

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07941

研究課題名(和文) microRNA-6126によるHBV増殖抑制機構の解明

研究課題名(英文) Pegylated interferon therapy-related microRNA-6126 downregulates sodium taurocholate cotransporting polypeptide expression in hepatocytes

研究代表者

藤田 浩二(Fujita, Koji)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50749421

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)：HBVが肝細胞に侵入する時、肝細胞表面に発現するNTCPを介して肝細胞の中に取り込まれる。miR-6126をトランスフェクションすると、NTCPの発現が抑制されることを明らかにすることが出来た。すなわち、miR-6126がHBVの肝細胞への感染を抑制する可能性が示唆された。次に、miR-6126の標的遺伝子を探索したが、時間的かつ予算的制約により、不可能であった。以上の成果をアメリカ微生物学会の学会誌の一つであるMicrobiology Spectrum誌に投稿し、現在Major revisionとなっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microRNAはヒトの体内にもともと存在する物質です。本研究においては、microRNAのうちの一つであるmiR-6126が、HBVの感染を抑制される可能性が示唆されました。HBVの感染メカニズムとその治療方法の開発に寄与する成果です。

研究成果の概要(英文)：We found that transfection of miR-6126 suppressed the expression of NTCP, suggesting that miR-6126 may inhibit HBV infection of hepatocytes. This suggests that miR-6126 may inhibit HBV infection of hepatocytes. Next, we searched for the target gene of miR-6126, which was not possible due to time and budget constraints. These results were submitted to Microbiology Spectrum, a journal of the American Society for Microbiology, and are now in major revision.

研究分野：B型肝炎

キーワード：B型肝炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染者数は、世界人口の5% (3億人)、本邦人口の1% (100万人) とされる。HBVの持続感染は出生時または乳幼児期の感染によって成立し、そのうち10~15%が慢性肝疾患 (慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がん) へ移行するとされる。

HBVの遺伝情報は、ヒトと同様にDNAに保存される。しかしHBV DNAの複製機構は、ヒトDNAの複製機構とは大きく異なる。ヒトDNAの複製は、DNAを鋳型としてDNA鎖が新たに合成される。これに対して、HBV DNAの複製における最大の特徴は、鋳型DNAからRNAで相補鎖を合成し (転写)、このRNAを鋳型としてDNAを複製する (逆転写) ことにある。このようなHBVのDNA複製機構において、複数のヒトmicroRNAが関与していることが報告されている。

microRNAは蛋白質に翻訳されないRNAの1種であり、ヒトでは2000種類以上のmicroRNAが既に同定されている。ヒトDNAに保存されている遺伝情報は、messenger RNAに転写され、さらにタンパク質へと翻訳される (セントラルドグマ)。この遺伝子発現の過程において、microRNAはmessenger RNAに結合し、messenger RNAからタンパク質が合成される過程を阻害する (図2)。microRNAはその生理機能として、細胞の分化、増殖、アポトーシスに関与している。ところが、一部のmicroRNAはヒト肝細胞におけるHBVの感染、増殖にも関与していることが、既に報告されている。

本研究の責任者は、臨床研究を先行して行い、HBVの治療に反応する症例と反応しない症例の血清中のmiRNAの発現プロファイルを比較した。その結果、治療に反応する症例においては、血清に含まれるmiR-6126の濃度が他方よりも高いことを明らかにした (Fujita Koji, et al. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 2;19(7):1940.)。本研究においては、HBVの肝細胞への感染メカニズムにおけるmiR-6126の役割について検討した。

### 2. 研究の目的

HBVは肝細胞に感染する際に、細胞表面のNTCPという分子に結合し、このNTCPと結合した状態で肝細胞の中に取り込まれる。本研究の目的は、HBVの増殖抑制効果を示すmicroRNAとして申請者が同定したmicroRNA-6126について、その標的遺伝子を同定し、microRNAを介したHBVの新たな増殖抑制機構を明らかにすることである。本研究を遂行することにより、HBVの増殖過程に関与するヒト遺伝子群のうち、microRNA-6126によりその発現が抑制される一群の遺伝子が明らかになる。さらにmicroRNA-6126と当該遺伝子群を含む細胞内パスウェイが明らかになる。

### 3. 研究の方法

本研究では、HBVを感染させた肝がん細胞にmicroRNA-6126をトランスフェクションし、対称群と比べて発現の変化しているmessenger RNA及びmicroRNAを抽出した。抽出されたmessenger RNA及びmicroRNAの発現データを組み合わせてパスウェイ解析を行い、microRNA-6126によって抑制される遺伝子群を同定することを目指した。

HBVの受容体であるNTCP (the sodium taurocholate co-transporting polypeptide) をトランスジェニックした肝がん細胞株にジェノタイプCの野生型HBV (フェニックスバイオ社) を感染させる系を用いた。HBV感染肝がん細胞にmicroRNA-6126またはscrambleをlipofectamine (Invitrogen社) にてトランスフェクションする。48時間後のtotal RNAをTrizolを用いて回収し、2) 及び3) に用いた。

トランスクリプトーム解析においては、10µgのtotal RNAからIon AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit (Thermo Fisher Scientific社) を用いてcDNAライブラリーを作成した。次世代型シーケンサーであるIon Proton™ System (Thermo Fisher Scientific社) を用いて各々のmessenger RNAのcDNAを定量した。

microRNAの網羅的解析においては、human miRNA Oligo chip (Toray社) と3D-Gene Scanner 3000 (Toray社) を用いて、2565種類のmicroRNAの発現を網羅的に解析した。

4) 2)トランスクリプトームのデータと、3)microRNAのデータを組み合わせてパスウェイ解析を行った。パスウェイ解析については一般財団法人 化学物質評価研究機構に委託し、解析ソフトIngenuity Pathway Analysis (Ingenuity社) を用いた解析結果を得ることとした。

### 4. 研究成果

NTCPを遺伝子導入した肝細胞であるHepG2-NTCPにmiR-6126をトランスフェクションすると、NTCPの発現が抑制されることをWestern Blotと免疫染色で明らかにすることが出来た。さらに、蛍光色素で標識したPreS1抗原を用いて、PreS1抗原の肝細胞表面への吸着を評価すると、miR-6126トランスフェクション群では対照群に比べて、PreS1抗原の吸着が減弱していた。ヒト初代継代肝細胞を用いた評価でも、miR-6126はPreS1抗原の肝細胞表面への吸着を減少させていた。以上の結果から、miR-6126はHBVの肝細胞表面への吸着を抑制することが明らかとなった。これにより、miR-6126がHBVの肝細胞への感染を抑制する可能性が示唆された。次に、miR-6126の標的遺伝子を探索した。HepG2-NTCP細胞をmiR-6126群と対照群に分けて、ト

ランスクリプトーム解析を行い、1万種類以上の遺伝子の mRNA の発現の増減を評価した。その結果、miR-6126 トランスフェクション群において対称群に比べて、25 遺伝子の発現が有意に抑制されていた。しかし、この 25 遺伝子うちに、miR-6126 の標的遺伝子は存在しなかった。NTCP そのものも、その mRNA の 3' 末に miR-6126 との相補的な配列はなく、miR-6126 が NTCP の mRNA に直接結合してその翻訳を抑える、とは考えにくかった。しかし、miR-6126 の転写産物の intron 領域に、miR-6126 が結合し得る配列が 22 か所存在した。この配列の存在意義を明らかにすることは、時間的かつ予算的制約により不可能であった。以上の成果をアメリカ微生物学会の学会誌の一つである Microbiology Spectrum 誌に投稿し、2022 年 6 月 14 日の時点で Major revision となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田 浩二
2. 発表標題 miR-6126によるHBV-DNA増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujita Koji
2. 発表標題 microRNA-6126 Reduces the Stability of NTCP Messenger RNA and Suppresses its Expression in Hepatocytes
3. 学会等名 APASL 2021 Osaka (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------