

・ 総括研究報告

C型肝炎ウイルス感染特異的な長鎖ノンコーディングRNAの探索

研究代表者：島上 哲朗 金沢大学附属病院 助教

研究要旨：近年、200塩基以上のlong non-coding RNA(以下lncRNA)が、様々な疾患・病態において重要な役割を果たしていることが報告されている。本年度、C型肝炎ウイルス（以下HCV）感染特異的に発現が変化するlncRNA群を抽出し、それらのHCV複製における役割、および臨床的意義を検討した。

まず、ヒト肝癌細胞株にHCVを感染させ、全細胞RNAを回収し、次世代シーケンサーを用いてlncRNAの発現解析を行った。統計学的にHCV感染特異的に発現が増加するlncRNAを26個抽出した。次にこのlncRNA26個それぞれに対するsiRNAを作成し、HCV感染細胞に導入したところ、26個中4個のlncRNAの投与によりHCV複製の抑制を認めた。この中でlncRNAのデータベースに登録され、肝臓での発現も報告されているlncRNA-Hに着目し解析を行った。In vitroにおける解析から HCV感染によりlncRNA-Hの発現が誘導され、lncRNA-Hに対する複数のsiRNAの投与による発現抑制により、HCV複製は抑制され、lncRNA-HによるHCV複製抑制効果は、ゲノタイプ1a, 1b, 1a/11aキメラ株いずれに対しても認められた。またペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された165例の治療前肝生検組織を用いて肝内のlncRNA-Hの発現量を測定した。その結果、ペグインターフェロン・リバビリン療法難治性であるIL28B ゲノタイプ minor群ではmajor群に比べてlncRNA-Hの発現量が有意に高値であった。

A. 研究目的

本研究の目的は以下である。

- 1) HCV感染特異的に発現が増減するlncRNAを探索する。
- 2) さらにそれらのlncRNAの中からHCV複製および感染を制御するlncRNAを同定する。
- 3) 同定したlncRNAによるHCV複製制御機構を解明する。
- 4) C型慢性肝炎感染肝組織におけるlncRNAの発現と、インターフェロン治

療効果およびインターフェロン治療抵抗性の関連を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) RNA シーケンス法にて HCV 感染培養細胞由来 RNA の解析を行い、HCV感染特異的に発現が増減する lncRNA を抽出した。
- 2) HCV 培養細胞系において、1)において同定した lncRNA の過剰発現および発現抑制を行い、実際に HCV 感染を制御

する lncRNA の同定を行った。

- 2) で同定した lncRNA の中から lncRNA-H に着目し、HCV 培養細胞系を用いて、lncRNA による HCV 感染制御機構の解明を行った。
- ペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された 165 例の治療前肝生検組織を用いて肝内の lncRNA-H の発現量を測定し、lncRNA-H の発現量とインターフェロン療法感受性因子である IL28B ゲノタイプ major 群と minor 群間で比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行う。

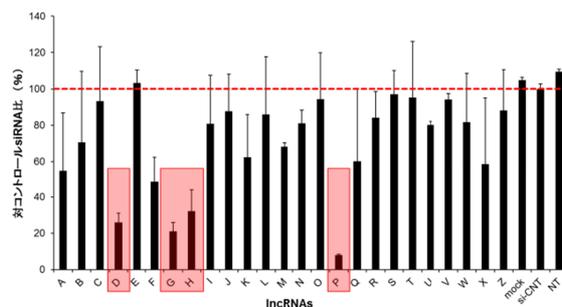
C. 研究結果

- 細胞培養感染 HCV クローン(Ia/IIa キメラ、HJ3-5)をヒト肝癌細胞株(Huh7.5 細胞)に感染させ、感染後経時的に細胞全 RNA を回収した。また

HCV 感染後 NS5A 阻害剤を投与し、同様に細胞全 RNA を回収した。

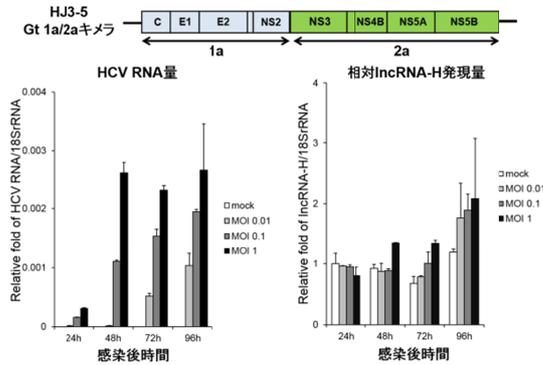
- これらの RNA のうち polyA を有する RNA のみ選択的に増幅し、次世代シーケンサー(Illumina HiSeq2000)を用いて lncRNA の発現解析を行った。さらに統計学的に HCV 感染特異的に発現が増加する lncRNA 群 26 個(A から Z)を抽出した。
- これら lncRNA 26 個に対する siRNA を作成し、HCV 感染細胞に投与し、HCV 複製における役割を検討した。その結果 lncRNA-D,G,H,P に対する siRNA 投与により HCV 複製抑制を認めた(図 1)。

図 1 lncRNA に対する siRNA 投与による HCV 複製に対する影響



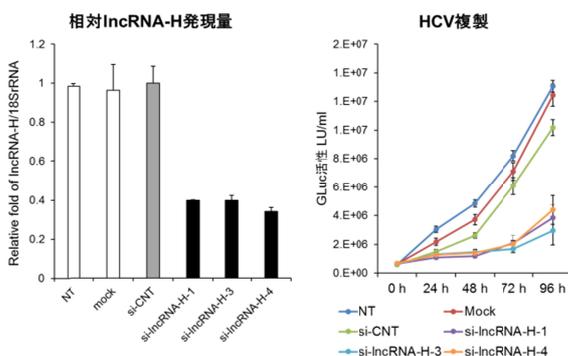
- これら 4 種類の lncRNA のうち、既に lncRNA としてデータベースに登録されており、さらに肝臓における発現も報告されている lncRNA-H に着目した。
- Huh7.5 細胞に HJ3-5 ウイルスを MOI 0.01-1 で感染させ、lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法で測定した。その結果、時間・MOI 依存性の lncRNA-H の発現誘導を認めた(図 2)。

図2 HCV 感染による IncRNA-H の発現誘導



6) IncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作成し、ヒト肝癌細胞株 (FT3-7 細胞) にそれぞれ導入したところ、全ての siRNA 導入で IncRNA-H の発現抑制を認めた。HJ3-5 複製 FT3-7 細胞において siRNA により IncRNA-H の発現を抑制したところ HCV 複製の抑制を認めた。いずれの siRNA の投与でも HCV 複製抑制効果を認めたが、si-IncRNA-H-3 によって最も強い効果を認めた (図3)。

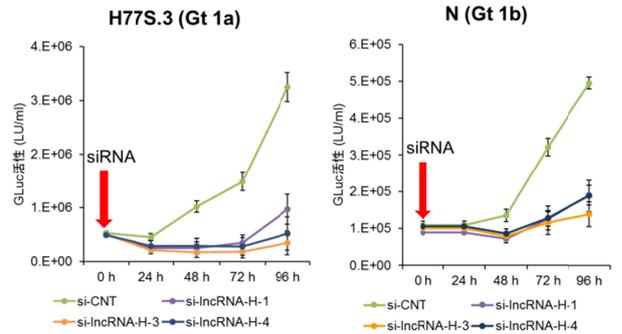
図3 IncRNA-H 発現抑制による HCV 複製抑制



7) 異なる HCV ゲノタイプである 1a H77S 株、1b N 株 (いずれもチンパンジー感染クローン) に対しても IncRNA-H の発現を抑制することで、

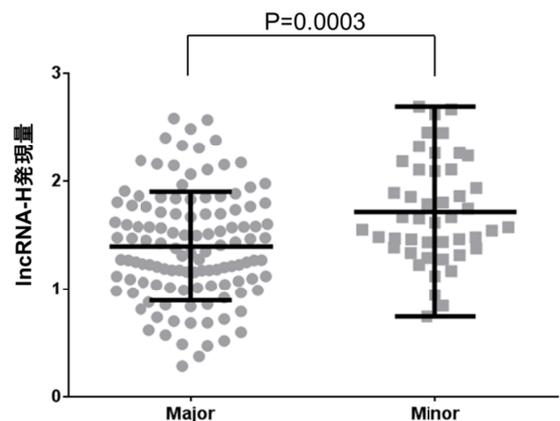
HCV 複製を抑制した (図4)。

図4 IncRNA-H による Gt 1a, Gt 1b HCV に対する複製抑制



8) ペグインターフェロンとリバビリン療法を施行された C 型慢性患者 165 例 (IL28B ゲノタイプ、major 119 例、minor 46 例) の治療前肝生検組織由来 RNA を用いて IncRNA-H 発現量を定量 PCR 法により測定した。IncRNA-H 量を IL28B major と minor 群で比較したところ、minor 群で有意に発現が高値であった (図5)

図5 IL28B ゲノタイプ別 IncRNA-H 発現量



D. 考察

1) IncRNA-H は HCV 複製により発現が促進され、またその発現抑制により HCV 複製の抑制を認めたことから、抗 HCV 療法の新規治療標的と考えられた。

2) 肝内の lncRNA-H の発現量は、インターフェロン療法難治性である IL28B minor 群において、感受性である major 群より高値であった。lncRNA-H は、インターフェロン治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。また IL28B ゲノタイプ同様にインターフェロン療法の治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

E. 結論

HCV 感染培養細胞由来 RNA を次世代シーケンサーを用いて解析し、HCV 感染を制御している可能性が考えられる lncRNA 群を 4 種類抽出した。そのうち既に lncRNA としてデータベースに登録され肝内での発現も報告されている lncRNA-H に着目して解析を行った。その結果 HCV 感染培養細胞系を用いた解析から、lncRNA-H の発現は HCV 感染により誘導され、さらに lncRNA-H の発現抑制により HCV の複製も抑制された。さらに lncRNA-H の肝内発現量は、インターフェロン療法難治性である IL28B minor 群において、感受性である major 群より高値であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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*. 2013 (in press).

2) 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

3) **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.

2. 学会発表

1) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, Kaneko S. A secretory protein specifically induced by IL28B regulates interferon response. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月

2) **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 64th AASLD2013, ワシントン DC, 2013 年 11 月

3) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake

R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S.
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis
C with advanced fibrosis via the TGF- β
signaling pathway. The 64th AASLD 2013,
ワシントンDC,2013年11月

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. HCV meeting 2013, メルボ
ルン , 2013年10月

5) **Shirasaki T**, Honda M, **Shimakami T**,
Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake
R, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S.
Impaired IFN signaling in chronic hepatitis
C with advanced fibrosis via the TGF- β
signaling pathway. HCV meeting 2013, メ
ルボルン , 2013年10月

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

