

厚生労働科学研究費補助金
〔肝炎等克服実用化研究事業（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。これまでに、C型肝炎ウイルス (HCV) 感染特異的に発現変化するlncRNA (lncRNA-H)を同定し、lncRNA-Hは、HCV複製に有利に働くlncRNAであることを明らかとした。本年度は、lncRNA-HによるHCV複製制御機序及びlncRNA-Hの発現誘導機序の解明を目指した研究を行った。HCV感染培養細胞を用いた検討から、lncRNA-Hの発現をsiRNAで抑制させることにより、HCV複製及びHCVの感染性粒子産生能を抑制させることが明らかとなった。より詳細な機序の解明のためlncRNA-Hの恒常的ノックアウト細胞の作成を試みた。興味深いことに、lncRNA-Hノックアウト細胞ではHCV複製がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。次に、HCV感染によるlncRNA-Hの発現誘導機序の解明を行った。lncRNA-Hのプロモーター領域にc-Jun (AP1)結合領域が存在することを見出した。c-Junの過剰発現細胞ではHCVの複製増強と共にlncRNA-Hの発現増強が認められた。研究代表者島上は患者検体を用いた実験から、lncRNA-Hは、インターフェロン (IFN) 感受性に関与している可能性を示唆する結果を得た。そこでlncRNA-Hは新規インターフェロン誘導遺伝子である可能性を考慮し、インターフェロンによる誘導を検討したが、lncRNA-Hはインターフェロンでは誘導されないlncRNAであることが明らかとなった。

A. 研究目的

昨年度までに、HCV 感染特異的に発現誘導される lncRNA-H を同定し、lncRNA-H は HCV の複製を正に制御する lncRNA であることを明らかにした。しかしながら、HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導機序や複製制御機序は不明である。

本年度は lncRNA-H による HCV 複製制御機序及び lncRNA-H の発現誘導機序のより詳細な検討を行った。

B. 研究方法

- 1) siRNA を用いて lncRNA-H ノックダウン細胞を作成し、その細胞に HCV 感染クローンである、遺伝子型 IIa JFH1 株のキメラ (HJ3-5 株) 感染させた。その後、培養上清を Huh7.5 細胞に処置し 72 時間後、96 時間後の HCV-core 蛋白質陽性細胞を算出し、感染性粒子産生能を評価した。
- 2) lncRNA-H の HCV 複製制御機序をより詳

細に解明するため恒常的 lncRNA-H ノックアウト細胞を作成した。ノックアウト細胞は Zinc Finger Nuclease システムを用いて lncRNA-H 特異的な遺伝子切断を行った。細胞はブラストサイジン耐性株を選択的に培養することによりクローン化した。

- 3) lncRNA-H ノックアウト細胞に HCV 感染クローンである HJ3-5Gluc2A 株を感染させ経時的に HCV 複製をモニターした。
- 4) Huh7.5 細胞に c-Jun の発現プラスミドを導入し c-Jun 過剰発現細胞を作成した。上記の細胞に HCV を感染させ lncRNA-H の発現を検討した。更に抗 HCV 薬であるシメプレビルを処置し、HCV 複製を抑制させたときの lncRNA-H の発現を検討した。
- 5) lncRNA-H がインターフェロン誘導遺伝子であるか否か確かめるためインターフェロンを Huh7.5 細胞に処置し、インターフェロン誘導遺伝子 (MX1, OAS2) と lncRNA-H の発現をモニターした。

(倫理面への配慮)

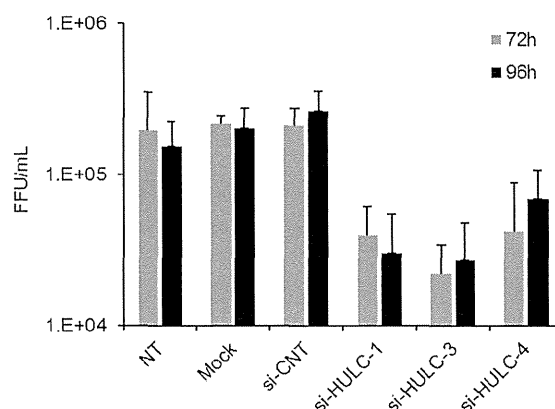
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

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

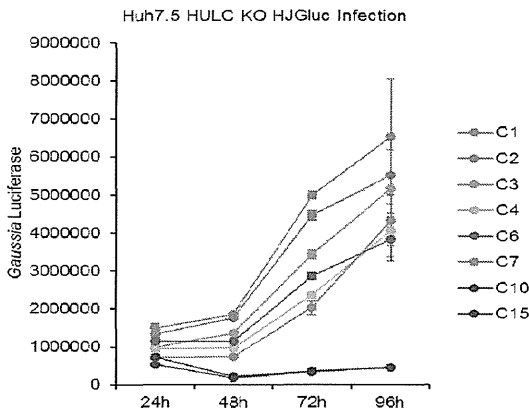
- 1) lncRNA-H ノックダウン細胞では HCV の感染性粒子産生能が顕著に減少した。lncRNA-H は HCV 複製のみならず感染性粒子産生能にも影響を与える lncRNA であることを示唆する(図 1)。

図 1 lncRNA-H の発現抑制の感染性粒子産生に与える影響



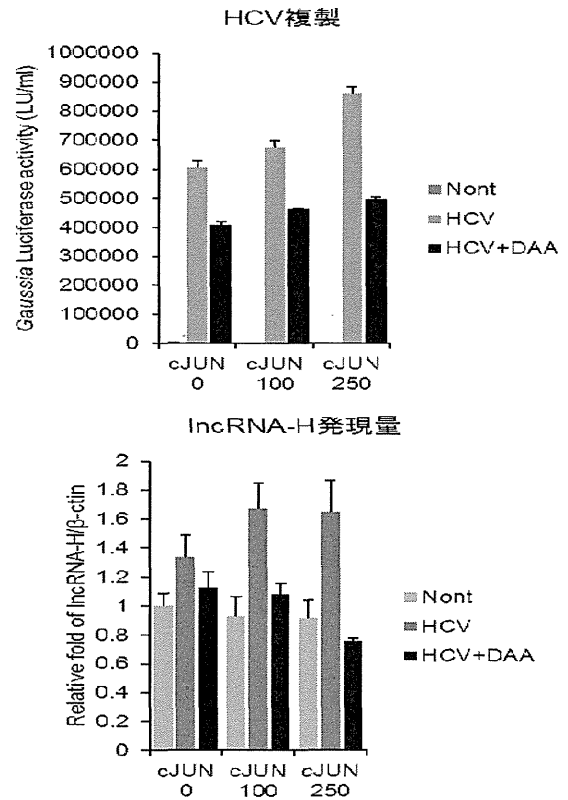
- 2) Huh7.5 細胞の lncRNA-H 恒常的ノックアウト細胞を作成しクローン化した (Huh7.5-lncRNA-H KO C-10, C15)。この細胞では、HCV 複製は顕著に抑制された(図 2)。

図 2 lncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製



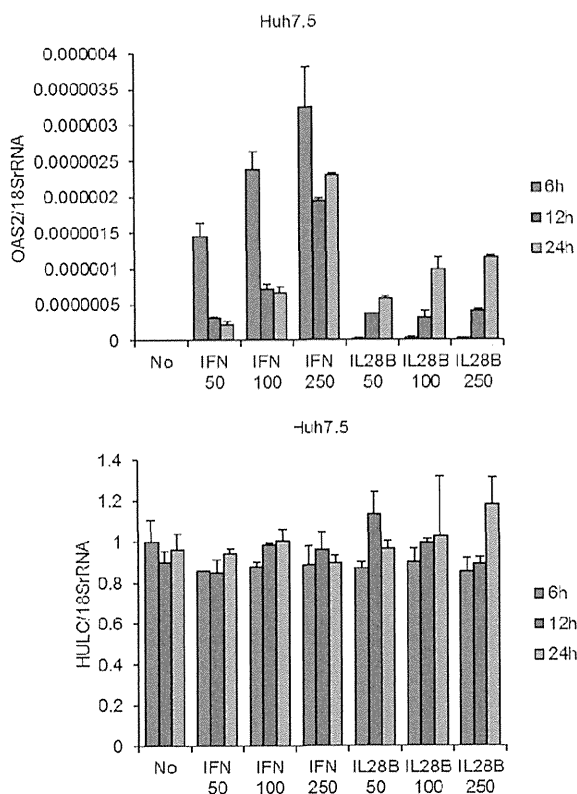
3) lncRNA-H のプロモータ領域の解析から c-Jun (AP1) 結合領域が存在することをみいだした。そのため c-Jun に着目し、HCV 感染による lncRNA-H 発現抑制機序の解明を行った。c-Jun の過剰発現により用量依存性の HCV 複製の増強を認めた。また HCV 感染なしの細胞では c-Jun の過剰発現を行っても lncRNA-H の発現誘導は認めなかったが、HCV 感染を伴った場合は著明な lncRNA-H の誘導を認めた (図 3)。

図 3 c-Jun を介した lncRNA-H の発現誘導



4) lncRNA-H がインターフェロン誘導遺伝子であるか否か検討するために、Huh7.5 細胞にインターフェロン及び IL28B を処置しインターフェロン誘導遺伝子と lncRNA-H の遺伝子発現を検討した。インターフェロン誘導遺伝子である OAS2 の発現はインターフェロン及び IL28B の量依存的、時間依存的に発現誘導されたが、lncRNA-H はインターフェロンによって誘導される遺伝子ではないことが明らかとなった (図 4)。

図 4 インターフェロンによる lncRNA-H の発現誘導



D. 考察

lncRNA-H は、HCV 複製により発現誘導する lncRNA でありその発現誘導は c-Jun を介していることが示唆された。lncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製の顕著な抑制やノックダウン細胞における感染性粒子産生能の著明な抑制効果から、lncRNA-H は HCV 複製に必須な lncRNA であることが強く示唆される。よって新規治療標的の候補となる可能性が十分に考えられる。

E. 結論

HCV 感染により誘導される lncRNA-H は HCV 複製に有利に働く lncRNA であり、その発現誘導は c-Jun を介する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30
- 2) Shimakami T, Honda M, **Shirasaki T**, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. The Acyclic Retinoid Peretinoin Inhibits Hepatitis C Virus Replication and Infectious Virus Release in Vitro. *Scientific Reports*. 2014 Apr15;4:4688
- 3) Honda M, **Shirasaki T**, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-838
- 4) Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Muraio K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, **Shirasaki T**, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2014 Jan;289(1):335-345.

2. 学会発表

- 1) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. The Liver Meeting 2014 (65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease)(2014年11月ポストン) Poster 1777
- 2) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. 21st International Symposium on Hepatitis C Viruses (2014年9月バンフ) Oral

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
島上哲朗、 酒井明人、 金子周一	C型肝炎、肝硬変患者 、キャリアのフォロー アップ戦略とエビ デンス	工藤正俊	日本臨牀増刊号 最新肝臓病学	日本臨牀社	大阪	2015年	73巻増刊 号 1,788-92

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T , Shimakami T , Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P	Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C	Scientific Reports	5	7675	2015
Shirasaki T , Honda M, Shimakami T , Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S	Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway	Hepatology	60	1519-30	2014
Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsch C, Antes I, Wen Y, Chugh PE, McGee CE, Widman DG, Misumi I, Bandyopadhyay S, Kim S, Shimakami T , Oikawa T, Whitmire JK, Heise MT, Dittmer DP, Kao CC, Pitson SM, Merrill AH Jr, Reid LM, and Lemon SM	Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation	Nature Medicine	20	927-35	2014
Li Y, Masaki T, Shimakami T , Lemon SM.	hnRNP L and NF90 Interact with Hepatitis C Virus 5'-Terminal Untranslated RNA and Promote Efficient Replication	Journal of Virology	88	7199-209	2014
Shimakami T , Honda M, Shirasaki T , Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S	The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro	Scientific Reports	4	4688	2014
Honda M, Shirasaki T , Shimakami T , Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Kaneko S	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes	Hepatology	59	828-38	2014

Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, <u>Shirasaki T</u> , Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T.	Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P Gene via an AMP-activated Kinase (AMPK)/FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes.	The Journal Of Biological Chemistry	289	335-45	2014
--	---	-------------------------------------	-----	--------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

日本臨牀 73 卷 増刊号 1 (2015 年 1 月 20 日発行) 別刷

最新肝癌学

—基礎と臨床の最新研究動向—

XV 特 論

C 型肝炎・肝硬変患者，キャリアのフォローアップ
戦略とエビデンス

島上哲朗 酒井明人 金子周一

C型肝炎・肝硬変患者，キャリアのフォローアップ戦略とエビデンス

Strategy and evidence for the follow-up for the patients with HCV-related liver diseases

島上 哲朗¹

酒井 明人²

金子 周一¹

Key words : C型肝炎ウイルス, C型慢性肝炎, C型肝硬変, 肝癌.

はじめに

C型慢性肝疾患患者のフォローアップの目的は主に2点と考えられる。1点目は、患者個々の年齢や肝線維化を考慮した発癌リスク、合併症、社会的背景、年々進歩する抗ウイルス薬の承認状況などを総合的に判断して適切な時期に適切な抗ウイルス療法を導入することである。2点目は、C型慢性肝疾患患者は肝癌の高リスク群であり、肝癌の早期発見を念頭に置いたサーベイランスである。また今後、C型慢性肝疾患に対する複数の経口抗ウイルス薬の登場によりウイルス排除率は90%以上となることが予測され、ウイルス排除後のフォローアップの方法も議論されるべきである。

本稿では、抗ウイルス療法導入を念頭に置いたC型慢性肝疾患患者のフォローアップ、肝発癌を念頭に置いたフォローアップ、また石川県で行っているC型慢性肝疾患患者のフォローアップシステム、およびウイルス排除後のフォローアップに関する戦略とエビデンスを概説する。

1 抗ウイルス療法導入を念頭に置いたC型慢性肝疾患患者のフォローアップ

1) 抗ウイルス療法導入時期の再検討

近年、C型慢性肝炎の治療は大きく変化しつつある。従来の標準的治療法であったペグインターフェロンとリバビリン併用療法における我が国での蔓延型である遺伝子型1型のC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルス排除率(SVR)は約50%にとどまっていた。しかしながら、HCVの複製に必須なウイルスタンパクの機能を直接抑制するdirect-acting antiviral agents(DAAs)の登場によりSVRは劇的に改善しつつある。テラプレビルやシメプレビルなどのプロテアーゼ阻害薬を従来のペグインターフェロンとリバビリン療法に加えた3剤併用療法により、約70-80%のSVRが得られるようになった。さらに今後早期に経口DAAs製剤のみによる、インターフェロン製剤を利用しない複数の治療レジメが我が国においても保険承認が得られる予定であり、SVRは90%以上にまで改善することが予想される。

従来の標準治療であったインターフェロン製剤をベースとした治療法は、超高齢者、うつ病

¹Tetsuro Shimakami, ²Akito Sakai, ¹Shuichi Kaneko: ¹Department of Gastroenterology, Kanazawa University Hospital 金沢大学附属病院 消化器内科 ²Department of Internal Medicine, Toyama Prefectural Central Hospital 富山県立中央病院 内科

などの重度の精神神経疾患、間質性肺炎の合併を認めた症例には禁忌であった。またインターフェロン製剤による治療を以前に施行されたが、SVRを得られず、肝庇護療法および肝発癌サーベイランスを目的に定期通院している症例も多く存在する。さらにインターフェロン製剤に対する副作用を危惧するため、あるいは職場や家庭環境からインターフェロン製剤投与のための定期通院が困難なため、インターフェロン治療を受けられない症例も散見される。今後、C型慢性肝炎治療に対する標準治療となりうるインターフェロン製剤を利用しないDAA製剤による経口の抗ウイルス療法は、このような多くのインターフェロン治療困難例や無効例に対する良い適応と考えられる。

2013年のC型肝炎治療ガイドライン第2版(日本肝臓学会)でも、遺伝子型1型のC型慢性肝炎患者の治療に関して、高齢者や線維化進行例に対してはプロテアーゼ阻害薬を併用したペグインターフェロンとリバビリンによる3剤併用療法を推奨しているが、非高齢者で線維化軽度例では、待機可能としている。そのため現在通院中のC型慢性肝炎患者に関して、血小板数、各種線維化マーカー、フィブロスキャン、可能であれば肝生検を行い、現時点における肝線維化の程度を正確に評価して、個々の患者における抗ウイルス療法導入の時期を検討すべきと考えられる。

2) ALT正常例への対応

まずC型、B型慢性肝炎患者におけるALTの基準値に関して留意する必要がある。ALTの基準値上限を40IU/Lとしている施設が散見されるが、ウイルス性肝炎患者におけるALTの基準値上限は30IU/Lであり、31-40IU/Lは異常値であることを認識すべきである。実際ALT値が比較的低く、血小板数が正常でも肝生検をしてみると比較的進行した症例も存在する。当科での検討であるが、肝生検時ALT50IU/L以下、血小板17万以上であった44症例の肝生検では、40%以上がF2以上の慢性肝炎であった¹⁾したがって、ALTが基準値症例の中にも線維化進行例が存在することを念頭に置くべきで、

‘問題ない’や‘通院の必要なし’との説明は不適切と考えられる。2013年のC型肝炎治療ガイドライン第2版では、血小板数を肝線維化の指標とし、ALT値と血小板数により治療適応を決定することを提案している。すなわちALT30IU/L以内の症例でも、血小板数15万/ μ L未満であれば抗ウイルス療法の対象とすることを推奨し、一方、ALT30IU/L以内かつ血小板数15万/ μ L以上の症例については、すぐに抗ウイルス療法を施行せずに経過観察することを推奨している。しかしながらC型慢性肝炎においては、経過中にALTが上昇する可能性もあるため、2-4カ月に1回の頻度で定期的に採血を行い、ALTが異常値を呈した時点で抗ウイルス療法を考慮すべきと考えられる。

3) 抗ウイルス療法が困難なALT高値例への対応

様々な理由で抗ウイルス療法が不可能な症例に関しては、肝炎を沈静化し肝組織の線維化進展を抑えることを目的とした肝庇護療法が必要である。肝庇護療法の実際として、ウルソデオキシコール酸、強力ネオミノファーゲンシー、瀉血療法、さらにこれらの治療の組み合わせが挙げられる。肝庇護療法中の患者に関しても2-4カ月に1回の頻度で定期的に採血を行い肝機能のチェックを行うべきと考えられる。

2 肝発癌を念頭に置いたC型慢性肝炎患者のフォローアップ

HCVの持続感染は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染と並んで最も重要な肝発癌リスクの一つである。C型肝炎を背景とした肝発癌の特徴は、そのほとんどが肝硬変を背景に発癌を認める点であり、F4すなわち肝硬変からの年間肝発癌率は8%とされている。しかしながら非肝硬変からも発癌することが知られており、F1でも0.5%、F2で1.5%、F3で5%と報告されている。さらにHCV、HBV持続感染に加えて肝発癌の危険因子として、男性、高齢、アルコール摂取、喫煙、肥満、糖尿病なども挙げられており、これらの因子を含めて患者個々における肝

発癌リスクを総合的に判断して、肝癌サーベイランスの頻度を決定すべきと考えられる。

2013年度肝癌診療ガイドラインでは、B型慢性肝炎、C型慢性肝炎患者を高危険群、B型肝炎硬変、C型肝炎硬変患者を超高危険群に分類し、それぞれの群に対するサーベイランスアルゴリズムを提唱している²⁾。すなわち、高危険群に対しては6カ月ごとの超音波検査、および腫瘍マーカー(AFP、PIVKA-II、AFP-L3)の測定を、また超高危険群に対しては、3-4カ月ごとの超音波検査、腫瘍マーカー(AFP、PIVKA-II、AFP-L3)の測定、オプションとして6-12カ月ごとのCT・MRI検査を推奨している。

3 HCV排除後の肝発癌を念頭に置いたフォローアップ

今後経口DAA製剤の導入によりSVRは90%を超えることが予想され、従来以上にHCV排除後の患者が存在するようになる。これまでの多くの検討からHCV排除により肝発癌のリスクが低下することは明らかにされているが、HCV排除後も少数例ながら肝発癌症例が存在することが報告されている。HCV排除後の発癌症例の特徴として、HCV排除時に既に肝線維化が高度であること、血小板数が低値であること、AFPが高値であること、などが報告されている³⁻⁵⁾。しかしながら、HCV排除後のフォローアップの期間、方法などに関する検討はなされていないため、現時点ではHCV排除後においても、肝発癌を念頭に置いた定期的なフォローアップは必須と考えられる。同時に、今後増加するHCV排除後の症例を蓄積して、肝発癌を念頭に置いたHCV排除後症例のフォローアップに関するエビデンスを蓄積する必要があると考えられる。

4 肝炎診療における専門医との連携

上述してきたように、HCV感染が判明した患者は、2-4カ月に1回の肝機能検査のための採血、さらに肝線維化の程度に応じた肝画像検

査、および腫瘍マーカー測定のための採血が必要である。さらにC型慢性肝炎治療の劇的な進歩を受けて、日本肝臓学会および厚生労働省研究班から発表されるC型慢性肝炎に対するガイドラインは近年頻繁に改訂されている。消化器病学会専門医や、肝臓病学会専門医が最新のガイドラインを熟知することは当然と思われるが、専門外のかかりつけ医がこれらのガイドラインを熟知することは困難と考えられる。平成19年厚生労働省は‘都道府県における肝炎検査後肝疾患診療体制に関するガイドライン：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou09/03.html>’を発表し、肝炎ウイルス検査陽性者の診療におけるかかりつけ医と専門医療機関との連携の必要性を述べている。

石川県では、行政および医師会の協力のもと、肝炎ウイルス検診陽性者が、年1回石川県が選定した専門医療機関を受診し、肝臓専門医の診察、肝画像検査を受けることを目的とした‘石川県肝炎診療連携’を平成22年度より開始した。石川県肝炎診療連携の概要は、平成14年から行政が肝炎ウイルス検診陽性者に対して行っていた毎年の受診勧奨、受診状況調査などのフォローアップを、肝疾患診療連携拠点病院(石川県の場合、金沢大学附属病院)が中心となっており、肝炎ウイルス検診陽性者に対して直接、フォローアップを行っていくシステムある(図1)。個人情報保護のため市町の有する氏名、住所などの個人情報を拠点病院に移管できないことが問題となったが、この連携に参加し個人情報を拠点病院に移管することに関する同意書を、市町を介してすべての肝炎ウイルス検診陽性者に発送した。その結果、同意を得られた個人に関しては、拠点病院も個人情報を有するため拠点病院が直接肝炎ウイルス検診陽性者にアクセスすることが可能となった。

さらに連携参加同意者には、年1回石川県が選定した石川県肝疾患専門医療機関の受診を勧めるリーフレットと、専門医療機関での診察内容を記載する調査票を送付している。調査票には、専門医療機関で施行した画像検査の結果と、今後の望ましい検査方針・治療方針を記載する

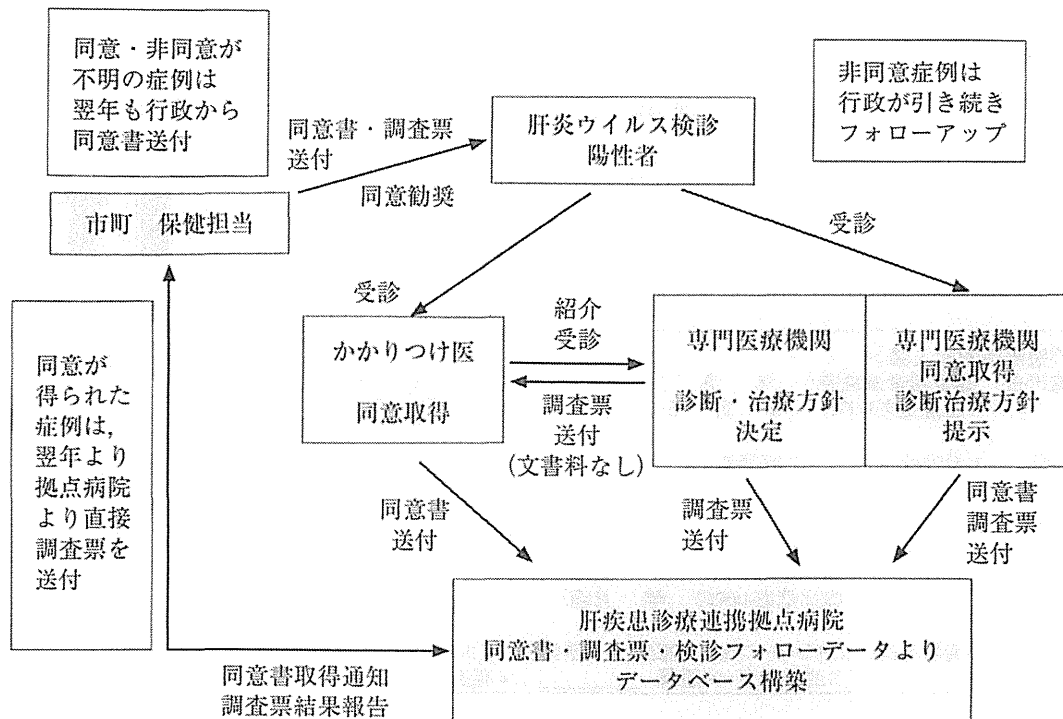


図1 石川県肝炎診療連携

こととなっている(図2)。そのため連携参加者は、年に1回の画像検査を受けることができると同時に、その時点で適切な治療方針を聞くことができる。もし同意者がかかりつけ医を受診した場合は、調査票を紹介状の代わりとして、専門医療機関を受診することとした。専門医療機関における診察結果は、複写式の調査票に記載され、かかりつけ医と拠点病院に送付される。かかりつけ医には専門医療機関での診察結果が調査票を介してフィードバックされ、拠点病院では調査票を用いて受診状況や治療内容などをデータベース化している。また連携参加に同意を得られなかったり、意思表示のなかったりした陽性者に関しては、従来どおり行政側でフォローアップを続けている。平成25年度末時点で2,840人の肝炎ウイルス検診陽性者のうち、参加同意者は1,166人(41%)、残りの1,674人のうち、参加非同意者が368人(13%)、意思表示のない参加未同意者が1,306人(46%)である。この意思表示のない1,306人に対しては、連携参加を呼びかけるリーフレットとともに同意書を送付し続けている。肝炎ウイルス検査陽性にもかかわらず自己判断で通院を中止したが、こ

の連携に入ったことでかかりつけ医を介して専門医療機関を受診し、肝臓癌を発見できた事例や、この連携に入ったことで専門医療機関を受診し、専門医の指導によりインターフェロン治療まで結びついた事例も多く存在する。この連携への参加により、肝炎ウイルス検診陽性者は、受診忘れなどによるフォローアップからの脱落を予防できるだけでなく、年に1回専門医療機関の受診を介して、肝画像検査を受け、専門医から最新の治療情報を得られるため、極めて有用なシステムと考えられる。

おわりに

C型慢性肝疾患患者においては、肝線維化の程度を正しく評価し、高度線維化例においては早期の抗ウイルス療法の導入を図ることが重要であり、逆にALTが正常値で軽度線維化例に関しては、経過観察も可能と考えられる。同時に、個々の症例において肝発癌リスクを総合的に判断して、画像検査および腫瘍マーカー測定による肝癌サーベイランスの頻度を決定すべきである。今後、経口DAA製剤の登場によりSVRは90%以上となることが予測されるが、SVR後

石川県肝炎診療連携 専門医療機関受診調査票	
氏名: _____ 性: _____ 生年月日: _____ 生 住所: _____	紹介医療機関名: 紹介医名: _____
石川県肝炎診療連携で診断・画像検査・治療方針について御高診お願いします。 HCV抗体陽性 _____ HBs抗原陽性 _____ ALT値(_____ IU/L) 血小板値(_____ / μ L)	
コメント	
<専門医療機関記入欄> 検査施行日: 腹部超音波検査(年 月 日)腹部造影CT(年 月 日) 腹部造影MRI(年 月 日)肝生検 (年 月 日)	
診断結果: 1.慢性肝炎 2.肝硬変 3.肝がん 4.無症候性キャリア 5.その他(_____)	
今後の望ましい検査方針: 腹部超音波検査(年 月頃) 腹部造影CT(年 月頃) 腹部造影MRI(年 月頃)	
今後の望ましい治療方針: 1.インターフェロン療法 2.経口抗ウイルス薬 3.他の注射・内服薬・ _____ 4.経過観察	
コメント	
専門医療機関名: _____ 担当医名: _____	
紹介医(かかりつけ医)保存用 <紹介医への返書>	

かかりつけ医

上段記載後, 専門医受診勧奨

↓ ↑

肝疾患専門医療機関

下段記載後,
かかりつけ医, 拠点病院へ送付

↓

拠点病院

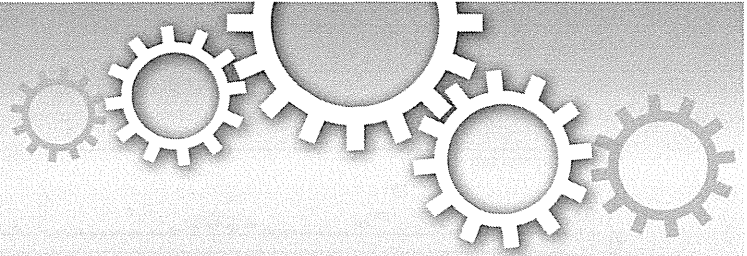
図2 石川県肝炎診療連携調査票とその取り扱い

も肝発癌が認められることも念頭に置いてウイルス排除後も経過観察を行う必要がある。また近年C型慢性肝疾患に対する治療戦略は、めまぐるしく変化しており、C型慢性肝疾患患者が、

少なくとも年に1回は肝臓病・消化器病専門医の診察を受け、最新の治療情報を得られるような連携システムの構築も重要と考えられる。

文 献

- 1) 酒井明人, 金子周一: ウイルス性慢性肝炎の自然経過とチェックポイント. 診断と治療 96(3): 429-434, 2008.
- 2) 日本肝臓学会(編): 第2章 診断およびサーベイランス. 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン 2013年版, p27-72. 金原出版, 2013.
- 3) Asahina Y, et al: α -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. Hepatology 58(4): 1253-1262, 2013.
- 4) Dohmen K, et al: The incidence and risk factors for the development of hepatocellular carcinoma after peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Hepatogastroenterology 60(128): 2034-2038, 2013.
- 5) Chang KC, et al: Clinical-guide risk prediction of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients after interferon-based therapy. Br J Cancer 109(9): 2481-2488, 2013.



OPEN

Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C

SUBJECT AREAS:
HEPATITIS B VIRUS
HEPATITIS C VIRUS
TRANSCRIPTOMICS
CANCER GENOMICS

Sara R. Selitsky^{1,2,3,4}, Jeanette Baran-Gale^{1,2}, Masao Honda⁵, Daisuke Yamane^{3,4}, Takahiro Masaki^{3,4}, Emily E. Fannin², Bernadette Guerra⁶, Takayoshi Shirasaki⁵, Tetsuro Shimakami⁵, Shuichi Kaneko⁵, Robert E. Lanford⁶, Stanley M. Lemon^{3,4,*} & Praveen Sethupathy^{1,2,4*}

Received
8 August 2014

Accepted
5 December 2014

Published
8 January 2015

¹Bioinformatics and Computational Biology Curriculum, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, ²Department of Genetics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, ³Departments of Medicine and Microbiology & Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, ⁴Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, ⁵Department of Gastroenterology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa, Japan, ⁶Department of Virology and Immunology, Texas Biomedical Research Institute and Southwest National Primate Research Center, San Antonio, Texas, United States of America.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S. (praveen_sethupathy@med.unc.edu)

* These authors contributed equally to this work

Persistent infections with hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) account for the majority of cases of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. Small, non-coding RNAs play important roles in virus-host interactions. We used high throughput sequencing to conduct an unbiased profiling of small (14–40 nts) RNAs in liver from Japanese subjects with advanced hepatitis B or C and hepatocellular carcinoma (HCC). Small RNAs derived from tRNAs, specifically 30–35 nucleotide-long 5' tRNA-halves (5' tRHs), were abundant in non-malignant liver and significantly increased in humans and chimpanzees with chronic viral hepatitis. 5' tRH abundance exceeded microRNA abundance in most infected non-cancerous tissues. In contrast, in matched cancer tissue, 5' tRH abundance was reduced, and relative abundance of individual 5' tRHs was altered. In hepatitis B-associated HCC, 5' tRH abundance correlated with expression of the tRNA-cleaving ribonuclease, angiogenin. These results demonstrate that tRHs are the most abundant small RNAs in chronically infected liver and that their abundance is altered in liver cancer.

Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) are phylogenetically unrelated non-cytopathic viruses that infect the liver¹. While HBV is a DNA virus, and HCV is a positive-strand RNA virus, both have the capacity to persist for years in some infected individuals. Hundreds of millions of people worldwide are chronic carriers of HBV or HCV, 30–50% of whom have chronic liver disease². Together, these viral infections are responsible for ~60% of liver cirrhosis and ~80% of hepatocellular carcinoma (HCC), a leading cause of cancer-related deaths worldwide. Numerous studies suggest that microRNAs (miRNAs), small 21–23 nt non-coding RNAs are important in the pathogenesis of these infections, modulating viral replication as well as host responses and possibly influencing the risk of carcinogenesis³. For example the HBV X protein represses expression of miR-148a, potentially enhancing tumorigenesis⁴. In contrast, HCV infection is associated with higher expression of miR-21, which targets key components of Toll-like receptor signaling pathways, possibly facilitating viral evasion of innate immune responses⁵. miR-122 stabilizes HCV RNA and promotes its replication^{6,7}, and the importance of this interaction is reflected in the clinical development of an anti-miR-122 antagomir (miravirsin) as an antiviral therapeutic⁸.

Somewhat larger, 30–35 nt RNAs derived from the 5' half of tRNA (5' tRHs) represent a second major class of small non-coding RNA⁹. Increased expression of 5' tRHs has been associated with viral and rickettsial infections in animals^{10,11}, and may serve to prevent apoptosis and promote cell survival¹². However, they have not been studied previously in the context of viral hepatitis. To our knowledge, only one study has described unbiased profiling of small RNAs in the liver during chronic viral hepatitis¹³, but the analysis was restricted to miRNAs. We sequenced small (14–40 nts) RNAs in liver biopsies from subjects with chronic hepatitis and HCC, examining both non-tumor and matched cancer tissue, and found a surprisingly high proportion of reads representing 5' tRHs⁹. Our results document their presence in human tissue, demonstrate that they are the most highly abundant

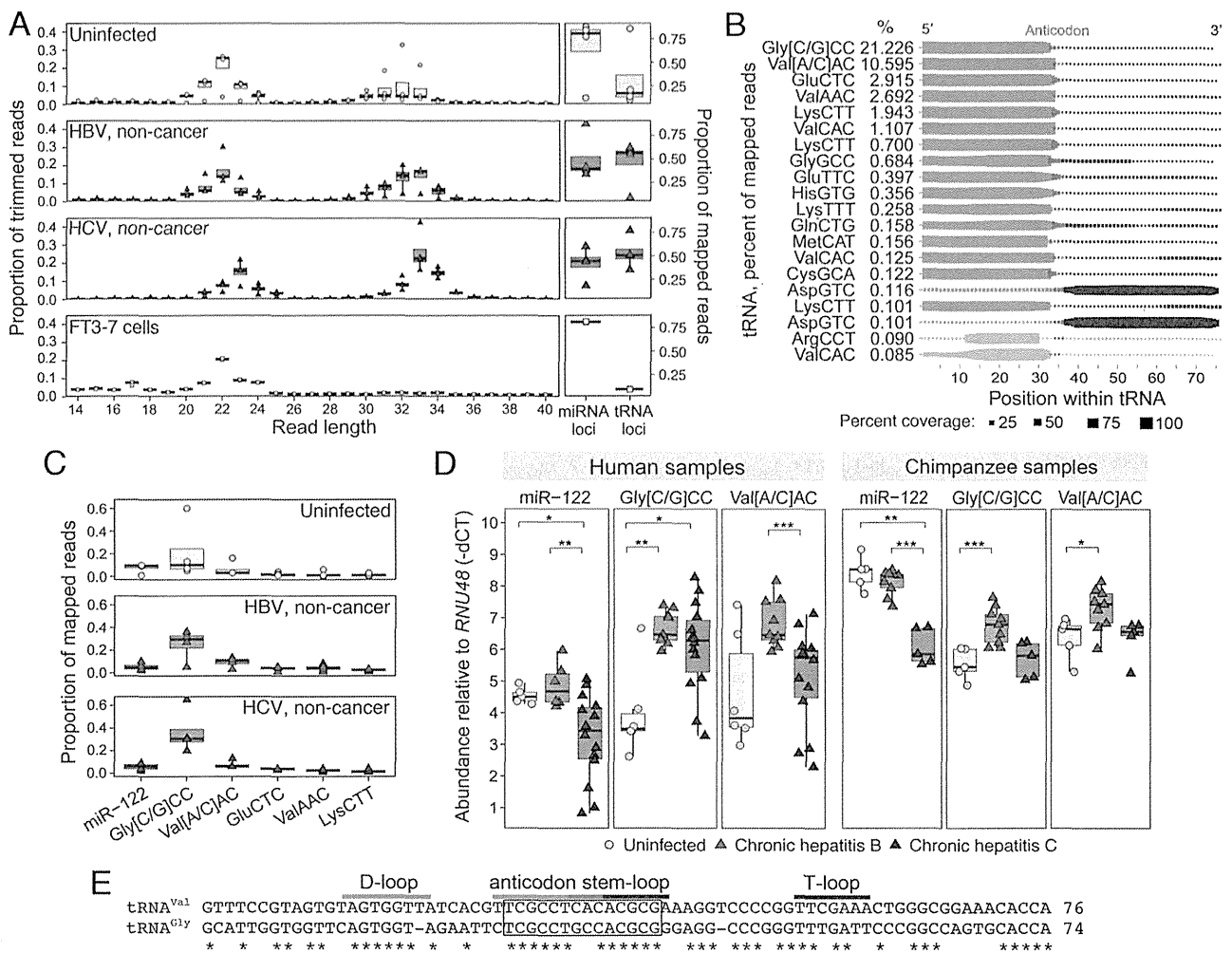


Figure 1 | tRH abundance in HBV- and HCV-infected liver. (a) (left) Read length distribution of 14–40 nt RNAs in non-malignant liver from uninfected, HBV-, or HCV-infected subjects ($n=4$ each), and FT3-7 cells ($n=3$ replicates). (right) Proportion of reads mapping to miRNA versus tRNA loci. Boxes represent median \pm 1.5 * interquartile range. (b) tRNA coverage plot from the average of the 20 non-cancer samples. Dot size represents percent of reads mapping at each base position within each tRNA (top 20 by average abundance). The anticodon is red, with 5' bases green and 3' bases blue. Gray: bases of RNAs that are non-tRHs. See Supplemental Figure 1. (c) Proportion of mapped reads aligning to miR-122 versus the five most abundant tRNA-derived RNAs. (d) (left) Expression levels (RT-qPCR) of miR-122, 5' tRH^{Gly} ("Gly[C/G]CC") and 5' tRH^{Val} ("Val[A/C]AC") in uninfected ($n=5-6$), HBV-infected ($n=6-9$) and HCV-infected ($n=14$) human liver. Numbers of samples differ due to limited RNA. (right) Similar results from uninfected ($n=5$), HBV-infected ($n=9$), and HCV-infected C ($n=5$) chimpanzees. *RNU48* was used as a normalizer. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$ by Mann-Whitney *U*-test. (e) ClustalW⁴³ multiple sequence alignment of representative tRNA^{Gly} and tRNA^{Val} genes from which 5' tRH^{Gly} and 5' tRH^{Val} could originate (see Supplemental Figure 3). tRNAs regions are highlighted according to the color scheme in panel (b). The box identifies a unique conserved sequence motif described in the text. "Mapped reads" represents all reads aligning to miRNAs or tRNAs (see Methods).

small RNAs in virus-infected liver, and show that their abundance is altered in various disease states including hepatocellular carcinoma.

Results

tRNA-half abundance is significantly increased in chronic viral hepatitis.

We employed high-throughput sequencing to characterize the small RNA transcriptome in liver tissue from Japanese adults with advanced hepatitis B or hepatitis C and concomitant HCC (see Supplemental Table 1 for patient information; see Supplemental Tables 2–4 for summary statistics on RNA, qRT-PCR, and sequencing). Initial studies focused on non-malignant tissue from 4 subjects with hepatitis B (mean age 53 ± 4 yrs s.e.m.), 4 with hepatitis C (63 ± 2 yrs), and 4 uninfected individuals undergoing resection of metastatic tumors (60 ± 10 yrs)¹⁴. A large proportion of the sequencing reads were 19–25 nts in length (median 38%, range 10–73%), as expected for miRNAs¹⁵ (Figure 1a, left). However, we

detected an equal or greater abundance of 30–35 nt reads in HBV- and HCV-infected liver (median 54%, range 14–80%). These larger RNAs were less abundant in uninfected tissue (median 21%, range 14–84%) and in human hepatoma (FT3-7) cells (median 9%, range 8.7–9.3%).

Most (~65%) of the 30–35 nt reads in infected samples aligned perfectly to the region 5' of the anticodon triplet in annotated tRNA genes¹⁶ (Figure 1b, Supplemental Figure 1, Supplemental Table 5 and 6). We refer to these as "5' tRNA-halves" (5' tRHs)⁹. Many of the remaining 30–35 nt reads also aligned to the 5' end of tRNAs, particularly tRNA^{Gly}, but with one or more nucleotide deletions. Also present were 3' tRHs (~36–39 nts) mapping to the region 3' of the anticodon, including the 3' terminal CCA (Figure 1b, Supplemental Figure 1). Additionally, we identified shorter reads derived from 3' or 5' tRNA termini, referred to previously as "tRNA fragments"⁹ (tRFs), or the region immediately 5' or 3' of the anticodon loop, but these



were much less frequent. In 6 of 8 infected livers, more reads mapped to tRNA loci¹⁶ than to known miRNAs¹⁷ (see Methods), while the opposite was true in 3 of 4 uninfected tissues as well as FT3-7 cells (Figure 1a, right).

There are 625 annotated tRNA genes in the human genome (hg19) encoding 458 unique tRNA sequences. We identified reads mapping to 348 of these 458 sequences. Notably, in 11 of the 12 subjects, the same five 5' tRHs comprised >80% of tRNA-derived reads (Supplemental Figure 2a). The two most abundant 5' tRHs were Gly[C/G]CC ("5' tRH^{Gly}"), which could be derived from any of 10 tRNA^{Gly} genes with identical 5' sequence, and Val[A/C]AC ("5' tRH^{Val}"), which could originate from any of 15 tRNA^{Val} genes (Figure 1b and c, Supplemental Figure 1 and 3, and Supplemental Table 5)¹⁶. 5' tRH^{Gly} accounted for 54 ± 9% (s.d.) and 5' tRH^{Val} 17 ± 9% of all tRNA-derived RNA reads (Supplemental Figure 2a). Remarkably, 5' tRH^{Gly} abundance exceeded that of miR-122, one of the most abundant liver miRNAs¹³, in 7 of 8 virus-infected tissues.

We used real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) to validate these results and compare 5' tRH^{Gly}, 5' tRH^{Val} and miR-122 abundance in liver tissue from 22 additional subjects (Supplemental Table 1–3)¹⁴. These analyses confirmed that 5' tRH^{Gly} abundance was increased in HBV- and HCV-infected liver compared with uninfected tissues ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) (Figure 1d, left). A similar trend was observed for 5' tRH^{Val} (HBV $P = 0.07$; HCV $P = 0.7$). 5' tRH^{Gly} and 5' tRH^{Val} were more abundant than miR-122 in HBV- and HCV-infected liver (5' tRH^{Gly}, $P < 0.005$ for both HBV and HCV; 5' tRH^{Val}, $P < 0.005$ for HBV and $P < 0.01$ for HCV) (Figure 1d left). Notably, 5' tRH^{Val} abundance was higher in HBV- than in HCV-infected tissues ($P < 0.005$).

Chimpanzees (*Pan troglodytes*) recapitulate many aspects of HBV and HCV infections in humans^{18,19}, and are free of potential confounding variables (e.g., alcohol intake, smoking) that are difficult to control in human cohorts. Similar to humans, we found that intra-hepatic 5' tRH^{Gly} and 5' tRH^{Val} abundance was increased in archived liver tissue from chimpanzees chronically infected with HBV compared to uninfected animals ($P < 0.005$ and $P < 0.05$, respectively) (Figure 1d, right, and Supplemental Table 7). However, 5' tRH abundance was not increased in chronically HCV-infected chimpanzee liver.

In human tissues, the relative abundance of specific tRNA-derived RNAs correlated with codon usage (codon frequency in DNA sequence) (Spearman's $\rho = 0.32$, $P = 0.01$) and the number of possible tRNA genes from which each could originate ($\rho = 0.41$, $P = 0.001$) (Supplemental Figure 2b). However, tRNAs representing potential sources of the five most abundant tRHs were not the most highly ranked by gene number or codon usage, suggesting that additional factors likely determine tRH biogenesis (Supplemental Figure 4). Interestingly, those tRNAs from which 5' tRH^{Gly} and 5' tRH^{Val} are potentially derived share a unique sequence motif in the anticodon stem-loop region (Figure 1e) not present in other tRNAs (Supplemental Figure 3).

tRNA-half abundance is altered in viral hepatitis associated cancer.

In HCC tissue from HBV-infected subjects, RT-qPCR analysis showed that 5' tRH^{Gly} and 5' tRH^{Val} abundance was significantly reduced ($P < 0.005$ for both) (Figure 2a). Similar reductions were evident in HCV-associated cancer tissue, but significant only for 5' tRH^{Val} ($P < 0.05$). We then sequenced small RNAs in cancer tissue from 4 HBV- and 4 HCV-infected subjects. The proportion of reads mapping to tRNA genes was reduced in 4 of 7 samples for which a paired analysis with non-malignant liver was possible, and relatively unchanged in the other 3 (Figure 2b). Although tRNA-derived RNA expression profiles were similar across non-malignant tissues from different subjects, there was substantial variation when compared to cancer tissues (Figure 2c). This suggests that the relative abundance of specific tRNA-derived

RNAs is altered in HCC. Notably, the relative abundance of 5' tRH^{Gly} was reduced by ~50–60% in both HBV- and HCV-associated cancer (Figure 2d).

tRNA-half abundance correlates with angiogenic levels in HBV-associated cancer.

Angiogenic (encoded by the gene *ANG*) is best known for its role in angiogenesis, but several studies suggest its RNase activity contributes to tRH biogenesis^{20,21}. Consistent with this, analysis of previous microarray data obtained from these tissues¹⁴ revealed that *ANG* mRNA was reduced in both HBV- and HCV-associated cancer compared to non-malignant tissue ($P < 0.01$ and $P < 0.005$, respectively) or uninfected liver ($P < 0.005$ and $P = 0.01$) (Figure 3a). Analysis of data from The Cancer Genome Atlas (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) also indicates that *ANG* expression is reduced in HCC compared to non-malignant tissue, although the difference is significant only for HBV-associated cancer (HBV $P < 0.005$, HCV $P = 0.12$) (Supplemental Figure 5). *ANG* mRNA abundance correlated strongly with 5' tRH expression in the HBV-infected subjects we studied (5' tRH^{Gly}: Spearman's $\rho = 0.67$, $P < 0.01$; 5' tRH^{Val}: $\rho = 0.74$, $P < 0.005$) (Figure 3b). Quantitative immunoblot analyses (Supplemental Figure 6) confirmed a correlation between *ANG* protein abundance and 5' tRH expression in HBV-associated cancer (5' tRH^{Gly}: $\rho = 0.83$, $P < 0.005$; 5' tRH^{Val}: $\rho = 0.87$, $P < 0.005$) (Figure 3c). *ANG* was expressed within the cytoplasm of hepatocytes (Figure 3d), and although its expression varied substantially in different tumors (Figure 3e), reductions in *ANG* expression likely explain the reduced tRH abundance we observed in most HBV-associated cancers. Unfortunately, however, the available tissue sections from these subjects were insufficient to power a formal analysis of the correlation between cytoplasmic versus nuclear expression of *ANG* and tRH abundance. *ANG* expression correlated poorly with tRH abundance in HCV-infected livers, suggesting that other factors determine tRH biogenesis.

Discussion

Recent advances in high-throughput sequencing technology have unveiled the complexity and diversity of functional small RNAs. We found that small RNAs derived from tRNAs, specifically 5' tRNA-halves⁹ (5' tRHs, ~30–35 nts), are abundant in liver, significantly increased during chronic viral infection, and altered in abundance in liver cancer associated with these infections. We do not believe that these tRNA-halves are products of stochastic endonuclease cleavage of tRNAs for several reasons. First, the same tRNA-halves were found to be increased in chronic viral hepatitis across all individuals. Second, each tRNA-half family exhibited a uniform length distribution (e.g., 5' tRH^{Gly} was represented primarily by reads of length 32–34 in every individual). Third, tRNA-halves were preferentially induced in chronic HBV infection (as compared to chronic HCV infection) in both human and chimpanzee tissue, indicating biological specificity. Finally, tRH abundance was correlated with disease state (cancer versus non-cancer), indicating reproducible sensitivity to the cellular environment.

Several models of disease have been shown to exhibit an increase in tRH abundance, including cultured human airway cells infected with respiratory syncytial virus²², mice infected with spotted-fever group rickettsia²³, and rats treated with cisplatin²⁴. While their function is not well understood, previous work in cell culture suggests that some tRHs promote cell survival, are anti-apoptotic¹², reduce translation²⁵, and promote the formation of stress granules²⁶. Preliminary studies in our laboratory do not support a role for 5' tRH^{Gly} or 5' tRH^{Val} in the regulation of global protein translation in human hepatoma cells (Supplemental Figure 7–8); however, more detailed investigation is required to uncover the potential functions of tRHs. It has also been suggested that tRHs may alter the immune response due to their enrichment in mouse lymphoid organs²⁷, high

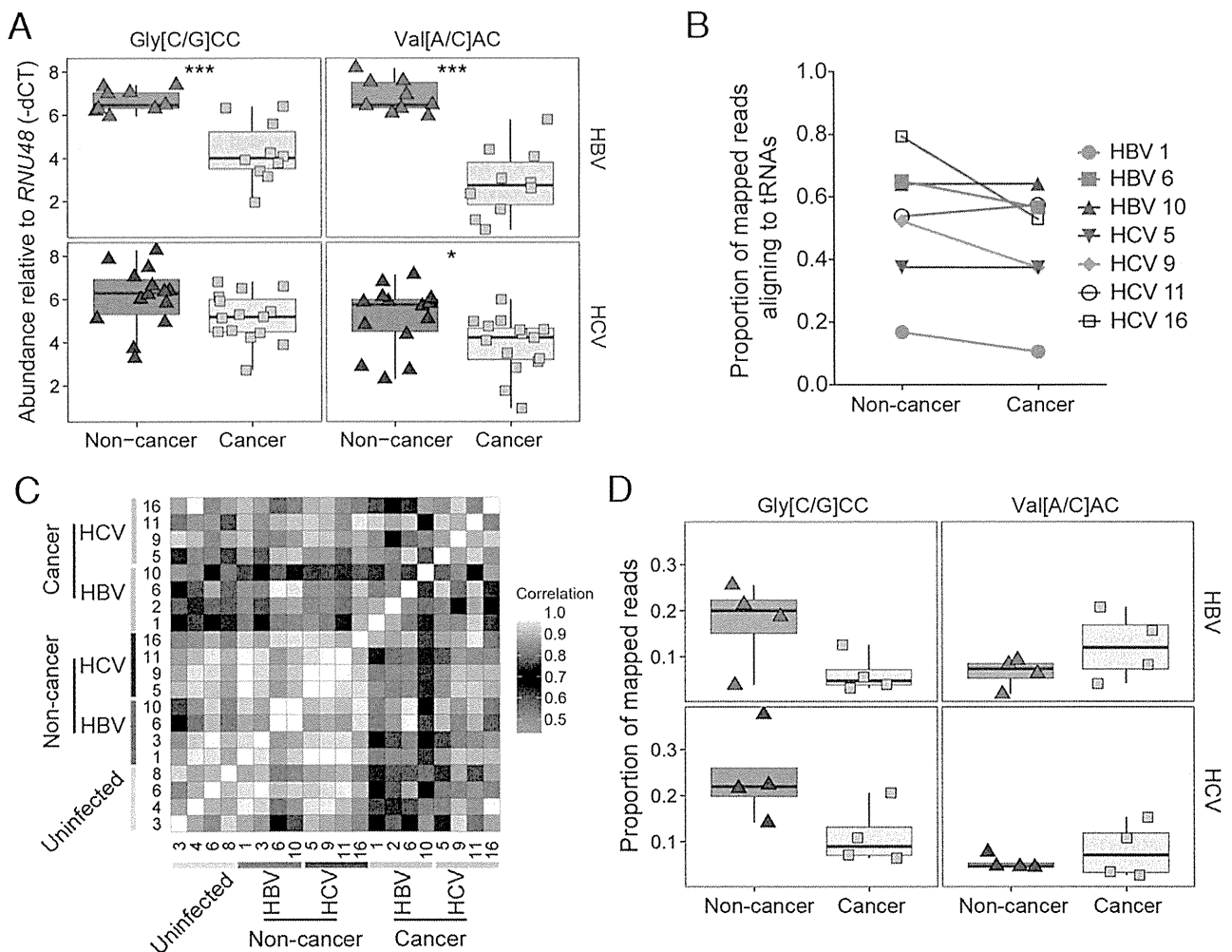


Figure 2 | 5' tRH abundance in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. (a) Abundance (RT-qPCR) of (left) 5' tRH^{Gly} (Gly[C/G]CC) and (right) 5' tRH^{Val} (Val[A/C]AC) in (top) non-malignant ($n=9$) and cancer tissue ($n=10$) from HBV-infected subjects, and (bottom) non-malignant ($n=14$) and cancer tissue ($n=15$) from HCV-infected subjects. Box and whisker plots are overlaid with data from each sample; whiskers extend to 1.5 * interquartile range. P-values calculated using Mann-Whitney U -test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$. (b) Proportion of mapped reads aligning to tRNAs for the paired cancer and non-cancer tissue from subjects with chronic hepatitis B ($n=3$) and hepatitis C ($n=4$) (c) Correlation heatmap of tRNA-derived RNA expression profiles determined by small RNA sequencing. The colors of the cells represent Spearman's rank correlation coefficients of the relative levels of the 10 most abundant tRNA-derived RNAs between all pairs of tissue samples sequenced ($n=20$). (d) Proportion of mapped reads that align to 5' tRH^{Gly} and 5' tRH^{Val} in non-malignant and cancer tissue from (top) HBV-infected and (bottom) HCV-infected subjects. "Mapped reads" represents all reads aligning to miRNAs or tRNAs (see Methods).

abundance in seminal exosomes (considered to be immunosuppressive)²⁸, and roles in facilitating *Trypanosoma cruzi* infection in human cells and altering host gene expression²⁹.

There is good evidence that the abundance of these small non-coding RNAs increases in response to specific kinds of cellular stress. For example, tRHs are induced in cell culture by the addition of sodium arsenite, exposure to UV, nutrient starvation, hypoxia, hypothermia and heat, but not by exposure to etoposide, γ -radiation, caffeine^{30,31}. This strongly suggests that the formation of tRHs is a regulated process, rather than due to general degradation of tRNAs in response to stress. In the nucleus angiogenin is involved in promoting angiogenesis³² and in the cytoplasm, when not bound to RNH1, it acts as a tRNA-processing RNase^{33,34}, cleaving tRNAs at the anticodon loop and producing tRHs^{30,31}. The cellular localization of angiogenin and its ribonuclease activity depend on the intracellular conditions and are regulated by RNH1³³. The differences we observed in correlations between ANG expression and tRH abundance in chronic hepatitis B, hepatitis C and

associated liver cancer may be a result of differences in angiogenin localization and function in these disease states. Non-tumor and tumor tissues from patients with chronic hepatitis C tend to show more evidence of angiogenesis than the in chronic hepatitis B^{35,36}. This could mean that in chronic hepatitis C angiogenin is primarily nuclear, and therefore not exclusively involved in tRH production. Finally, it must also be noted that factors other than ANG may be critical to tRH biogenesis in different cell types or in response to different types of cellular stress. Much more remains to be uncovered about the specific mechanisms that lead to tRH accumulation.

Chronic infections with HBV and HCV typically lead to more severe liver disease in human patients than in the chimpanzee model^{37,38}. Disease severity may account for the differences we observed in tRH abundance between liver tissue from human subjects with chronic HCV infection and the chimpanzee samples. Interestingly, however, humans and chimpanzees exhibited similar increases in tRH abundance in chronic hepatitis B, suggesting that

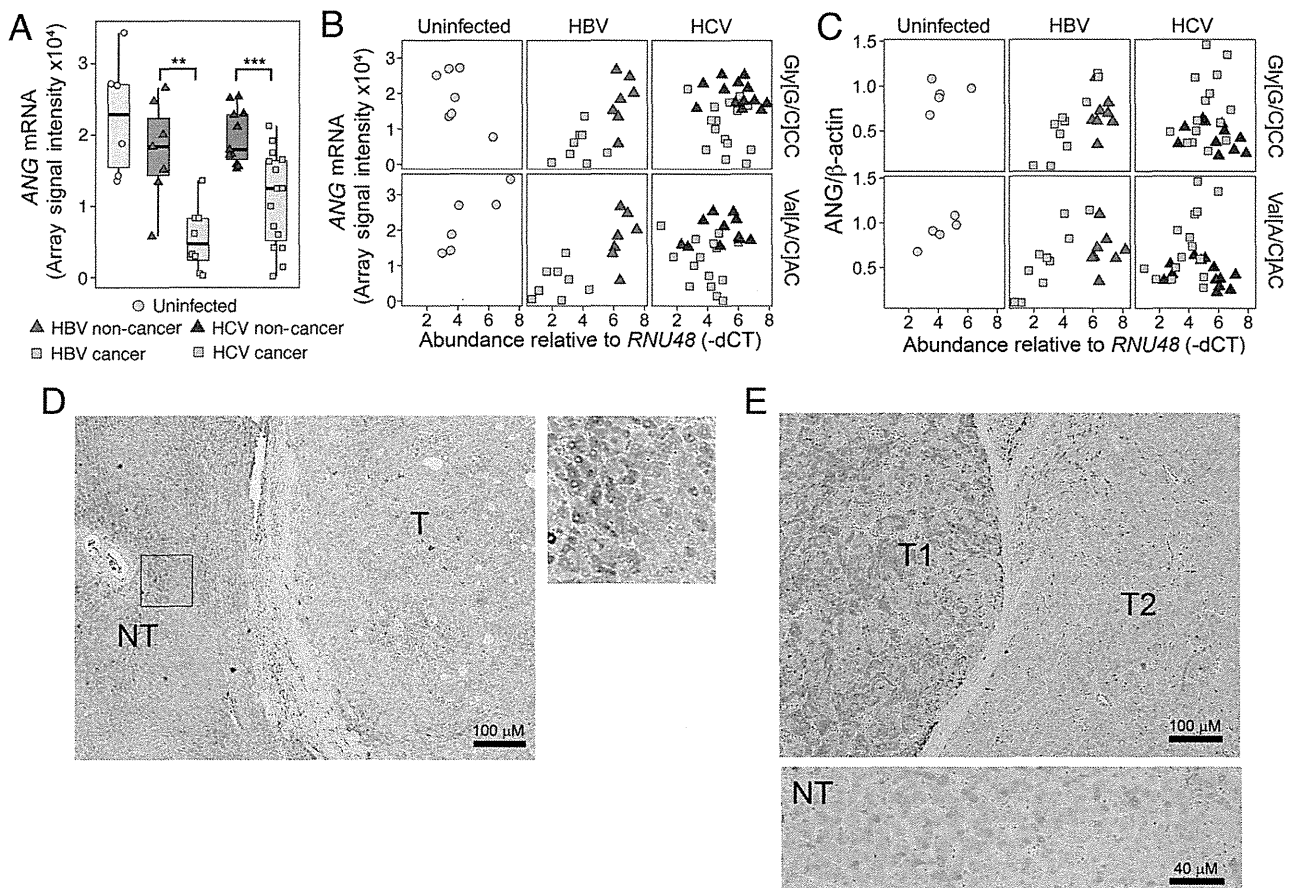


Figure 3 | Angiogenin expression in viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. (a) Normalized ANG mRNA levels from previously generated liver microarray data¹⁴ from uninfected subjects ($n=6$), non-malignant ($n=7$) and liver cancer ($n=8$) tissue from HBV-infected subjects, and non-malignant ($n=11$) and cancer tissue ($n=15$) from HCV-infected subjects. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$, calculated by Mann-Whitney U -test. (b) Scatter plot of the levels of 5' tRHs (RT-qPCR, -dCT normalized to *RNU48*) and ANG mRNA (microarray). 5' tRH^{Gly} ("Gly[C/G]CC"): uninfected subjects ($n=7$), non-cancer ($n=7$) and cancer ($n=8$) liver tissue from chronic hepatitis B subjects, and non-cancer ($n=11$) and cancer ($n=15$) liver tissue from chronic hepatitis C subjects; 5' tRH^{Val}: uninfected subjects ($n=6$), non-cancer ($n=7$) and cancer ($n=8$) liver tissue from chronic hepatitis B subjects, and non-cancer ($n=11$) and cancer ($n=15$) liver tissue of chronic hepatitis C subjects. (c) Scatter plot of the levels of 5' tRHs (RT-qPCR, -dCT normalized to *RNU48*) and ANG protein expression (normalized to β -actin) determined by immunoblot analysis. (d) Immunohistochemistry staining for ANG in formalin-fixed non-tumor (NT) and tumor tissue (T) from HBV-infected subject #10. (Right) Magnified view of non-tumor (NT). (e) ANG staining in adjacent tumor nodules (T1 and T2) and in non-tumor (NT) tissue from HCV-infected subject #7.

there may be a primary HBV-specific mechanism that directly regulates tRH biogenesis.

Our study has some technical limitations. tRNAs are subject to many different chemical modifications³⁹, several of which could impede library preparation and sequencing. This may have biased which tRNA-derived RNAs we detected. Also, we do not know how tRH abundance varies among the diverse cell types that populate the liver. Given that these small RNAs have not previously been studied in human tissue, we also have little appreciation of what functions these small non-coding RNAs have within the liver. Nonetheless, our finding that the intrahepatic abundance of tRHs is substantially increased in chronic viral infections of the liver and altered in HCC suggest that tRHs may have important, yet to be determined roles in liver disease. Thus, this study may have implications for disease pathogenesis and novel therapeutic strategies.

Methods

The methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

Human subjects. Written informed consent was obtained from all human subjects. Ethics approval was obtained from the Ethics Committee for Human Genome/Genome Analysis Research at Kanazawa University Graduate School of Medical Science.

Chimpanzee liver tissue. The chimpanzee samples used in this study were archived from previous studies and were collected prior to December 15, 2011. Chimpanzees were housed and cared for at the Southwest National Primate Research Center (SNPRC) of the Texas Biomedical Research Institute. The animals were cared for in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and all protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. SNPRC is accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International. SNPRC operates in accordance with the NIH and U.S. Department of Agriculture guidelines and the Animal Welfare Act. Animals were sedated for all procedures. Animals are group-housed with indoor and outdoor access and an environmental enrichment program is provided by a staff of behavioral scientists.

Small RNA-sequencing. RNA was isolated as described previously¹⁴. RNA purity was assessed with Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) and integrity was determined with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). RNA integrity and sequencing quality were comparable for all specimens (Supplemental Table 2–4). Small RNA libraries were generated using Illumina TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA). Sequencing was performed on Illumina HiSeq 2000 platform. Bioinformatic analysis: Sequencing reads were trimmed using Cutadapt (parameters $O -10 e 0.1$) and were further analyzed in two different ways: (i) Mapped trimmed reads allowing no mismatches to all tRNA sequences (except pseudo-tRNAs and undefined tRNAs) downloaded from GtRNAdb¹⁶ (Figure 1b,c; Figure 2c,d; Supplemental Figure 1,2,4,7); (ii) Mapped trimmed reads to genomic regions spanning annotated miRNA s⁴⁰ (+/- 20 nts) and tRNA sequences (+/- 40 nts) using Bowtie 0.12.7⁴¹ allowing for no mismatches. Next, reads that did not map