

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

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(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。H25年度、研究代表者島上は、C型肝炎ウイルス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。

ヒト肝癌細胞株にHCVを感染させ、感染後24時間から72時間まで24時間おきに経時的にRNAを回収、また感染24時間後からNS5A阻害剤によりHCV複製を抑制し、NS5A阻害剤投与後48時間後にRNAを回収した。これらのRNAを次世代シーケンサーを用いて解析し、既存の遺伝子情報、統計学的手法を用いて、HCV感染特異的に発現が変化するlncRNA群26個を同定した。さらにこれらlncRNAに対するsiRNAを作成し、HCV複製細胞に投与したところ、4種のlncRNAに対するsiRNAの投与によりHCV複製の抑制を認めた。この中で既にlncRNAのデータベースに登録されているlncRNA-Hに着目して、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

本年度は、HCV感染培養細胞由来RNAを解析してHCV感染特異的に発現が変化するlncRNAを抽出し、それらのHCV複製における役割およびC型慢性肝炎患者における臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

24、48、72 時間後に細胞全 RNA を回収した。また感染 24 時間後に EC50 の 50 倍濃度（500pM）の NS5A 阻害剤を投与し、その 48 時間後（感染 72 時間後）に同様に RNA を回収した。さらにコントロールとして、HCV 感染なしの細胞から、24、72 時間後に RNA を回収した。

B. 研究方法

- 1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子型 Ia H77S 株と IIa JFH1 株のキメラである HJ3-5 株をヒト肝癌細胞株（Huh7.5）に MOI 1 で感染させ、感染

- 2) 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）を用いて解析を行った。
- 3) 次世代シーケンサーにより発現を確

認された RNA のうち既存の遺伝子データベースとの照合を行い IncRNA のみ抽出した。さらにこれらの IncRNA の中から、HCV 感染後発現が増減し、NS5A 阻害剤の投与により HCV 感染による変化がキャンセルされ、細胞 passage の影響を受けない、IncRNA 群 26 個を統計学的手法を用いて抽出した。

- 4) これらの IncRNA 26 個に対する siRNA をそれぞれの IncRNA に対して 2-3 個作成し、HCV 感染培養細胞に導入し、HCV 複製における役割を検討した。
- 5) HCV 複製に影響を与えた IncRNA のうち既に IncRNA のデータベースに登録されている IncRNA-H に着目して、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 IncRNA-H の発現量を測定し、IL28B ゲノタイプ (major と minor) との相関の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

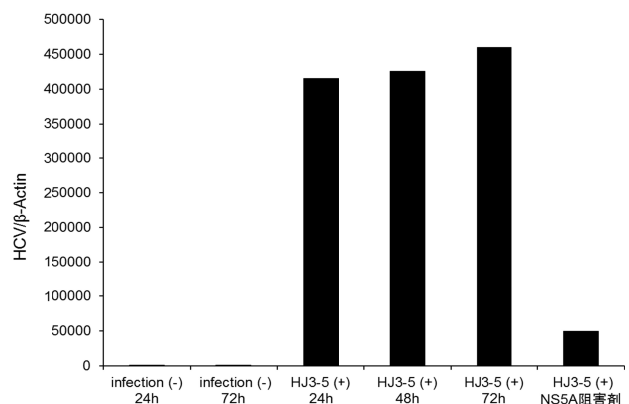
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォー

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った。

C. 研究結果

- 1) HCV 感染後および NS5A 阻害剤投与後回収した RNA 中の HCV RNA 量を定量 PCR 法により測定した。その結果 HCV 複製は感染後 24 時間後から確認され、また NS5A 阻害剤の投与により HCV 複製の効果的な抑制を認めた。

図 1 HCV 感染後 HCV RNA 量

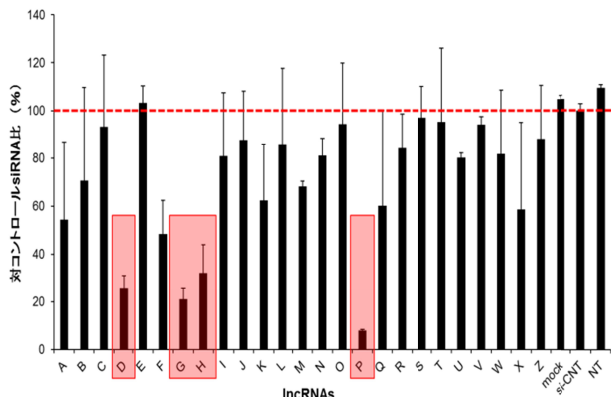


- 2) 次世代シーケンサーによる解析から抽出した HCV 感染特異的に発現が増減する IncRNA 26 個に対する siRNA を作成し、HCV 感染細胞に投与し、HCV 複製における役割を検討した。HCV は HJ3-5 株を用いた。また HCV 遺伝子中には分泌型ルチフェラーゼである Gaussia luciferase (GLuc) が挿入されているため、luciferase 活性を HCV 複製の指標として用いた (図 2)。その結果 IncRNA-D, G, H, P に対する siRNA 投与により HCV 複製の抑制を認めた (図 3)。

図 2 HJ3-5/GLuc2A

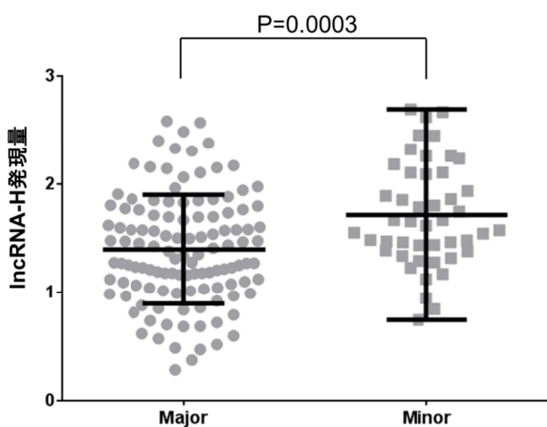


図 3 IncRNA に対する siRNA 投与による HCV 複製に対する影響



4) これら 4 種類の IncRNA のうち、既に IncRNA 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 IncRNA-H に着目した。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 4）。

図 4 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 IncRNA-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。IncRNA-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 IncRNA 群を 4 種類抽出した。そのうち IncRNA-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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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):e76867

- 3) 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. 学会発表

- 1) **Tetsuro Shimakami**, Masao Honda, Takayoshi Shirasaki, Masaya Funaki, Riuta Takabatake, Stanley Lemon, and Shuichi Kaneko. Acyclic Retinoid, Peretinoin, Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture, The 64rd AASLD2013, 2013年11月

G. 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

