

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461014

研究課題名(和文) C型慢性肝炎ウイルスによる脂質代謝異常に対するmiRNAsの関与の解明

研究課題名(英文) Analysis of participation of miRNAs to lipid metabolic malfunction by hepatitis C virus

研究代表者

斉藤 聡 (SAITO, SATORU)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：00275041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(以下HCV)は宿主の脂質代謝を利用し、自身の増殖や感染の環境を有利にしていることはこれまでに多くの報告がある。脂質代謝に関与するmiRNA-33が、HCVの増殖や感染を抑制することで抗ウイルス効果が期待できるかを検討したが、効果は示されなかった。一方、肝臓内で発現が高いmiRNA-27が非アルコール性脂肪肝炎(NASH)患者で発現が亢進していた。このmiRNA-27がHCV治療終了後の患者の線維化改善のマーカーとなりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：There are many reports so far for using host's lipid metabolism for a hepatitis C virus (below HCV) and making the environment of the replication and infection profitable. It was considered whether the anti-viral effect could be expected by miRNA-33, which participates in lipid metabolism, restraining replication and infection of an HCV, but the effect wasn't indicated. On the other hand, the expression of miRNA-27 was accelerated in the liver of non-alcoholic steatohepatitis hepatitis (NASH) patients. This miRNA-27 can be a marker of improvement for fibrosis in HCV patients after treatment.

研究分野：医師薬学

キーワード：ウイルス 肝炎 microRNA

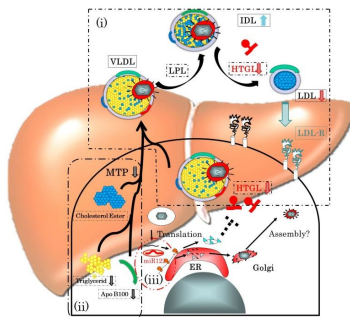
### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス（以下 HCV）は宿主の脂質代謝を利用し、自身の増殖や感染の環境を有利にしていることはこれまでに多くの報告がある。我々も HCV と脂質、リポ蛋白質代謝との関連について早くから注目し、特に HCV により肝性リパーゼ（HTGL）の発現が抑制され、このことが HCV の感染に大きく関わっている可能性を示した。本研究では、近年重要な転写調節因子として注目されている miRNAs があるが、脂質代謝に関与しているとされる miRNA のうちどれが HCV の増殖や感染を抑制するのに優れているかを比較検討することを目的としている。一方、内在性の低分子 RNA であるマイクロ RNA (microRNA:miR) が、遺伝子発現を精巧に調節していることが示されてきた。その中には miR-27, miR-33 などが脂質代謝に重要な役割をもっていることが報告されている。最終的に miR による治療効果を明らかにする。

### 2. 研究の目的

脂質代謝に関与する miRNA 発現の阻害剤や、誘導剤を投与することで HCV の発現抑制や感染性抑制をもたらすことが可能かを明らかにする。HCV 複製増殖細胞（OR6 細胞）において各 miR の定量を行い、その発現量をコントロール細胞（HCV を完全に除去した細胞）（OR6c 細胞）とで比較検討を行う。C型肝炎患者の肝生検検体を用いて、各 miR の定量を行い、この結果を *in vitro* の結果とヒト検体での整合性を確認する。Fig.1 は本研究で明らかにしようとしているポイントである。(i)は HCV により発現が低下した HTGL が miR 阻害剤により回復するかを確認し、その状況下でウイルス感染が抑制されることを示す。(ii)は HCV 感染により脂質が肝細胞内に蓄積する状況をどの miR がより効率よく改善するかを解析する。(iii)では miR により HCV ウイルスの増殖の抑制にも影響をもたらすかを明らかにする。miR-33 が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）と関与しているかを検討し、HCV 患者に応用可能かを検討する。

Fig.1



### 3. 研究の方法

本研究で使用した細胞は、レプリコン細胞

OR6 で HCV 遺伝子型 1b の全長が組み込まれた Huh7 由来の細胞である(岡山大学・加藤先生、池田先生より供与)。対照は OR6 細胞にインターフェロン (500 IU/ml) を添加し、HCV 遺伝子を除去した OR6 cured 細胞 (OR6c) を 4 日間培養したものを用いた。

(1)このレプリコンシステムで OR6 細胞と OR6c 細胞を用いて Total RNA を抽出し、Real time PCR(TaqMan Micro RNA Assays)で各 miR を定量する。IFN の影響を除外するため、OR6 細胞の元であるヒト肝癌細胞由来 (Huh-7) に IFN を加えた場合と、Huh-7 に溶媒のみ加えた場合の各 miR を定量、比較し IFN による各 miR への影響を除外する。IFN 影響が miR の発現に無視できるレベルであることを確認した上で、OR6 細胞と OR6c 細胞との間の各 miR の発現量を比較する。(2)C型肝炎患者の肝生検検体から、Real time PCR(TaqMan Micro RNA Assays)で各 miRNA を測定する。コントロールとして C型肝炎以外の慢性肝疾患(B型肝炎や、自己免疫性肝炎など)患者の肝生検検体を用いる。可能であれば治療後に肝生検を行うことが可能であった場合には、治療前後での miR の発現量の差を比較する。(3)Exosomes は、30-150nm の小さな球体でその中に miR や蛋白などを豊富に含んでいる。NASH 患者と健常者における miR-27 を比較検討する。

### 4. 研究成果

本研究では生体内では利用できる豊富な脂質が存在するが、これを再現するためにオレイン酸 100  $\mu$ M を培地に添加してまず miR-33b の発現を比較したが、両者の間に有意な差は認めなかった。in vivo の状況を比較するために C型肝炎患者 2 名の生検検体と、非 C型肝炎患者の検体における miR-33b の発現量を比較検討した。生体における miRNA に有意差は認めなかった。OR6 細胞に miR-33b mimic(内在性 miR-33b の配列で、miR-33b が増加した状態を示す)をトランスフェクションしたところ、HCV のコア蛋白(構造領域)、NS3(非構造領域)の発現の低下を認めた。このことは miR-33b mimic が HCV 複製を抑制することが示された。miR-33b inhibitor(miR-33b と結合し miR-33b の発現を抑制する)をトランスフェクションしたところ HCV 複製には影響を与えなかった。SREBP1 は HCV 感染により発現が更新することが知られているが、今回の結果からは miR-33b の発現レベルは HCV タンパクが発現している状態と、発現していない状態では有意差を認めず、miR-33b inhibitor の抗ウイルス作用は期待できないことが明らかとなった。

肝臓・miR-27c 血清 Exosome・miR-27c

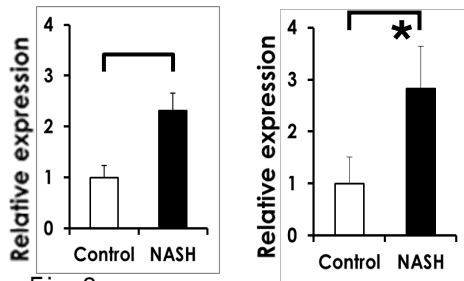


Fig.2

一方、NAFLD・肥満患者では miR-27b が亢進していた(Fig.2)。高脂肪食負荷により、まず肝臓で miR-27b の亢進がおき、血清 exosome を介して脂肪組織へ伝播することが示唆された。HCV 感染患者の治療経過を観察するうえで miR-27b が利用できる可能性を引き続き検討している。

