

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09035

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスによる宿主RNA干渉経路の抑制を介した新たな肝発癌機構の解析

研究課題名(英文) Suppression of host cellular microRNA functions by hepatitis C virus infection and its possible implication in hepatocarcinogenesis

研究代表者

政木 隆博 (MASAKI, Takahiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60535657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗発癌作用を有する肝臓特異的なmicroRNA(miRNA)であるmiR-122に注目し、C型肝炎ウイルス(HCV)関連肝発癌機序の解明を目指した。HCV感染細胞ではmiR-122をはじめとする広範囲なmiRNAの機能不全が惹起されていた。その原因として、HCV構造タンパク質がmiRNAの機能発現に関与するmiRNA-induced silencing complex(miRISC)を標的とし、その機能を障害する可能性が示唆された。本研究で示されたHCVによるmiR-122機能抑制機構の詳細は、肝発癌機序の新規知見として期待される。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to test whether HCV affects the ability of microRNAs(miRNAs), including miR-122, to repress their endogenous targets, and if so, to address the underlying mechanism(s). The results showed that HCV infection led to increases in the expression of endogenous miRNA targets. This de-repression of miRNA targets was canceled in HCV subgenomic replicon(SGR) cells by supplementation of exogenous mature miRNAs. However, miRNA functions remained impaired in HCV-infected cells, suggesting the possible involvement of viral structural proteins in miRNA dysfunction. Interestingly, this miRNA dysfunction was reproduced in SGR cells by knocking down some of miRNA-induced silencing complex(miRISC) proteins, while overexpression of these proteins restored miRNA functions in HCV-infected cells. These results suggest that HCV structural proteins may induce the dysfunction of miRISC, resulting in the global de-repression of miRNA targets.

研究分野：消化器内科学、肝臓病学、ウイルス学

キーワード：HCV microRNA miR-122 miRISC 肝発癌

1. 研究開始当初の背景

直接作用型抗ウイルス薬の登場により C 型慢性肝炎の治療成績は劇的に向上したが、C 型肝炎ウイルス (HCV) 持続感染者の肝発癌は依然として高率で、治療成績も十分とはいえない。有効な治療法の開発のためには HCV 肝発癌機構のより詳細な理解が必要である。申請者は、肝臓特異的な microRNA (miRNA) である miRNA-122 (miR-122) の機能が HCV 感染により抑制されることを見出した。miR-122 は抗発癌作用を有することから、miR-122 機能の抑制は HCV による直接的な肝発癌機序の新たな知見として期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 2 項目である。

- 1) HCV 感染による宿主 miR-122 機能抑制機構の解明
- 2) miR-122 機能の抑制が細胞増殖等の細胞特性に与える影響の解析

HCV 感染による宿主 miRNA 機能制御の詳細な分子機構が明らかになれば、HCV 肝発癌機序に新たな知見をもたらす、また、新規治療標的の創出も期待できる。

3. 研究の方法

- 1) HCV 感染細胞における宿主 miRNA の網羅的発現・機能プロファイリング

HCV 感染、非感染の肝癌由来細胞株 Huh7.5.1 から RNA 抽出後マイクロアレイを施行し、HCV 感染に伴い発現変動した宿主 miRNA 及び mRNA を網羅的に解析した。マイクロアレイ結果の検証は定量 RT-PCR 法で行った。miRNA 機能は、内在性標的遺伝子の発現もしくは miRNA の標的配列を 3' UTR に有するルシフェラーゼレポータープラスミド導入後のルシフェラーゼ活性を指標に解析した。

- 2) HCV 感染細胞における miR-122 標的遺伝子の発現解析

miR-122 標的因子の細胞内発現を定量 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で検証した。また、代表的な miR-122 標的因子である SLC7A1 mRNA の 3' UTR (miR-122 の結合部位を含む) を発現するルシフェラーゼレポータープラスミドを HCV 感染細胞に導入し、48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、標的遺伝子の発現上昇が miR-122 の過剰発現もしくは阻害剤を用いた拮抗処理によりそれぞれ減弱、増大するか否かを解析した。この解析により、miR-122 標的因子の発現上昇が HCV 感染による miR-122 機能の抑制を介して起きていることを明らかにすることができる。

- 3) miR-122 機能を抑制する責任 HCV タンパク質の同定

miR-122 標的因子の発現を全長 HCV ゲノム複製細胞と構造タンパク質領域を欠失させたサブゲノミックレプリコン (SGR) 細胞間で比較し、miR-122 機能抑制が構造タンパク質、非

構造タンパク質のうち、どちらの領域に起因するのかを解析した。次に、責任領域を絞り込むために、ウイルスタンパク質を個々に発現するプラスミドを作製後細胞に導入し、miR-122 の機能解析を行った。

- 4) miR-122 の機能抑制に関与する HCV 標的宿主細胞性因子の同定

HCV 感染は miR-122 の細胞内発現量に影響を与えないことが報告されているため (Randall et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2007)、HCV は miR-122 の機能抑制に際し、その機能発現に関与する宿主細胞性因子を攻撃標的にしている可能性が考えられる。標的宿主因子を同定するために、miRNA の成熟化、機能発現に関与する代表的な細胞性因子である DICER、AGO タンパク質 1~4 に注目し、これらのタンパク質をノックダウン、もしくは過剰発現した後に HCV 感染細胞の miR-122 機能を解析した。3) で同定された HCV 領域と標的宿主因子の細胞内相互作用を検証するために、免疫蛍光細胞染色を行った。

- 5) miR-122 機能亢進・抑制肝細胞の性状解析 (細胞増殖能の解析)

miR-122 は癌抑制作用を有しており、miR-122 の過剰発現は肝癌細胞株である HepG2 細胞、Hep3B 細胞の足場非依存性増殖や遊走・浸潤能、ヌードマウスでの腫瘍形成能を抑制することが報告されている (Bai et al, J Biol Chem, 2009)。本研究では、Huh7.5.1 細胞に合成 miR-122 もしくは miR-122 阻害剤を導入し、miR-122 機能亢進、抑制時の細胞特性 (細胞増殖能) を解析した。

4. 研究成果

- 1) HCV 感染細胞における宿主 miRNA の網羅的発現・機能プロファイリング

miR-122 をはじめとする肝臓高発現の miRNA 量は HCV 感染後も不変もしくは軽度増加に留まったが、それらの標的 mRNA 発現は感染後有意に上昇しており、定量 RT-PCR でも同様の結果を得た。これは HCV 感染細胞内では miR-122 だけでなく、miRNA の全体的な機能抑制が起きている可能性を強く示唆するものと考えられた。

- 2) HCV 感染細胞における miR-122 標的遺伝子の発現解析

複数の内在性 miR-122 標的遺伝子発現が HCV 感染後に増強することを定量 RT-PCR 法で確認した。それらの遺伝子発現の増強は miR-122 阻害剤の細胞内導入により同様に再現されたが、HCV 感染との相加的な増強作用は認められなかった。これにより、HCV 感染後の miR-122 標的遺伝子発現の増強は miR-122 の機能抑制を介して起きていることが明らかとなった。

- 3) miR-122 機能を抑制する責任 HCV タンパク質の同定

miR-122 の機能抑制に関与するウイルスタンパク質領域を同定するため、全長 HCV ゲノム複製細胞と HCV 構造タンパク質を欠失さ

せた SGR 細胞を用いて miR-122 機能を比較解析した。SGR 細胞では過剰量の合成 miR-122 導入後に標的 mRNA の発現上昇が有意に抑制されたが、HCV 感染細胞では抑制されず miR-122 機能不全が持続した。さらに、同様の結果は非感染細胞に HCV 構造タンパク質領域 (C-NS2/JFH1 及び C-NS2/J6) を導入した後も再現され (図 1)、HCV 構造タンパク質領域 (特にエンベロープタンパク質領域) が miR-122 の機能抑制に関与する可能性が示唆された。

