

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590956

研究課題名(和文)非コードRNAによるIFN作用増強効果の機構解析とC型肝炎ウイルス治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the enhanced IFN action by the non-coding RNA and its application on HCV treatment

研究代表者

吉田 晴彦 (Yoshida, Haruhiko)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：60240305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：IFNの作用を増強するmicroRNAをスクリーニングしたところ、miR122が同定された。miR122はインターフェロンシグナルを負に制御するSOCS3のプロモーターのメチル化を促進することが示された。従ってIFNの投与によりmiR122の発現が低下するとSOCS3の発現も増強しnegative feedbackになることが示唆された。miR122の発現を減らすアピゲニンはHCVの複製をIFNと併用することで効率的に抑えることが示された。

研究成果の概要(英文)：miR122 was identified as an enhancer of IFN action. miR122 enhanced methylation of the SOCS3 DNA promoter and decreased its expression, which enhances IFN signaling. Apigenin decreases miR122 expression. Therefore, cotreatment of IFN and apigenin may be useful for the inhibition of HCV replication through the augmentation of IFN signaling.

研究分野：消化器内科学

キーワード：IFN 非コードRNA HCV

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は長年にわたり C 型肝炎ウイルス (HCV) の治療 およびそれに関連する肝臓癌の病態・治療に関する臨床および基礎研究を続けてきた。我が国では毎年 3 万人前後の肝臓癌死亡があり、そのうち 75-80% は HCV 感染が原因である。したがって HCV 感染は、例えば「喫煙と肺癌」の相関に比べても、はるかに強い発癌因子と言える。インターフェロン (IFN) は HCV の駆除を目指す治療において中心となる薬剤であるが、本研究代表者は、日本国内での多施設共同研究を主導し、IFN 治療によって C 型肝炎患者で有意に肝臓癌発癌抑制効果が得られること (Yoshida H. et al. *Ann Intern Med.* 1999)。また、IFN 治療によりウイルス駆除が得られると肝の線維化が改善し肝不全の進行も抑制されること (Shiratori Y, Yoshida H. et al. *Ann Intern Med.* 2000) を世界に報告した。さらに、IFN が肝臓関連死を減少させ、患者の生命予後も有意に改善することもみいだした (Yoshida H. et al. *Gastroenterology* 2002)。このように IFN が C 型肝炎患者の治療において、極めて重要で有用な薬剤であることは臨床的にも科学的に実証されているが、その重要性は、HCV に対する新規薬剤が開発されつつあるが、研究開始当初は変わっていなかった。

いっぽう本研究の研究分担者は、RNA ウイルスである HCV がコードする NS3 蛋白が Toll-like receptor の下流に位置する TBK・IKKi と結合し double-strand RNA から始まる innate immunity のシグナリングを阻害して IFN の産生を抑え 自らの増殖に有利な環境を作り出すことを報告した (Otsuka et al. *Hepatology.* 2005)。さらに、細胞内の small non-coding RNA である microRNA の成熟に必須の分子である Dicer が、HCV-RNA を切断することで感染防御に一部ながら寄与していることも報告した (Wang, Otsuka et al. *Gastroenterology.* 2006)。続けて、Dicer 遺伝子のノックアウトマウスを作製し「強力な抗ウイルスシステムである IFN 系を備えた哺乳類の細胞においても、microRNA は種々のウイルスの複製・増殖の制御に関わっている」ことを明らかにし (Otsuka et al. *Immunity.* 2007)、この Dicer のノックアウトマウスの表現型の解析から、microRNA は血管新生にも非常に密接に関与していることも報告した (Otsuka et al. *J Clin Invest.* 2008)。また、最近では肝臓における microRNA122 の発現量の変化に伴う生物学的意義について in vivo, in vitro で解析し報告した (Kojima, Otsuka et al. *Nat Commun.* 2011)。

これらの背景を踏まえて、本研究代表者と分担者は共同で、HCV 治療の中心薬剤である IFN の細胞内シグナルを制御する microRNA を探索し、その機構に基づいて、HCV の抗ウイルス療法における IFN の効果