### 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. Hepatitis B Virus and DNA Stimulation Trigger a Rapid Innate Immune Response through NF- $\kappa$ B. Yoneda M, Hyun J, Jakubski S, Saito S, Nakajima A, Schiff ER, Thomas E. *J Immunol*. 2016 Jun 10. pii:1502677. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27288535. 査読有
2. Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. Kessoku T, Imajo K, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, Kato S, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Nagashima Y, Saito S, Wada K, Nakajima A. *Sci Rep*. 2016 Feb 25;6:22251. doi: 10.1038/srep22251. 査読有
3. Magnetic Resonance Imaging More Accurately Classifies Steatosis and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Than Transient Elastography. Imajo K, Kessoku T, Honda Y, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Taguri M, Hyogo H, Sumida Y, Ono M, Eguchi Y, Inoue T, Yamanaka T, Wada K, Saito S, Nakajima A. *Gastroenterology*. 2016 Mar;150(3):626-637. e7. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.048. Epub 2015 Dec 8. 査読有
4. Nonalcoholic fatty liver disease comorbid with major depressive disorder: the pathological features and poor therapeutic efficacy. Tomeno W, Kawashima K, Yoneda M, Ogawa Y, Honda Y,

Kessoku T, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Saito S, Hirayasu Y, Nakajima A. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun;30(6):1009-14. doi:10.1111/jgh.12897. 査読有

5. LDL-Migration Index (LDL-MI), an Indicator of Small Dense Low-Density Lipoprotein (sdLDL), Is Higher in Non-Alcoholic Steatohepatitis than in Non-Alcoholic Fatty Liver: A Multicenter Cross-Sectional Study. Imajo K, Hyogo H, Yoneda M, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Taguri M, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Saito S, Sumida Y, Ono M, Wada K, Nakajima A, Eguchi Y. *PLoS One*. 2014 Dec 26;9(12):e115403. doi: 10.1371/journal.pone.0115403. eCollection 2014 査読有

[学会発表](計17件)

1. 留野涉、篠原義康、斉藤聡 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 P 136 ポスターセッション35 C型肝炎・基礎 2014年5月30日 ホテルニューオータニ(東京)
2. 小川祐二、本多靖、結束貴臣、留野涉、今城健人、馬渡弘典、斉藤聡、中島淳 パルミチン酸単独投与が引き起こす肝臓における自然免疫応答の検討 第51回日本消化器免疫学会総会 ワークショップ 2014年7月10日(木) 京都大学医学部 芝蘭会館(京都)
3. 斉藤聡、武田和永、留野涉、馬渡弘典、今城健人、小川祐二、結束貴臣、桐越博之、加藤由理、遠藤格、中島淳 肝移植後のC型慢性肝炎に対する3剤併用療法の問題点 2014年度日本消化器関連学会週間(JDDW 2014)ポスターセッション(肝臓学会) C型肝炎(治療)13 2014年10月24日 神戸国際会議場(神戸)
4. 留野涉、中島淳、斉藤聡 高齢者におけるペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害薬3剤併用療法における治療効果の検討 第40回日本肝臓学会東部会パネルディスカッション3 C型肝炎:3剤併用療法のOverview 2014年11月28日 京王プラザホテル(東京)
5. 斉藤聡、三橋将人、中島淳 ペグインターフェロン・リバビリン・テラプレビル3剤併用療法におけるC型慢性患者の末 第40回日本肝臓学会東部会 ワークショップ2 肝疾患のゲノム・免疫研究を治療に繋ぐ 2014年11月28日 京王プラザホテル(東京)
6. 結束貴臣、本多靖、小川祐二、留野涉、

今城健人、馬渡弘典、藤田浩司、米田正人、  
斉藤聡、酒井英子、水口裕之、和田孝一郎、  
中島淳 NASH/NAFLD における肝  
microRNA-27b の臓器移行を介した肥満形成  
メカニズム 第34回アルコール医学生物学  
研究会学術集会 シンポジウム「NASHと  
ASH: 病態解明の最先端」 2015年1月23  
日 ホテルグリーンパーク津(三重)

