

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790687

研究課題名(和文)抗microRNA122療法を基軸とした新規抗C型肝炎ウイルス治療法の開発

研究課題名(英文)Clarification of Mechanism of Anti-microRNA-122 Therapy for Hepatitis C Virus Infection

研究代表者

島上 哲朗(Shimakami, Tetsuro)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：50436820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：今後C型慢性肝炎治療はDirect-Acting Antiviral Agents (DAA)耐性ウイルスが問題となる。今回肝特異的に発現するmicroRNA-122 (miR-122)を標的とした抗miR-122療法とDAA併用療法の有用性を検討した。その結果、DAAと抗miR-122療法の併用により相乗的な抗ウイルス効果を示し、DAA耐性ウイルスにDAAと抗miR-122療法を併用することでDAA耐性が改善し、DAAと抗miR-122療法併用によりDAA耐性ウイルスの出現を抑制した。これらの結果からDAAと抗miR-122療法併用は、DAA耐性ウイルスを抑制しうる点で有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The emergence of Direct-Acting Antiviral Agents (DAA)-resistant virus could be a serious problem for the treatment of chronic hepatitis C patients. We examined the efficiency of the combination therapy with DAA and anti-miR-122 therapy, which is targeting liver-specific miRNA, miR-122. We demonstrated that the combination therapy (1) shows synergistic antiviral effect, (2) alleviates the drug resistance of DAA-resistance viruses, and (3) completely inhibits the emergence of DAA-resistance virus. These results indicate that anti-miR-122 therapy is quite useful in terms of inhibiting the emergence of DAA-resistance virus when it is combined with DAA.

研究分野：消化器内科学

キーワード：C型肝炎ウイルス microRNA-122 C型慢性肝炎 抗ウイルス療法

1. 研究開始当初の背景

C 型慢性肝炎に対する治療は、C 型肝炎ウイルス（以下 HCV）複製を直接抑制する Direct-Acting Antiviral Agents (DAA) の登場により、約 80%以上のウイルス排除が可能となった。しかし、DAA 耐性ウイルスの選択・出現が今後問題となると考えられる。肝特異的に発現する microRNA-122 (miR-122) が HCV の複製に促進的に作用することが報告され、HCV 感染チンパンジー (Science 2009)、さらに HCV 感染患者 (NEJM 2013) に対する抗 miR-122 療法の有用性が報告された。抗 miR-122 療法は、耐性ウイルスの出現頻度が極めて低いため、今後 DAAs 耐性ウイルスによる難治性 C 型肝炎に対する極めて有用な治療法と考えられる。しかしながら抗 miR-122 療法と DAA 製剤とを併用した際の抗ウイルス効果に関しては検討されていなかった。今回、抗 miR-122 と DAA 製剤へ併用をした際の抗ウイルス効果を HCV の培養細胞系を用いて詳細に検討した。

2. 研究の目的

HCV の培養細胞系を用いて以下の 5 点に関して明らかにすることを目的とした。

- (1) 抗 miR-122 療法と DAAs 製剤の一つである NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 Simeprevir 併用による相加相乗的な抗ウイルス効果の有無。
- (2) Simeprevir 耐性ウイルスに対して抗 miR-122 療法と Simeprevir を併用した際の Simeprevir に対する薬剤耐性の改善効果の有無。
- (3) 抗 miR-122 療法と Simeprevir を併用した際の Simeprevir 耐性ウイルス出現の抑制の効果の有無。
- (4) 同じく DAA 製剤の一つである NS5A 阻害剤 Daclatasvir 耐性ウイルスに対して抗 miR-122 療法と Daclatasvir を併用した際の Daclatasvir に対する薬剤耐性の改善効果の有無。
- (5) 抗 miR-122 療法と Daclatasvir を併用した際の Daclatasvir 耐性ウイルス出現の抑制の効果の有無。

3. 研究の方法

上記の目的のため以下の実験を行った。

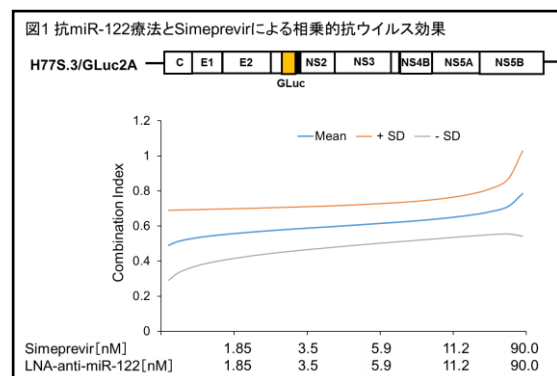
- (1) HCV 複製培養細胞 (HCV は遺伝子型 Ia H77S.3/GLuc2A, p7-NS2 間に分泌型ルチフェラーゼ GLuc 遺伝子を含む、図 1 上段) に LNA 修飾 miR-122 アンチセンス鎖 (以下 LNA-anti-miR-122) と NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 Simeprevir を様々な

濃度で投与して、相加・相乗的な抗ウイルス効果の有無を Combination Index を指標に検討した。

- (2) 既知の Simeprevir および Daclatasvir 耐性ウイルス複製細胞に LNA-anti-miR-122 および Simeprevir あるいは Daclatasvir を様々な濃度で投与して、Simeprevir および Daclatasvir に対する薬剤耐性の改善を Simeprevir および Daclatasvir に対する EC50 を算出し検討した。
- (3) NS5A の内部に Blastocidin-S 耐性遺伝子を含む HCV (H77S.3/Blast5A ; 図 2 上段) 持続複製細胞を作成した。この細胞に、Simeprevir 単独、および LNA-anti-miR-122 と Simeprevir の併用投与を行った。尚、HCV 複製細胞のみを選択する目的で、Blasticidin-S は持続投与とした。これらの細胞から全 RNA を抽出し、HCV RNA の定量を行った。
- (4) Neomycin 耐性遺伝子を含む HCV (tat2ANeo-H77S; 図 4 上段) 持続複製細胞を作成した。この細胞に、Daclatasvir 単独、および LNA-anti-miR-122 と Daclatasvir の併用投与を行った。尚、HCV 複製細胞のみを選択する目的で、neomycin は持続投与とした。これらの細胞から全 RNA を抽出し、HCV RNA の定量を行った。

4. 研究成果

- (1) LNA-anti-miR-122 と Simeprevir を図 1 下段に示す濃度で HCV 複製細胞に投与し、HCV 複製を GLuc 活性により評価した。各濃度での Combination Index (CI : 0.8 以上を相加作用, 0.8 未満を相乗作用) を算出した。検討したいずれの濃度においても CI は 0.8 未満であり、相乗的な抗ウイルス作用を示すことが明らかとなった。



(2)

- ① Simeprevir に LNA-anti-miR-122 療法を併用することで、野生型ウイルス (H77S.3/GLuc2A) に対する Simeprevir の EC50 は約 50%にまで低下した。さらに LNA-anti-miR-122 の投与により Simeprevir 耐性ウイルスの Simeprevir に対する EC50 はおおむね低下傾向を示した。(表 1)

表1 抗miR-122療法併用によるSimeprevir耐性ウイルスの薬剤耐性の改善

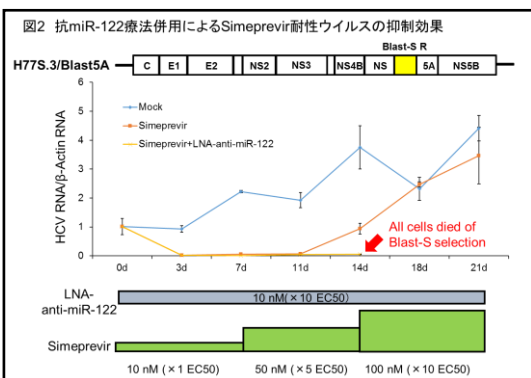
Mutants	EC50 for Simeprevir LNA-anti-miR-122 concentrations		
	0 nM	0.5 nM	1 nM
WT	2.3	1.1	1.2
Q80R	39.7	24.3	23.7
Q80K	34.2	23.0	28.7
S122R	137.8	106.1	96.0
R155K	189.1	149.7	94.4
R155T	65.0	14.2	30.3
D168G	43.4	22.0	36.1
D168T	1376.7	418.7	409.6
D168V	5385.3	3101.7	2808.2
I170T	25.4	18.0	19.2
I132V+D168E	145.5	119.7	78.5
Q80R+D168E	1012.6	820.9	514.2
D168E+N174K	502.1	336.8	294.6

- ② Daclatasvir に LNA-anti-miR-122 療法を併用することで、Simeprevir 耐性ウイルスの Simeprevir に対する EC50 はおおむね低下傾向を示した。(表 2)

表2 抗miR-122療法併用によるDaclatasvir耐性ウイルスの薬剤耐性の改善

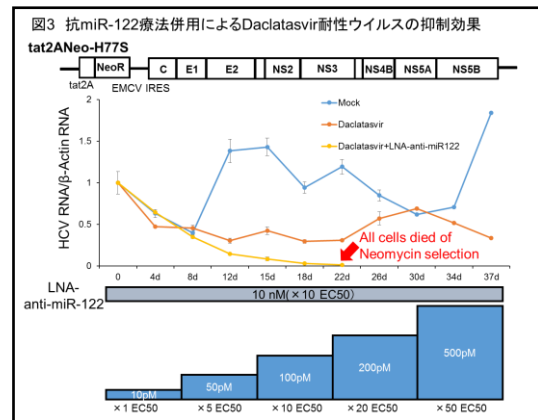
Mutant	EC 50 for Daclatasvir (pM) LNA-anti-miR-122 concentrations			
	0 nM	0.5 nM	1 nM	5 nM
WT	18.80	13.16	17.02	15.40
Q30R	4370	1130	980	700
L31V	8690	3700	1430	790

- (3) H77S.3/Blast5A 持続複製細胞を Simeprevir 単剤, Simeprevir と LNA-anti-miR-122 の併用投与, および無処理にて長期間培養した。その結果併用投与により, HCV 複製細胞は全て投与 14 日後に死滅した。一方 Simeprevir 単剤投与細胞, 無処理細胞は持続的な複製を示した (図 2)。



- (4) Tat2ANeo-H77S 持続複製細胞を Daclatasvir 単剤, Daclatasvir と LNA-anti-miR-122 の併用投与, および無

処理にて長期間培養した。その結果併用投与により, HCV 複製細胞は全て投与 22 日後に死滅した。一方 Daclatasvir 単剤投与細胞, 無処理細胞は持続的な複製を示した (図 3)。



以上の検討から, 以下の事が明らかとなった。

- (1) DAAs 製剤の一つである NS3/4A プロテアーゼ阻害剤 Simeprevir と抗 miR-122 療法の併用により相乗的な抗ウイルス効果を示した。
- (2) Simeprevir 耐性ウイルスに対して Simeprevir と抗 miR-122 療法を併用することで Simeprevir に対する薬剤耐性が改善した。
- (3) DAAs 製剤の一つである NS5A 阻害剤 Daclatasvir 耐性ウイルスに Daclatasvir と抗 miR-122 療法を併用することで Daclatasvir に対する薬剤耐性が改善した。
- (4) Simeprevir と抗 miR-122 療法の併用により Simeprevir 耐性ウイルスの出現を完全に抑制した。
- (5) Daclatasvir と抗 miR-122 療法の併用により Daclatasvir 耐性ウイルスの出現を完全に抑制した。

