

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790774

研究課題名（和文）C型肝炎の病態と治療効果を規定するmiR-122の発現調節機構の解明

研究課題名（英文）The regulation of miR-122 which is involved in Hepatitis C virus replication and interferon treatment response

研究代表者

室山 良介 (MUROYAMA RYOSUKE)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50549459

研究成果の概要（和文）：肝臓で発現している microRNA (miRNA) の大半を占める miR-122 は、C型肝炎ウイルス (HCV) の複製やインターフェロンによる治療の応答性、発癌との関連性が報告されている。当研究では、その発現調節につき検討を行った。はじめに種々の肝癌細胞株を用いて、miR-122 の発現量とその初期転写産物である pri-miR-122 の発現量を比較検討した。その結果、miR-122 と pri-miR-122 の発現量には正の相関が認められ、pri-miR-122 の発現量は miR-122 の発現量を規定する重要な因子であると考えられた。次に、pri-miR-122 の promoter 領域を種々の長さで reporter plasmid にクローニングして reporter assay を行い、pri-miR-122 の転写に重要な領域を同定した。次に DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな制御を受けている可能性を考え、同定した pri-miR-122 の promoter 領域の DNA メチル化状態を検討した。その結果、pri-miR-122 の発現量が豊富な細胞株では DNA メチル化が乏しいのに対し、発現量が低い細胞株ではほぼ完全にメチル化されていることが判明した。さらに 5-aza-CdR を用いた脱メチル化処理により、pri-miR-122 の発現量が低い細胞株において発現量の増加を認めた。以上より、pri-miR-122 の発現制御機構には、DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな制御が深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mir-122 is a highly abundant and liver-specific miRNA, and reported to enhance Hepatitis C virus (HCV) replication and be associated with interferon treatment response and hepatocarcinogenesis. In this study, we investigated the regulation mechanism of miR-122. At first, we examined the correlation between the expression level of miR-122 and pri-miR-122 which was primary transcript of miR-122 in various hepatoma cell lines by realtime PCR. The result showed the positive correlation between miR-122 and pri-miR-122. Therefore, the expression level of pri-miR-122 was considered to be a major factor which determined that of miR-122. Next, we performed reporter gene assays integrated with truncation in the pri-miR-122 promoter, and determined the region which had high trans-activation effect. Next, we examined the DNA methylation status in the promoter region of pri-miR-122 by sodium bisulfite DNA sequencing, and found that the promoter region of pri-miR-122 was hyper-methylated in the hepatoma cell lines which have the low expression level of pri-miR-122. Moreover, with 5-aza-CdR treatment, the expression level of pri-miR-122 was increased in such cell lines. Therefore, the epigenetic regulation might play an important role in the expression of miR-122.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：microRNA、発現調節

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は、慢性肝炎・肝硬変・肝臓がんの主要な病原因子であり、その制御は肝臓病学の最重要課題の1つである。また、C型肝炎の治療にはインターフェロン (IFN) が臨床にて主に用いられているが、その治療効果は決して満足できるものではない。近年、真核生物において蛋白質の発現を制御する 18~25 塩基長の一本鎖 RNA である microRNA (miRNA) が発見され、その制御システムに生じた異常は、癌などのヒトの疾患の発生や進展に関与していることが明らかとなってきた。miR-122 は肝臓における miRNA の大半を占め、HCV の複製や IFN 治療の応答性、発癌との関連性が今までに報告されている。したがって、その発現調節機構の解明は、HCV 感染患者の病態把握や治療法の進展に役立つものと考え、当研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

HCV の複製や IFN 治療応答性、肝発癌に深く関与する miR-122 の発現調節の解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) miR-122 は、まず初期転写産物である pri-miR-122 としてゲノムから転写されることより、pri-miR-122 の発現量は miR-122 の発現量を規定する重要な因子と考えられた。そこで、種々の細胞株中の miR-122 と pri-miR-122 の発現量を realtime PCR にて定量し、その発現量につき、比較検討した。

(2) pri-miR-122 の promoter 領域を種々の長さで reporter plasmid にクローニングし、pri-miR-122 を高発現している Huh7 を用いて reporter assay を行い、pri-miR-122 の転写活性に重要な領域の同定を試みた。

(3) 種々の培養細胞株の genomic DNA に対し、pri-miR-122 の転写活性に重要な領域の配列を direct sequencing 法にて同定し、その配列の相違を検討した。

(4) 種々の肝癌細胞株の genomic DNA に対し、sodium bisulfite DNA sequencing 法を用いて、pri-miR-122 の promoter 領域における DNA メチル化状態を評価した。

(5) pri-miR-122 の発現量が低い細胞株に対し、5-aza-CdR を用いて脱メチル化処理を行って total RNA を抽出し、pri-miR-122 の発現量の変化を realtime PCR にて評価した。

4. 研究成果

(1) 肝癌細胞株である Huh7, Huh6, Alex, HepG2, Hep3B, HLE から抽出した total RNA を用いて realtime PCR を行い、pri-miR-122, miR-122 の発現量を定量した (図 1)。

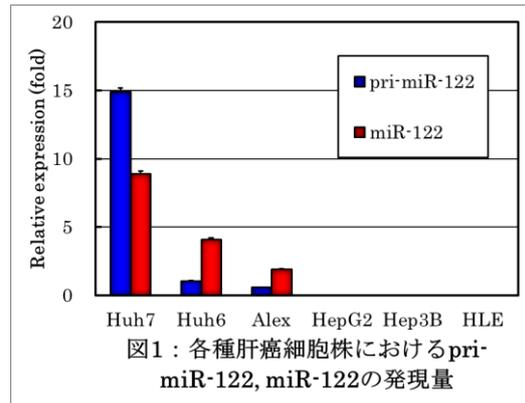


図1：各種肝癌細胞株における pri-miR-122, miR-122 の発現量

miR-122 は Huh7, Huh6, Alex において発現量が高く、特に Huh7 では顕著であった。一方、HepG2, Hep3B, HLE では、miR-122 はほとんど発現していなかった。pri-miR-122 は、miR-122 を高発現している Huh7, Huh6, Alex において発現を認め、逆に miR-122 をほとんど発現していない HepG2, Hep3B, HLE では定量不可であった。すなわち、pri-miR-122 と miR-122 の発現量には正の相関関係が認められることより、miR-122 の初期転写産物である pri-miR-122 の発現量は、miR-122 の発現量を規定する重要な因子であると考えられた。

(2) pri-miR-122 の転写開始点から上流の領域 (pri-miR-122 の promoter 領域) を 5kb, 3kb, 1kb, 500bp, 200bp, 100bp と種々の長さで reporter plasmid にクローニングし、pri-miR-122 を高発現している Huh7 に導入して reporter assay を行った (図 2)。

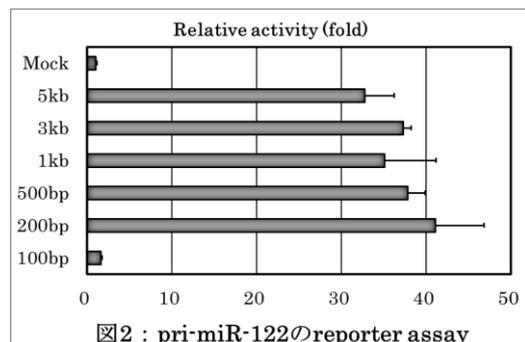
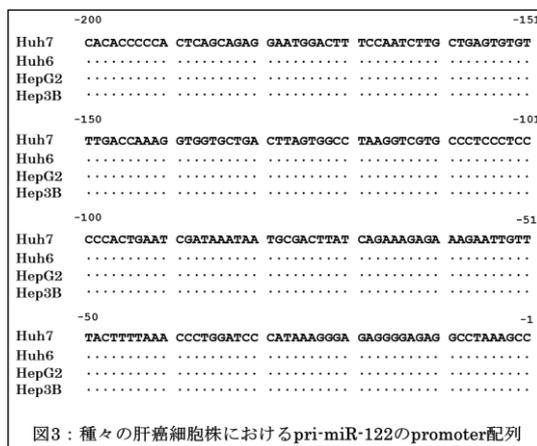


図2：pri-miR-122 の reporter assay

本検討により、pri-miR-122 の転写開始点から上流 200bp までは強い転写活性を認めるが、100bp では転写活性が劇的に低下することが判明した。このことより、pri-miR-122 の転写活性には、転写開始点から上流 200bp の配列が重要な領域であると考えられた。

(3) pri-miR-122 の転写開始点から上流 200bp の配列中には、一塩基多型 (SNP) に代表されるゲノムの多様性が存在し、それにより pri-miR-122 の転写活性の相違が生じている可能性が考えられた。そこで pri-miR-122 を発現している Huh7, Huh6 と、発現が認められない HepG2, Hep3B の genomic DNA を用いて、pri-miR-122 の転写開始点から上流 200bp の配列を direct sequencing 法にて同定し、その配列の相違を比較検討した (図 3)。

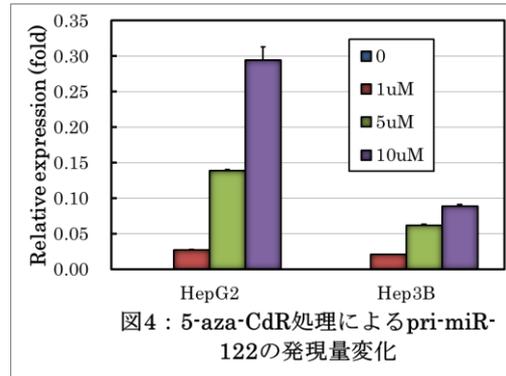


pri-miR-122 の転写開始点から上流 200bp の配列は、Huh7, Huh6, HepG2, Hep3B 間で同一であり、promoter 領域の塩基の多様性が、転写活性の相違を生じさせているわけではないことが明らかとなった。

(4) DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな修飾は、転写活性に多大な影響を与えることが知られている。実際、pri-miR-122 の転写開始点から上流 200bp 中には 3 つの CpG 配列が存在し、これらが DNA メチル化修飾を受けることにより pri-miR-122 の転写活性の相違が生じている可能性が考えられた。そこで Huh7, Huh6, HepG2, Hep3B の genomic DNA を用いて、pri-miR-122 の promoter 領域中の DNA メチル化状態を sodium bisulfite DNA sequencing 法にて評価した。その結果、pri-miR-122 の発現が認められる Huh7, Huh6 では 3 つの CpG 配列のメチル化頻度は低く、特に Huh7 では全く認められなかった。一方、pri-miR-122 の発現が認められない HepG2, Hep3B では、3 つの CpG 配列はいずれもほぼ 100%メチル化されていた。すなわち、pri-miR-122 の promoter 配

列中のメチル化頻度と pri-miR-122 の発現量には相関関係が認められ、pri-miR-122 の転写活性の制御には promoter 領域のメチル化が関与している可能性が示唆された。

(5) (4) の結果より、pri-miR-122 の転写活性の制御には promoter 領域のメチル化が関与している可能性が示唆されたため、pri-miR-122 の発現量が低い HepG2, Hep3B に対し 5-aza-CdR による脱メチル化処理を行い、pri-miR-122 の発現量変化を realtime PCR にて評価した (図 4)。



5-aza-CdR を用いた脱メチル化処理により、HepG2, Hep3B いずれにおいても pri-miR-122 の発現量は容量依存性に増加することが確認され、(4) の結果と合わせて、pri-miR-122 の転写活性の制御には promoter 領域のメチル化が関与している可能性がより強く示唆される結果となった。

以上のように、今回の検討により、miR-122 の発現調節において、その初期転写産物である pri-miR-122 の発現量が重要な規定因子であること、pri-miR-122 の転写活性には、上流 200bp の promoter 配列が重要であること、また pri-miR-122 の転写活性には DNA メチル化修飾が深く関与している可能性があること、などが明らかとなった。

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0件)

なし

〔学会発表〕(計1件)

①室山良介、後藤寛、Li Wenwen、古渡礼恵、加藤直也：C型肝炎の病態と治療効果を規定するmiR122の発現調節機構の解明。第15回日本肝臓学会(第19回日本消化器関連学会週間)、肝P-272、福岡、2011年10月

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

該当なし

○取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

室山 良介 (MUROYAMA RYOSUKE)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：50549459

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし