

## 野菜に含まれるポリフェノール類の一種アピゲニンによる microRNA 成熟

## 抑制作用を介した抗 C 型肝炎ウイルス作用

## 【助成対象者】

東京大学医学部附属病院消化器内科  
特任講師 大塚 基之

## 【共同研究者】

東京大学医学部附属病院特任臨床医  
岸川 孝弘  
東京大学大学院医学系研究科大学院生  
大野 元子  
東京大学医学部附属病院登録研究医  
高田 朱弥

## 【研究の目的】

ポリフェノール類は多彩な生理学的作用が報告されているがその作用機構は大部分が不明である。いっぽう、ヒトで現在 2000 種ほど報告されている小分子 RNA である microRNA は、ひとつひとつが複数の mRNA を標的としてそれらの mRNA からのタンパク合成を阻害することで生理機能を発揮することが最近明らかになってきている。私たちは、ポリフェノールの中のフラボノイド属のひとつであるアピゲニンが、microRNA の成熟過程で必須の分子である TARBP というタンパクのリン酸化を抑制し、TARBP に依存して合成される一群の microRNA の機能を抑制することをみいだした。

microRNA のひとつ、microRNA-122 は、肝臓の中の microRNA の大半を占める重要な microRNA であるが、中でも C 型肝炎ウイルスの増殖を正に制御する（その正確な機構は不明だが C 型肝炎ウイルスの 5' IRES に作用して増殖を助けていることが示されている）機能がある。そこで本研究においては、ブロッコリーやパセリなどの緑色野菜に多量に含まれるフラボノイドであるアピゲニンが、microRNA-122 の合成阻害を介して C 型肝炎ウイルス増殖抑制効果を持たないかを、臨床試験の前段階として *in vitro* で検証し一定の効果が得られれば臨床試験に移行したいと考えている。また、もし期待通りの効果が得られなかったとしても、アピゲニンが作用する microRNA の一群には具体的にどのような種類の microRNA があるのか（おそらく TARBP 依存性に生成される microRNA）を明らかにして、その後の根拠に基づいたアピゲニンの応用のための基礎データとする。

## 【研究の成果】

1) アピゲニンによる microRNA122 の合成・機能阻害効果の確認：

a) アピゲニンが TARBP のリン酸化阻害を介して合成阻害に関わる microRNA の一つとして microRNA-122 があることを、アピゲニンを添加した培養幹細胞株を用いて、Northern blotting あるいは qRT-PCR によって確認した。この効果が TARBP のリン酸化阻害に寄っていることを、TARBP のリン酸化部位をリン酸化 mimic に置換したタンパクを発現してレスキューされることで確認した。

b) 並行して microRNA-122 の機能も抑制されることを、microRNA-122 が標的とするレポーターコンストラクトを transfection した細胞にアピゲニンを添加することで確認した。上記と同様にこの効果が TARBP の constitutively active form でレスキューされることを確認した。

2) C 型肝炎ウイルス in vitro 複製系に与える 影響の検証：

C 型肝炎ウイルスはウイルスそのものの in vitro 複製系はいまだ確立されていないが、ウイルス複製を mimic するレプリコンの系は確立されている。今回は、アッセイをしやすいように C 型肝炎ウイルスレプリコンの複製に応じてルシフェラーゼレポーターを発現する系に改変したコンストラクトを用いて、これにアピゲニンを添加して C 型肝炎ウイルス複製に与える影響を検討した。その結果、アピゲニンは投与添加量に依存して、C 型肝炎ウイルスレプリコンの複製を抑制することを見出した。

3) C 型肝炎ウイルス複製に与える影響のレスキュー：

上記のアピゲニンによるウイルス複製抑制作用が microRNA-122 の合成阻害に依存していることを確認するために、合成 microRNA-122 を導入して、効果がキャンセルされるかどうか検討したところ、確かにウイルスレプリコンの複製阻害効果がキャンセルされたため、アピゲニンによる作用は microRNA-122 の抑制作用に依存していることが示唆された。

4) アピゲニンが成熟に影響を与える microRNA の種類の同定：

上記に並行して、アピゲニンが成熟に影響を与える microRNA の種類を同定するために、アピゲニンを添加した肝細胞株を用いて mature な microRNA だけを測定できる microRNA microarray を用いて検討した。ここで得られた結果については Northern blotting によって microRNA と precursor microRNA を同時にみることで合成過程の変化を確認した。これらの結果から、microRNA-122 以外に影響を受ける microRNA として microRNA103 を同定した。

5) microRNA103 の過剰発現による耐糖能異常のアピゲニンによる改善効果：

microRNA103 の過剰は耐糖能異常を惹起することが知られていたため、microRNA103 のトランスジェニックマウスを作製し、耐糖能異常マウスモデルとした。そこにアピゲニンを投与することによって microRNA103 の発現を抑制し、それにともなって耐糖能異常が改善することを確認した。

これらの結果から、アピゲニンの摂取によって、C型肝炎ウイルス量を「減らす」ことが可能になると思われた。

これ自体はウイルス「駆除」とは異なり厳密には肝炎の「治癒」にはならないが、たとえば抗ウイルス治療を行う時の食事面の注意など、日常生活の実際的な注意点につながる科学的根拠が得られると思われる。

また、アピゲニンによる microRNA103 阻害による耐糖能異常の改善効果は、アピゲニン摂取による C 型肝炎ウイルス抑制作用だけでなく、他にも対象母集団が多い生活習慣病の予防改善効果もあることが示唆され、「科学的根拠に基づいた『食と健康』の一例」として社会的に提示することができたのではないかと考える。

#### 【今後の課題】

本研究の成果に基づく今後の課題を以下に記す。

1) C 型慢性肝炎に罹患している患者さんの補助療法としてのアピゲニンに摂取：本研究から、ポリフェノールの一種アピゲニンには C 型肝炎ウイルスの増殖を抑える効果があることが示唆された。今後の課題としては、アピゲニンを摂取する際の有効血中濃度に到達させるための具体的な食品摂取量の検討、あるいは効果的なサプリメントの開発が必要である。

2) TRBP リン酸化を抑える阻害剤の開発：C 型肝炎ウイルスの増殖あるいは耐糖能異常についても、アピゲニンの効果は TRBP のリン酸化を抑えることで効果が発揮されていると考えられる。したがって、TRBP のリン酸化を阻害するような化合物を合成あるいは同定できれば、アピゲニンに依存しない、より特異的な「治療薬」の開発につながる可能性もある。

3) microRNA103 の過剰に伴う耐糖能異常の改善効果について：microRNA103 の過剰に伴う耐糖能異常をアピゲニンが改善する可能性が示唆されたが、この効果についての臨床的な検証が必要と思われる。そのためには、耐糖能異常を呈する患者さんのうち、microRNA103 過剰に基づいている人を選別する方法の確立が必要である。それができれば、効率的な臨床研究が可能になると思われる。

4) 副作用について：microRNA の抑制が副作用として他の生物学的機能に影響しないか、in vivo モデルを用いた厳密な検証が、ヒトを対象とした臨床研究に進む前に、安全性の観点から必要となる。

5) その他の機能の検討：microRNA に依存した増殖をする悪性新生物（癌）も多数報告されているので、ここまでに検討した効果以外の機能があるか、将来的には検討の価値があると思われる。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

# : Corresponding author

1. Shibata C, #Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(1):1-6.
2. Shibata C, Ohno M, #Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Murayama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462・463:42-8.
3. Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, #Otsuka M, Koike K. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. *Sci Rep* 2013;3:2553.