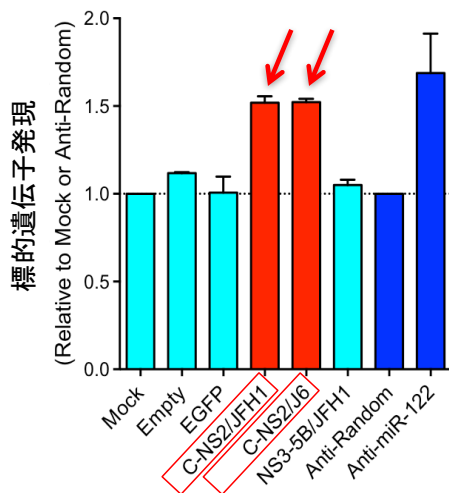


図 1: HCV 構造タンパク質による miRNA の機能抑制

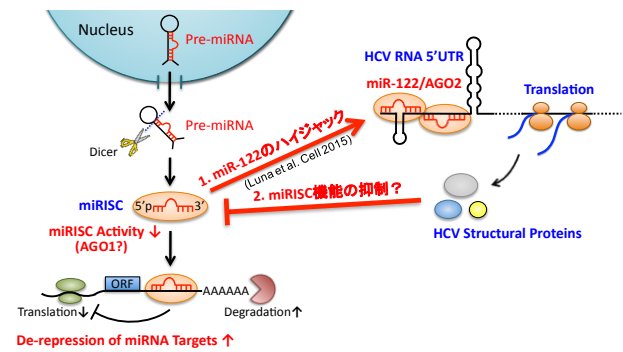
4) miR-122 の機能抑制に関与する HCV 標的宿主細胞性因子の同定

HCV が標的とする宿主細胞性因子を明らかにするため、miR-122 の成熟化に関与する宿主因子のノックダウン及び過剰発現実験を行なった。その結果、microRNA-induced silencing complex (miRISC) の構成因子のうち、AGO タンパク質を含む宿主因子のノックダウンは、SGR 細胞における miR-122 補充後の miRNA 機能回復を有意に抑制した。反対に、AGO タンパク質の過剰発現により感染細胞の miR-122 機能は顕著に回復した。免疫蛍光細胞染色により、HCV 構造タンパク質が miRISC の構成タンパク質と細胞内で共局在すること、また、全長 HCV ゲノム複製細胞では SGR 細胞と比べて細胞内の processing body 数が減少することを明らかにした。

以上の結果より、HCV 構造タンパク質が AGO タンパク質を中心とした miRISC を標的とし、その機能を障害することで、miR-122 をはじめとする広範囲な miRNA 機能不全を惹起する可能性が示唆された (図 2)。

5) miR-122 機能亢進・抑制肝細胞の性状解析 (細胞増殖能の解析)

合成 miR-122 の Huh7.5.1 細胞への導入により細胞増殖能が減弱することを見出した。miR-122 阻害剤の導入は細胞増殖能に有意な影響を与えなかった。



- HCV RNAによるmiR-122のハイジャック →→→ 機能的miR-122予備量の低下
- HCV構造タンパク質によるmiRISC機能不全 →→→ miRNA機能の全体的な抑制

図 2: 本研究結果の概要

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- Qin XY, Suzuki H, Honda M, Okada H, Kaneko S, Inoue I, Ebisui E, Hashimoto K, Carninci P, Kanki K, Tatsukawa H, Ishibashi N, Masaki T, Matsuura T, Kagechika H, Toriguchi K, Hatano E, Shirakami Y, Shiota G, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S. Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有. 2018; 115: 4969-4974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802279115>
- Mezaki Y, Nagatsuma K, Yokoyama H, Park J, Nakamura M, Masaki T, Blomhoff R, Senoo H, Matsuura T. Biochemical and histochemical analyses of lecithin: retinol acyltransferase from polar bear (*Ursus maritimus*) livers. Polar Biology. 査読有. 2018; 41: 805-815. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2241-x>
- Sugiyama R, Murayama A, Nitta S, Yamada N, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Aly HH, Shiina M, Ryo A, Ishii K, Wakita T, Kato T. Interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus influences virus production and interferon signaling. Oncotarget. 査読有. 2017; 9: 5627-5640. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23562>
- Park J, Masaki T, Mezaki Y, Yokoyama H, Nakamura M, Maehashi H, Fujimi TJ, Gouraud SS, Nagatsuma K, Nakagomi M, Kimura N, Matsuura T. Alpha-1 antichymotrypsin is involved in astrocyte injury in concert with arginine-vasopressin during the development of acute hepatic encephalopathy. PLoS One. 査読有. 2017; 12: e0189346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189346>
- 西原弘人, 小林謙一郎, 阪本直也, 岩渕千太郎, 河野緑, 政木隆博, 松浦知和. 東京都立墨東病院の感染症科外来患者にお

- ける糞便からの ESB� 産生腸内細菌の検出状況について. 医学検査. 査読有. 2017; 66: 141-146.
- 6) Nitta S, Asahina Y, Matsuda M, Yamada N, Sugiyama R, Masaki T, Suzuki R, Kato N, Watanabe M, Wakita T, Kato T. Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents. *Sci Rep*. 査読有. 2016; 6: 34652. <https://doi.org/10.1038/srep34652>
 - 7) 松浦知和, 目崎喜弘, 政木隆博, 松本喜弘, 前橋はるか, 中村まり子, 中田浩二, 朴ジョンヒョク, 横山寛. バイオ人工肝臓開発から臨床検査医学へ -空腹時 ¹³C-glucose 呼吸試験の開発-. 臨床病理. 査読無. 2016; 64: 558-563.
 - 8) Masaki T, Suzuki T. NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. *Future Virol*. 査読有. 2015; 10: 751-762. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.33>
 - 9) McGivern DR, Masaki T, Lovell W, Hamlett C, Saalau-Bethell S, Graham B. Protease inhibitors block multiple functions of the NS3/4A protease-helicase during the hepatitis C virus life cycle. *J Virol*. 査読有. 2015; 89: 5362-5370. <https://doi.org/10.1128/JVI.03188-14>
 - 10) Li Y, Yamane D, Masaki T, Lemon SM. The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA. *Nat Rev Microbiol*. 査読有. 2015; 13: 544-558. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3506>
 - 11) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Masaki T, Murayama A, Yamada N, Sugiyama R, Tsukuda S, Watashi K, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Amino acid polymorphisms in hepatitis C virus core affect infectious virus production and major histocompatibility complex class I molecule expression. *Sci Rep*. 査読有. 2015; 5: 13994-14002. <https://doi.org/10.1038/srep13994>
 - 12) 政木隆博, Lemon SM. microRNA-122 による C 型肝炎ウイルスの複製制御. ウイルス. 査読無. 2015; 65: 277-286.
- [学会発表] (計 24 件)
- 1) Masaki T, Mezaki Y, Matsuura T. Hepatitis C virus attenuates host cellular microRNA functions by targeting the microRNA-induced silencing complex. The 29th World Congress of WASPaLM2017. Kyoto. Nov 15-18, 2017.
 - 2) Park J, Masaki T, Mezaki Y, Yokoyama H, Nakamura M, Maehashi H, Matsuura T. Alpha-1 antichymotrypsin is involved in astrocyte injury during the development of acute hepatic encephalopathy. The 29th World Congress of WASPaLM2017. Kyoto. Nov 15-18, 2017.
 - 3) Yokoyama H, Mezaki Y, Masaki T, Nakamura M, Park J, Kojima S, Matsuura T. TGF- β LAP degradation products reflect fibrogenesis in patients with chronic liver disease. The 29th World Congress of WASPaLM2017. Kyoto. Nov 15-18, 2017.
 - 4) 河野緑, 政木隆博, 秋月撰子, 中田浩二, 大西明弘, 海渡健, 松浦知和. 血液培養から分離された *Helicobacter* 属菌の菌株特性と臨床的特徴に関する検討. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会. 京都. 11 月 16-19 日, 2017 年.
 - 5) 政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字, 松浦知和. C 型肝炎ウイルスは microRNA-induced silencing complex を標的として宿主 microRNA 機能を抑制する. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島. 6 月 8-9 日, 2017 年.
 - 6) 横山寛, 政木隆博, 小嶋聡一, 松浦知和. 肝炎患者における線維新生マーカー TGF- β LAP 断片の検討. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島. 6 月 8-9 日, 2017 年.
 - 7) 朴ジョンヒョク, 政木隆博, 目崎喜弘, 横山寛, 中村まり子, 前橋はるか, 松浦知和. 急性肝不全に伴う致死的肝性脳症の発症機序の解明と新規診断・治療法の開発に向けた基礎的検討. 第 43 回日本急性肝不全研究会. 広島. 6 月 7 日, 2017 年.
 - 8) 横山寛, 目崎喜弘, 政木隆博, 中村まり子, 朴ジョンヒョク, 松本喜弘, 永妻啓介, 原詳子, 井上育代, 小嶋聡一, 松浦知和. NASH の線維化における TGF- β LAP 断片 R58 抗体発現の意義. 第 30 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 富山. 11 月 25-26 日, 2016 年.
 - 9) 目崎喜弘, 永妻啓介, 横山寛, 朴ジョンヒョク, 中村まり子, 政木隆博, 妹尾春樹, 松浦知和. ホッキョクグマ肝臓レチノールエステル化酵素の生化学的および組織学的解析. 第 30 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 富山. 11 月 25-26 日, 2016 年.
 - 10) Masaki T, Kato T, Mezaki Y, Nakamura M, Matsuura T, Wakita T. Hepatitis C virus targets the microRNA-induced silencing complex and attenuates host cellular microRNA functions. The 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto. Oct 11-15, 2016.
 - 11) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Yamada N, Nitta S, Masaki T, Ishii K, Ryo A, Wakita T, Kato T. Amino acid substitutions in IFN sensitivity-determining region of HCV-NS5A affect infectious virus production and ISG induction. The 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto. Oct 11-15, 2016.
 - 12) 松浦知和, 政木隆博. 脂肪肝における肝臓インスリン抵抗性と空腹時 ¹³C-glucose

- 呼吸試験による評価. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡. 9月23-25日, 2016年.
- 13) Masaki T, Matsumoto Y, Aizaki H, Nagamori S, Watashi K, Park J, Kanai Y, Kojima S, Wakita T, Matsuura T. Induction of NTCP expression in a human HCC cell line by retinoic acid and its effect on host susceptibility to HBV infection. International HBV Meeting 2016. Seoul. Sep 21-24, 2016.
- 14) 政木隆博, 目崎喜弘, 松浦知和. C型肝炎ウイルス感染における宿主マイクロRNAの網羅的発現プロファイリングと機能解析. 第63回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸. 9月1-4日, 2016年.
- 15) 横山寛, 永妻啓介, 白井美佐子, 目崎喜弘, 政木隆博, 朴ジョンヒョク, 小嶋聡一, 松浦知和. 非アルコール性脂肪性肝炎の肝病理組織における TGF- β LAP-Dの分布とその意義. 第63回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸. 9月1-4日, 2016年.
- 16) 松浦知和, 目崎喜弘, 横山寛, 永妻啓介, 政木隆博, 小嶋聡一. 慢性肝疾患における肝線維新生マーカー TGF- β LAP-D と肝線維化マーカー M2BPGi の継時測定. 第63回日本臨床検査医学会学術集会. 神戸. 9月1-4日, 2016年.
- 17) 政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字. C型肝炎ウイルスによる宿主 microRNA 機能抑制の分子機構. 第52回日本肝臓学会総会. 千葉. 5月19-20日, 2016年.
- 18) 政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字. Inhibition of host cellular microRNA functions by hepatitis C virus infection. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡. 11月22-24日, 2015年.
- 19) 加藤孝宣, 藤田めぐみ, 杉山奈央, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字. Attenuation of MHC class I expression by intracellular accumulation of HCV core protein. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡. 11月22-24日, 2015年.
- 20) Masaki T, Kato T, Wakita T. Suppression of host cellular microRNA functions by HCV infection and its implication in the aggressiveness of hepatocellular carcinoma cells. The 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Strasbourg. Oct 9-13, 2015.
- 21) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Shin EC, Kato T. Amino acid polymorphisms in HCV core affect infectious virus production and MHC class I molecule expression. The 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Strasbourg. Oct 9-13, 2015.
- 22) 政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字. microRNA-122によるC型肝炎ウイルスゲノム複製の新規制御機構. 第51回日本肝臓学会総会. 熊本. 5月21-22日, 2015年.
- 23) 加藤孝宣, 政木隆博, 脇田隆字. C型肝炎ウイルス ISDR 変異によるインターフェロン耐性発現機序の解析. 第51回日本肝臓学会総会. 熊本. 5月21-22日, 2015年.
- 24) 新田沙由梨, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 政木隆博, 脇田隆字, 朝比奈靖浩, 加藤孝宣. HCV 感染培養系を用いた Daclatasvir 耐性変異株の抗 HCV 薬に対する薬剤感受性の評価. 第51回日本肝臓学会総会. 熊本. 5月21-22日, 2015年.

[図書] (計 1 件)

- 1) 政木隆博, 加藤孝宣. 中外医学社. Annual Review 消化器 2016, 2016, 247 ページ.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Alpha-1 アンチキモトリプシンを含む
バイオマーカー

発明者: 松浦知和, 朴ジョンヒョク, 政木隆博
権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-111441

出願年月日: 平成 29 年 6 月 6 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

政木 隆博 (MASAKI, Takahiro)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60535657

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし