

2009 33006A

2009 33006B

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 19-21 年度 総合研究報告書  
平成 21 年度総括研究報告書

研究代表者 村上善基  
平成 21(2010)年 5 月

## 目 次

### 平成 19-21 年度総合報告書

#### 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---11  
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-----17  
下遠野邦忠

#### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----24

### 平成 21 年度総括報告書

#### 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--30  
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----37  
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-----40  
下遠野邦忠

#### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----43

#### 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

慢性 C 型肝炎ウイルス (HCV) は適切な治療を行わないと年余をへて肝硬変、肝細胞癌に進展する。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、(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、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 感染者は約 200 万人と推定されている、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、日本人に多い genotype 1b で高ウイルス量患者では奏効率が 50%程度である事、副作用による治療中断例は 10%程度と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 3.4 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慢性 C 型肝炎患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とインターフェロンシステムによるウイルス排除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 つの観点から行なった。(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、ヒトキメラマウスを用いて in vivo で抗ウイルス活性を示した。これを元にした臨床試験を目指した抗ウイルス治療のシーズ作成、(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 を同定した。このマイクロ RNA の機能解析を元に新規抗ウイルス活性分子の同定の布石を作成した、(3)慢性 C 型肝炎の肝組織マイクロ RNA 発現解析を元にした抗ウイルス治療効果予測アルゴリズムの開発、肝線維化診断アルゴリズムの開発を行った、(4)肝発癌、癌の悪性度を規定するマイクロ RNA の同定を元にした肝発癌メカニズムの解析、を行った。マイクロ RNA を代表とする RNA 干渉の技術を用いて今までの解析方法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、新規 RNA 創薬研究のシーズ作成を目標とした。このことは肝細胞癌での死者数が本邦では第 5 位を占めることから考えて、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が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。さらに新たな抗ウイルス活性のあるマイクロ RNA を同定するためにヒトマイクロ RNA721 種類のライブラリーを作成し、順次こうウイルス活性のあるマイクロ RNA を同定している。

## 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。

## ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前の治療効果予測アルゴリズム作成

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 237 の解析を三菱レイヨン作成の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

今までにインターフェロンなどの抗ウイルス療法を行ったことのない慢性 C 型肝炎患者 106 例より肝生検を行い Metavir 基準で組織の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。

さらに肝細胞癌の治療前後に採取した血清を用いて、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した。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た。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した。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した。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、実施した。

## 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。マイクロ RNA とレプリコンのそれぞれの結合部位に変異を作成すると、レプリコンの複製制御機能は低下した。マイクロ RNA は機能を発揮す

際に RISC complex を形成する、この構成成分の一つである argonaute2 (Ago2) 抗体にて免疫沈降した場合、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 が集積することを示し、別のマイクロ RNA を過剰発現した場合にはレプリコン RNA は集積しなかった、この事よりマイクロ RNA は生理的にレプリコンと結合し機能を発揮することを明らかにした。

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 とヒト初代培養した肝細胞である 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た。現在機能が知られていない遺伝子が含まれているためにオフターゲット現象が起きているか否かは正確には不明であるが、培養細胞の表現系に変化がないためにオフターゲットの関与は少ないと考えられた。

in vivo 実験のために ICR マウス、C57BL/6 マウスを用いて肝臓にマイクロ RNA を発現させた。発現は単回投与で 1 週間以上持続した。1 週間目にと殺して肝、腎、肺、心

などの臓器を観察したが炎症はみられなく、安全に投与できると考えた。ヒト肝組織をもつキメラマウスに HCV を感染させ、マイクロ RNA を投与した、単一のマイクロ RNA を単回投与した場合 1 週間後に末梢血 HCVRNA 量は 40% に低下していた。3 種のマイクロ RNA を 3 回投与した所 (1 週間) 1 週間後に HCVRNA は 1/100 に低下していた。**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 を同定した。このマイクロ RNA はターゲット検索アルゴリズムを用いて HCV 遺伝子そのものをターゲットにする可能性が低いことを確認した。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 はそれを過剰発現するとレプリコン活性が低下し、siRNA で機能を抑制するとレプリコン活性が上昇することがわかった。

#### ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前の治療効果予測

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を著効例 (SVR)、再発例 (R)、無効例 (NR) の 3 群にわけ、それぞれマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。Monte Carlo Cross Validation (MCCV) を用いてペグインターフェロン+リバビリン併用療法をシミュレーションした。SVR と NR の分別は 76.1%、

SVRとRは56.6%、R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、R、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。

インターフェロン関連遺伝子237種を搭載したマイクロアレイを用い、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法治療効果別に遺伝子発現プロファイルを作成した。

ISG15, IFIT2, MX1, HERC5の発現が併用療法有効例で治療前の発現が、無効例に比べると有意に低い事が分かった。また正常肝とHCV感染肝と比較すると感染肝の方がこれらの遺伝子の発現が有意に亢進している事が明らかになった。インターフェロン関連遺伝子の発現プロファイルを用いて治療固着予測をすると、NRとSVR+Rの分別は84.1%の高率であり、インターフェロン治療前に高い予測効果が得られる事が分かった。

#### 肝線維化の制御についての検討

今までに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から順に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。

#### 肝発癌に関係しているマイクロRNAとその標的遺伝子の同定

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と正反対の効果をもつ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。

#### 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-92/miR-638) は術後に有意に低下していることが分かった。miR-92 は癌部で in situ hybridization を行った所過剰に発現していることがわかった。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。

#### 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

下遠野班員は本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見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 実験では、マイクロ RNA の種類、投与方法を選択する事により、高い抗ウイルス効果が発揮できる事が期待された。特に Lanford et al. が HCV 感染チンパンジーに anti-miR-122 を投与し、HCV 制御の遺伝子治療開発を行なっているが、彼らの結果では 10 週間 (1 回/週) の投与で血液中 HCV RNA は 1/100 に減少しているが、我々の実験では 1 週間の投与で最大 1/100 に HCV RNA が減少していた。この事はマイクロ RNA の治療がより有効なものになると考えられる。

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。この事より細胞のウイルス排除メカニズムが明らかにされ、新規抗ウイルス活性物質の発見につながる。

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た、またインターフェロン関連遺伝子マイクロアレイにて追加解析を行ない、その結果を比較したところ、マイクロ RNA を用いた治療効果予測アルゴリズムは SVR の予測を効率的に出来た、またインターフェロン関連遺伝子を用いた治療効果予測アルゴリズムは NR を



効率的に予測する事が出来た。今後解析数を増やして、より正確で、再現性の高い、治療効果予測アルゴリズムを作成する。

線維化程度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。現状の肝線維化の評価は専門の病理診断によるものが golden standard であり、簡便に診断が出来ない点、病理医間での診断の差、再現性、等が問題となっている。血液検査や画像診断では F4 とそれ以外を分別する事が出来るが、F0, 1, 2, 3 それぞれを分別する事が出来ない。今回我々は任意の二群間を抽出し、それらを高い正確性で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。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。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

4. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*. 2009; 14: 529-38.
  5. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int* (in press)
  6. 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
  7. 村上善基 マイクロ RNA の発現異常と肝発癌の関与 細胞 42 (6) 2010
- ### 2) 学会発表
1. Murakami Y, Ali HH, Hijikata M, and Shimotohno K. Novel approach for HCV regulation by using miRNA. JCA 66<sup>th</sup> Annual meeting, Yokohama October 3-5, 2007
  2. Murakami Y, Okanoue T and Shimotohno

- K. Aberrant expression of miR-224 has a potential for hepatocarcinogenesis. JCA 67<sup>th</sup> Annual meeting, Nagoya October 3-5, 2008
3. 村上善基、豊田秀徳、下遠野邦忠。マイクロ RNA 発現プロファイルを用いた慢性 C 型肝炎ウイルス治療効果予測。第 13 回日本肝臓学会大会  
平成 21 年 10 月 14-17 日 京都市
4. 第 32 回日本分子生物学会年会バイオテクノロジーセミナー  
平成 21 年 12 月 11 日 横浜市
5. AACR 101<sup>st</sup> annual meeting 2010  
Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. April 17-21, Washington, DC

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
1. 遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法. 村上善基. 特願 2010-86966 (H22-4-5)
2. 慢性 C 型肝炎の治療効果予測方法. 村上善基. 特願 2009-229977 (H21-9-7)
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。本研究事業においては、以下の2つの課題に取り組んだ：(1) マイクロ RNA により RNA レベルで発現制御され得る遺伝子の網羅的同定法の開発、(2) マイクロ RNA の発現制御機構の解明。(1) においては、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標的候補遺伝子を絞り込む方法を開発し、肝癌関連マイクロ RNA の標的遺伝子や、C 型肝炎ウイルス (HCV) の細胞内発現量と相関するマイクロ RNA の標的候補の同定に寄与した。一方、(2) においては、HCV 抑制効果を有し、肝発癌とも関連する microRNA-199a\* の肝臓での発現に対する DNA メチル化の関与について検討し、マウス正常肝においては、microRNA-199a\* 制御候補領域が DNA メチル化されていることを明らかにした。

#### 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。一般に、(1) マイクロ RNA が生体内でどの遺伝子を標的とするか、(2) マイクロ RNA 自身の発現がどのように制御されているか、という2つの事柄についての知見が十分ではないことから、本研究事業においては、これらの課題に寄与することを主たる目的として、研究を行った。

#### 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* 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. HCV リプリコン量関連マイクロ RNA 標的遺伝子候補の同定

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 レプリコン 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。標的候補遺伝子の絞り込みは、前項 B-1 と同様に行った。

## B-3. DNA メチル化によるマイクロ RNA 発現制御

主任研究者(村上)らにより同定された HCV 抑制効果を有し、肝発癌とも関連する microRNA-199a\* (Murakami et al., *Oncogene*

2006; Murakami et al., *J Hepatol* 2009)につき、その肝臓組織での発現制御における DNA メチル化の関与を検討した。

四塩化炭素、あるいはその溶媒(オリブオイル)投与 4, 6, 8 週後のマウス肝臓を摘出し、実験に供した。肝臓由来 DNA の抽出には、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いた。抽出ゲノム DNA は EpiTech Bisulfite Kit (QIAGEN)を用いてバイサルファイト処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルへと変換した。マウス microRNA-199a\* 上流 CpG アイランド領域の DNA メチル化検索には、PCR-COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis, 制限酵素 *HhaI*)法を用いた。

(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

肝臓関連マイクロ 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. HCV リプ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 リプ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、前項 C-1 と同様の3項目を設定したところ、1遺伝子のみがこの3条件すべてを満たし、HCV リプ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から、標的遺伝子の抗 HCV 活性などを見極める必要がある。

## C-3. DNA メチル化によるマイクロRNA 発現制御

HCV 抑制効果を有し、肝発癌とも関連する microRNA-199a\* に焦点を絞り、分析を加えた。

マウス microRNA-199a\* は、ゲノムの2カ所（1番および9番染色体）に位置することが明らかになっている。情報学的解析 [Methyl Primer Express (Applied Biosystems)] により、9番染色体にある microRNA-199a\* の上流領域に CpG アイランドを認め、その発現制御に対して DNA メチル化が関与し得ると考えた。

バイサルファイト処理後の肝臓 DNA を鋳型とし、9番染色体上の対象 CpG アイランド領域を PCR 増幅した。正常マウス肝由来の PCR 増幅産物は *HhaI*（認識配列 GCGC）により切断され、この領域は、マウス生体

内ではメチル化状態にあると考えられた。同様に、四塩化炭素誘発肝線維化マウス由来の PCR 増幅産物もまた *HhaI* により切断されることが明らかになり、肝臓の線維化に伴うメチル化状態の大きな変化は生じないことが推察された。

#### D. 結論

設定した2つの研究課題に対して、以下のことを明らかにした。(1) 肝癌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。この手法を用いて、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。(2) HCV 抑制や肝発癌と関連するマイクロ RNA である microRNA-199a\* の発現制御候補領域は、マウス肝臓ゲノム DNA において、DNA メチル化されている可能性を見いだした。

#### E. 健康危険情報

特記事項なし。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
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. Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I. Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 39, 972-981, 2009.
6. Kang E-H, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, Yamaguchi M, Park S-B, Maki K, Inoue I.

- Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch Oral Biol* 54, 556-562, 2009.
7. Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor genes in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 136, 536-541, 2009.
  8. Koike A, Nishida N, Inoue I, Tsuji S, Tokunaga K. Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project. *J Hum Genet* 54, 543-546, 2009.
  9. Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C, Kasuya H, Tajima A, Takahashi T, Hata A, Inoue I, Kirschke B. Association analysis of genes involved in the maintenance of the integrity of the extracellular matrix with intracranial aneurysms in a Japanese cohort. *Cerebrovasc Dis* 28, 131-134, 2009.
  10. Brookes AJ, Lehvaslaiho H, Muilu J, Shigemoto Y, Oroguchi T, Tomiki T, Mukaiyama A, Konagaya A, Kojima T, Inoue I, Kuroda M, Mizushima H, Thorisson GA, Dash D, Rajeevan H, Darlison MW, Woon M, Fredman D, Smith AV, Senger M, Naito K, Sugawara H. The phenotype and genotype experiment object model (PaGE-OM): a robust data structure for information related to DNA variation. *Hum Mutat* 30, 968-977, 2009.
  11. Nakaoka H, Inoue I. Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. *J Hum Genet* 54, 615-623, 2009.
  12. Yoshihara K, Tajima A, Komata D, Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Inoue I, Tanaka K. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates *ZEB2* in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci* 100, 1421-1428, 2009.
  13. Yoshihara K, Tajima A, Yahata T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Kotera K, Masuzaki H, Tashiro H, Katabuchi H, Inoue I, Tanaka K. Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent databases. *PLoS ONE* 5, e9615, 2010.
  14. 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.
- 2) 学会発表



なし。

**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。

## 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

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 千葉工業大学 附属総合研究所

#### 研究要旨：

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。さらに、siRNA などを用いて HCV 複製、増殖を制御する宿主因子の機能を変化させ、抗 HCV 剤開発に向けた基礎研究をおこなった。そのために、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、本研究の達成に努めた。これまでに、以下の研究成果を得た。(1) 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。(2) 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。(3) ウイルス粒子産生が脂質輸送と関連していることを明らかにした。すなわち、microsomal triglyceride transfer protein (MTP) 阻害剤により、HCV の産生が抑制されることを見出した。(4) アポリポタンパク質が HCV 産生に重要な働きをすることを見出した。アポリポタンパク質 E の siRNA を導入した細胞では、感染にウイルス粒子の細胞外への放出は強く抑制された。すなわち、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。これらのことから細胞から脂肪放出に関与する遺伝子発現を制御する miRNA は HCV 産生の制御に働くと考えられた。

#### 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。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目標にした。そのために、HCV 産生の制御に関わる一連の宿主因子の探索を行う。また、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することもおこなう。

## 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。その目的のために分担者が開発したヒト肝臓由来の培養細胞

(HuS) 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う。そのために、本細胞を三次元で培養して、HCV 感染性と感染の持続性を評価する。

(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。

(3) 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。

(4) 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、

産生を制御する因子を明らかにする。特に脂肪輸送系に働く宿主因子に注目して siRNA を用いて関連因子をノックダウンさせたときのウイルス産生を評価する。

(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) 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。本細胞を 3 次元培養することにより、HCV 複製、増殖効率が高まるか否かを調べた。HuS 細胞を中空糸内で培養し、経時的にウイルス量を測定すると、平面培養時に比べウイルスの複製維持時間が 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因子の解析を効率よく行うことができる。

(2) 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。この過程にも 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