をさらに飛躍的に高めることができないかということをも想定した。

microRNA は、哺乳細胞では一般的に標的 mRNA の 3'UTR のシーケンス相同性に依存した蛋白翻訳抑制あるいは mRNA の不安定化によって緻密な遺伝子発現制御をしていると考えられている。本研究代表者は IFN の作用を制御する microRNA を検定する目的で、microRNA library を用いて網羅的に IFN シグナルを変化させる microRNA のスクリーニングを行ない、microRNA122 が IFN シグナルを強く抑制する microRNA のひとつであることをみいだした。さらに microRNA122 の機能的ノックアウトにおける DNA のメチル化変化をゲノムワイドに網羅的に探索したところ、IFN シグナルの抑制因子である SOCS3 のプロモーターが強くメチル化されていた。これらの予備の結果から、microRNA122 と IFN シグナル、および microRNA と DNA メチル化のあいだには、これまでに知られていない相互作用があることがすでに想定される結果を得ていた。

microRNA122 は肝臓に特異的に発現する microRNA であるが、この microRNA122 と HCV については、microRNA122 が HCV の増殖を 機序は不明ながら「正」に制御すること (*Science* 2005)・IFN は肝細胞内の microRNA122 の発現を減少させることによって、抗 HCV 効果を発揮するという報告がなされた (*Nature.* 2007)。しかし、IFN 治療を受けた HCV 罹患者の肝生検組織を用いた検討では、miRNA122 の発現量と血中 HCV-RNA 量は相関しないこと・IFN 治療により肝細胞内の miRNA122 の量は変化しないことなど in vitro の結果と相反する事項も報告されている (*Nat Med.* 2009;15:31)。これらの結果からも miRNA122 と HCV 増殖・IFN シグナルとは 少なくとも何らかの関連があると推定されるが、その詳細は明らかではない。

また、マウスを用いた in vivo の系で肝細胞での microRNA122 の機能を一過性に落とすと、肝細胞内でのコレステロール合成能が低下すると報告されている (*Nature.* 2005)。さらにマウスの検討で サークァリアンリズムにも microRNA122 が関与していることが明らかにされた (*Genes Dev.* 2009)。いずれも肝細胞の生理機能として重要な系に microRNA122 が関与していることを示す報告ではある。ところが、microRNA122 の標的遺伝子候補をシーケンスの相同性から探索しても、それらの生理機能に直接に結びつく遺伝子は認められない。

これらの結果から microRNA122 がもたらす生理機能は、1) 二次的・三次的な遺伝子発現変化を介しての機能制御、か 2) 未知の要因による遺伝子発現制御 を介して発揮されている可能性があると考えられる。そこで本研究では 申請者と研究分担者が共にこれらの視点を持って、microRNA122 と IFN シ

グナルの関連について検討を進めていく計画とした。

## 2. 研究の目的

- 1) microRNA library を用いた IFN シグナルを制御する microRNA の同定
- 2) microRNA122 機能的ノックダウン細胞株および microRNA122 ノックアウトマウスの樹立
- 3) microRNA122 ノックアウトに伴う特にエピジェノミク的な変化の網羅的解析
- 4) microRNA122 によってメチル化状態が変化する遺伝子と IFN シグナルの分子機構の変化の in vivo, in vitro での解析
- 5) ここまでの知見を応用した、IFN と microRNA を併用した HCV replication の効率的な阻害法の検討。

同時に、本研究過程で得られた知見を用いて、より普遍的な現象として「microRNA を介した DNA メチル化機構の分子機序の解明」への展開を常に考慮しつつ検討を進めていく。

## 3. 研究の方法

### **1) microRNA library を用いた IFN シグナルを制御する microRNA の同定:**

IFN シグナル作用に影響を与える microRNA を同定するために、IFN sensitivity response element (ISRE) に luciferase 遺伝子を連結したレポーターコンストラクトを恒常的に発現する細胞を樹立し、800 種の microRNA それぞれを 96-well plate で reverse transfection し、IFN 刺激のうへ luciferase activity の変化を検討する。

### **2) レンチウイルスを用いた microRNA122 機能的ノックダウン細胞株の樹立:**

肝細胞特異的 microRNA である microRNA122 に対する anti-sense 配列 RNA を発現するレンチウイルスを作製しこれを肝細胞株に感染させ microRNA122 の機能をノックダウンした stable cell line を樹立する。

### **3) microRNA122 機能的ノックダウンに伴うエピジェノミク的な変化の網羅的解析:**

ノックダウン細胞を用いて、まずエピジェノミクの変化、特に DNA のメチル化状態の変化を Illumina 社の Beadchip を用いてゲノムワイドに検討する。