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 12 件)

1. Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep.* 2015 Jan 8;5:7675. (査読あり)
2. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T,

- Murai K, Shiomoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30. (査読あり)
3. Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, **Shimakami T**, Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine*. 2014 Aug;20(8):927-35. (査読あり)
 4. Li Y, Masaki T, **Shimakami T**, Lemon SM. hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication. *J Virol*. 2014 Jul 1;88(13):7199-7209. (査読あり)
 5. **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiomoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4:4688. (査読あり)
 6. Honda M, Shirasaki T, **Shimakami T**, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-38. (査読あり)
 7. Spaniel C, Honda M, Selitsky SR, Yamane D, **Shimakami T**, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. microRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e7686 (査読あり)
 8. Shirasaki T, Honda M, **Shimakami T**, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M, Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol*. 2013 May;87(9):5270-86. (査読あり)
 9. Welsch C, **Shimakami T**, Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM. Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the hepatitis C virus NS3/4A serine protease. *Gastroenterology*. 2012. 142(3):654-63 (査読あり)
 10. Welsch C, Schweizer S, **Shimakami T**, Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012. 56(4):1907-15. (査読あり)
 11. **Shimakami T**, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol*. 2012. 86(13):7372-83. (査読あり)
 12. **Shimakami T**, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 109(3):941-6. (査読あり)
- [学会発表] (計 9 件)
- 国内
1. **島上哲朗**, 本多政夫, 金子周一. IL28B Genotype, ISGs 発現量, 前治療反応を用いたテラプレビル併用抗 HCV 療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討. 第 50 回日本肝臓学会総会 シンポジウム 1-8 (2014 年 5 月 29 日, 東京都)
 2. **島上哲朗**, 本多政夫, 金子周一. 前治療無効例に対するテラプレビル併用 3 剤併用療法 48 週間延長投与に関する検討. 第 100 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 6-9 (2014 年 4 月 26 日, 東京都)
 3. **島上哲朗**, 本多政夫, 金子周一. プロテアーゼ阻害剤耐性 C 型肝炎ウイルスの RNA 複製能・感染性粒子産生能に関する検討. 第 48 回日本肝臓学会総会, (2012 年 6 月 8 日, 石川県金沢市)
- 国外
1. **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiomoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation

of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. The Liver Meeting 2014, 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, Poster 1776, 2014 年 11 月 11 日, ポストン (アメリカ)

2. **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. 21st International Symposium on Hepatitis C Viruses, Poster P3.66, 2014 年 9 月 8 日, バンプ (カナダ)
3. **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOLIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Poster 1701, 2014 年 4 月 10 日, ロンドン (イギリス)
4. **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Acyclic Retinoid, Peretinoin, Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture. The 64rd AASLD2013, Poster, 2013 年 11 月 21 日, ワシントン (アメリカ)
5. **Shimakami T**, Yamane D, Honda M, Kaneko S, and Lemon SM. miR-122 stabilizes Hepatitis C Virus RNA by an Ago2-dependent mechanism. The 10th single topic conference, Poster, 2012 年 11 月 21 日, 東京都 (日本)
6. **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Acyclic Retinoid. The 63rd AASLD2012, Poster, 2012 年 11 月 12 日, サンフランシスコ (アメリカ)

[図書] (計 2 件)

1. **島上哲朗**, 酒井明人, 金子周一. 日本臨牀社. C 型肝炎, 肝硬変患者, キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス. 日本臨牀 2015 年 1 月 73 巻増刊号 1, 788-92
2. **島上哲朗**, 山根大典, Lemon S. 羊土社. miR-122-Ago2 複合体による C 型肝炎ウイルス RNA の安定化. 2012 年 実験医学, 30:1444-8

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
特記すべきことなし

6. 研究組織
(1)研究代表者
島上 哲朗
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号: 50436820

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし