

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

研究分担者：白崎 尚芳 金沢大学医薬保健研究域保健学系 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（HCV）感染特異的に発現変化するlncRNA26個の中からHCV複製を制御するlncRNAを4個同定し、その中で、lncRNA-Hに注目した。lncRNA-Hはおよそ500塩基のRNAであり、ヒト肝臓や肝細胞由来培養細胞で発現が認められる。島上は、C型慢性肝炎患者の肝生検サンプルによる網羅的遺伝子発現解析から、1L28Bマイナー型遺伝子を持つ患者でlncRNA-Hの発現が有意に高いことを明らかにした。そこで、H25年度、研究分担者白崎は、lncRNA-HのHCV複製における影響をHCVの培養細胞系を用いて解析した。

HCV感染によりlncRNA-Hの発現は感染ウイルス量及び時間依存的に増加した。lncRNA-Hに対するsiRNAを作成し、lncRNA-Hの発現抑制下で、HCV感染に与える影響を検討した。その結果、siRNAの濃度依存的にHCV複製の抑制を認めた。この複製抑制効果は異なるゲノタイプHCVにおいても認められた。この結果から、lncRNA-Hは、HCV複製に有利に働くlncRNAであり、HCV感染制御に対する新しい標的となる可能性があることが示唆された。来年度以降、lncRNA-HによるHCV複製制御機序の解明を行う予定である。

A. 研究目的

研究代表者島上は、HCV感染培養細胞由来RNAの次世代シーケンサーによる解析とC型慢性肝炎患者の肝生検サンプルによる網羅的遺伝子発現解析から、HCV感染を制御し得るlncRNAを同定した。その中から1L28B遺伝子多型と関連のあったlncRNA-Hに注目し、そのHCV複製制御機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞培養感染クローンである、遺伝子

型IIa JFH1株のキメラ（HJ3-5株）をヒト肝癌細胞株（Huh7.5及びFT3-7）に種々のMOI（0.01, 0.1, 1）で感染させ、感染24、36、48、72、96時間後に細胞全RNAを回収した。qRT-PCR法にてHCV RNA及びlncRNA-Hの発現量を測定した。

2) lncRNA-Hに対するsiRNAを3種類作成した。HCV持続複製細胞にsiRNAを導入し、HCV複製に与える影響を検討した。siRNA導入後、経時的に全RNA及び培養上清を回収しqRT-PCR法にて

HCV RNA 及び IncRNA-H の発現量を、Gaussia Luciferase 法により HCV 複製を測定した。

- 3) 上記の結果から、最も強く IncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-IncRNA-H-3) に対する濃度依存実験を行った。
- 4) 細胞培養感染クローンであるゲノタイプ Ia 型 H77S 株、Ib 型 N 株に対しても同様の実験を行い、HCV ゲノタイプの違いにおける IncRNA-H の HCV 複製に与える影響を検討した。

(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う。

C. 研究結果

- 1) HCV 感染により IncRNA-H の発現は感染ウイルス量及び時間依存的に増加した。感染 96 時間後では 24 時間後に比べおよそ 2 倍の IncRNA-H の発現増加を認めた。(図 1)
- 2) IncRNA-H に対する siRNA を 3 種類作

成した。IncRNA-H の発現を抑制し、HCV 感染に与える影響を検討した。その結果、3 種類の siRNA 全てで IncRNA-H の発現抑制を認めた。IncRNA-H の発現抑制下では HCV の複製は有意に抑制された。si-IncRNA-H-3 に最も強い抑制効果が認められた。(図 2)

- 3) 最も強く IncRNA-H の発現を抑制する siRNA (si-IncRNA-H-3) を種々の濃度 (10nM ~ 100nM) で処置し HCV 複製を測定した結果、siRNA 用量依存的に HCV 複製を抑制した。100nM 処置により HCV 複製を 5 分の 1 まで抑制することが出来た。(図 3)
- 4) 異なる HCV ゲノタイプである培養細胞感染クローン Ia H77S 株、Ib N 株に対しても IncRNA-H の発現を抑制することで、HCV 複製を有意に抑制した。(図 4)

図1 HCV感染によるIncRNA-Hの発現誘導

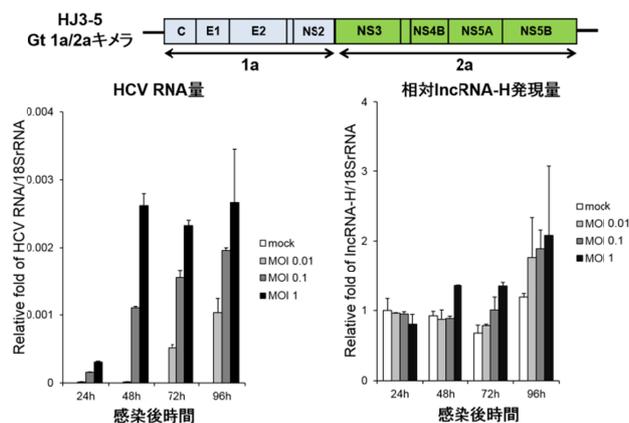


図2 IncRNA-H発現抑制によるHCV複製抑制

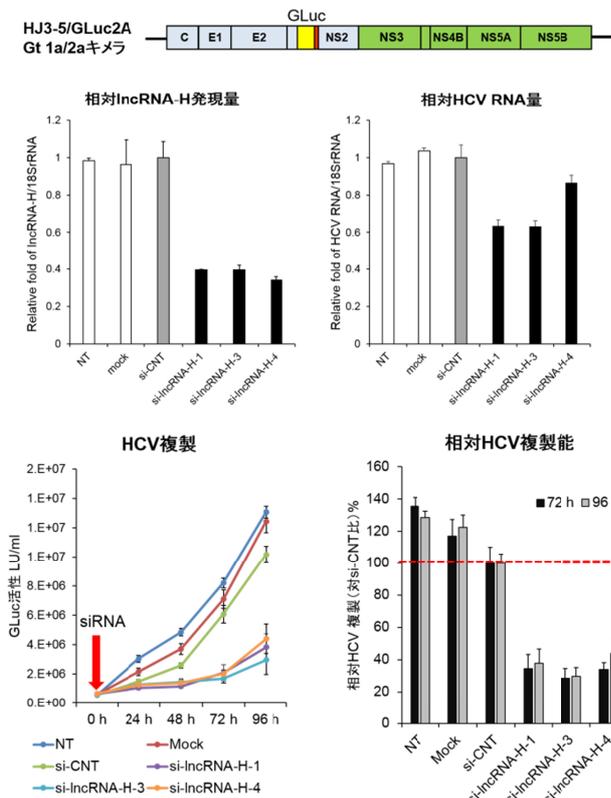


図3 si-IncRNA-HIによる用量依存性HCV複製抑制

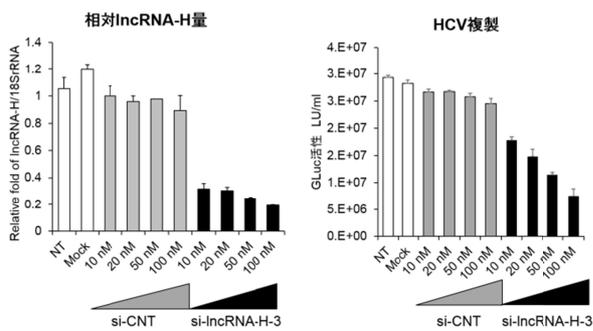
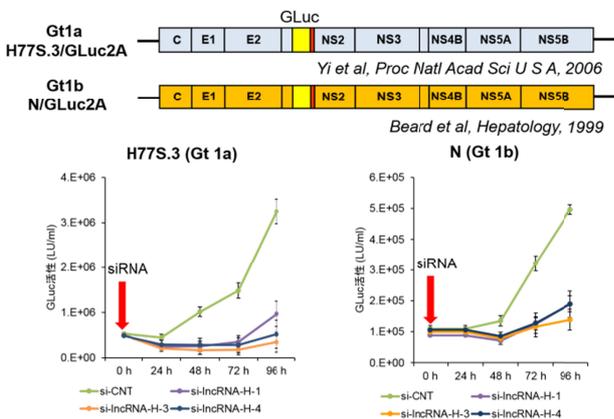


図4 IncRNA-HIによるGt1a, 1b HCVIに対する複製制御



D. 考察

IncRNA-Hは、HCV複製により発現誘導するIncRNAである。このIncRNA-Hの発現をsiRNA処置により減少させることでHCV複製を有意に抑制させることが出来たことから、HCV感染に対する新しい標的となり得る可能性があることが示唆された。

E. 結論

HCV複製を制御する機構を持つIncRNA-Hを同定した。来年度以降、IncRNA-HによるHCV複製制御機序の解明を行う予定である。

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. *Journal of Virology*. 2013 May;87(9):5270-5286.
- 2) 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 Oct.

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, 2013年12月

2) **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, 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. HCV meeting 2013, 2013年10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

