

平成 28 年 7 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590565

研究課題名(和文) マイクロRNAによるウイルス複製と脂肪酸合成経路のクロストーク制御の分子機構

研究課題名(英文) Cross-talk regulation of viral replication and fatty acid synthesis by miRNAs

研究代表者

棟方 翼 (MUNAKATA, Tsubasa)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：50420237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： マイクロRNA (miRNA) による遺伝子発現制御が宿主細胞のみならずウイルスでも存在する。我々の解析により、C型肝炎ウイルス (HCV) 増殖を抑制するmiR-199aが、宿主の脂肪酸合成酵素 (FASN) の発現も直接抑制していることが判明した。HCVはFASNの発現を転写レベルで高めるが、一方でFASNはHCV複製に必要である為、両者の制御にクロストークが存在する可能性は示唆されていた。しかし、同一のmiRNAがウイルス遺伝子と宿主遺伝子の双方の発現を制御するクロストークの要であることは新たな発見であり、その分子機構の解明は大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)： It is reported that miR-199a-3p represses HCV replication by targeting 5' untranslated region (UTR) of HCV genomic RNA. On the other hand, induction of the lipogenesis pathway upon HCV infection is known to play an important role in regulating HCV propagation and pathogenesis. We have reported that fatty acid synthase (FASN), an enzyme essential for de novo synthesis of a fatty acid, was induced by HCV infection and replication, and that FASN was needed for the efficient replication of HCV. Moreover, we have found that there is a functional interaction between HCV and FASN through miR-199a-5p and -3p. Interestingly, expression of miR-199a-5p and -3p is regulated by HCV replication. These data demonstrate that miR-199a-3p simultaneously represses HCV replication and FASN expression, and that there exists a crosstalk between HCV replication and host lipogenesis at the level of miRNA-mediated regulation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：マイクロRNA 脂肪酸合成酵素 C型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は、全世界で推定1億7千万人の感染者が存在する、極めて重要な感染症の原因因子である。HCVはフラビウイルス科・ヘパシウイルス属のRNAウイルスであり、9.6kbのプラス鎖の一本鎖RNAをゲノムとする。HCVの病理学的特徴は、感染後に急性肝炎を起こす稀な株もあるものの、一般にヒト肝細胞に長期間持続感染することで肝炎が慢性化して脂肪肝・肝繊維症となり、最終的に肝硬変を経て肝癌に至ることにある。慢性のC型肝炎で生じる炎症及び酸化ストレスが、HCV感染後の肝臓癌の進行に寄与する可能性が臨床的に示されているものの、一つ以上のウイルス由来の蛋白質が癌化に直接寄与することを示す結果が、トランスジェニック (Tg) ・マウスにおいて明らかとなっている。全HCV蛋白質を発現するTgマウスで肝臓癌への進行が確認されているが、HCVの構造蛋白質であるコアのみを発現するTgマウスでも肝臓癌の発生が報告されている。これらの結果を鑑みると、HCV由来の蛋白質が癌化に直接影響を与えていることが考えられる。

一方で、これらのマウスでは癌以外の病態も再現する。特に、HCV感染後の中性脂肪の蓄積による脂肪肝の形成は、近年注目されているメタボリック・シンドロームとも関係する。しかし、どのウイルス蛋白質がどのような分子メカニズムで脂肪肝の形成を促すのかについて、未だ十分な知見は無かった為、我々が解析を進めた結果、HCVのNS5B蛋白質がRb/E2F経路を介して脂肪酸合成酵素 (FASN) を含む脂肪酸合成経路の因子群の発現を活性化することが判明した。更に我々はFASNの阻害剤やsiRNAを用いた解析から、FASNの脂肪酸合成活性がHCV複製に必要であることも見出し、最終的に脂肪酸の一種であるパルミチン酸がHCV複製に

関与する新規宿主因子であることを同定した。

2. 研究の目的

FASNの発現制御を解析する一環として、マイクロRNA (miRNA) による制御の可能性を考え、FASN mRNAの3' UTR (非翻訳領域) でmiRNAの標的検索を行ったところ、miR-199aの標的部位を発見した。培養肝細胞でmiR-199aを過剰発現するとFASNの発現は低下し、miR-199aの発現を抑制するとFASNの発現は上昇したことから、miR-199aはFASNの発現を制御するmiRNAの一つである。興味深いことに、miR-199aはHCVのゲノムRNA内にも標的部位を有し、実際HCVの増殖を制御することも判明した。

これらのデータから、同一のmiRNAがウイルス遺伝子と宿主遺伝子の双方の発現を制御するクロストークの要である可能性が示唆されている。miR-199a以外にも、HCVゲノムと脂肪酸合成経路因子の双方を標的とするmiRNAの候補を我々は同定しており、それらの解析も合わせて行うことで、クロストークの全体像が解明できると考えている。

3. 研究の方法

マイクロRNAによるウイルス複製と脂肪酸合成経路のクロストーク制御の分子機構の研究を行う上で、

(1) ウイルス複製と脂肪酸合成経路を標的とするマイクロRNA (miRNA) の作用機序の解明

(2) ウイルス複製と脂肪酸合成経路のmiRNA標的部位の階層性と優先性の検討

(3) ウイルス複製と脂肪酸合成経路を制御するmiRNAによる病原性発現機構の解明

の三点に大きく分けて、試験管内再構成系、培養細胞系とモデル動物系の各レベルの実験を駆使して研究を進める。当初はHCVを用いて実験を行うが、インフルエンザウイルスも利用して、ウイルス間の共通性と多様性に

についても理解する。

4. 研究成果

miR-199a は、前駆体であるプレ miRNA のプロセシングで、miR-199a-5p と miR-199a-3p の二種の異なる miRNA として発現する。我々は、miR-199a-5p と miR-199a-3p が共に FASN 蛋白質の発現を抑制して、肝細胞内の中性脂肪の量を減少させることを見出した。しかし、更に詳細に miRNA の効果を解析するために行ったレポーター・アッセイから、miR-199a-3p だけが FASN の 3'UTR 中の標的配列に直接作用することが判明した。また、HCV レプリコン細胞と感染細胞を用いた解析から、HCV 複製依存に miR-199a-5p は発現量が増加するが、miR-199a-3p は発現量が低下することも発見した。miR-199a-5p と miR-199a-3p の KD は共に HCV 複製を上昇させた。

HCV 中には miR-199a-3p の標的配列しか発見されていないため、miR-199a-5p は間接的に HCV の複製と FASN の発現に影響を与えていると推測できる。HCV 依存に miR-199a-3p の量が低下することは、ウイルス複製に有利に働くためリーズナブルである。今後は HCV 感染の動物モデルを利用して、miR-199a、FASN、HCV の三者間の相互関係を明らかにしていく予定である。

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 3 件)

Yamamoto N, Sato Y, Munakata T, Kakuni M, Tateno C, Sanada T, Hirata Y, Murakami S, Tanaka Y, Chayama K, Hatakeyama H, Hyodo M, Harashima H, *Kohara M. Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection. *J Hepatol.* 2016 Mar;64(3):547-55. (査読有)

doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.014.

*Amako Y, Munakata T, Kohara M, Siddiqui A, Peers C, *Harris M. Hepatitis C Virus Attenuates Mitochondrial Lipid β -Oxidation by Downregulating Mitochondrial Trifunctional-Protein Expression. *J Virol.* 2015 Apr;89(8):4092-101. (査読有)
doi: 10.1128/JVI.01653-14.

*Munakata T, Inada M, Tokunaga Y, Wakita T, Kohara M, Nomoto A. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. *Antiviral Res.* 2014 Aug;108:79-87. (査読有)

doi: 10.1016/j.antiviral.2014.05.011.

〔学会発表〕(計 4 件)

Naoki Yamamoto, Yusuke Sato, Tsubasa Munakata, Takahiro Sanada, Masakazu Kakuni, Chise Tateno, Hideyoshi Harashima and *Michinori Kohara. Novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice for siRNA-based treatments for chronic HBV infection. 第 38 回日本分子生物学会学術集会. 2015. 12. 1-4. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

*Naoki Yamamoto, Yusuke Sato, Tsubasa Munakata, Takahiro Sanada, Masakazu Kakuni, Chise Tateno, Shuko Murakami, Yasuhito Tanaka, Kazuaki Chayama, Hideyoshi Harashima, Michinori Kohara. siRNA-based therapies to chronic HBV infection using a novel pH-sensitive multifunctional envelope-type nanodevice. 2015 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2015.10.4-8.ドイツ(バート・ナウハイム)

*棟方 翼、徳永 優子、真田 崇弘、脇田 隆字、野本 明男、小原 道法. C 型肝炎ウイ

ルス感染時に TLR3 は IFN 非依存的に発現して抗ウイルス作用を示す。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014. 11.10-12. パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市）

*Tsubasa Munakata, Makoto Inada, Yuko Tokunaga, Takaji Wakita, Michinori Kohara, and Akio Nomoto. Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. 2014.9.7-11. The Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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

棟方 翼 (MUNAKATA, Tsubasa)

東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：50420237

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小原 道法 (KOHARA, Michinori)

東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：10250218

斉藤 誠 (SAITO, Makoto)

東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：20433021