

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）

総括研究報告書

ウイルス性慢性肝疾患の病態に影響を与えるmiRNA多型の網羅的探索に関する研究

研究代表者 三木 大樹 独立行政法人理化学研究所 研究員

研究要旨：肝疾患の診療現場では、宿主のゲノム情報を活用した個別化医療が現実のものとなりつつあるが、依然として宿主の遺伝的要因が全て解明された訳ではないし、医療の個別化も満足いくものではない。本研究は、臨床応用に近い研究シーズである miRNA とそれに関連した遺伝子多型に照準を絞り、臨床で有用な情報を導き出すことを目的としている。

これまでに GWAS で得られた関連シグナルやデータベースから得られる人種別頻度情報、miRNA 配列情報、発現組織特異性、過去の文献などから、網羅的にスクリーニング対象とする miRNA 多型を絞り込み、スクリーニングから追認試験を進めた。一定の意義があっても多型からのアプローチのみでは検出し難い miRNA も多数あることが想定されたため、並行して、miRNA アレイにより肝組織および血清中での発現量を網羅的に解析し、種々の phenotype と関連する miRNA の絞り込みを行った。一連の絞り込みにあたっては、*IL28B* 多型や HLA 型との関連、予測される標的が IFN シグナル経路であるか、といった免疫システムとの関連性に特に注目して優先候補とした。また、宿主の標的遺伝子のみならず、ウイルスゲノムとの相補性についても解析を進めてきた。miRNA とその多型を軸に、ウイルス性肝炎の病態解明に様々なアプローチを試行錯誤する中から、いくつかの興味深い知見を得ることができた。

血清試料によって、肝炎の dynamic な病勢を反映できる可能性のある miRNA を複数同定しており、臨床で有用なバイオマーカーとなるよう、他のマーカーも取り入れた予測モデルの構築を試みている。また、HBV/HCV 感染や HBV ウイルスマーカーと連動する複数の miRNA について、これらがどのようなメカニズムで肝炎の病態とリンクするのかを明らかにした上で、治療標的となり得るかどうかなを見極めるために、現在、*in vitro/in vivo* の実験系で検討している。

< 研究協力者 >

豊田成司

JA北海道厚生連 札幌厚生病院 院長

狩野吉康

JA北海道厚生連 札幌厚生病院 副院長

芥田憲夫

国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 医長

越智秀典

広島大学大学院 消化器・代謝内科学 講師

ヘイズ・ネルソン

広島大学大学院 消化器・代謝内科学 特任准教授

A．研究目的

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、C 型慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療の効果を強く規定する *IL28B* 遺伝子多型が発見され、ガイドラインにも盛り込まれるなど、すでに臨床応用がなされた。他にも、GWAS は B 型慢性肝炎・C 型慢性肝炎の易罹患性、肝硬変・肝癌への進展などに関連する遺伝子多型あるいは一塩基多型 (SNP) を明らかにしてきた。しかし、GWAS ではカバーしきれないゲノム領域の存在や、統計学的検出力の不足などの問題が依然として残っている。一方で、機能を有するノン・コーディング RNA、中でも 21 ~ 25 塩基ほどの miRNA が肝疾患を含む多くの疾患で新規バイオマーカーとして期待され、これを核酸医薬の標的とした C 型慢性肝炎治療薬の臨床試験が進行中であるなど、注目が集まっている。わが国における肝炎対策が急務であるとい

う点では、臨床応用に比較的近い位置にある miRNA とそれに関連した多型を研究対象にすることは期待度が高い。また、医療の個別化を意識する点では、SNP 解析という実績のある手法を用いることは妥当である。発展目覚しい種々の大規模データベースを活用することで、効率的に、これまでの GWAS では明らかにできなかったウイルス性慢性肝疾患の病態・種々の表現型に関連する miRNA とそれに関連した多型の同定を目指す。

B．研究方法

網羅的アプローチとして GWAS データを活用し、候補アプローチとして免疫関連遺伝子との関係、ウイルスゲノムとの相補性に注目し、種々のバイオデータベースを参照した上で、200 個強の候補 SNP を抽出した。最大で B 型慢性肝炎 2,000 例、C 型慢性肝炎 5,000 例、健常人 1,000 人超のゲノム試料を用いて SNP genotyping (Invader 法) によるスクリーニングと追認試験を行った (1 ~ 2 年目に予定通り遂行した)。

また、ここまでの解析過程から、一定の意義があっても多型からのアプローチのみでは検出し難い miRNA も多数あることが想定されたため、並行して miRNA アレイで肝組織・血清の網羅的発現解析を行った (2 年目に追加した)。miRNA の発現量解析には、バイオマーカーとしての応用を念頭にヒト血清を用いるとともに、肝内の経時的な発現量変化を検討する目的で、ヒト肝細胞キメラマウスの実験系も用いている。

現在、miRNA やそれに関連した多型が表現型に影響するメカニズムにつき *in vitro/in vivo* の実験系での機能解析を進めている (2 ~ 3 年目予定通り進行中)。

サンプルと付随する臨床情報は虎の門病院、札幌厚生病院、広島大学病院とその関連病院といった研究協力施設で収集されており、解析対象とする種々の表現型については、各研究協力者からのアドバイスを受けながら選別を行った。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて、インフォームド・コンセントが得られた検体を用いて実施した。「動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して実施した。各所属研究機関の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

中国を中心に B 型肝炎との関連が報告されている *miR-146a* 上の SNP と *miR-196a2* 上の SNP について、1,500 人以上の B 型肝炎患者を解析した結果、わが国における B 型肝炎においても関連があることを明らかにし、学会発表した(Miki, *et al.* Two microRNA polymorphisms are associated with hepatitis B virus-related but not hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in the Japanese population. *AASLD 2014*).

当初、肝癌関連解析を行った GWAS のシグナルを頼りに上記のような既報のもの以外の miR-SNP の絞込みを試みたが、その方法では再現性をもって肝癌との関連を確認し得たものはなかった。そこで次に、miRNA およびその遺伝子多型の肝癌における意義を考察する上でも重要であろうと考えて、癌組織の全ゲノム解析で報告のあった高頻度変異遺伝子の発現量を baseline で規定している germline の SNP について、肝癌関連解析の GWAS データで検討した。C 型肝炎 977 例(うち肝癌合併 212 例)の解析から、これら SNP と肝癌易

罹患性とは関連が無いことを明らかにし、学会発表した(Miki, *et al.* Germline variants of highly point-mutated genes in hepatocellular carcinoma do not have strong effects on HCV-related hepatocarcinogenesis. *AASLD 2014*).

miRNA の作用を解析するに先立ち、HCV 持続感染下での肝臓内遺伝子発現パターンと遺伝子多型との関連について予備的検討を行った。C 型肝炎 133 例について解析した結果、インターフェロン誘導遺伝子群 (ISGs) の一つである *OAS1* の HCV 持続感染肝内における発現量は、HCV 非感染時リンパ球とは全く異なるパターンで *IL28B* 遺伝子多型の影響を受けていることが明らかになった。マイクロアレイ等で遺伝子発現解析を行った結果を解釈する際、感染の有無といった外的要因や遺伝子発現の臓器特異性についても十分考慮する必要があることを示す重要な知見と考え、学会発表した(Miki, *et al.* The *IL28B* SNP has a stronger regulatory effect on the expression of *OAS1* than a nearby SNP located downstream of *OAS1* in chronic HCV patients. *AASLD 2014*).

IL28B 遺伝子多型と *miR-122* 発現量の相関の報告がある。今回、*IFNL4-IL28B* の領域に存在する互いに連鎖の強い 3 つの SNP について、C 型肝炎 4,630 症例と健常人 1,122 名を用いてハプロタイプを推定した上で、Peg-IFN+Rib 併用療法の SVR 率との関連を解析した結果、ss469415590、rs12979860 の 2 つが治療効果とより強く関連することが示され、論文発表した(Ochi, Miki, *et al.* *J Gen Virol 2014*).

HCV 慢性化と *HLA-DQB1*03* および *IFNL4* あるいは *IL28B* 遺伝子多型との関連を確認するとともに、両者の相互作用を示唆する知見を得て、論文発表した(Miki, *et al.* *PLoS One 2013*). さらに、

Peg-IFN+Rib 併用療法 1,140 例を解析し、HCV 持続感染の成立に防御的に働く *HLA-DQB1*03* は SVR 率とは関連しないことを明らかにした。同じく持続感染の成立に重要な *IFNL4* 遺伝子多型が治療効果にも強く関連するのとは対照的な結果であり、学会で発表した (Miki, et al. A single amino acid substitution in HLA-DQB1 as well as an *IFNL4* variant strongly affect susceptibility to chronic hepatitis C. *AASLD 2014*)。

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、肝細胞を miRNA アレイにより検討した結果、HBV 感染によって増加する miRNA を 5 つ認め、このうち 4 つは臨床材料でも再現された (*miR-486-3p*, *miR-1908*, *miR-675*, *miR-1231*)。最も増加が顕著かつ HBV ゲノムとの相補性の高い *miR-1231* に注目して機能解析を行った。HepG2 で HBV に *miR-1231* をあわせて発現させると、HBV 複製中間体、HBV-RNA、Hbc 蛋白がいずれも抑制された。*miR-1231* と相補性の高いコア領域の発現プラスミドを *miR-1231* 発現プラスミドと共に HepG2 へ導入すると Hbc 蛋白の発現量が低下した。*miR-1231* が HBV コア領域の mRNA に結合してコア蛋白の産生を阻害することで HBV 複製を抑制することが示唆されたため、論文で発表した (Kohno, et al. *J Viral Hepat 2014*)。

miRNA のバイオマーカーとしての利用を念頭に、B 型・C 型慢性肝炎患者 (42 例・30 例) の血清中 miRNA のプロファイリングを行った。B 型よりも C 型肝炎群でより多くの miRNA の変動が認められた。*miR-122* は B・C 両群で最も強い発現亢進を認めた。HBe 抗原陽性群 (e+群) と陰性群 (e-群) は同様のプロファイルを示したものの、e-群に比して e+群で発現が有意に亢進している miRNA も複数認められた (*miR-122*, *194*, *125b*, *99a*, *100*)。多変量解析を行った結果、*miR-122* は HBV-DNA 量に、

miR-125b は HBV-DNA と HBs 抗原と HBe 抗原の量に関連していることが明らかとなった。以上、血清中の miRNA 量が肝炎の etiology の違いや病期・病勢の違いを反映し得ることを論文で発表した (Akamatsu, et al. *J Infect 2015*)。

D . 考察

これまでの網羅的解析で、miRNA の増減やその多型の効果は単独では決して大きなものではないことが分かってきた。多数の miRNA が種々の程度で増減し、複数の標的遺伝子あるいはウイルスに対して様々な効果量で作用して病態を形成・修飾していることが、明らかになってきた。

これまでに得られた基礎研究の成果を臨床応用していくために、バイオマーカーとしての利用においては、周辺情報も統合しつつ総合的な変動を捉えるような多変量を含む予測モデルの構築が必要であるし、また、創薬へと進めるためには、そのメカニズムを一つ一つ機能的な解析で明らかにしていくことが必要である。

E . 結論

ゲノム情報あるいは発現量情報を網羅的に解析することで、ウイルス性慢性肝疾患と関連する複数の miRNA あるいはそれに関連した遺伝子多型を同定した。バイオマーカーや創薬といった臨床応用を目指し、*in vitro/in vivo* の実験系での機能解析など、さらなる検証が必要である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *J Infect.* 70(3):273-87, Mar, 2015.
- 2) Honda Y, Takahashi S, Zhang Y, Ono A, Murakami E, Shi N, Kawaoka T, Miki D, Tsuge M, Hiraga N, Abe H, Ochi H, Imamura M, Aikata H, Chayama K. The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. *J Gastroenterol Hepatol.* 30(3):619-27, Mar, 2015.
- 3) Akamatsu S, Hayes CN, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group. Ribavirin dose reduction during telaprevir/ribavirin/peg-interferon therapy overcomes the effect of the ITPA gene polymorphism. *J Viral Hepat.* 22(2):166-74, Feb, 2015.
- 4) Kosaka K, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Yoshimi S, Murakami E, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Emergence of resistant variants detected by ultra-deep sequencing after asunaprevir and daclatasvir combination therapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *J Viral Hepat.* 22(2):158-65, Feb, 2015.
- 5) Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H. Quantitative Effect of Natural Killer-Cell Licensing on Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Curative Hepatectomy. *Cancer Immunol Res.* 2(12):1142-7, Dec, 2014.
- 6) Fujino H, Imamura M, Nagaoki Y, Kawakami Y, Abe H, Hayes CN, Kan H, Fukuhara T, Kobayashi T, Masaki K, Ono A, Nakahara T, Honda Y, Naeshiro N, Urabe A, Yokoyama S, Miyaki D, Murakami E, Kawaoka T, Hiraga N, Tsuge M, Hiramatsu A, Hyogo H, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Ohishi W, Chayama K; Hiroshima Liver Study Group. Predictive value of the IFNL4 polymorphism on outcome of telaprevir, peginterferon, and ribavirin therapy for older patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 49(12):1548-56, Dec, 2014.
- 7) Kawaoka T, Takahashi S, Tatsukawa Y, Hiramatsu A, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Ishiyama K, Ide K, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. Two patients treated with pegylated interferon/ribavirin/telaprevir triple therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Hepatol Res.* 44(12):1259-64, Nov, 2014.
- 8) Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by

targeting core mRNA. *J Viral Hepat.*

21(9):e89-97, Sep, 2014.

9) Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Kubo M, Chayama K. IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. *J Gen Virol.* 95(Pt 6):1297-306, Jun, 2014.

10) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(4):2105-12, Apr, 2014.

2. 学会発表

1) Miki D, Ochi H, Takahashi A, Hayes CN, Urabe Y, Abe H, Ono A, Akamatsu S, Nakahara T, Seki N, Murakami E, Zhang Y, Uchida T, Honda Y, Yoshimi S, Kobayashi T, Masaki K, Kan H, Kawaoka T, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Akuta N, Suzuki F, Ikeda K, Kumada H, Karino Y, Toyota J, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. A single amino acid substitution in HLA-DQB1 as well as an IFNL4 variant strongly affect susceptibility to chronic hepatitis C. *The Liver Meeting 2014.* Boston, USA. 2014/11/11

2) Miki D, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Kawaoka

T, Akamatsu S, Ono A, Nakahara T, Seki N, Murakami E, Zhang Y, Uchida T, Honda Y, Masaki K, Kan H, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Kubo M, Chayama K. The IL28B SNP has a stronger regulatory effect on the expression of OAS1 than a nearby SNP located downstream of OAS1 in chronic HCV patients. *The Liver Meeting 2014.* Boston, USA. 2014/11/11

3) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Kawaoka T, Ono A, Akamatsu S, Nakahara T, Seki N, Murakami E, Zhang Y, Uchida T, Honda Y, Masaki K, Kan H, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Kubo M, Chayama K. Two microRNA polymorphisms are associated with hepatitis B virus-related but not hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in the Japanese population. *The Liver Meeting 2014.* Boston, USA. 2014/11/9

4) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Ono A, Akamatsu S, Y. Urabe, Masaki K, Abe H, Kawaoka T, Nakahara T, Seki N, Murakami E, Zhang Y, Uchida T, Honda Y, Kan H, Tsuge M, Hiraga N, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Kubo M, Chayama K. Germline variants of highly point-mutated genes in hepatocellular carcinoma do not have strong effects on HCV-related hepatocarcinogenesis. *The Liver Meeting 2014.* Boston, USA. 2014/11/9

5) Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Kubo M, Chayama K. IFNL4/IL-28B haplotype structure and predictability of their variations for spontaneous and treatment-induced clearance of HCV infection in the Japanese population.

The Liver Meeting 2014. Boston, USA.

2014/11/9

6) Tsuge M, Hiraga N, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Ochi H, Hayes CN, Chayama K.

Nucleotide analogue improves interferon responsiveness in HBV-infected human hepatocytes. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/11

7) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Pretreatment

induction of ISGs in the presence of IFNL4 in hepatocytes but not in white blood cells is related with poor induction of ISGs following IFN- therapy. *The Liver Meeting 2014*.

Boston, USA. 2014/11/11

8) Hayes CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Hepatitis B

virus infection efficiency and immune response decreases with cell density in primary cultured hepatocytes. *The Liver Meeting 2014*. Boston, USA. 2014/11/11

9) 三木大樹、相方浩、大野敦司、卜部祐司、柘植雅貴、川上由育、久保充明、中村祐輔、茶山一彰。わが国における miR-146a および miR-196a2 の遺伝子多型と肝炎ウイルス関連肝発癌リスク。第 73 回日本癌学会学術総会。横浜。2014/9/26

10) 三木大樹、越智秀典、ヘイズ・ネルソン、阿部弘美、大野敦司、中原隆志、村上英介、河岡友和、柘植雅貴、平賀伸彦、今村道雄、川上由育、相方浩、高橋祥一、茶山一彰。HCV 慢性化における HLA-DQB1 の重要性:ゲノムワイド関

連解析。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。

2014/5/30

11) 阿部弘美、三木大樹、平賀伸彦、今村道雄、柘植雅貴、小林知樹、河岡友和、川上由育、相方浩、越智秀典、茶山一彰。HCV 感染における IFNL4 の多型の違いによる IFN- s の発現量とインターフェロン投与前後のインターフェロン誘導遺伝子の発現量の関係。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/30

12) 狩野吉康、山口将功、木村睦海、荒川智宏、中島知明、桑田靖昭、小関至、佐藤隆啓、大村卓味、髭修平、豊田成司、三木大樹、越智秀典、茶山一彰。HCV 関連肝疾患における IFNL3(IL28B)、IFNL4 遺伝子型乖離例の頻度と抗ウイルス療法の効果の検討。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/30

13) 村上英介、柘植雅貴、藤野初枝、菅宏美、福原崇之、小林知樹、本田洋士、中原隆志、苗代典昭、大野敦司、宮木大輔、三木大樹、河岡友和、平賀伸彦、平松憲、今村道雄、兵庫秀幸、川上由育、相方浩、茶山一彰。当院における HBs 抗原陰性化例の解析。第 50 回日本肝臓学会総会。東京。2014/5/29

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