

厚生労働省科学研究費肝炎等克服緊急対策研究事業
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

miR-122 による C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解明

分担研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学 教授

研究要旨:肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に対して促進的に働くことが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法は、HCV 複製を抑制することが知られており、実際抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は HCV 感染チンパンジーさらに HCV 感染患者においても証明され、今後の臨床応用が期待されている。しかしながら、miR-122 による HCV 複製機序は不明であったため今回その解明を行った。培養細胞系での検討から、miR-122 は、HCV の 5' UTR 領域に存在する結合部位への結合を介して HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。さらに miR-122 による HCV RNA の安定化には RISC 複合体が必須であり、特に RISC 複合体の中の Ago2 蛋白が、HCV RNA の安定化に必須であることを明らかとした。抗 miR-122 療法は、DAA 製剤で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られており、今後 DAA 製剤との併用療法が期待される。

A. 研究目的

肝特異的に発現するマイクロ RNA である miR-122 は HCV の複製に促進的に働くことが報告されている。そのため miR-122 に対するアンチセンス鎖を利用した抗 miR-122 療法による抗ウイルス効果は、HCV 感染培養細胞系のみではなく、HCV 感染チンパンジー、さらには HCV 感染患者においても証明されている。そのため miR-122 を標的とした抗 miR-122 療法は、今後の C 型慢性肝炎の有効な新規治療法と考えられるが、miR-122 による HCV 複製制御機構は明らかではなかった。本年度は、miR-122 による HCV 複製制御機構を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。

B. 研究方法

1) miR-122 の HCV RNA 複製に対する影響を排除するため、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有する NS5B の活性を有しな

い HCV RNA を作成した。また蛋白合成への影響も同時に評価するため HCV 遺伝子中に分泌型ルチフェラーゼを挿入した。この HCV RNA を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞に遺伝子導入し、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

- 2) HCV 持続感染培養細胞を作成、高濃度 (EC50 の 10 倍濃度) の NS5B 阻害剤 (PSI-6130) を投与して、HCV RNA 合成を停止させ、直ちに miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖を投与し、HCV RNA の安定化作用の有無を検討した。
- 3) HCV 持続感染細胞を作成し、DICER、Ago1 から Ago4 蛋白に対する siRNA を投与して、HCV RNA 複製への影響を検討した。
- 4) Ago2 ノックアウト細胞に非複製 HCV RNA(1) で使用) を miR-122 あるいは miR-122 アンチセンス鎖と共に遺伝子導

入して、HCV RNA の安定化作用の有無を northern blot 法にて、さらに蛋白合成に与える影響をルチフェラーゼ活性により評価した。

(倫理面への配慮)

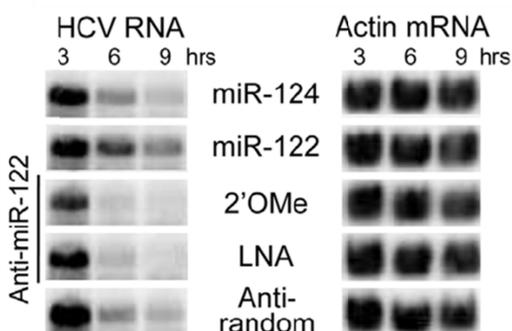
本研究では感染性粒子を産生する HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

C. 研究結果

- miR-122 の投与により非複製 HCV RNA は安定化され、miR-122 アンチセンス鎖の投与により、非複製 HCV RNA は不安定化された。(図 1) また miR-122 の投与により、非複製 HCV RNA からの蛋白合成は促成され、逆に miR-122 アンチセンス鎖の投与により、蛋白合成は抑制された。この結果から HCV RNA を安定化することで HCV の蛋白合成を促進し、結果的に HCV 複製を促進することが明らかとなった。

図 1

- HCV 持続複製細胞においても miR-122 は HCV RNA を安定化し、逆に miR-122 アンチセンス鎖は HCV RNA を不安定化

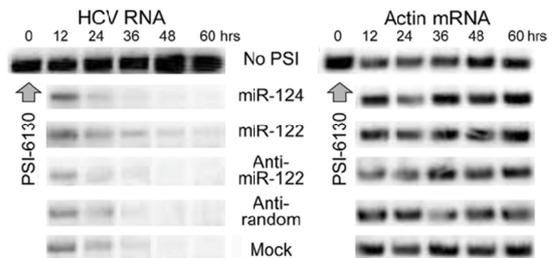


した。(図 2)

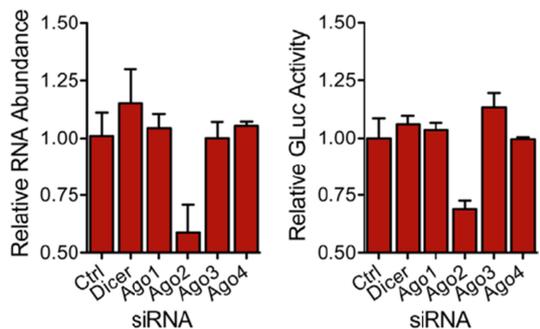
図 2

- Ago2 蛋白の siRNA によるノックダウンにおいてのみ HCV 複製の抑制を認めた。(図 3)

図 3



- Ago2 ノックアウト細胞では miR-122 による HCV RNA 安定化作用および蛋白合

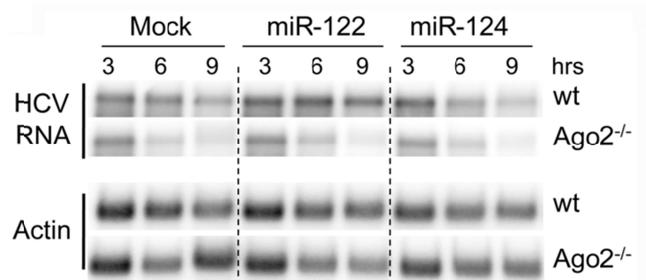


成促進作用は認めなかった。(図 4)

図 4

D. 考察

抗 miR-122 療法は DAA 製剤による抗ウイ



ルス療法で問題となっている薬剤耐性ウイルスが極めて出現しにくいことが知られている。しかしながら miR-122 非発現細胞においても HCV は複製することが知られており、抗 miR-122 療法単独での HCV の排除は困難と

考えられる。そのため抗 miR-122 療法と DAA 製剤の併用療法は DAA 製剤による薬剤耐性ウイルスの出現予防の点で極めて有用であり、今後検討を行う予定である。

E. 結論

- 1) miR-122 は HCV RNA を安定化することで HCV 複製を促進することが明らかとなった。
- 2) miR-122 による HCV RNA の安定化には Ago2 が必須であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A Seki, S Y akai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, S Kaneko. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology 58(3):1133-42, 2013
- 2) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, S Kaneko. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87(9):5270-86, 2013
- 3) T Ueda, M Honda, K Horimoto, S Aburatani, S Saito, T Yamashita, Y

Sakai, M Nakamura, H Takatori, H Sunagozaka, S Kaneko. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Genomics 101(4):238-48, 2013

- 4) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 57(4):1484-97, 2013
- 5) Y Hodo, M Honda, A Tanaka, Y Nomura, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sakai, M Sasaki, Y Nakanuma, M Moriyama, S Kaneko. Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Clin Cancer Re 19(7):1827-37, 2013

2. 学会発表

- 1) Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Acyclic Retinoid, Peretinoin, Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture, The 64rd AASLD2013, ワシントンDC, 2013年11月

- 2) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C with advanced fibrosis via the TGF- signaling pathway. The 64th AASLD 2013, ワシントン DC , 2013 年 11 月

G. 所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし