

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：15301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K07972
研究課題名（和文）抗HCV薬リバビリンの中性脂肪合成抑制機序の解明とリバビリンに代わる薬剤の探索

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms of anti-HCV drug ribavirin-induced downregulation of C/EBP α and establishment of drug screening system for suppression of neutral lipid synthesis

研究代表者
佐藤 伸哉（Sato, Shinya）
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80333558
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：C型慢性肝炎治療薬の一つであるリバビリンが中性脂肪合成を抑制することを我々は以前見出した。本研究ではまず、リバビリンによる転写因子C/EBP およびSREBP1cの発現量低下が下流遺伝子であるトリグリセリド合成酵素GPAMの発現低下を誘引し細胞内中性脂肪量が減少することを見出した。そして、両転写因子によるGPAM遺伝子発現制御機序を明らかにした。さらに、C/EBP タンパク質の量を簡便的にモニタリングできる細胞アッセイ系を用いて薬剤スクリーニングを行った結果、mTORがC/EBP タンパク質の量の維持に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解明したトリグリセリド合成律速酵素であるGPAMの遺伝子発現制御機序では、C/EBP が遠位のエンハンサーとして働き、GPAMゲノムDNAの構造変化を誘引し活性化することを初めて示した。肝細胞での中性脂肪合成の亢進は脂肪肝、肝がんの発症リスクを高める。従って、本研究で得られた知見は中性脂肪合成を抑制する治療法や薬剤開発に貢献すると考えられ、肝病態発症の予防、改善に恩恵を与える。また、中性脂肪合成の亢進は、肝がんのみならず他組織でのがん発生、悪性化にも関わっており、組織の垣根を越えた抗がん作用の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We have previously demonstrated that anti-hepatitis C virus drug ribavirin reduces the amount of intracellular neutral lipids. In this study, we revealed that ribavirin-induced downregulation of C/EBP and SREBP1c reduced the level of GPAM, which is one of the limiting enzymes of triglyceride synthesis, leading to the reduction in the intracellular neutral lipids. We also revealed the mechanism of the regulation of GPAM expression by C/EBP, in which C/EBP functions as the distal enhancer to maintain an open chromatin structure at C/EBP binding regions in the GPAM genome. Furthermore, by using the cell-based assay system monitoring the level of exogenously expressed C/EBP protein, which was developed by us, and kinase screening library, we found mTOR-inhibitors reduced the level of C/EBP protein, suggesting that mTOR contributes to sustaining C/EBP protein level.

研究分野：肝臓学 ウイルス学 分子生物学

キーワード：C/EBP リバビリン GPAM 中性脂肪量 トリグリセリド合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎治療薬としてC型肝炎ウイルス(HCV)に直接作用する薬剤(DAA)が開発され、現在90%以上の著効率となった。しかし、HCV排除後の肝がん発症を予防できる薬剤はない。また、最近では、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)から非アルコール性脂肪肝炎(NASH)への進展、さらに肝がん発症が問題となっている。中性脂肪合成の亢進はがん細胞の特徴の一つであり、これらの肝疾患発症を阻止するには中性脂肪の合成を抑制することが重要な鍵となる。現在、国内外において、中性脂肪合成を阻害する薬剤の開発が行われている。脂肪酸合成酵素阻害剤が抗肥満薬として欧米で販売され、さらに抗腫瘍効果も期待されているが臨床研究段階であり、未だに特効薬がない状況である。

