

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670357

研究課題名(和文) miRNA-33を標的とした新規抗HCV作用の検討

研究課題名(英文) Micro RNA 33 as a potential therapeutic target in chronic hepatitis c

研究代表者

留野 渉 (Tomeno, Wataru)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：00644957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Micro RNAの1つであるmiRNA-33b(miR-33b)は膜結合型転写因子SREBP1と協同して脂質代謝を調節し細胞内コレステロールの恒常性を維持している。C型肝炎ウイルス(HCV)複製増殖細胞にmiR-33b阻害剤を投与しHCV複製への阻害効果を検討した。HCV複製や粒子産生に有利な脂質豊富な環境を作るためmiR-33bの発現亢進を予想したが、HCV蛋白発現細胞及びC型肝炎患者の肝生検検体で、miR-33b発現量はコントロールと比較し有意差を認めなかった。miR-33b阻害剤の投与でHCV蛋白発現及びRNA複製レベルに変化は認めず、新規抗ウイルス薬としての有用性は否定的であった。

研究成果の概要(英文)：Micro RNA 33b (miR-33b) contributes to the regulation of cholesterol homeostasis in cooperation with sterol regulatory element-binding protein (SREBP). We transfected a miR-33b inhibitor into hepatitis c virus (HCV) replicon to examine whether the nucleic acid could inhibit HCV replication. We expected that the expression of miR-33b was upregulated in order to make the lipid-rich environment that HCV was easy to replicate. However, the significant difference was not detected in expression of miR-33b not only in HCV replicon cells but also in the liver biopsy specimens of the chronic hepatitis c patients. Because both the expression of HCV protein and the replication of HCV RNA have not changed significantly after transfection of the miR-33b inhibitor, we were not able to find the usefulness of the agent as the new anti-viral drug.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：C型慢性肝炎 マイクロRNA33 消化器内科 基礎医学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) は、わが国における慢性肝炎・肝硬変・肝癌の最大の原因である。わが国では、毎年 3 万 5 千人もの方が肝癌で亡くなり、その約 70% は C 型肝炎が原因である。2011 年 11 月より初めて使用可能となった経口抗ウイルス薬 (direct acting antiviral agents: DAA) の登場により高い治療効果が期待されているが、患者の高齢化が進むわが国ではより有効率が高く、副作用の少ない新規治療薬の開発が望まれている。

(2) 近年、マイクロ RNA (miRNA) は様々な遺伝子の重要な転写調節因子であることが明らかになり、様々な疾患の新たな治療標的やバイオマーカー候補となっている。また miRNA を標的とした治療は副作用も少ないことが報告されている。miRNA の 1 つである miRNA-33b (miR-33b) は膜結合型転写因子 SREBP1 と協同してリポ蛋白質、脂質代謝を調節し細胞内コレステロールの恒常性を維持している。

HCV は、肝細胞への感染 (吸着、侵入)、複製、粒子形成、放出などその生活環の多くのステップで宿主の脂質を巧みに利用しているが、特に SREBP1 を中心とした脂質代謝異常を引き起こし HCV の生活環に有利な環境を作り出している。そこで我々は、miR-33b 阻害剤の投与により、HCV が引き起こす SREBP1 を中心とした脂質代謝異常を改善させることで HCV の複製増殖を阻害し、有効性が高く副作用の少ない新たな抗ウイルス薬を開発できる可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

(1) 培養細胞、及びヒト肝生検検体における HCV 感染による miR-33b 発現亢進の有無を検討する。

(2) HCV 複製増殖細胞に miR-33b 阻害剤を投与しウイルス複製の阻害効果の有無を検討する。

## 3. 研究の方法

遺伝子型 1b の HCV-O 株から開発され、全長 HCV-RNA の複製を培養細胞内で再現できるレプリコンシステム、OR6 を用いた。また OR6 からインターフェロンにより HCV を除去した OR6c をコントロールとした。OR6、OR6c にはレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子が含まれ、HCV-RNA の複製レベルをルシフェラーゼ活性の測定により簡便に測定できる。

(1) HCV 複製増殖細胞、及びヒト肝生検検体における miR-33b 発現亢進の有無についての検討

OR6 と OR6c との間で miR-33b の発現量をリアルタイム PCR で比較した。また生体内での脂質が豊富に利用できる環境を再現するためオレイン酸 100  $\mu$ M を培地に添加し検討した。

C 型肝炎患者 2 名と肝移植ドナー (ほぼ正常肝) 1 名の肝生検検体で miR-33b の発現量を比較した。

(2) HCV 複製増殖細胞に miR-33b 阻害剤を投与した際のウイルス複製、蛋白発現の阻害効果の有無についての検討

OR6、OR6c に miR-33b inhibitor (miR-33b と結合し拮抗阻害する核酸) と miR-33b mimic (内在性 miR-33b と同じ配列の核酸)、及びコントロール核酸をリポフェクション法で遺伝子導入し、導入から 72 時間後に以下検討を行った。

それぞれの複製効率と HCV 蛋白発現をルシフェラーゼアッセイとウエスタンブロットで検討した。

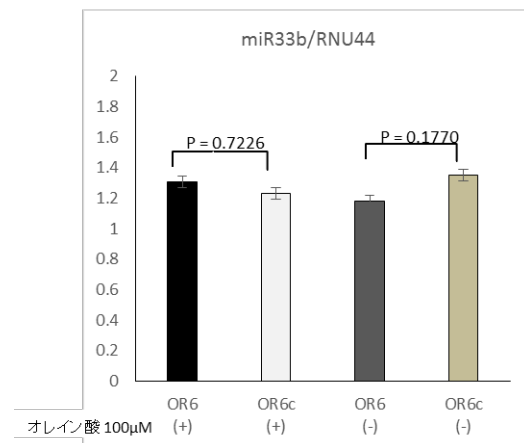
上記検討を培地にオレイン酸 100  $\mu$ M を添加し培養細胞は脂質を豊富に利用できる環境下で行い、オレイン酸を添加しない場合と比較して OR6、OR6c の miR-33b inhibitor への反応性の変化について検討した。

## 4. 研究成果

(1) HCV 複製増殖細胞、及びヒト肝生検検体における miR-33b 発現亢進の有無についての検討

OR6 と OR6c との間で miR-33b の発現量の比較

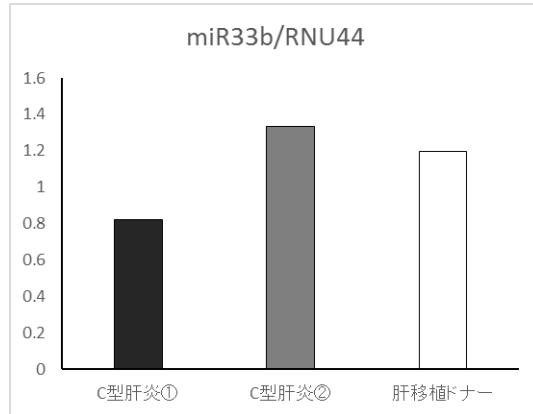
OR6 と OR6c との間で miR-33b の発現量に有意差を認めず、オレイン酸 100  $\mu$ M を培地に添加して検討したがやはり miR-33b の発現量に有意差を認めなかった (図 1)。



(図 1) miR-33b 発現量の比較 (OR6 と OR6c)

## 肝生検検体での miR-33b 発現量の比較

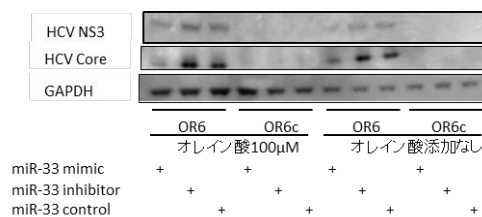
肝生検検体では C 型肝炎患者 2 名は肝移植ドナーに比較し miR-33b の発現量が一定の傾向を示さなかった(図 2)。



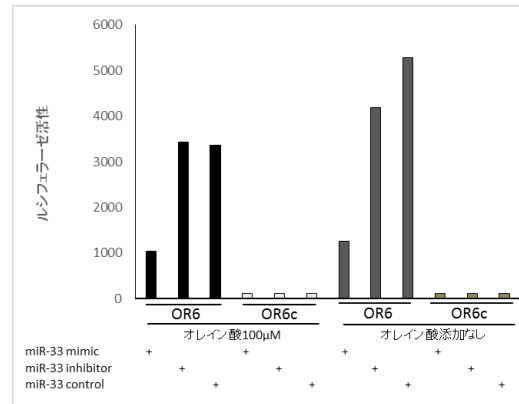
(図 2) miR-33b 発現量の比較(肝生検検体)

(2) HCV 複製増殖細胞における、miR-33b 阻害剤投与による HCV 複製、蛋白発現の阻害効果の検討

OR6 に miR-33b mimic を遺伝子導入すると HCV 構造蛋白(Core)、及び非構造蛋白(NS3) は発現が低下し(図 3)、培養細胞内の HCV 複製レベルは顕著に低下した(図 4)。これはオレイン酸添加の有無に関わらず同様の傾向であった。一方、miR-33b inhibitor を導入した場合にはコントロール核酸を導入した場合と比較し大きな変化は認めなかった。



(図 3) miR-33b inhibitor 及び miR-33b mimic 投与による HCV 蛋白発現の変化



(図 4) miR-33b inhibitor 及び miR-33b mimic 投与による HCV-RNA 複製レベルの変化

### (3) 研究成果の総括

miR-33b は SREBP1 と協同し脂質代謝を調節して細胞内がコレステロール不足になることを防ぐと考えられている。SREBP1 は HCV により発現が亢進することが報告され、HCV の複製や粒子産生に有利な脂質豊富な環境を作るため miR-33b は SREBP1 と共に発現が亢進することを研究開始前は予想した。しかし今回の検討で HCV 複製増殖細胞(OR6)、及び C 型肝炎患者の肝生検検体において、miR-33b はコントロールと比較し発現量に有意差は認めなかった。

miR-33b mimic の投与で HCV 蛋白発現及び RNA 複製レベルが低下したことは当初の予想とは異なるものの興味深い結果であったが、miR-33b inhibitor の投与では HCV 蛋白発現及び RNA 複製レベルに変化はみられず、miR-33b 阻害剤の新規抗ウイルス薬としての有用性は否定的であった。

今後は miR-33b mimic の投与による HCV 複製増殖阻害の機序について、脂質代謝経路を介した作用、及び標的部位に結合することによる直接的なウイルス阻害作用の有無について、検討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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

留野 涉、篠原 義康、齊藤 聡、microRNA33b を標的とした新規抗 HCV 作用についての検討、第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 30 日、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

〔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：特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

留野 渉 (TOMENO, Wataru)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：00644957

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

斉藤 聡 (SAITO, Satoru)