

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590856

研究課題名（和文）：C型慢性肝炎の肝内マイクロRNA発現とIFN・リバビリンの治療効果

研究課題名（英文）：Intrahepatic microRNA expression and response to peginterferon- α and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C

研究代表者

榎本 大（ENOMOTO MASARU）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20423874

研究成果の概要（和文）：C型慢性肝炎の生検組織における肝内マイクロRNA（miRNA）発現を、マイクロアレイを用いて解析したところ、肝線維化進行例ではmiR-422aなどの発現が有意に低下し、miR-199a-5p/199a-3pやmiR-221/miR-222などの発現が有意に亢進し、その結果はリアルタイムPCRでも確認できた。またmiR-222の発現は2種類のマウス肝線維化モデルにおいても、肝線維化の進展とともに亢進していた。さらに初代培養マウス星細胞、ヒト不死化星細胞株においても、miR-222の発現は亢進していた。その発現はTNF- α 、TGF- α などによって促進され、NF- κ B阻害剤によって抑制された。miR-222発現はWST1アッセイで不死化星細胞株の増殖に影響を与えなかった。miR-222は標的遺伝子であるp27^{Kip1}の3'-UTRに結合しその蛋白発現を調節し、コラーゲン1A1の発現を誘導し、MMP-1の発現を抑制した。以上より、miR-222が肝線維化の進展に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The regulated microRNAs (miRNAs) in human livers infected with hepatitis C virus (HCV) were identified by microarray analysis. MiR-422a was down-regulated, and miR-199a-5p/199a-3p and miR-221/222 up-regulated in the human liver in a fibrosis progression-dependent manner. Their expression was validated by real-time RT-PCR. Among these miRNAs, miR-222 increased in mouse livers from two fibrosis models. The expression of miR-222 was up-regulated in cultured stellate cells LX-2 and increased during the course of culture-dependent activation of mouse primary stellate cells. NF- κ B inhibitor significantly suppressed the miR-222 induction that was stimulated in culture by TNF- α or TGF- α . Although over-expression or down-regulation of miR-222 failed to regulate the growth of LX-2 cells, miR-222 bound to the p27^{Kip1} 3' UTR and regulated the expression of the corresponding protein. Transient transfection with miR-222 precursors significantly up-regulated α 1 (I) collagen and down-regulated MMP-1 mRNA expressions. In conclusion, miR-222 may be new markers for stellate cell activation and liver fibrosis progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：C型慢性肝炎・マイクロRNA・インターフェロン・リバビリン

1. 研究開始当初の背景

本邦においてC型肝炎ウイルス(HCV)は約200万人に持続感染しており、肝臓、肝硬変の原因の70~80%を占めると推定される。現在なおC型肝炎に対する唯一の根治的治療はインターフェロン(IFN)のみであるが、その治療抵抗性の機序は明らかになっていない。

HCVの持続感染は肝臓における慢性的な壊死・炎症を惹起し、それに対する非実質細胞(肝星細胞、筋線維芽細胞など)による修復と実質細胞(肝細胞)の再生が、肝線維化と肝発癌に繋がると考えられるが、その詳細な機序については未だ不明な点が多く残されている。

最近、特定の遺伝子の発現を調節する因子としてマイクロRNA(miRNA)が注目されている。miRNAは20~25塩基ほどの1本鎖のノンコーディングRNAであり、相補的なメッセンジャーRNA(mRNA)との結合により翻訳を阻害する又はmRNAの分解を惹き起こすことにより遺伝子発現を抑制する。miRNAは、肝臓における病態生理や発癌にとっても重要と思われる。

2. 研究の目的

我々はC型肝炎における抗ウイルス治療抵抗性の機序を明らかにするため、また肝線維化の分子機構におけるmiRNAの意義を検討するため、それぞれに関与すると思われる肝内miRNA発現を網羅的に探索し、有意と思われるmiRNAの機能について基礎的解析を行った。

3. 研究の方法

1) C型肝炎・肝硬変35例(男性15例/女性20例、平均59±9歳、ALT中央値57IU/L、遺伝子型1b)のうち、22例の治療前の肝生検組織よりmirVana miRNA isolation kit(Applied Biosystems)を用いてRNAを抽出し、3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1(東レ)を用いてmiRNA発現の網羅的解析を行なった。有意に変動したmiRNAについては、35例においてTaqMan MicroRNA Assay(Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCRによる定量的解析を行った。

治療についてはPEG-IFN- α 2b 1.5 μ g/kg週1回とリバビリン 600~1,000mg連日を48週間投与し、治療終了6ヶ月後に血中HCV RNA陰性のものをウイルス学的著効(SVR)と判定した。

2) メチオニン・コリン欠乏食(MCDD)を与えたマウス(C57BL/6、雄)の脂肪性肝炎モデルまたはチオアセトアミド(TAA)を投与したマウス肝線維化モデルにおけるmiRNA発現をリアルタイムPCRにより定量した。

3) 初代培養マウス星細胞とヒト不死化星細胞LX-2におけるmiRNA発現をリアルタイムPCRにより定量した。

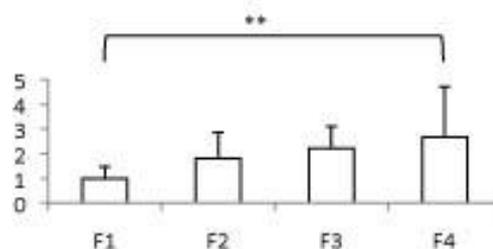
初代培養マウス星細胞は、培養1日目に細胞内にビタミンA顆粒が観察されるが、培養後の時間経過に伴って形態が変化し肥大化し、星細胞内のビタミンA顆粒は消失する。この現象は、肝臓内における星細胞の活性化が細胞培養系で再現されることを示している。

LX-2はDr. Scott Friedmanにより提供され、10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle Medium(Sigma)で培養した。

4. 研究成果

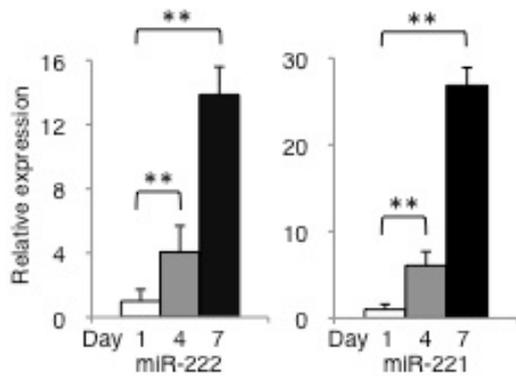
1) SVRが得られた症例と得られなかった症例の間で肝内miRNA発現を網羅的に解析した結果、SVR症例において11種の発現が有意に低下(fold change, 0.69~0.90)し、2種の発現が有意に亢進(fold change, 1.03~1.80)していた。有意に低下したもののうち、miR-660、miR-324-5p、miR-532-5pについては、 $p < 0.01$ であった。

次にC型肝炎の肝線維化軽度群(F1/F2)と肝線維化進行群(F3/F4)の間で肝内miRNA発現を網羅的に解析した結果、肝線維化進行例ではmiR-422aなど7種の発現が有意に低下(fold change, -1.69~-1.20)し、miR-199a-5p/199a-3pやmiR-221/222など17種の発現が有意に亢進(fold change, 1.21~2.59)していた。有意に亢進したもののうち、miR-222など数種はリアルタイムPCRでも肝線維化の進行とともに増加した(F1/F2/F3/F4, 1.0/1.8/2.2/2.7; $p < 0.01$)。



2) MCDDマウス肝臓におけるmiR-222発現は対照に比べ、15週目に2.6倍に増加し

た ($p < 0.01$)。TAA マウス肝臓における miR-222 発現は対照に比べ、8 週目に 1.4 倍に増加した ($p < 0.01$)。



3) マウス肝臓より分離・培養した活性化星細胞の miR-222 発現は、培養 1 日目に比べ 7 日目では 13.9 倍に増加した ($p < 0.01$)。

LX-2 における miR-222 発現はヒト肝癌細胞 HepG2 に比べ 6.0 倍と高値であった。その発現は tumour necrosis factor α (TNF- α)、transforming growth factor α (TGF- α) など炎症性サイトカンによって促進され 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamono) quinazoline (NF- κ B 阻害剤) によって抑制された。

データベース TargetScan の検索により miR-222 の標的遺伝子のひとつとして cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27^{Kip1}) を同定した。p27^{Kip1} の 3' -UTR を挿入したリポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにて、miR-222 は p27^{Kip1} の 3' -UTR に結合し蛋白を発現した。一方、miR-222 を LX-2 に過剰発現させると p27^{Kip1} の蛋白発現が抑制された。また miR-222 はコラーゲン 1A1 の発現を誘導し、metalloproteinase-1 (MMP-1) の発現を抑制した。WST1 アッセイにて、miR-222 は LX-2 の増殖に対しては直接の影響を及ぼさなかった。

結論として、C 型慢性肝炎・肝硬変において miR-222 が肝線維化の進展に関与する可能性が示された。miRNA は血中ではエクソソームで安定した状態で存在すると言われているので、血清中でのアッセイ系を確立すれば肝線維化バイオマーカーとしても利用可能かも知れない。miR-222 発現は不活化星細胞株の増殖に影響を与えなかったため機序につき更なる検討は必要であるが、この研究が肝線維化の分子機構解明の一助になれば、新規治療薬の開発にも繋がること期待される。miR-222 と肝発癌との関連も示唆されており、線維化と発癌の関係を理解する上でも重要と考えられる。

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 5 件)

- ① Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 2012 in press、査読有り。
- ② Tamori A, Kawajiri H, Takashima T, Motoyama H, Morikawa H, Enomoto M, Hirakawa K, Kawada N. Could trastuzumab suppress hepatitis C virus in a patient with chronic hepatitis and breast cancer? *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 1865-6、査読有り。
- ③ Tamori A, Kioka K, Kurai O, Sakaguchi H, Enomoto M, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Yamaguchi S, Kawasaki Y, Oka H, Tanaka Y, Kawada N. Favorable factors for re-treatment with pegylated interferon α 2a plus ribavirin in patients with high viral loads of genotype 1 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2011; 41: 1169-77、査読有り。
- ④ Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2011; 46: 350-8、査読有り。
- ⑤ Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. *Rev Recent Clin Trials* 2009; 4: 179-84、査読有り。

【学会発表】 (計 5 件)

- ① Enomoto M, Ogawa T, Iizuka M, Fujii H, Tamori A, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Indication of the Activation of Stellate Cells and the Progression of Liver Fibrosis by MicroRNA-222. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2011 年 11 月 4-8 日 (San Francisco, CA)
- ② 榎本大、小川智弘、河田則文. 慢性肝疾患における肝線維化バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の有用性. 第 39 回日本肝臓学会西部会. 2011 年 12 月

- 9-10日(岡山)
- ③ 飯塚昌司、小川智弘、関谷由美子、榎本大、吉里勝利、池田一雄、河田則文. 肝線維化と星細胞活性化に關与するマイクロRNAの解析. 第15回日本肝臓学会大会. 2011年10月20-21日(福岡)
 - ④ 飯塚昌司、榎本大、小川智弘、藤井英樹、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、田守昭博、河田則文. 慢性肝疾患における肝線維化診断マーカーとしてのmiR-222の有用性. 第15回日本肝臓学会大会. 2011年10月20-21日(福岡)
 - ⑤ 小川智弘、榎本大、河田則文. C型慢性肝炎患者における肝線維化診断マーカーとしてのマイクロRNAの有用性. 第97回日本消化器病学会総会. 2011年5月13-15日(東京)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:「肝線維症の存在及び/又は肝線維症の重症度の判定方法、判定マーカー、判定用キット、肝線維症の治療の効果予測方法、効果予測マーカー、並びに効果予測用キット」

発明者:河田則文、榎本大、小川智弘

権利者:公立大学法人大阪市立大学

種類:IPD0111

番号:特願2010-281254

出願年月日:平22年12月17日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syokaki/hepatology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 大 (ENOMOTO MASARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号:20423874

(2) 研究分担者

河田 則文 (KAWADA NORIFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号:30271191

田守 昭博 (TAMORI AKIHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号:30291595

(3) 連携研究者

なし