

食品成分アピゲニンのマイクロRNA抑制機構を介した 抗C型肝炎ウイルス効果の検討

大野元子

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻（消化器内科学） 博士課程

緒言

ポリフェノールは分子内にフェノール性ヒドロキシル基をもつ植物性成分の総称で、多彩な生理学的作用を持つことが知られているが、その作用機構の大部分は明らかにされていない。一方、microRNAは20~25塩基程度の小分子RNAで、現在ヒトで2,000種ほど報告されているが、ひとつのmicroRNAが複数のmRNAを標的として結合し、それらの遺伝子からの蛋白発現を負に制御することで様々な生理機能を発揮することが近年明らかになってきた¹⁾。我々はmicroRNAが多彩な生理作用を持つという点でポリフェノールと類似していることに着目し、「ポリフェノールの持つ生理作用の多様性は、多彩な生理作用をもつmicroRNAの機能変化によって惹起されている可能性がある」という仮説を立ててこれを検証した。その結果、ブロッコリー・パセリなどの緑色野菜やカモミール茶に多量に含まれるポリフェノールの中のフラボノイド属のひとつアピゲニンが、microRNAの成熟過程に関与するTRBPというタンパクのリン酸化をMAPK経路依存性に抑制し、TRBPに依存して合成される一群のmicroRNAの産生を低下させその機能を抑制するという見出しをした。その具体的な効果として、耐糖能異常に関与することが報告されていたmicroRNA-103 (miR103)²⁾に着目し、アピゲニンがmiR103の生成を抑制することによって耐糖能異常を改善する効果があることをマウスモデルで検証し報告した³⁾。アピゲニンはTRBPを介して生成されるmicroRNAの一群の機能を抑制すると考えられるが、その中でmicroRNA-122 (miR122) もアピゲニンによって合成が阻害されるmicroRNAのひとつであった。

miR122は肝細胞特異的に発現し、脂質代謝や鉄代謝など肝臓の多彩な機能に関わるmicroRNAである⁴⁾とともに、C型肝炎ウイルス (HCV) の複製を「正」に促すことが示されており⁵⁾、実際にmiR122のアンチセンス核酸が小規模の短期臨床試験 (Phase 2) でC型肝炎ウ

イルス量を減らすことが確認されている⁶⁾。慢性C型肝炎は治療法が進歩しつつあるものの、いまだに我が国の肝癌の主要な原因であり、また抗ウイルス療法の治療効果はウイルス量によって規定されているという側面もあり、miR122の機能調整・発現調整は肝臓関連疾病の管理に有用な可能性がある。本研究ではこれまでに見出したアピゲニンのmicroRNA合成・機能阻害効果の知見を元に、miR122の合成阻害を介したC型肝炎ウイルス増殖抑制効果について検証した。

方法・結果

1. アピゲニンはmiR122の産生を抑制する

ヒト肝癌細胞株であるHuh7細胞にアピゲニンを添加後5日目の細胞中の成熟miR122発現量をRT-PCR法で定量した。TRBPが関与しないmicroRNAの一つlet-7gをControlとして用いたところ、let-7gの発現量は変化しなかったものの、miR122はアピゲニン濃度依存的に有意な低下を認めた (図1a)。また、Northern blottingでもアピゲニン存在下でのmiR122の発現低下を確認した (図1b)。一方、miR122の前駆体であるmiR122 precursorはアピゲニン濃度依存的に増加しており (図1c)、アピゲニンがprecursorからmiR122への成熟の過程を阻害していると考えられた。

次に、miR122のターゲット領域を3'-UTRに持つルシフェラーゼレポーターを細胞に導入し、miR122の機能をルシフェラーゼアッセイで評価した。この系においてmiR122はルシフェラーゼの発現を抑制するが、アピゲニンの濃度依存的にルシフェラーゼ活性の上昇を認め、アピゲニンがmiR122の機能を抑制していると考えられた (図1d)。また、miR122のターゲット領域に変異を導入したレポーターではルシフェラーゼ活性の変化はなく、活性変化はmiR122の特異的な作用を反映していると考えられた。なお、アピゲニン濃度は5 μ Mまで上げても有意な細胞毒性を認めず、50 μ Mではわずかに細胞

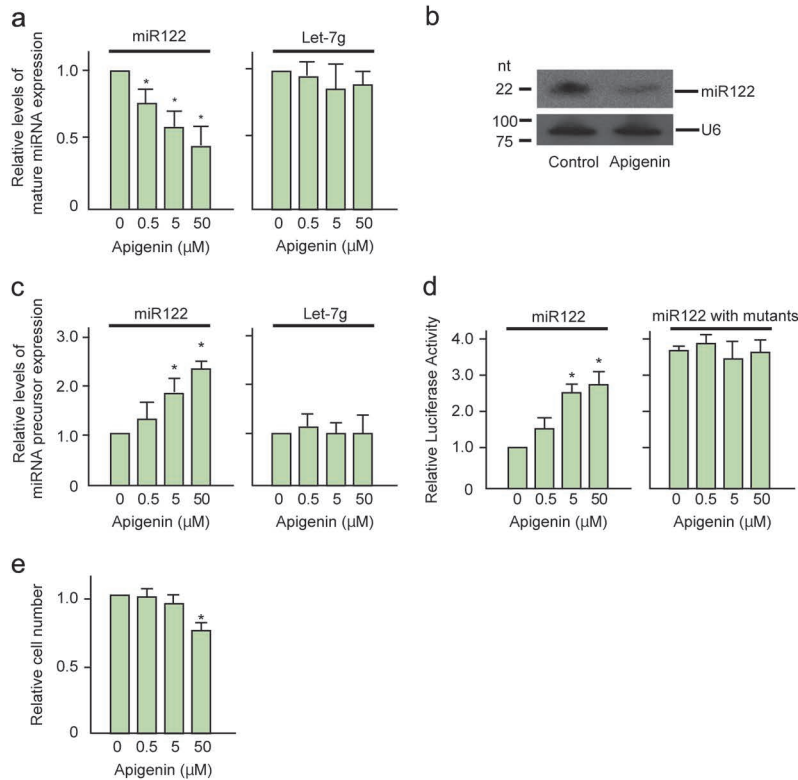


図1 アピゲニンのmiR122産生抑制効果

数の低下がみられた (図1e)。

2. アピゲニンはmiR122発現抑制を介してHCV複製を抑制する

miR122がHCV複製に促進的に働くことから、アピゲニンがmiR122発現抑制を介してHCV複製を抑制するという仮説を立て、これを検証した。この際、HCVレプリコンによるレポーターコンストラクト (Huh7-Feo) を持つHuh7-Feo細胞を用いた。このレプリコンは、HCVの5' IRESの下流にルシフェラーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子による融合遺伝子Feoを持ち、細胞内のHCV複製をルシフェラーゼ活性によってモニターできる (図2a)。この細胞にアピゲニン添加後5日目にルシフェラーゼ活性を測定すると、アピゲニン濃度依存的にルシフェラーゼ活性は有意に低下 (すなわちHCV複製の低下を示唆) しており、5 μ Mのアピゲニン処理後ではmiR122アンチセンスを導入したものとほぼ同程度の低下であった (図2b)。Western Blottingでも同様に、アピゲニンによるルシフェラーゼの発現抑制を確認した (図2c)。

次に、合成miR122の導入がアピゲニンの効果に拮抗するかどうかを調べた。まず合成miR122導入後の細胞

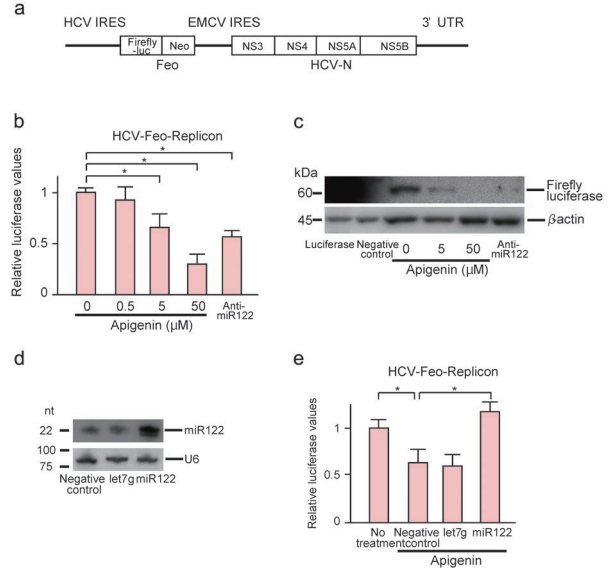


図2 アピゲニンのmiR122抑制を介したHCV複製抑制効果

中のmiR122が増加していることをWestern Blottingで確認 (図2d)、アピゲニン添加によるルシフェラーゼ活性をみると、miR122高発現細胞ではアピゲニン存在下でもルシフェラーゼ活性低下を認めなかった (図2e)。以上より、アピゲニンはmiRNA発現抑制を介してHCV複製抑制効果を阻害すると考えられた。

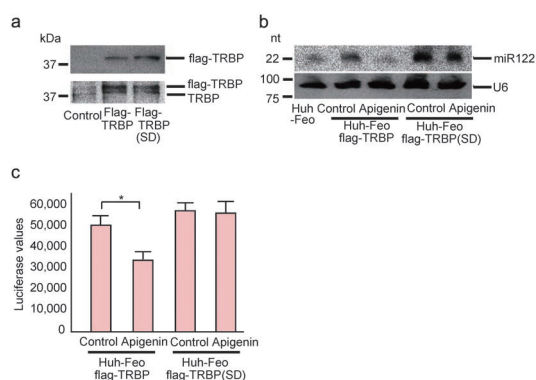


図3 アピゲニンのHCV複製抑制効果に対するリン酸化TRBPの拮抗効果

3. リン酸化TRBPはアピゲニンのHCV複製抑制効果を阻害する

アピゲニンのmicroRNA産生抑制効果がTRBPリン酸化抑制によるという以前の実験結果を踏まえ、flag-Tag付きTRBP、および活性型であるリン酸化TRBPのmimic (TRBP (SD): TRBPのセリンをアスパラギン酸に置換)の発現コンストラクトを作成した。これらのコンストラクトを293T細胞に導入すると、共に同程度の発現を認めた(図3a)。次に、レンチウイルスを用いてTRBPおよびTRBP (SD)安定発現Huh7-Feo細胞株を作成し、これらの安定発現株にアピゲニンを添加したところ、TRBP (SD)発現株ではmiR122の発現が有意に高く、アピゲニン存在下でもmiR122発現は低下しなかった(図3b)。また、ルシフェラーゼ活性(HCVレプリコンの複製)の低下も認めなかった(図3c)。つまりTRBP (SD)はリン酸化TRBPの機能を持ち、アピゲニンのmiR122発現抑制作用をキャンセルしていると思われる。

以上より、アピゲニンはTRBPのリン酸化抑制を介

してmiR122の成熟過程を阻害し、結果としてmiR122が促進的に働くHCV複製が抑制されると考えられる。

考 察

慢性C型肝炎の治療においては、近年DAA製剤(direct acting antiviral drug)の進歩により治療効果が目覚ましく向上してきており、アピゲニンのHCV複製抑制効果がどれほど寄与できるかは不明である。しかし、DAAが高価であることから経済性・利便性の問題、またDAA耐性株を持つ治療無効な患者などの問題も存在している。我々の見出したこの知見により、例えばアピゲニンと従来の治療を組み合わせるなど、アピゲニンがHCVの制御に補助的な役割を果たすことができるかもしれない。また、miR122が脂質代謝にも関与しており、miR122の発現抑制がコレステロールを低下させる効果も示唆されることから、アピゲニンのサプリメントや補助食品の開発など、新たな予防法・補助治療法として発展することも期待できる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) D. P. Bartel: *Cell*, **116**, 281-297, 2004.
- 2) M. Trajkovski, et al.: *Nature*, **474**, 649-653, 2011.
- 3) M. Ohno, et al.: *Sci Rep.*, **3**, 2553, 2013.
- 4) A. Takata, et al.: *Minerva Gastroenterol Dietol.*, **59**, 187-203, 2013.
- 5) C. L. Jopling, et al.: *Science*, **309**, 1577-1581, 2005.
- 6) H. L. Janssen, et al.: *N Engl. J. Med.*, **368**, 1685-1694, 2013.
- 7) C. Shibata, et al.: *Virology*, **462-463**, 42-48, 2014.