

201423021A

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)

抗C型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

高機能型核酸医薬の創製に関する研究

平成26年度 研究報告書

研究代表者 山口朋子

平成27(2015)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 抗C型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ高機能型核酸
医薬の創製に関する研究 ----- 1
山口 朋子 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)

II. 分担研究報告

- I型インターフェロン産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価に関する検討
および分岐型Small Interfering RNAによるHCV増殖抑制に関する検討
----- 3
山口 朋子 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)

- miR-122aに対する阻害能とI型インターフェロン誘導能を兼ね備えたアンチ
センスオリゴヌクレオチドの開発 ----- 10
櫻井 文教 (大阪大学大学院 薬学研究科)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ

高機能型核酸医薬の創製に関する研究

研究代表者 山口 朋子

独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

研究要旨

現在、全世界で 2 億人の HCV 感染者が存在し、さらにその数が年間 300 万人ずつ増加していることから、革新的抗 HCV 薬の開発が期待される。中でも核酸医薬には大きな期待が寄せられており、特にデンマークの Santaris ファーマ社が開発中の miR-122 を阻害する LNA (miR-122 は HCV の複製に必須) は、臨床試験で有望な結果を示している。しかし既存の核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫活性化能を大きく低減させており、患者自身の免疫機能を利用できていない。そこで本研究においては、抗 HCV 活性に加えて、自然免疫を活性化し I 型 IFN を誘導可能な核酸医薬を開発することとした。

これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-1) を活性化させると高効率に IFN 産生を誘導できることが報告されている。RIG-I は、5'末端に 3 リン酸基を持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することから、本研究では miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規アンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligo nucleotide; ASO) を作製し、HCV 増殖抑制効果を検討した。また、核酸医薬の I 型 IFN 産生誘導を評価するために、自然免疫活性化による I 型 IFN 産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価を行った。

分担研究者

櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科
准教授

A. 研究目的

近年、抗 HCV 薬として Small Interfering RNA (siRNA) や Locked Nucleic Acid (LNA) などの核酸医薬が注目され、臨床試験でも優れた治療効果が得られている。しかし既存の核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫を活性化しないよう設計されており、患

者の免疫機能が活用されていない。優れた核酸医薬を開発するには、免疫賦活化能を付与する必要がある。そこで、本研究では、C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染を抑制可能な核酸医薬を化学修飾することで、本来の抗 HCV 活性に加えて、インターフェロン (IFN) を誘導可能な我が国独自の高機能型核酸医薬を創製することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、研究代表者 山口、分担研究者 櫻井の計 2 名で遂行した。当該年度においては、5'末端

に3リン酸基を有する複数の siRNA を連結させた分岐型 siRNA (3ptsiRNA) による自然免疫活性化能について更に詳細に検討を進めるとともに、HCV レプリコン増殖抑制能について検討した(山口)。また、miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規 ASO である LNA122-DS の自然免疫活性化機構ならびに3型 IFN 発現誘導について検討した(櫻井)。

2. 3ptsiRNA の末端は、Blunt end、Sticky end どちらでも同等の自然免疫活性化能およびノックダウン効率を有することが示された。
3. LNA122-DS は、主に RIG-I を介して3型 IFN の発現を誘導することが示された。
4. LNA122-DS による HCV 増殖抑制効果は、miR-122a 阻害や自然免疫活性化以外の経路も存在することが示された。

C. 研究結果

- (1) 昨年度開発した 3ptsiRNA の末端構造は、Blunt end および Sticky end どちらにおいても同等のノックダウン効率および自然免疫活性化能を有することが示された。
- (2) 3ptsiRNA は主に RIG-I を介して自然免疫を活性化しているが、TLR3 も少なからず 3ptsiRNA による自然免疫活性化に関与していることが明らかとなった。
- (3) 3ptsiRNA 作用群において HCV レプリコンゲノムのノックダウンと自然免疫活性化による更なる HCV 増殖の抑制は観察されなかったものの、核酸医薬によって自然免疫を活性化することにより HCV 増殖を抑制可能であることが示された。
- (4) LNA122-DS は1型 IFN のみならず、3型 IFN を誘導可能であることが示された。
- (5) LNA122-DS による3型 IFN の発現誘導においても RIG-I が主に関与していることが明らかとなった。
- (6) LNA122-DS は肝細胞において自然免疫を活性化し、従来 ASO である miR-122a に対する ASO より高い HCV 増殖抑制効果を示すものの、それにおける自然免疫活性化の寄与は低いことが示唆された。

D. 結論

1. 3ptsiRNA は、主に RIG-I を介して自然免疫を活性化させること、そのためには5'末端の3リン酸基が重要であることが示された。

「抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ高機能型核酸

医薬の創製に関する研究」

総括研究報告書

I 型インターフェロン産生誘導を評価可能な培養細胞系の評価に関する検討

および分岐型 Small Interfering RNA による HCV 増殖抑制に関する検討

研究代表者 山口 朋子

独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染者は、全世界で2億人、国内では200万人にものぼり、C型肝炎は世界で最大のウイルス感染症の一つである。HCV感染患者は高い割合で慢性肝炎を発症し、その後、肝硬変、肝癌へと移行することから、革新的治療薬の開発は緊急的な課題であるといえる。近年、新たなC型肝炎治療薬として、Small interfering RNA（siRNA）や Antisense oligonucleotide（ASO）などの核酸医薬に大きな注目が集まっている。従来の核酸医薬は副作用軽減のため、自然免疫を活性化しないよう設計されている。しかし、HCV感染者の一部はHCVによって自然免疫が活性化させることで自然と排除されること、C型肝炎治療薬としてI型インターフェロン（IFN）が用いられていること、HCVに対する免疫を誘導することでより高い治療効果が期待できることを考慮すると、核酸医薬本来の抗HCV活性に加えて、自然免疫活性化能を付与することができれば、より高い抗HCV活性が得られるものと期待される。そこで本研究においては、抗HCV活性に加えて、自然免疫を活性化しI型IFNを誘導可能な核酸医薬を開発することとした。昨年度は、高効率に自然免疫を活性化するとともに、複数の標的遺伝子をノックダウン可能な分岐型 Small interfering RNA（siRNA）を開発し、そのノックダウン効率ならびにI型IFN誘導能について検討した。そこで本年度は、分岐型 siRNA のIFN誘導機構に関して詳細に検討を行った。さらに、HCV増殖抑制能についても検討した。

分担研究者

櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研究科
准教授

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科
教授

Ong Tyng Tyng 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

協力研究者

川端 健二 独立行政法人医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー

坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科
教授

加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬総合研究科
教授

福原 崇介 大阪大学微生物病研究所
助教
松浦 善治 大阪大学微生物病研究所
教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、約9.6kbのプラス鎖RNAをゲノムに持つRNAウイルスであり、現在、世界には約2億人、本邦では200万人ものHCV感染患者がいると推定されている。C型肝炎治療薬としては、IFN製剤ならびにリバビリンの併用療法が優れた治療効果を示し、国内のHCV感染者は減少傾向にあるものの、世界では依然として年間200~300万人ずつ感染者が増加していることから、その革新的治療薬の開発は世界的な緊急課題であると言える。

近年、抗HCV薬としてSmall interfering RNA (siRNA)やAntisense oligonucleotides (ASO)などの核酸医薬が注目を集めている。たとえば、HCVの増殖に肝細胞特異的microRNAであるmiR-122aが重要であることが明らかとなっており、miR-122aに対するASOを作用させることでHCVの感染を抑制可能である。既にmiR-122aに対するASOは、欧米のベンチャー企業によって臨床試験が行われており、第2相試験においても有望な結果が得られている。これら既存の核酸医薬は副作用軽減のために自然免疫を活性化しないように設計されている。しかし、C型肝炎治療薬としてI型インターフェロン(IFN)が使用されていることや、HCV感染者の一部はHCVゲノムによって自然免疫が活性化され、HCVが自然排除されることを考慮すると、もし核酸医薬により本来の抗HCV活性に加えて、I型IFNが産生誘導可能となれば、さらに高い治療効果が期待できると考えた。

そこで本研究では、核酸医薬に自然免疫活性化能を付与しI型IFNを産生誘導することを試みた。昨年度の検討としては、5'末端に3リン酸基を有する複数のsiRNAを連結させた分岐型siRNA

(3ptsiRNA)を開発し、そのHCVゲノムノックダウン効率ならびに自然免疫活性化能を評価した。本年度は3ptsiRNAによる自然免疫活性化能について更に詳細に検討を進めるとともに、HCVレプリコン増殖抑制能について検討した。

B. 研究方法

1. 5'末端に3リン酸基を有した分岐型siRNA (3ptsiRNA)の作製

昨年度、HCVゲノムを切断可能なsiRNA配列を設計した。これらsiRNAを連結することで、3ptsiRNAを設計した。Negative control 3ptsiRNAとしては、Green fluorescence protein (GFP)、 β -galactosidase (LacZ)、chloramphenicol acetyl transferase (CAT)に対するsiRNAを連結したものをを用いた。設計した配列をコードした合成オリゴDNAとT7 RNA polymerase enzyme kit (MEGAscript kit, Ambion)を用いて各Strandを合成した。各Strandは、15% denaturing PAGEで泳動後、回収した。回収したRNAは、混合後、98°Cでインキュベートしたのち、室温で徐々に冷却することによってアニーリングさせた。各Strandがアニーリングし3ptsiRNAが形成されているか否かについては、電気泳動により確認した。

2. 3ptsiRNAの5'末端3リン酸基の除去に関する検討

上記1で合成した3ptsiRNA用のRNA Strand (Single strand)をCalf Intestine Phosphatase (CIP)で8時間以上処理することにより、5'末端の3リン酸基を取り除いた。その後、カラム精製によりRNA Strandを精製したのち、上記1と同様に3ptsiRNAを調製した。3ptsiRNAのTransfection実験に関しては、ヒト不死化肝細胞株であるPH5CH8細胞(岡山大学・加藤宣之先生より供与)を24-well plateに 1×10^5 cells/wellで播種した。翌日、3ptsiRNAをLipofectamine RNAiMAXを用いて最終濃度25nMでTransfectionした。Poly I:Cについては、最終濃度2.5 μ g/mLでTransfectionした。Transfection12時間後にIsogenを用いてRNAを回収し、Real-time

RT-PCRにより mRNA level を解析した。

3. 3ptsRNA による I 型 IFN 誘導における自然免疫受容体の関与に関する検討

二本鎖 RNA を認識することが報告されている Toll-like receptor 3 (TLR3) および Retinocid-inducible gene-1 (RIG-I) に対する siRNA を、Reverse Transfection により PH5CH8 細胞に終濃度 50nM で Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入した。24 時間後、3ptsRNA (終濃度 25 nM)、5' ppp-dsRNA (5' 末端に 3 リン酸基を有する 19 塩基長の二本鎖 RNA、Invivogen、終濃度 2.5ng/ul)、および polyI:C (終濃度 2.5ng/ul) を Lipofectamine RNAiMAX を用いて Transfection した。Transfection 4 時間後に培地交換を行い、Transfection 12 時間後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により、Type I および III IFN の mRNA 量を検討した。

4. HCV レプリコンに対する 3ptsRNA の HCV 増殖抑制効果に関する検討

HCV レプリコン発現 Hec1B/miR-122a 細胞 (miR-122a を過剰発現する Hec1B 細胞 (ヒト子宮内膜癌細胞株)、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞) を 24 well plate に 1×10^5 cells/well で播種した。翌日、作製した 3ptsRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いて終濃度 25 nM で Transfection した。Transfection 4 時間後に培地交換を行うとともに、Transfection 48 時間培養後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により HCV ゲノム量を定量した。また Transfection 12 時間後に Total RNA を回収し、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞における自然免疫応答能を評価した。

C. 研究結果

1. 3ptsRNA の 5' 末端 3 リン酸基の除去に関する検討

まず 3ptsRNA による自然免疫活性化機構を検討するために、CIP 処理によって 5' 末端の 3 リン酸

基を取り除いた 3ptsRNA を調製し、I 型および III 型 IFN 誘導能を検討した。これまでに、RIG-I による二本鎖 RNA の認識においては 5' 末端の 3 リン酸基が重要であることが報告されている。CIP 処理した 3ptsRNA では、従来の 3ptsRNA と比較し、IFN- β および IFN- λ の mRNA 量とも 1/100 以下に減少した。以上の結果より、3ptsRNA による I 型および III 型 IFN 誘導においては、5' 末端の 3 リン酸基が極めて重要であることが明らかとなった。しかし、CIP 処理した 3ptsRNA において、I 型 IFN の mRNA 量はほぼ No-treated cells と同レベルまで減少したが、III 型 IFN の mRNA 量は Non-treated cells と比較し依然として高いレベルであった。これは、3ptsRNA が RIG-I のみならず、他の自然免疫受容体に認識され、IFN の発現を誘導しているものと考察された。

次にさらに 3ptsRNA の末端の構造が IFN 発現誘導に及ぼす影響について検討した。これまでに、RIG-I を介した自然免疫活性化においては、Sticky end よりも Blunt end の方が IFN 発現誘導能が高いことが報告されている。そこで、5' リン酸基を有する末端部位が Blunt end の 3ptsRNA と、Sticky end の 3ptsRNA を調製し、その IFN 誘導能を検討した。その結果、Blunt end、Sticky end とともにほぼ同程度の I 型および III 型 IFN 発現誘導能を示した。なお、siRNA における末端構造は、RNA 鎖のどちらが RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれるか決定する上で重要な因子である。そこで、Blunt end および Sticky end の 3ptsRNA による HCV ゲノムのノックダウン効率について検討したところ、こちらにおいても両者の間に有意な差は見られなかった。以上の結果より、3ptsRNA においては末端構造は Blunt end および Sticky end どちらにおいても同等のノックダウン効率および自然免疫活性化能を有することが示された。

2. 3ptsRNA による I 型 IFN 誘導における自然免疫受容体の関与に関する検討

さらに 3ptsRNA による自然免疫活性化に関する

自然免疫受容体を明らかにすることを目的に、二本鎖 RNA を認識する自然免疫受容体である RIG-I および TLR3 を siRNA でノックダウンした細胞に対し、3ptsRNA を Transfection し、IFN 発現誘導能について検討した。まず RIG-I および TLR3 に対する siRNA のノックダウン効率について検討したところ、RIG-I および TLR3 ともに 50 nM で約 50%まで mRNA 量を減少させた。そこで次に RIG-I もしくは TLR3 をノックダウンした細胞に 3ptsRNA を作用させたところ、Control siRNA 前処理群と比較し、IFN-β および IFN-λ ともに約 50% mRNA 量が減少した。一方で、TLR3 をノックダウンした場合には IFN-β および IFN-λ ともに有意な発現量の低下は観察されなかった。しかしながら、RIG-I および TLR3 の両者をノックダウンしたところ、RIG-I のみをノックダウンした場合と比較し、わずかなではあるが各種 IFN mRNA 量の更なる減少が観察された。以上の結果より、3ptsRNA は主に RIG-I を介して自然免疫を活性化しているが、TLR3 も少なからず 3ptsRNA による自然免疫活性化に関与していることが明らかとなった。

3. HCVレプリコンに対する 3ptsRNA の HCV 増殖抑制効果に関する検討

これまでに検討より、3ptsRNA は優れた I 型および III 型 IFN 誘導能を有するとともに、HCV ゲノムに対するノックダウン効率を有することから、次に HCV レプリコン発現細胞を用いて、HCV 増殖抑制効果に関して検討を行った。HCV レプリコン細胞としては、miR-122a を過剰発現するヒト子宮内膜癌細胞株である Hec1B/miR-122a 細胞に Con1 株の HCV レプリコンを導入した細胞を用いた。Hec1B 細胞は肝細胞ではないものの、miR-122a を過剰発現させているため、HCV レプリコンが複製可能であること、Huh7.5.1 細胞とは異なり、二本鎖 RNA により自然免疫が活性化することを確認している。まず Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に 3ptsRNA を Transfection したところ、Non-treated cells と比較し、IFN-β は約 50 倍、IFN-λ は 100 倍以上高い mRNA

量が誘導された。

つぎに Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に 3ptsRNA を Transfection し HCV レプリコン増殖抑制効果について検討したところ、3ptsRNA 作用群では HCV レプリコンゲノム量は 25 nM で約 25%にノックダウンされた。しかし、Control の siRNA (HCV ゲノムに対する siRNA)を 75nM で Transfection したところ、3ptsRNA と同程度のノックダウン効率が得られた。自然免疫活性化能を有する Control の 3ptsRNA (HCV ゲノムをノックダウンしない)においても、I 型および III 型 IFN 発現を誘導することで、約 50%まで HCV レプリコンゲノム量が減少した。以上の結果より、3ptsRNA 作用群において HCV レプリコンゲノムのノックダウンと自然免疫活性化による更なる HCV 増殖の抑制は観察されなかったものの、核酸医薬によって自然免疫を活性化することにより HCV 増殖を抑制可能であることが示された。

D. 考察

昨年度は、3ptsRNA を開発するとともに、その HCV ゲノムに対するノックダウン効率および自然免疫活性化能について検討した。本年度は、3ptsRNA による自然免疫活性化メカニズムについて検討を進めるとともに、RNA 干渉と自然免疫活性化の両方の作用によって更なる HCV 増殖抑制効果が観察されるか検討を行った。

二本鎖 RNA を認識して自然免疫を活性化する自然免疫受容体としては、主に TLR family と RLR (RIG-like receptor) family が同定されている。一方、核酸医薬の場合、主に細胞質において機能を発揮することから、細胞質に効率よくデリバリーする必要がある。従って核酸医薬によって自然免疫を活性化する場合においても、細胞質にて自然免疫受容体に認識された方が自然免疫活性化と核酸医薬本来の薬理作用の両方を効率よく誘導できるのではないかと考えた。そこで今回は細胞質にて二本鎖 RNA を認識し自然免疫を活性化する RIG-I を標的として 3ptsRNA を設計・開発した。これまでの報告より RIG-I は、①5' 末端に 3リン酸基を有する 19bp 以上の二本鎖 RNA を強く認識するとともに、②Sticky end よりも Blunt end を有する二本鎖 RNA によって強く活性化することが明らかとなっている。まず初めに CIP 処理により 5' 末端の 3リン酸基を除いた 3ptsRNA を調製し、自然免疫活性化能を検討した。その結果、CIP 処理により I 型および III 型 IFN の mRNA 量は 100 倍以上減少した。従って、3ptsRNA による自然免疫活性化においては 5' 末端の 3リン酸基が極めて重要であることが示された。一方で、CIP 処理した 3ptsRNA の場合、IFN- β mRNA 量はほぼバックグラウンドレベルであり、約 1/1000 に発現が抑制された。しかし、III 型 IFN の場合には約 1/100 に mRNA 量が減少しただけであり、Non-treated cells と比較すると、依然として 100 倍以上の mRNA が検出された。従って III 型 IFN に関しては 5' 末端の 3リン酸基依存的な誘導経路と非依存的な誘導経路が存在するのかもしれない。

さらに 3ptsRNA による自然免疫活性化経路について検討したところ、RIG-I をノックダウンすることで

大きく I 型および III 型 IFN 発現量が減少したことから、3ptsRNA は設計通り RIG-I に認識されることで自然免疫を活性化することが明らかとなった。一方で TLR3 については、TLR のみをノックダウンしても 3ptsRNA による IFN 発現誘導には大きな影響は観察されなかった。しかし、TLR3 と RIG-I の両者を同時にノックダウンした場合には、RIG-I のみをノックダウンした場合と比較して優位に高いノックダウン効率が得られた。従って 3ptsRNA は主に RIG-I を介して自然免疫を活性化するものの、TLR3 も一部関与することが明らかとなった。TLR3 は主にエンドソーム/ライソソーム膜に局在することが知られている。従って 3ptsRNA は内在化後、エンドソーム/ライソソームを脱出する以前に TLR3 に認識されていることが示唆された。

これまでに siRNA の末端構造 (Blunt or Sticky end) は、siRNA のどちらの RNA 鎖が RISC に取り込まれるかを決定する重要な因子であることが明らかとなっている。すなわち、アンチセンス鎖の 3' 末端が 2 塩基突出した構造の方が高いノックダウン効率を有することが報告されている (Sano et al., *Nucleic Acid Res.*, 2008)。一方で、RIG-I による自然免疫活性化においては 5' 末端に 3リン酸基を有する末端が Blunt end の方が高い自然免疫活性化能を有することが明らかとなっている (Schlee et al., *Immunity*, 2009)。そこで 3ptsRNA では末端構造を Blunt にすべきか Sticky にすべきか明らかにするため、末端が Blunt end のものと Sticky end のものを調製し、HCV ゲノムに対するノックダウン効率を自然免疫活性化能を検討した。その結果、まずノックダウン効率については、平均値では Sticky end の方が高いノックダウン効率を示したが、Blunt end と比較し有意な差は観察されなかった。これは HCV ゲノムの場合、複製過程でマイナス鎖も形成されるため、3ptsRNA のどちらの Strand が取り込まれても HCV ゲノムのプラス鎖マイナス鎖とどちらかがノックダウンされたためと考察された。次に自然免疫活性化能について検討したところ、こちらについても Blunt end および Sticky end とともに同程度の IFN 発現誘導を示した。これは 3ptsRNA は複雑な構造

をとるために、単純な二本鎖 RNA とは RIG-I の認識機構が異なる可能性が考えられた。以上の結果より、3ptsRNA では Sticky end を有していても優れたノックダウン効率および自然免疫活性化能を有することが示された。

これまでに HCV レプリコン発現細胞としては Huh7.5.1 細胞が汎用されている。Huh7.5.1 細胞は RIG-I 遺伝子に変異を有しているため、HCV レプリコンゲノムによる自然免疫活性化が起こらず HCV レプリコンが増殖しやすい環境となっている。一方で Huh7.5.1 細胞では自然免疫活性化が HCV 増殖に及ぼす影響を評価できない。実際に我々も Huh7.5.1 細胞に 3ptsRNA を作用させたところ、IFN 発現の誘導は観察されなかった。そこで本検討では Hec1B 細胞を用いた。Hec1B 細胞は子宮内膜癌細胞株であるが、miR-122a を過剰発現させることで HCV ゲノムが増殖可能であることが報告されている。さらに我々の検討において Hec1B/miR-122a 細胞では RIG-I 経路が機能していることが示された。そこで Hec1B/miR-122a 細胞より作製された HCV レプリコン発現細胞に 3ptsRNA を Transfection し、HCV レプリコン増殖抑制能について検討した。しかしながら、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞では自然免疫活性化と RNA 干渉による HCV ゲノムノックダウンの相加効果は観察されなかった。この理由としては、Hec1B/miR-122a 細胞では自然免疫活性化による HCV ゲノム増殖抑制効果が弱いのかかもしれない。Hec1B 細胞は I 型 IFN 受容体が発現していない。一方で、RIG-I 経路が活性化すると I 型 IFN 非依存的に IFN-stimulated gene (ISG) の発現が誘導されることが報告されており、Hec1B 細胞でも I 型 IFN 非依存的に ISG が誘導され、HCV レプリコンゲノム量が低下したと思われる。しかしながら I 型 IFN による ISG 発現誘導が起こらないために、十分な抑制が観察されなかったと思われる。現在のところ、HCV レプリコンが維持・増殖可能で、自然免疫活性化も同時に評価可能な細胞は他に報告されていない。今後そのような評価系が開発されれば、3ptsRNA の機能に関しても、より詳細に解析でき

るものと期待される。

E. 結論

1. 3ptsRNA は、主に RIG-I を介して自然免疫を活性化させること、そのためには5'末端の3リン酸基が重要であることが示された。
2. 3ptsRNA の末端は、Blunt end, Sticky end どちらでも同等の自然免疫活性化能およびノックダウン効率を有することが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

- (1) Takayama K., Kawabata K., Inamura M., Ohashi K., Nagamoto Y., Okuno H., Yamaguchi T., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision., *Development*, 1: 91-100 (2014)

G-2 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

「抗 C 型肝炎ウイルス活性と高いインターフェロン誘導能を併せ持つ高機能型核酸

医薬の創製に関する研究」

総括研究報告書

miR-122a に対する阻害能と I 型インターフェロン誘導能を兼ね備えたアンチ

センスオリゴヌクレオチドの開発

分担研究者 櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

C型肝炎はC型肝炎ウイルス（HCV）の慢性感染によって引き起こされる疾患であり、高効率に肝硬変や肝臓に移行することから大きな社会問題となっている。現在C型肝炎治療薬としては、Interferon（IFN）およびリバビリンが第一選択薬であるが、HCVの感染・増殖を規定する細胞側因子を標的とした新規治療薬の開発に期待が寄せられている。最近、肝臓特異的microRNA（miRNA）であるmiR-122aがHCVの感染・増殖を規定する新たな細胞側因子であることが報告された。miR-122aはHCVゲノムの5'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合することにより、HCVゲノムの安定化および翻訳を促進し、HCVの感染を正に制御している。従って、miR-122aを高効率かつ特異的に阻害できれば、HCVの感染を阻害できると考えられる。実際に、miR-122aのアンチセンスオリゴヌクレオチド（Antisense oligonucleotide; ASO）が抗HCV薬として開発され、臨床試験が行われている。一方でASOなどの核酸医薬は、副作用軽減のため自然免疫を活性化しないように設計されており、患者自身の免疫能を十分に活用できていない。核酸医薬品においても、自然免疫活性化能を付与しIFN産生を誘導可能になれば、ASO本来のHCV感染抑制機構に加えて、IFNによる抗HCV活性を誘導することが可能となり、さらに高い治療効果を誘導できるのではないかと考えた。これまでの研究により、細胞質において非自己RNAを認識するRIG-I（Retinoic acid-inducible gene-I）を活性化させると高効率にIFN産生を誘導できることが報告されている。RIG-Iは、5'末端に3リン酸基を持つ二本鎖RNAと高い親和性を有することから、本研究ではmiR-122aのアンチセンス配列にRIG-Iに結合可能な5'末端に三リン酸基をもつ二本鎖RNAをつなげた新規ASOであるLNA122-DSを開発し、昨年度までに、LNA122-DSのmiR-122a阻害能、1型IFN誘導能およびHCV増殖抑制効果について明らかにした。本年度は、LNA122-DSの3型IFN誘導能について詳細に検討するとともに、LNA122-DSによる自然免疫活性化がHCVゲノムの増殖抑制に及ぼす寄与について検討した。

研究代表者
 山口 朋子 独立行政法人医薬基盤研究所
 研究員

協力研究者
 水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科
 教授

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科
 助教

坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科
 教授

福原 崇介 大阪大学微生物病研究所
 助教

松浦 善治 大阪大学微生物病研究所
 教授

加藤 宣之 岡山大学大学院医歯薬総合研究科
 教授

A. 研究目的

プラス鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持つエンベロープウイルスである C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus; HCV) は、文字通り C 型肝炎の原因ウイルスであることから、公衆衛生上最も重要なウイルスの一つである。HCV 感染者は、現在我が国において 200 万人、全世界では 1 億 7 千万人の C 型肝炎患者がいるとされており、C 型肝炎は現在世界最大のウイルス感染症の一つである。HCV は肝細胞に感染後、30%の患者では一過性の急性肝炎ののち自然排除され治療するものの、残り 70%の患者では慢性肝炎となり、20-30 年の歳月をかけて肝硬変、肝癌へと進展する。現在、C 型肝炎治療薬の標準治療薬はペグ化 1 型インターフェロン (PEGylated interferon; PEG-IFN) とリバビリンの併用療法である。両薬剤併用により著効率 (Sustained virological response (SVR) 率; 治療終了後 6 ヶ月の時点まで HCV の RNA ゲノムが検出されない状態が持続している割合) は飛躍的に向上したが、難治性とされる遺伝子型 1b・高ウイルス量症例では、PEG-IFN とリバビリンの併用でも SVR 率は 50%であり、半数の症例で HCV ゲノ

ムを排除できない。また、国内においては HCV 感染者数は減少傾向であるものの、世界的には発展途上国を中心に患者数が増加している。従って、新規 C 型肝炎治療薬の開発は国家的な重要課題であると言える。

近年、HCV の増殖に関与する新規細胞内因子として、肝臓特異的な microRNA (miRNA) である miRNA-122a が同定された。miR-122a は、肝細胞において約 50000 コピー/cell も発現しており、肝細胞中の全 miRNA の約 70%を占めている。この miR-122a は HCV ゲノムの 5'非翻訳領域に存在する部分的相補配列に結合し、HCV の感染・増殖を正に制御することが報告されている。HCV ゲノムの 5'非翻訳領域にある miR-122a の部分的相補配列は、全ての HCV 遺伝子型で保存されているため、日本人の約 7 割を占める遺伝子型 1b でも、miR-122a を阻害すれば HCV に対して抑制的に働くことが期待される。このような背景の中で、デンマークのサンタリス社により、C 型肝炎治療薬として miR-122a のアンチセンスオリゴヌクレオチド (Antisense oligonucleotide; ASO) が開発され、現在第二相臨床試験まで進んでいる。この miR-122a に対する ASO は、世界初の microRNA を標的とした治療薬として注目されている。

一方で ASO や small interfering RNA (siRNA) などの核酸医薬品は、副作用をさけるために IFN 産生を誘導しないように設計されている。しかしながら、C 型肝炎治療薬として IFN 製剤が使用されていることを考慮すると、核酸医薬品においても自然免疫活性化能を付与し 1 型 IFN 産生を誘導可能になれば、miR-122a 阻害による HCV 感染抑制機構に加えて、1 型 IFN による抗 HCV 活性を誘導することが可能となり、さらに高い治療効果を誘導することが期待される。

これまでの研究により、細胞質において非自己 RNA を認識する RIG-I (Retinoic acid-inducible gene-1) を活性化させると高効率に 1 型 IFN 産生を誘導できることが報告されている。また RIG-I は、5'末端に 3 リン酸基を

持つ二本鎖 RNA と高い親和性を有することが知られている。そこで我々は、miR-122a に対する ASO に、従来の miR-122a 阻害効果に加え IFN 発現誘導能を付与することを試みた。すなわち、miR-122a のアンチセンス配列に RIG-I に結合可能な 5' 末端に三リン酸基をもつ二本鎖 RNA をつなげた新規 ASO である LNA122-DS を開発した。我々はこれまでに LNA122-DS の miR-122a 阻害能、1 型 IFN 産生誘導能および HCV 感染阻害能を明らかにしてきた。今年度は、LNA122-DS の自然免疫活性化機構ならびに 3 型 IFN 発現誘導について検討した。

B. 研究方法

1. LNA122-DS の作製

5' 末端に三リン酸基をもつ一本鎖 RNA (3pssRNA) を合成するために、*in vitro* 転写をする際の Template となる T7 プロモーターを有した合成オリゴ DNA を作製した。作製した合成オリゴ DNA および MEGAshortscript kit (ambion) を用いて 3pssRNA の合成を行った。合成に用いたオリゴ DNA の配列を Table 1 に示す。合成した 3pssRNA を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて Native-PAGE を行ったのち目的のバンド位置の RNA を切り出し、ポリアクリルアミドゲルから RNA を回収した。回収した 3pssRNA と miR-122a に対する相補配列を有した ASO を等量で混合した後、アニーリングし LNA122-DS を作製した。miR-122a に対する相補配列は、サンタリス社が臨床試験を進めている ASO と同一の配列を用いた。Locked nucleic acid (LNA) による修飾部位 (塩基) についてもサンタリス社の ASO を同じ部位を LNA とした。目的の二本鎖 RNA が形成されていることを確認するために、上記の同じ条件で Native-PAGE を行った。

2. LNA122-DS による 3 型 IFN 発現誘導に関する検討

ヒト肝細胞株 PH5CH8 細胞 (岡山大学・加藤宣之先生よりご供与) および Hec1B/miR-122a-Con1

細胞 (miR-122a を発現する Hec1B 細胞 (ヒト子宮内膜癌細胞株) に Con1 株の HCV レプリコンゲノムを導入した細胞) を 12well plate に 5×10^5 cell/well で播種し、24 時間後に、100nM で各種 ASO を Transfection した。その後、細胞から total RNA を回収、DNase I で処理したのちに、逆転写を行った。得られた cDNA を鋳型として定量的 RT-PCR を行い、各種遺伝子の mRNA 発現量の測定を行った。このとき、内部標準として GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) mRNA 量の測定も同時に行った。

3. LNA122-DS による 3 型 IFN 誘導機構に関する検討

ヒト肝細胞株 PH5CH8 細胞を 12well plate に 2×10^5 cells/well で播種するとともに、Reverse Transfection により RIG-I に対する siRNA もしくは Control siRNA を 10 nM で Transfection した。24 時間後に培地交換を行った後、合計 48 時間培養した。その後、LNA122-DS を 100 nM で Transfection し、4 時間後に培地交換を行った。LNA122-DS を Transfection 12 時間後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により 3 型 IFN mRNA 量を検討した。

4. LNA122-DS による自然免疫活性化が HCV 増殖抑制に及ぼす影響に関する検討

Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に RIG-I もしくは IPS-1 に対する siRNA を 100nM で Transfection した。48 時間後、細胞を 24well plate に 1×10^5 cell/well で播種した。細胞播種 24 時間後、LNA122-DS を 100nM で Transfection し、LNA122-DS を Transfection 24 時間後に HCV レプリコンゲノム量を定量的 RT-PCR により定量した。

