

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590760

研究課題名（和文）新規 RNA 情報基盤を利用した慢性 C 型肝炎の制御の試み

研究課題名（英文）Trial for the novel therapy of chronic hepatitis C by using platform of the RNAi machinery

研究代表者

村上善基（MURAKAMI YOSHIKI）京都大学・医学研究科・産学官連携准教授

研究者番号：00397556

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。日本人に多い遺伝子型 1b 感染で高ウイルス量による慢性 C 型肝炎はインターフェロン治療効果が低い。

(1) HCV ゲノム複製を抑制するマイクロ RNA を利用して、慢性 C 型肝炎の制御、(2) ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療効果別と肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、患者個人の遺伝子情報に応じたテーラーメード治療の確立、を目指し体系的な慢性肝炎新規治療への基盤を構築する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
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：マイクロ RNA、C型肝炎ウイルス、慢性 C 型肝炎、

1. 研究開始当初の背景

我が国の HCV 感染者は全人口の約 2% と推定されており、HCV は感染すると高率に慢性化し年余をへて結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する事が知られている。現在 C 型慢性肝炎治療はペグインターフェロンとリバビリン併用療法が主であるが、奏効率が 50% 程度である事、副作用が強く治療中断例が少なくない事が問題となっている。さらに本邦にお

ける慢性肝疾患の年間死亡者数は約 5 万人に上り感染対策は急務である。このため HCV の感染防止、慢性 C 型肝炎の制御は保険、医療の向上に直結し、医療費の削減をもたらす。しかし現状では満足のいく HCV 感染者に対する治療結果が得られていない。この原因としてウイルスの増殖メカニズムが十分に解明されていないことがある。そのために慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌においてそれぞれ疾患の進

展を規定する宿主、ウイルス側因子を明らかにし、それぞれの病態における新たな治療方法の確立が必要である。

2. 研究の目的

マイクロ RNA は 20bp 程度の小分子 RNA で塩基配列特異的に遺伝子の発現を調節することが知られている。マイクロ RNA の発現異常と疾患密接に関係していると考えられており、とくにウイルス感染、発癌では多くの報告がみられる。今までに我々は C 型慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、各疾患特異的なマイクロ RNA 発現プロファイルを得た。これらのデータを基盤として、本研究では HCV 感染制御を以下の観点から行なった。(1) マイクロ RNA を用いた新たな慢性 C 型肝炎治療を目指した *in vivo* 実験の確立、(2) 従来から知られている抗ウイルス活性をもつインターフェロン、サイクロスポリンを HCV レプリコン細胞に用いた時に見られるマイクロ RNA の発現変化を利用した、抗ウイルス活性をもつ新規宿主因子の同定、(3) マイクロ RNA 発現プロファイルを用いた慢性 C 型肝炎の抗ウイルス治療効果予測、(4) 肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを利用した、新規バイオマーカーの作成と患者の状態に応じたテーラーメイド医療の確立。従来検討されていなかった各疾患におけるマイクロ RNA 情報基盤を組み合わせる事によって、本研究の今までとはまったく異なったアプローチで HCV ウイルス感染、慢性感染、線維化の進行、発癌の制御、と一連の慢性ウイルス性肝炎の各ステージにおける病態解析を行ない、新規 RNA 創薬研究に結びつけることを目標とする。このことは依然肝細胞癌での死亡者数が本邦では第 5 位を占めることより、社会的貢献度は大きく、研究の意義、必要性は高いと考えられる。

3. 研究の方法

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの

制御 (ウイルス側因子の検討)

塩基配列上 HCV ゲノムをターゲットとするマイクロ RNA 1 種を用いて HCV の複製モデルであるレプリコン細胞 2 種、SN1a (遺伝子型 1b)、JFH1 (遺伝子型 2a) を用いて、マイクロ RNA の過剰発現は HCV レプリコンの複製を抑制することを示した。またこのときレプリコン細胞にマイクロ RNA を発現させた時に発現か変化する遺伝子をマイクロアレイにて解析し、意図しない遺伝子への影響 (オフターゲット) を解析した。

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (宿主側因子の検討)

レプリコン細胞に抗ウイルス剤 (インターフェロン (IFN) またはサイクロスポリン A (CyA)) を投与しそれぞれレプリコンが検出できなくなった細胞 (cured 細胞) を作成した。この際に共通してレプリコンが検出できなくなった時に発現の変化したマイクロ RNA を 1 種同定し、そのターゲット候補遺伝子を得た。ターゲット候補遺伝子がレプリコンに与える影響過剰発現、発現抑制実験を行ない、*real-time* PCR にてレプリコン RNA の発現を観察した。またペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織 99 例よりからマイクロ RNA 発現プロファイルを治療効果別に作成した。同じサンプルを用いインターフェロン関連遺伝子約 180 の解析をマイクロアレイにて行ない解析した。

肝線維化の制御についての検討

IFN 投与前の慢性 C 型肝炎患者 106 例より肝生検を行い組織学的に線維化の程度を評価した。肝組織より RNA を抽出しマイクロ RNA マイクロアレイを用い線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを行った。

4. 研究成果

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (ウイルス側因子の検討)

(1) 塩基配列上 C 型肝炎ウイルス(HCV)をターゲットとする 1 種類のマイクロ RNA を HCV の複製モデルである HCV レプリコン細胞に過剰発現するとレプリコンの活性が低下し、マイクロ RNA の機能を低下させると複製が亢進する事を示した。マイクロ RNA は宿主のもっている抗ウイルス活性を惹起して抗ウイルス作用を発揮しているのではなく、直接 HCV レプリコンに作用することによって起こることを示すために以下の実験を行なった。マイクロ RNA とレプリコン RNA それぞれに変異を起こし、お互いに認識できないようにすると、この機能は低下した。またマイクロ RNA が生理的にレプリコン RNA と結合することを示すために、マイクロ RNA は argonaute2 等の細胞タンパクとターゲット遺伝子で RISC complex を形成する。マイクロ RNA をレプリコン細胞に過剰発現させこの構成成分の一つである argonaute2 にて免疫沈降して HCV レプリコン RNA が集積することを利用して示した。

マイクロ RNA は塩基配列上非常に多くのターゲット遺伝子をもつ可能性があり、このため意図しない表現系の変化がある可能性がある(オフターゲット効果)、このことを検証するために、レプリコン細胞の SN1a とヒト肝細胞を不死化した HuS-E2 細胞を用い HCV レプリコンの機能を抑制するマイクロ RNA を過剰発現した時にみられる遺伝子変化をマイクロアレイにて解析した。発現変化のみられた遺伝子は塩基配列上該当するマイクロ RNA のターゲットではなかった、HCV 複製に関係していると報告されている遺伝子は 3 種同定できたが、マイクロ RNA の発現することにより、それぞれの遺伝子の発現パターンがこれらの遺伝子の機能発現パターンが異なっているために、直接 HCV レプリコンに影響しているとは考えにくかった。またマイクロ

RNA 過剰発現で発現の変化している遺伝子は現在知られている範囲では細胞毒性、ウイルス活性を有しているとの報告はない。以上のことにより、このマイクロ RNA は直接 HCV を制御すると考えられた。

マイクロ RNA による C 型肝炎ウイルスの制御 (宿主側因子の検討)

cured 細胞を作成した際に 2 種の薬剤を用いて共通に発現の低下した、マイクロ RNA を一つ見いだされた。このマイクロ RNA はターゲット検索アルゴリズム上 HCV そのものをターゲットにしない事を確認した。このマイクロ RNA の機能抑制したところレプリコン活性が低下し、cured 細胞にレプリコンを導入したところこのマイクロ RNA の発現が上昇した。またターゲット候補遺伝子 15 種のうち 1 はマイクロ RNA の発現パターンと一致した。マイクロアレイ解析によりペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果別の sustained virological responder (SVR)、transient virological responder (TR)、non-virological responder (NR)のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果予測を試みた所 SVR と NR の分別は 76.1%、SVR と TR は 56.6%、TR と NR は 71.1%であった。validation set を用いた所 SVR と NR の分別は 63.0%であった。この際に必要なプローブ数は 14 であった。肝線維化の低いものと、そうでないものに分けて SVR と NR を分別したところその正確性は差がみられなかった。SVR、TR、NR になるにつれ発現が有意に上昇しているマイクロ RNA が 20 種、低下しているものが 8 種あった。

肝線維化の制御についての検討

抗ウイルス療法を行っていない慢性 C 型肝炎患者 106 名より肝の線維化の軽度なものから順に F0:7 例、F1: 56 例、F2: 24 例、F3:17

例を解析しそれぞれにマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。これを用いて二群間分別を行なった所 F0/F1 84.3%、F1/F2 82.7%、F2/F3 87.8%の確率で分別できた。また線維化の程度が進行するにつれて発現の亢進しているマイクロ RNA は 22 種、低下しているマイクロ RNA は 16 種であった。

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 13 件)

1. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9(9):1089-9710, 2007
2. Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem.* 282 (45) 32765-32772, 2007
3. Watashi K, Shimotohno K. Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol.* 17: 245-252, 2007
4. El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K. In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol.* 2007;51(1):127-133, 2007
5. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
6. Zhang J, Yamada O, Yoshida H, Sakamoto T, Araki H, Shimotohno K. Helper virus-independent trans-replication of hepatitis C virus-derived minigenome. *Biochem Biophys Res Commun.* 352(1):170-176, 2007
7. Aly HH, Shimotohno K. Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(2):330-334, 2009.
8. Isono O, Ohshima T, Saeki Y, Matsumoto J, Hijikata M, Tanaka K, Shimotohno K. Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. *J Biol Chem.* 283(49):34273-34282, 2008.
9. Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology.* 379(2):306-313, 2008.
10. Ikejiri M, Ohshima T, Fukushima A, Shimotohno K. Maruyama T. Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(16):4638-4641, 2008.
11. Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y. Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients. *Journal of Hepatology.* 48: 43-50, 2008

12. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I. Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (*MLL4*) Gene and Rearrangements of *MLL4* in Human Hepatocellular Carcinoma. Hum Mutat. 2008;29:703-8
13. Murakami Y, Ali HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Novel approach for HCV regulation by miR-199a*. Journal of Hepatology. 50: 453-460, 2009

[学会発表] (計2件)

1. Murakami Y, Ali HH, Hijikata M, and Shimotohno K. Novel approach for HCV regulation by using miRNA. JCA 66th Annual meeting, Yokohama October 3-5, 2007
2. Murakami Y, Okanoue T and Shimotohno K. Aberrant expression of miR-224 has a potential for hepatocarcinogenesis. JCA 67th Annual meeting, Nagoya October 3-5, 2008

[図書] (計1件)

14. 村上善基、安田 剛 マイクロアレイを用いたmiRNAの大規模発現解析 RNA実験ノート 羊土社 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

C型肝炎ウイルスの複製を制御するマイクロRNA 特願 2007-91723 (H19-3-30)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 善基 (MURAKAMI YOSHIKI)

京都大学・医学研究科・産学官連携准教授

研究者番号: 00397556

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

下遠野 邦忠 (SHIMOTOHNO KUNITADA)

慶応義塾大学・医学部・教授

研究者番号:10000259

田嶋 敦 (TAJIMA ATSUSHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 10396864