我々は、C型慢性肝炎治療薬として使われているリバビリンが脂質合成を抑制(肝細胞内中性脂肪量の減少)するという、リバビリンの新たな機能を発見した[Satoh S, et al., *Hepato/Commun*, 1:550-563, 2017]。また、研究代表者らの最近の研究成果から、脂質合成の亢進に寄与する転写因子C/EBPがリバビリンにより分解され、その結果、中性脂肪合成が抑制されることを見出した[日本ウイルス学会 2017 口頭発表]。C/EBPの転写活性化能が亢進したマウスの肝臓では中性脂肪合成関連酵素の発現量が増加し、それにより中性脂肪が増加蓄積し脂肪性肝炎を発症すること、また、NAFLD患者の肝臓ではC/EBPが強く活性化されていることが報告されている[Jin J, et al., *Cell Reports*, 3:831-843, 2013]。従って、C/EBPの活性を阻害できる薬剤は中性脂肪合成の亢進に伴う肝疾患発症の予防・治療薬になると考えられる。しかし、リバビリンによるC/EBPの分解機序、および、C/EBPの分解に伴いどのような遺伝子発現変動が起こり中性脂肪合成が抑制されるのかは分かっていない。また、リバビリンの投与は貧血を伴う等の副作用の問題があり、中性脂肪合成阻害剤として脂肪肝や肝がん発症の予防・治療薬として適応拡大するのは難しい。

2. 研究の目的

本研究では、リバビリンによるC/EBPタンパク質分解の機序、およびC/EBP分解に伴う中性脂肪合成抑制の機序の解明を目指した。さらに、C/EBPタンパク質の量と相関する下流遺伝子を特定し、その遺伝子の転写活性を簡単にモニタリングできるアッセイ系開発を目指した。そして開発したアッセイ系を用いて、リバビリンのようにC/EBPを分解、あるいはC/EBPの転写活性化を阻害することで中性脂肪合成を抑制する薬剤を探索し同定したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 肝がん細胞株 HuH-7, HepG2, Hep3B あるいはそれら由来の樹立細胞株を解析に用いた。

(2) 遺伝子発現量の変化を RT-qPCR、タンパク質量変化をウエスタンブローディング法により解析した。

(3) gain of function 実験として、レトロウイルスベクターにより遺伝子過剰発現細胞(恒常的発現)を作成し解析を行なった。

(4) 標的遺伝子に対する siRNA を細胞に導入し loss of function 実験を行った。

(5) C/EBP の下流遺伝子に対する制御機構を解析するために以下の解析を行なった。

5'-RACE 法による下流遺伝子の転写開始点の同定

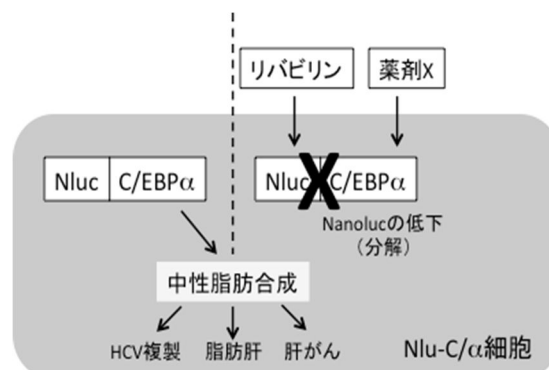
下流遺伝子の発現制御ゲノム領域のクローニングとレポーターアッセイ系の確立

ゲルシフトアッセイによる C/EBP の DNA 結合能の解析

Formaldehyde-Assisted isolation of Regulatory Elements (FAIRE)法による

クロマチン構造の解析

(6) 研究代表者らが開発した細胞内C/EBPタンパク質の量を簡易的にモニタリングできる細胞アッセイ系(右図、Nluc-C/細胞)およびkinase screening library(国立感染症研究所・渡士幸一博士より供与)を用いて、C/EBPタンパク質の量を制御する薬剤のスクリーニングを行った。



4. 研究成果

(1) C/EBPタンパク質の分解機序の解析

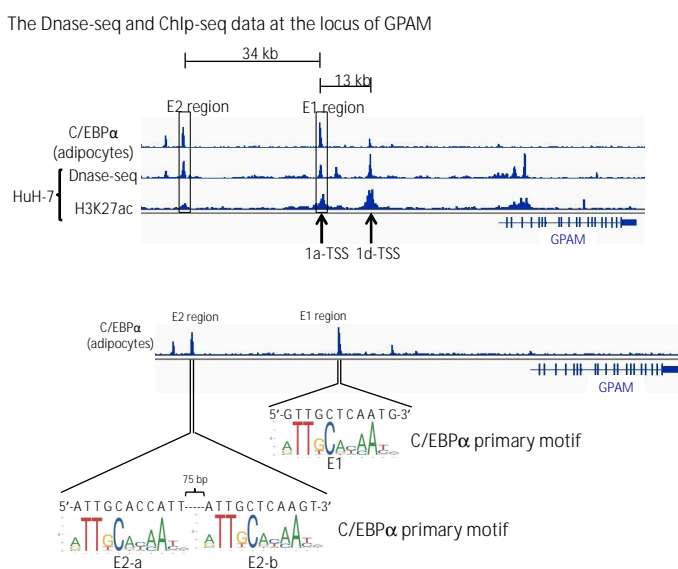
リバビリンの代謝を促進する Adenosine kinase (ADK) を強制発現させた HuH-7 細胞 (HuH-7A 細胞) をリバビリン処理すると、C/EBPタンパク質の発現量が減少すること (C/EBP mRNA の量

に変化はなし) プロテアソーム阻害剤である MG-132 によりその効果がキャンセルされることから、リバビリンはプロテアソームによる C/EBP タンパク質の分解を促進することが示唆された。そこで、C/EBP タンパク質の分解に関わることが知られている TRIB1 に着目した。TRIB1 遺伝子の発現はリバビリンにより増加した。TRIB1 を標的にした siRNA を HuH-7A 細胞に導入後、リバビリン処理し C/EBP の発現量を調べた。TRIB1 のノックダウンにより C/EBP タンパク質の量の増加が観察されたが、リバビリンによる C/EBP の減少を阻止することはできなかった。従って、定常状態で TRIB1 は C/EBP タンパク質の分解に寄与しているが、リバビリンによる C/EBP タンパク質分解に関与している可能性は低いと示唆された。TRIB1 のファミリータンパク質である TRIB2 についても調べたが、発現量が低く、また、TRIB2 を siRNA によりノックダウンしても影響は見られなかった。

(2) リバビリンによる中性脂肪量低下に寄与する C/EBP 下流遺伝子の同定

マウスを用いた研究から C/EBP は肝臓において脂肪酸合成関連酵素やトリグリセリド合成関連酵素遺伝子の転写活性化因子であることが知られていた [Matsusue K et al., *Mol Endocrinol*, 18:2751-2764, 2004; Jin J et al., *Cell reports*, 3:831-843, 2013]。そこで、HuH-7A 細胞において C/EBP を過剰発現あるいはノックダウンした時にそれら脂質合成関連遺伝子の発現変動を調べた結果、トリグリセリド合成酵素遺伝子の一つである *glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (GPAM)* が C/EBP の発現と最もリンクする遺伝子であった。また、リバビリン処理により GPAM の発現量は減少した。従って、GPAM は C/EBP の下流遺伝子であることが示唆された。

The Dnase-seq and ChIP-seq data at the locus of GPAM



C/EBP による GPAM 遺伝子発現制御機構を解析するために、まず 5' -RACE 法により HuH-7 細胞における GPAM の転写開始点を調べてみた。その結果、正常肝細胞あるいは脂肪細胞と同じ転写開始点 (TSS)、1d-TSS であることが分かった (右図)。1d-TSS 近傍の上流ゲノム領域 (1d-TSS から上流約 2 kb の範囲) をクローニング、レポータープラスミドを作成し C/EBP の影響をレポーターアッセイで調べてみたが、C/EBP による転写活性化は見られなかった。そこで、ChIP-seq データベースを駆使して GPAM 遺伝子付近を探索したところ、1d-TSS から上流 13 kb (E1) および 47 kb (E2) 付近に候補となる C/EBP 結合領域を見出した。ゲルシフトアッセイおよびレポーターアッセイにより、両ゲノム領域内に C/EBP 結合配列が存在し、C/EBP が直接結合して転写活性化しうることを見出した。また、FAIRE 法により C/EBP 結合による GPAM 遺伝子領域のクロマチン構造変化を調べてみたところ、C/EBP の結合によりその結合領域がオープンクロマチン構造を取ることを見出した。

以上の結果から、GPAM の発現をモニタリングできる細胞アッセイ系を構築し中性脂肪量を減少させる薬剤のスクリーニングを行おうと考えた。しかし、GPAM を siRNA によりノックダウンすると、トリグリセリド合成酵素遺伝子の一つである *diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1)* の発現量が増加した。そして細胞内中性脂肪量に変化は見られなかった。GPAM の発現量減少を DGAT1 の発現量増加によりトリグリセリド合成量を維持する機構の存在が示唆された。従って、GPAM の遺伝子発現量を標的にする薬剤では DGAT1 の発現上昇により補完されてしまう可能性が考えられたため、GPAM の遺伝子発現をモニタリングする細胞アッセイ系の開発は断念した。今後、GPAM の発現量減少による DGAT1 の発現量増加のメカニズムを明らかにして、GPAM を標的にした中性脂肪量減少のための薬剤スクリーニングアッセイ系の開発が有用であるか検討していきたいと考えている。

(3) C/EBP タンパク質の量を制御するキナーゼの探索

リン酸化により C/EBP タンパク質分解が制御されていることが知られている。研究代表者らは、細胞内の C/EBP タンパク質の量をモニタリングできるアッセイ細胞 (Nluc-C/EBP 細胞) を作成した。C/EBP の N 末に NanoLuc (Nluc, Promega) を付加した Nluc-C/EBP が恒常的に発現しており、Luciferase 活性を指標に Nluc-C/EBP の産生量をモニタリングすることができる。約 150 種類のキナーゼ活性化剤あるいはキナーゼ阻害剤を含む kinase screening library (Cayman) をこのアッセイ系に用いて、C/EBP タンパク質の量を制御する薬剤のスクリーニングを行った。その結果、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤である Torin1 および INK128

において NIuc-C/EBP の減少が観察された。また、内在性の C/EBP タンパク質の産生量もそれぞれの阻害剤存在下で減少することが観察された。従って、C/EBP の産生量維持に mTOR の関与が示唆された。今後、mTOR 関連シグナルを標的にした薬剤が C/EBP の産生量低下を介して中性脂肪量を減少させるか、また mTOR を標的にした副作用の少ない薬剤が存在するかなどを検討して脂質合成抑制剤の開発に臨みたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onomura Daichi, Satoh Shinya, Ueda Youki, Dansako Hiromichi, Kato Nobuyuki	4. 巻 533
2. 論文標題 Identification of ribavirin-responsive cis-elements for GPAM suppression in the GPAM genome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 148-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.08.112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoh Shinya, Onomura Daichi, Ueda Youki, Dansako Hiromichi, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Kato Nobuyuki	4. 巻 476
2. 論文標題 Ribavirin-induced down-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein leads to suppression of lipogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 137 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20180680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野村大地、佐藤伸哉、上田優輝、団迫浩方、加藤宣之
2. 発表標題 C/EBP によるトリグリセリド合成酵素遺伝子GPAM発現制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野村大地、佐藤伸哉、上田優輝、団迫浩方、加藤宣之
2. 発表標題 抗HCV薬リバビリンによるGPAM発現抑制機序の解析
3. 学会等名 第3回中性脂肪学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤伸哉、小野村大地、上田優輝、団迫浩方、本多政夫、金子周一、加藤宣之
2. 発表標題 抗ウイルス薬リバビリンによる転写因子C/EBP タンパク質の分解亢進は細胞内中性脂肪量を低下させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野村大地、佐藤伸哉、上田優輝、団迫浩方、加藤宣之
2. 発表標題 抗HCV薬リバビリンによるGPAM発現抑制機序の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤伸哉、小野村大地、上田優輝、団迫浩方、加藤宣之
2. 発表標題 抗HCV薬リバビリンによる中性脂肪合成抑制機序の解明
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野村大地、佐藤伸哉、上田優輝、団迫浩方、加藤宣之
2. 発表標題 抗HCV薬リバビリンによるGPAM発現抑制機序の解明
3. 学会等名 第33回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野村大地、佐藤伸哉、上田優輝、団迫浩方、加藤宣之
2. 発表標題 Mechanism of GPAM suppression by anti-HCV drug ribavirin
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小野村 大地 (Onomura Daichi)	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・腫瘍ウイルス学・博士課程学生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------