また LNA122-DS の 5' 末端の 3 リン酸基を Calf Intestine Phosphatase (CIP) 処理により取り除いたのち、Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に Transfection した。24 時間後に Total RNA を回収し、定量的 RT-PCR により IFN- β mRNA 量および HCV レプリコンゲノム量を測定した。

C. 研究結果

1. LNA122-DS による 3 型 IFN 発現誘導に関する検討

昨年までに検討により、LNA122-DS を Transfection することにより 1 型 IFN ならびに IFN-stimulated gene (ISG) を誘導可能であることを明らかにしている。そこで本年度は LNA122-DS による 3 型 IFN (IFN- λ) の発現誘導に関して検討を行った。まず初めに Hec1B/miR-122a-Con1 細胞および PH5CH8 細胞における 3 型 IFN 受容体の発現について検討した。3 型 IFN 受容体は、IL10R2 と IFN λ R1 のヘテロダイマーであるが、PH5CH8 細胞の方が Hec1B/miR-122a-Con1 細胞よりも約 6-7 倍高いものの、両細胞において IL10R2 と IFN λ R1 の有意な発現が認められた。

そこで次に LNA122-DS 作用後の 3 型 IFN 発現量について検討した。まず PH5CH8 細胞においては、IFN- λ 1, 2, 3 とともに Transfection 6 時間後から mRNA 量の有意な上昇が観察され、12 時間後にピークを迎え、Transfection 前を比較し、1000 倍以上の発現上昇が観察された。一方で従来の ASO である LNA122 や Control LNA 作用群においては 3 型 IFN mRNA 量の上昇は観察されなかった。また Hec1B/miR-122a-Con1 細胞では、PH5CH8 細胞と比べると発現量は低いものの、LNA122-DS によって全ての 3 型 IFN において約 100 倍の mRNA の上昇が観察された。Hec1B/miR-122a-Con1 細胞においても従来の ASO 作用群において 3 型 IFN の発現誘導は観察されなかった。以上の結果より、LNA122-DS は 1 型 IFN のみならず、3 型 IFN を誘導可能であることが示された。

2. LNA122-DS による 3 型 IFN 誘導機構に関する検討

次に LNA122-DS による 3 型 IFN の発現誘導がどのような機構で起こっているか検討することとした。昨年度までの検討において、LNA122-DS による 1 型 IFN の発現誘導には主に RIG-I が関与することが明らかとなっている。そこで siRNA を用い

て RIG-I をノックダウンした細胞に LNA122-DS を導入し、3 型 IFN の発現量を検討した。その結果、RIG-I をノックダウンすることで、全ての 3 型 IFN において 1/100 以下に mRNA 量が減少した。以上の結果より、LNA122-DS による 3 型 IFN の発現誘導においても RIG-I が主に関与していることが明らかとなった。

3. LNA122-DS による自然免疫活性化が HCV 増殖抑制に及ぼす影響に関する検討

そこで次に LNA122-DS による HCV レプリコン増殖抑制効果に、LNA122-DS の自然免疫活性化がどの程度関与しているか明らかにするため、RIG-I および IPS-1 をノックダウンした Hec1B/miR-122a-Con1 細胞に LNA122-DS を Transfection し、HCV ゲノム量を定量した。その結果、RIG-I や IPS-1 をノックダウンした細胞においても、LNA122-DS によって Control siRNA 作用群と同程度の HCV レプリコンゲノム量の減少が観察された。なお、RIG-I および IPS-1 のノックダウンのみにおいては明らかな HCV レプリコンゲノム量の変化は観察されなかった。以上の結果より、LNA122-DS は肝細胞において自然免疫を活性化し、従来の ASO である miR-122a に対する ASO より高い HCV 増殖抑制効果を示すものの、それにおける自然免疫活性化の寄与は低いことが示唆された。

D. 考察

本年度はLNA122-DSによる3型IFNの発現誘導に関して検討を行った。3型IFNは1型IFNを比較すると、非常に多くのmRNA量が発現誘導されてくる。また3型IFNは肝細胞においても自然免疫活性化によって強く誘導される。これまでも3型IFNがHCVのみならず、他のウイルス感染症に対しても有効であることが報告されている。しかし3型IFNの発現誘導機構についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで本年度はLNA122-DSによる3型IFN誘導について検討を行った。

これまでにLNA122-DSによる1型IFNの発現誘導には主にRIG-Iが関与していることを明らかにしていることから、3型IFNの発現誘導にもRIG-Iが関与していると考え、RIG-Iの関与について検討した。siRNAを用いてRIG-Iをノックダウンしたところ、LNA122-DSによる3型IFNのmRNAは大きく減少した。従って、LNA122-DSによる3型IFNの発現誘導には、RIG-Iが関与していることが示された。これまでに研究により、RIG-Iの下流ではIRF3およびIRF7が活性化すること、3型IFNの発現にはIRF3およびIRF7が関与することが報告されており、今回の結果はそれらの報告と一致するものと思われる。

これまでの検討によりLNA122-DSはmiR-122aを阻害するとともに、1型および3型IFNの発現を強く誘導することが示された。またHCVcc (JFH-1株)の感染増殖も、従来のmiR-122aに対するASOと比較し強く抑制した。そこで、LNA122-DSによる強力なHCV感染増殖抑制効果において、LNA122-DSによるIFN発現誘導がどの程度寄与しているか検討するため、RIG-Iをノックダウンした Hec1B/miR-122-Con1 細胞に LNA122-DS を Transfectionし、HCVレプリコンゲノム量を検討した。その結果、RIG-Iをノックダウンした細胞においても、Control細胞と比較しLNA122-DSによるHCV感染増殖抑制効果は同程度であった。IFNの発現誘導が観察されないHuh7.5.1 1bFeo細胞においても、LNA122-DSはmiR-122に対する

ASOよりも高いHCV増殖抑制効果を示したことを考えると、LNA122-DSはその特徴的な構造から自然免疫活性化やmiR-122a阻害以外のメカニズムを介してHCV増殖抑制効果を示している可能性が考えられた。例えばTLR3の関与が考えられる。最近、LNA122-DSと類似した構造を有する核酸医薬品がTLR3のリガンドとなることが報告された (Matsumoto et al., Nature Commun. 2015)。TLR3シグナルによってもIRF3およびIRF7が活性化することから、ひょっとしたらLNA122-DSは主にはRIG-Iを介して自然免疫を活性化するものの、TLR3を介した経路も活性化しているのかもしれない。またDouble-stranded RNA-dependent Protein Kinase (PKR)を介したシグナルを活性化している可能性も考えられる。PKRも5'末端に3リン酸基を有する二本鎖RNAを認識して下流のシグナルを活性化する。LNA122-DSによるHCV増殖抑制効果のメカニズム解明に関しては、更なる検討が必要である。

E. 結論

1. LNA122-DSは、主にRIG-Iを介して3型IFNの発現を誘導することが示された。
2. LNA122-DSによるHCV増殖抑制効果は、miR-122a阻害や自然免疫活性化以外の経路も存在することが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G-研究発表

G-1 論文発表

該当無し

G-2 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

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 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|--------------------|----|--------|------|
| Takayama K., Kawabata K., Inamura M., Ohashi K., Nagamoto Y., Okuno H., Yamaguchi T. , Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H. | CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision. | Development | 1 | 91-100 | 2014 |
| | | | | | |
| | | | | | |

RESEARCH ARTICLE

STEM CELLS AND REGENERATION

CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision

Kazuo Takayama^{1,2,3}, Kenji Kawabata⁴, Yasuhito Nagamoto^{1,2}, Mitsuru Inamura¹, Kazuo Ohashi⁵, Hiroko Okuno¹, Tomoko Yamaguchi⁴, Katsuhisa Tashiro⁴, Fuminori Sakurai¹, Takao Hayakawa⁶, Teruo Okano⁵, Miho Kusada Furue^{7,8} and Hiroyuki Mizuguchi^{1,2,3,9,*}

ABSTRACT

Human embryonic stem cells (hESCs) and their derivatives are expected to be used in drug discovery, regenerative medicine and the study of human embryogenesis. Because hepatocyte differentiation from hESCs has the potential to recapitulate human liver development *in vivo*, we employed this differentiation method to investigate the molecular mechanisms underlying human hepatocyte differentiation. A previous study has shown that a gradient of transforming growth factor beta (TGF β) signaling is required to segregate hepatocyte and cholangiocyte lineages from hepatoblasts. Although CCAAT/enhancer binding proteins (c/EBPs) are known to be important transcription factors in liver development, the relationship between TGF β signaling and c/EBP-mediated transcriptional regulation in the hepatoblast fate decision is not well known. To clarify this relationship, we examined whether c/EBPs could determine the hepatoblast fate decision via regulation of TGF β receptor 2 (TGFR2) expression in the hepatoblast-like cells differentiated from hESCs. We found that TGFR2 promoter activity was negatively regulated by c/EBP α and positively regulated by c/EBP β . Moreover, c/EBP α overexpression could promote hepatocyte differentiation by suppressing TGFR2 expression, whereas c/EBP β overexpression could promote cholangiocyte differentiation by enhancing TGFR2 expression. Our findings demonstrated that c/EBP α and c/EBP β determine the lineage commitment of hepatoblasts by negatively and positively regulating the expression of a common target gene, TGFR2, respectively.

KEY WORDS: Hepatoblasts, c/EBP, CEBP, Human ESCs

INTRODUCTION

Many animal models, such as chick, *Xenopus*, zebrafish and mouse, have been used to investigate the molecular mechanisms of liver development. Because many functions of the key molecules in liver

development are conserved in these species, studies on liver development in these animals can be highly informative with respect that in humans. However, some functions of important molecules in liver development might differ between human and other species. Although analysis using genetically modified mice has been successfully performed, it is not of course possible to perform genetic experiments to elucidate molecular mechanisms of liver development in human. Pluripotent stem cells, such as human embryonic stem cells (hESCs), are expected to overcome some of these problems in the study of human embryogenesis, including liver development, because the gene expression profiles of this model are similar to those in normal liver development (Agarwal et al., 2008; DeLaForest et al., 2011).

During liver development, hepatoblasts differentiate into hepatocytes and cholangiocytes. A previous study has shown that a high concentration of transforming growth factor beta (TGF β) could give rise to cholangiocyte differentiation from hepatoblasts (Clotman et al., 2005). To transmit the TGF β signaling, TGF β receptor 2 (TGFR2) has to be stimulated by TGF β 1, TGF β 2 or TGF β 3 (Kitisin et al., 2007). TGF β binding to the extracellular domain of TGFR2 induces a conformational change, resulting in the phosphorylation and activation of TGFR1. TGFR1 phosphorylates SMAD2 or SMAD3, which binds to SMAD4, and then the SMAD complexes move into the nucleus and function as transcription factors to express various kinds of differentiation-related genes (Kitisin et al., 2007). Although the function of TGFR2 in regeneration of the adult liver has been thoroughly examined (Oe et al., 2004), the function of TGFR2 in the hepatoblast fate decision has not been elucidated.

CCAAT/enhancer binding protein (c/EBP) transcription factors play decisive roles in the differentiation of various cell types, including hepatocytes (Tomizawa et al., 1998; Yamasaki et al., 2006). The analysis of c/EBP α (*Cebpa*) knockout mice has shown that many abnormal pseudoglandular structures, which co-express antigens specific for both hepatocytes and cholangiocytes, are present in the liver parenchyma (Tomizawa et al., 1998). These data demonstrated that c/EBP α plays an important role in hepatocyte differentiation. It is also known that the suppression of c/EBP α expression in periportal hepatoblasts stimulates cholangiocyte differentiation (Yamasaki et al., 2006). Although the function of c/EBP α in liver development is well known, the relationship between TGF β signaling and c/EBP α -mediated transcriptional regulation in the hepatoblast fate decision is poorly understood. c/EBP β is also known to be an important factor for liver function (Chen et al., 2000), although the function of c/EBP β in the cell fate decision of hepatoblasts is not well known. c/EBP α and c/EBP β bind to the same DNA binding site. However, the promoter activity of hepatocyte-specific genes, such as those encoding hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6, also known as ONECUT1) and UGT2B1,

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan. ²Laboratory of Hepatocyte Differentiation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan. ³IPS Cell-based Research Project on Hepatic Toxicity and Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan. ⁴Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan. ⁵Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Tokyo 162-8666, Japan. ⁶Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan. ⁷Laboratory of Embryonic Stem Cell Cultures, Department of Disease Bioresources Research, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan. ⁸Department of Embryonic Stem Cell Research, Field of Stem Cell Research, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan. ⁹The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan.

*Author for correspondence (mizuguch@pms.osaka-u.ac.jp)

Received 27 August 2013; Accepted 3 October 2013

is positively regulated by *c/EBP α* but not *c/EBP β* (Hansen et al., 1998; Plumb-Rudewicz et al., 2004), suggesting that the functions of *c/EBP α* and *c/EBP β* in the hepatoblast fate decision might be different.