### **4) microRNA122 によってメチル化状態が変化する遺伝子と IFN シグナル:**

miR122 による SOCS3 の発現量変化が IFN シグナルの変化にどの程度の影響を及ぼしているのかを検討し、ノックダウンによるウイルス複製 (HCV の in vitro 複製系であるレプリコンあるいは培養が容易で IFN 感受性のある VSV を使用) への影響を in vitro において検討する。

## 4. 研究成果

### **1) microRNA library を用いた IFN シグナ**

### **ルを制御する microRNA の同定:**

800 種の microRNA それぞれを 96-well plate で reverse transfection し、IFN 刺激のうへ luciferase activity の変化を検討したところ、miR122 が INF シグナルを低下させる因子として含まれていた。

### **2) レンチウイルスを用いた microRNA122 機能的ノックダウン細胞株の樹立:**

上記で得られた miR122 の機能を検証するために、miR122 の機能的ノックダウン細胞をアンチセンスコンストラクトを発現させて恒常的細胞株を作製した。microRNA122 の機能については luciferase 遺伝子の下流 5'UTR に microRNA122 の標的配列を組み込んだレポーターコンストラクトを作製し定量することにより確認した。

### **3) microRNA122 機能的ノックダウンに伴うエピジェノミク的な変化の網羅的解析:**

27,579 個所のゲノム上の CpG island および CpG shore のメチル化状態を解析したところ、50 の遺伝子の上流領域のみでメチル化状態が大きく変化(その多くは増強)していた。その中に、IFN シグナルを抑制することが知られている SOCS3 が含まれていた。

### **4) microRNA122 によってメチル化状態が変化する遺伝子と IFN シグナル:**

miR122 による SOCS3 の発現量変化が IFN シグナルの変化にどの程度の影響を及ぼしているのかを検討するために、ノックダウンによるウイルス複製 (HCV の in vitro 複製系であるレプリコンを使用) への影響を検討したところ、IFN によって miR122 の発現が減り、そのために SOCS3 の発現が減り、その結果 SREBP1 の発現も減って、コレステロールの生成が減り、また、HCV の複製も減ることが示された。スクリーニングの結果、フラボノイドのひとつアピゲニンが miR122 の発現を減らすことで HCV の複製を減らすことを同定した。

この結果は、IFN 刺激に伴う SOCS3 の発現減少や、アピゲニン併用による miR122 低下による抗 HCV 複製効果を示唆するものとなった。

経口剤による HCV 治療がこの研究遂行過程で実際に臨床で用いられるようになって、高い効果を見ているが、今後、脂肪肝などの制御にも miR122 は関与していることがしっせられているので、その分野でも応用法が期待される。

## 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. Kishikawa T, #Otsuka M, Poh Seng T, Ohno M, Sun X, Yoshikawa T, Shibata C, Takata A, Kojima K, Takehana K, Ohishi M, Ota S, Noyama T, Kondo Y, Sato M, Soga T, Hoshida Y, Koike K. Decreased miR122 in hepatocellular carcinoma

- leads to chemoresistance with increased arginine. *Oncotarget* 2015 in press. [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=3234](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=3234)
2. Shibata C, Ohno M, #Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462-463:42-8. doi: 10.1016/j.virol.2014.05.024.
  3. Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of PNPLA3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology Res.* 2014;44(10):E137-44. doi: 10.1111/hepr.12258.
  4. Shibata C, Kishikawa T, #Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;438(1):230-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.064.
  5. Yoshikawa T\*, Takata A\*, #Otsuka M\*, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K (\*; equal contribution). Silencing of microRNA-122 enhances interferon- $\alpha$  signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep.* 2012;2:637. doi: 10.1038/srep00637.

〔学会発表〕(計2件)

1. 大塚基之、microRNA122の機能的抑制によるIFNシグナル増強作用を介した抗ウイルス作用の増幅、第48回日本肝臓学会 ワークショップ C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略、金沢 2012年6月7日
2. 大塚基之、抗ウイルス補助療法としての臨床応用を見すえたフラボノイドによるmicroRNAの成熟阻害を利用したC型肝炎ウイルス増殖抑制効果について、第50回日本肝臓学会総会 ワークショップ 肝炎ウイルスに対する創薬研究、2014年5月29日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田晴彦 (Yoshida Haruhiko)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：60240305

(2) 研究分担者

大塚 基之 (Otsuka Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院消化器内科・助教

研究者番号：90518945