfected into cells using FuGENE 6. At 90 h post-transfection, these cells were treated with IFN α (Sigma; 500 IU/ml) for 6 h. Whole cell lysates were prepared and assayed with Dual-Luciferase Reporter Assay System kit.

Total RNA was extracted from the cells, and cDNA was synthesized from 5 μ g of total RNA. The primer sequences are shown in Table 1 [21].

2.9. Co-immunoprecipitation with Ago2

A cell lysate of RNA-induced silencing complex (RISC) was collected by using microRNA Isolation Kit, Human Ago2 (Wako) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 48 h after transfection with miRNA expression plasmid, 5×10^6 cells were washed with PBS and harvested by trypsinization. The cells were suspended in PBS and mixed with beads conjugated human Argonaute2 (hAgo2) monoclonal antibody for 2 h at 4°C. HCV replicon RNA from the Ago2-IP fraction was quantified by RT-qPCR.

2.10. Statistical analyses

Data were statistically analyzed by the Student's *t*-test; and *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. The HCV genome contains a putative miRNA target sequence

To search for an miRNA with complementarity to the HCV genome, we performed *in silico* analysis with