In the present study, we first examined the function of TGFBR2 in the hepatoblast fate decision using hESC-derived hepatoblast-like cells, which have the ability to self-replicate, differentiate into both hepatocyte and cholangiocyte lineages, and repopulate the liver of carbon tetrachloride (CCl₄)-treated immunodeficient mice. *In vitro* gain- and loss-of-function analyses and *in vivo* transplantation analysis were performed. Next, we investigated how TGFBR2 expression is regulated in the hepatoblast fate decision. Finally, we examined whether our findings could be reproduced in delta-like 1 homolog (Dlk1)-positive hepatoblasts obtained from the liver of E13.5 mice. To the best of our knowledge, this study provides the first evidence of *c/EBP*-mediated regulation of TGFBR2 expression in the human hepatoblast fate decision.

RESULTS

Hepatoblast-like cells are generated from hESCs

First, we investigated whether the hepatoblast-like cells (HBCs), which were differentiated from hESCs as described in supplementary material Fig. S1A, have similar characteristics to human hepatoblasts. We recently found that hESC-derived HBCs could be purified and maintained on human laminin III (LN111)-coated dishes (Takayama et al., 2013). The long-term cultured HBC population (HBCs passaged more than three times were used in this study) were nearly homogeneous and expressed human hepatoblast markers such as alpha-fetoprotein (AFP), albumin (ALB), cytokeratin 19 (CK19, also known as KRT19) and EPCAM (Schmelzer et al., 2007) (supplementary material Fig. S1B). In addition, most of the colonies observed on human LN111-coated plates were ALB and CK19 double positive, although a few colonies were ALB single positive, CK19 single positive, or ALB and CK19 double negative (supplementary material Fig. S1C). To examine the hepatocyte differentiation capacity of the HBCs *in vivo*, these cells were transplanted into CCl₄-treated immunodeficient mice. The hepatocyte functionality of the transplanted cells was assessed by measuring secreted human ALB levels in the recipient mice (supplementary material Fig. S1D). Human ALB serum was detected in the mice that were transplanted with the HBCs, but not in the control mice. These results demonstrated that the HBCs generated from hESCs have similar characteristics to human hepatoblasts and would therefore provide a valuable tool to investigate the mechanisms of human liver development. In the present study, HBCs generated from hESCs were used to elucidate the mechanisms of the hepatoblast fate decision.

TGFBR2 expression is decreased in hepatocyte differentiation but increased in cholangiocyte differentiation

The HBCs used in this study have the ability to differentiate into both hepatocyte-like cells [cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) positive; Fig. 1B] and cholangiocyte-like cells (CK19 positive; Fig. 1C) (the protocols are described in Fig. 1A). Because the expression pattern of TGFBR2 during differentiation from hepatoblasts is not well known, we examined it in hepatocyte and cholangiocyte differentiation from HBCs. *TGFBR2* was downregulated during hepatocyte differentiation from HBCs (Fig. 1D), but upregulated in cholangiocyte differentiation from HBCs (Fig. 1E). After the HBCs were cultured on Matrigel, the cells were fractionated into three populations according to the level of TGFBR2 expression (TGFBR2-negative, -lo or -hi; Fig. 1F). The

HBC-derived TGFBR2-lo cells strongly expressed *αAT* and *CYP3A4* (hepatocyte markers), whereas the HBC-derived TGFBR2-hi cells strongly expressed *SOX9* and integrin $\beta 4$ (*ITGB4*) (cholangiocyte markers). These data suggest that the TGFBR2 expression level is decreased in hepatic differentiation, but increased in biliary differentiation of the HBCs.

The cell fate decision of HBCs is regulated by TGF β signals

To examine the function of TGF $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ (all of which are ligands of TGFBR2) in the hepatoblast fate decision, HBCs were cultured in medium containing TGF $\beta 1$, $\beta 2$ or $\beta 3$ (Fig. 2A,B). The expression levels of cholangiocyte marker genes were upregulated by addition of TGF $\beta 1$ or TGF $\beta 2$, but not TGF $\beta 3$ (Fig. 2A), whereas those of hepatocyte markers were downregulated by addition of TGF $\beta 1$ or TGF $\beta 2$ (Fig. 2B). To ascertain that TGFBR2 is also important in the hepatoblast fate decision, HBCs were cultured in medium containing SB-431542, which inhibits TGF β signaling (Fig. 2C,D). Hepatocyte marker genes were upregulated by inhibition of TGF β signaling (Fig. 2C), whereas cholangiocyte markers were downregulated (Fig. 2D). To confirm the function of TGF $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$ in the hepatoblast fate decision, colony assays of the HBCs were performed in the presence or absence of TGF $\beta 1$, $\beta 2$ or $\beta 3$ (Fig. 2E). The number of CK19 single-positive colonies was significantly increased in TGF $\beta 1$ - or $\beta 2$ -treated HBCs. By contrast, the number of ALB and CK19 double-positive colonies was reduced in TGF $\beta 1$ -, $\beta 2$ - or $\beta 3$ -treated HBCs. These data indicated that TGF $\beta 1$ and $\beta 2$ positively regulate the biliary differentiation of HBCs. Taken together, the findings suggested that TGFBR2 might be a key molecule in the regulation of hepato-biliary lineage segregation.

TGFBR2 plays an important role in the cell fate decision of HBCs

To examine whether TGFBR2 plays an important role in the hepatoblast fate decision, *in vitro* gain- and loss-of-function analysis of TGFBR2 was performed in the HBCs. We used siRNA in knockdown experiments (supplementary material Fig. S2) during HBC differentiation on Matrigel. Whereas TGFBR2-suppressing siRNA (si-TGFBR2) transfection upregulated the expression of hepatocyte markers, it downregulated cholangiocyte markers (Fig. 3A). si-TGFBR2 transfection increased the percentage of asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)-positive hepatocyte-like cells (Fig. 3B). By contrast, it decreased the percentage of aquaporin 1 (AQP1)-positive cholangiocyte-like cells. These results suggest that TGFBR2 knockdown promotes hepatocyte differentiation, whereas it inhibits cholangiocyte differentiation. Next, we used Ad vector to perform efficient transduction into the HBCs (supplementary material Fig. S3) and ascertained *TGFBR2* gene expression in TGFBR2-expressing Ad vector (Ad-TGFBR2)-transduced cells (supplementary material Fig. S4). Ad-TGFBR2 transduction downregulated the expression of hepatocyte markers, whereas it upregulated cholangiocyte markers (Fig. 3C). Ad-TGFBR2 transduction decreased the percentage of ASGR1-positive hepatocyte-like cells but increased the percentage of AQP1-positive cholangiocyte-like cells (Fig. 3D). These results suggest that TGFBR2 overexpression inhibits hepatocyte differentiation, whereas it promotes cholangiocyte differentiation. Taken together, these results suggest that TGFBR2 plays an important role in deciding the differentiation lineage of HBCs.

To investigate whether hepatoblasts would undergo differentiation in a TGFBR2-associated manner *in vivo*, HBCs transfected/transduced with si-control, si-TGFBR2, Ad-LacZ or Ad-