7. Kessoku T, Honda Y, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Wada K, Eguchi Y, Nakajima A: MICRO RNA-27B PROMOTES NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS THROUGH THE INHIBITION OF PPAR AND MTTP IN VIVO ANIMAL STUDY. EASL Monothematic Conference: Microbiota, Metabolism and NAFLD, Innsbruck Austria, February 26-28, 2015.
8. 留野涉、中島淳、斉藤聡: 当院における HCV/HIV 重複感染例に対する抗 HCV 療法の治療成績. 第 101 回日本消化器病学会総会一般演題 口演 C 型肝炎 6 臨床, 2015 年 4 月 24 日. 仙台国際センター(仙台)
9. 今城健人、斉藤聡、中島淳: 非アルコール性脂肪肝疾患の病態診断は MRI 単独で可能か. 第 41 回日本肝臓学会西部会 パネルディスカッション 3 非侵襲的肝繊維化診断法の進歩 2015 年 12 月 3 日. 名古屋国際会議場(名古屋)
10. Imajo K, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Fujita K, Yoneda M, Saito S, Nakajima A: MAGNETIC RESONANCE IMAGING MORE ACCURATELY CLASSIFIES STEATOSIS AND LIVER FIBROSIS IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE THAN TRANSIENT ELASTOGRAPHY. Presentations: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis Fatty liver disease Clinical 15 April 2016, The International Liver Congress 2016, EASL Barcelona Spain
11. 河島圭吾、五十川正記、堤進、村上周子、斉藤聡、中島淳、田中靖人; 異なる HBV 遺伝子型による HBV 抗原遷延率の違い~肝臓内 CD8+T 細胞応答およびコア抗原発現量の相関性. 第 52 回日本肝臓学会総会 一般演題 口演 0-64、B 型肝炎・基礎 3, 2016 年 5 月 19 日、東京ベイ幕張ホール(千葉)
12. 斉藤聡、留野涉、寺谷卓馬. C 型肝炎に対する DAA 使用にける問題点. 第 52 回日本肝臓学会総会 一般演題 ポスター、P-12、C 型肝炎 2、2016 年 5 月 19 日、東京ベイ幕張ホール(千葉)
13. 松井宣昭、佐藤広隆、斉藤聡: MR Elastography を用いた肝硬度・脾硬度の測定と食道静脈瘤評価への応用. JDDW2016 ワークショップ 15(肝臓学会・消化器病学会). 2016 年 11 月 4 日. 神戸コンベンションセン

ター(兵庫)

14. 松井宣昭、今城健人、斉藤聡: MR Elastography を用いた食道静脈瘤の非侵襲的な診断及び管理の検討. 第 41 回日本肝臓学会東部会 ワークショップ 10 門脈圧亢進症治療の進歩. 2016 年 12 月 9 日. 京王プラザホテル(東京都)
15. 今城健人、斉藤聡、中島淳: 慢性肝疾患における肝硬度の不均一性を検討する. 第 41 回日本肝臓学会東部会 一般演題(口演) 14 肝線維化(1). 2016 年 12 月 8 日. 京王プラザホテル(東京都)
16. 斉藤聡、熊本宜文、中島淳: 肝移植における C 型肝炎患者の抗ウイルス治療の問題点. 第 41 回日本肝臓学会東部会 一般演題(口演) 17 C 型肝炎(2). 2016 年 12 月 8 日. 京王プラザホテル(東京都)
17. 留野涉、中島淳、斉藤聡: MRI を用いた C 型肝炎治療前後の肝内鉄沈着及び肝硬度変化についての検討. 第 41 回日本肝臓学会東部会 一般演題(口演) 57 C 型肝炎(14). 2016 年 12 月 9 日. 京王プラザホテル(東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斉藤 聡 (SAITO, Satoru)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00275041

### (2) 研究分担者

中島 淳 (NAKAJIMA, Atsushi)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30326037  
今城 健人 (IMAJO, Kento)  
横浜市立大学・附属病院・助教  
研究者番号: 30600192

### (3) 連携研究者

なし