

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。しかしながらC型慢性肝疾患におけるlncRNAの意義は不明であり、本研究ではC型肝炎ウイルス（以下HCV）感染によるlncRNAの役割を明らかにすることを目的とした。昨年度までのHCVの培養細胞系を用いた検討から、lncRNA-HがHCV感染により発現が誘導され、さらにlncRNAの発現抑制によりHCV複製が抑制されることを見いだした。本年度は、チンパンジー、キメラマウスにおいてHCV感染によるlncRNA-Hの発現誘導の有無を検討した。その結果HCV感染チンパンジー、キメラマウスにおいて、培養細胞系と同様にHCV感染による肝内のlncRNA-Hの発現誘導を認めた。さらにHCV排除前後で肝生検を施行されたC型慢性肝疾患患者において、lncRNA-Hの肝内の発現量を測定したところHCV排除により有意にlncRNA-Hの発現量の低下を認めた。また昨年度までの検討で肝内のlncRNA-Hの発現量がIL28Bマイナー患者は有意にIL28Bメジャー患者に比べ高値であることを見いだした。本年度は血清中のlncRNA-Hの発現量についても検討を行い、肝内と同様血清中においてもlncRNA-Hの発現量はIL28Bマイナー患者では有意にIL28Bメジャー患者に比べて高値であった。これらの結果からHCV感染は、lncRNA-Hの発現を誘導することがin vivoにおいても明らかとなった。またlncRNA-Hは、インターフェロン感受性に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度までのHCV感染培養細胞由来RNAの次世代シーケンサーを用いた解析からlncRNAの一つであるlncRNA-HがHCV感染において発現誘導されること、またlncRNA-Hの発現抑制によりHCV複製が抑制されることを明らかにした。lncRNA-Hは、500塩基のlncRNAで既にlncRNAのデータベース(lncRNA db; <http://lncrnadb.org/>)に登録されている。さらにヒト肝癌組織、血清、

肝癌細胞株での発現が複数報告されているが、C型慢性肝疾患、およびHCV感染における意義は不明である。

本年度の検討では、in vitro（培養細胞）において認められたHCV感染によるlncRNA-Hの発現誘導が、in vivo(マウス、チンパンジー、ヒト)においても認められるかどうかを検討した。また昨年度までの検討でC型慢性肝疾患患者では肝内のlncRNA-Hの発現量がIL28Bマイナー患者は有意にIL28B

メジャー患者に比べ高値であることを見いだした。本年度は血清中の lncRNA-H の発現量に関して測定し、L28B メジャー患者とマイナー患者での比較を行った。

## B. 研究方法

- 1) チンパンジーに HCV を含む血清を投与し、投与前、1 週、3 週、6 週、11 週、24 週後に、肝生検、血清の採取を行った。各タイムポイントで得られた肝組織由来 RNA を次世代シーケンサーによる RNAseq により解析した。lncRNA-H 量に関しては RNAseq のデータを用いて測定した。また肝組織中・血清中の HCV RNA 量を定量 PCR 法にて、さらに血中 ALT を測定した。
- 2) キメラマウスに遺伝子型 1b の HCV を感染させ、4 週間後にマウスを安楽死させ、肝組織を採取した。その後肝組織中の HCV RNA 量、lncRNA-H 量を定量 PCR 法にて解析した。
- 3) C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での lncRNA-H の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。
- 4) テラプレビル併用ペグインターフェロン、リバビリン療法を施行された C 型慢性肝疾患患者 80 例 (IL28B ゲノタイプ メジャー、マイナー 各々 40 例) に関して治療開始前の血清中 lncRNA-H 量を定量 PCR 法にて測定して IL28B ゲノタイプによる lncRNA-H の発現量を比較した。

(倫理面への配慮)

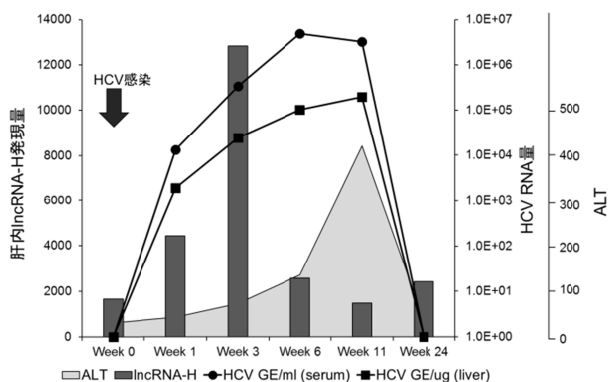
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。またヒトゲノム・遺伝子解析研究が必要になった場合にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、インフォームドコンセントを得た症例の試料のみを用いて研究を行った。

## C. 研究結果

### 1) HCV 感染チンパンジーにおける lncRNA-H の発現誘導解析

HCV の感染により HCV RNA は 1 週間後から 11 週間後まで持続的に肝内、血清で持続的に検出されたが、24 週間後には肝内、血清中で検出されなかった。また血清 ALT 値は感染直後より 11 週間後まで増加傾向を示したが、HCV RNA が陰性化した 24 週間後には正常化した。これらの結果から HCV は少なくとも 11 週間後まで持続感染し、急性肝炎を惹起したが、24 週間後には自然排除されたと考えられた。lncRNA-H の発現量に関しては、HCV RNA の増加と共に、3 週間後まで著明に増加し、その後低下傾向を示し、ウイルス排除時には、感染前の値に復した(図 1)。

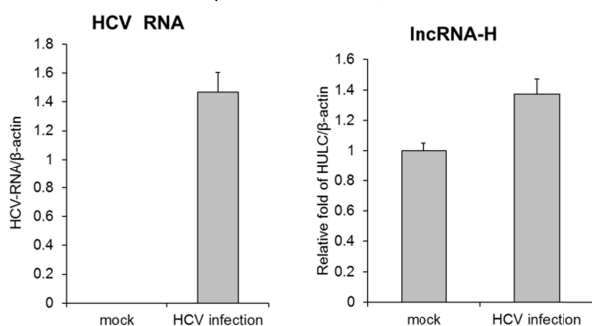
**図 1 HCV 感染チンパンジーにおける肝内 IncRNA-H 発現量**



**2) HCV 感染マウスにおける IncRNA-H の発現誘導解析**

キメラマウスに HCV に感染させ、1 週間後にマウスより採血し HCV RNA 量を測定したところ  $4.2 \times 10^7$  copies/ml 存在し、持続感染が成立したものと判断した。28 日後 HCV 感染マウスおよび非感染マウスを安楽死後、肝組織から全 RNA を抽出し、HCV RNA と IncRNA-H 発現量を定量 PCR にて測定した。その結果 HCV RNA は HCV 感染マウスにおいて検出され、28 日後まで持続感染したと考えられた。また HCV 感染マウスの IncRNA-H の発現量は非感染マウスに比べて高値であった (図 2)。

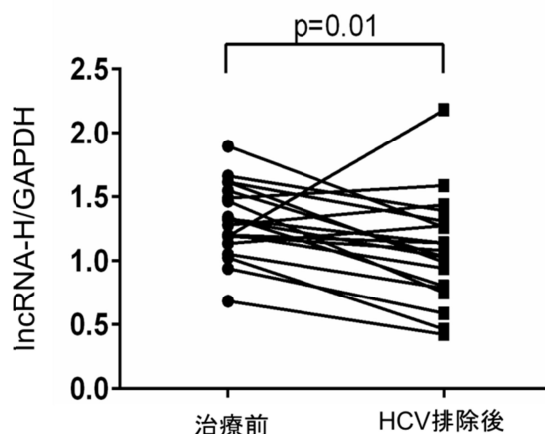
**図 2 HCV 感染キメラマウスにおける肝内 HCV RNA、IncRNA-H 発現量**



**3) C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の肝内 IncRNA-H 発現量**

C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV の排除前後で肝生検が施行された 20 例を対象として、HCV 排除前後での IncRNA-H の肝組織中の発現量を定量 PCR 法で測定し、比較した。その結果、HCV 排除により有意に IncRNA-H の発現量の低下を認めた (図 3)。

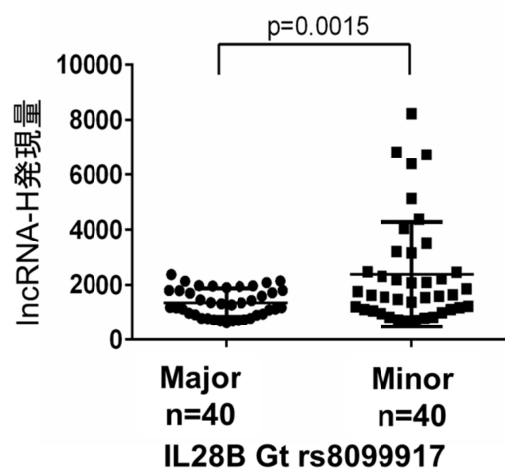
**図 3 HCV 排除前後における IncRNA-H の発現量の比較**



**4) IL28B ゲノタイプ別血清中 IncRNA-H 発現量の比較**

テラプレビル併用ペグインターフェロン、リバビリン療法を施行された C 型慢性肝疾患患者 80 例 (IL28B ゲノタイプ メジャー、マイナー 各々 40 例) に関して治療開始前の血清中 IncRNA-H 量を定量 PCR にて測定して IL28B ゲノタイプによる IncRNA-H の発現量を比較した。肝内と同様血清中においても IncRNA-H の発現量は IL28B マイナー患者では有意に IL28B メジャー患者に比べて高値であった (図 4)。

**図 4 IL28B ゲノタイプ別血清中 IncRNA A-H 発現量**



考えられ、その観点から今後も症例数を増やして検討を行う。

- 4) 肝内、および血清の 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。

#### D. 考察

- 1) チンパンジーおよびキメラマウスへの HCV 感染により、培養細胞系と同様に IncRNA-H の肝内での発現誘導を認めた。さらに C 型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法による HCV 排除により IncRNA-H の肝内での有意な発現の低下を認めた。今回の検討により in vivo においても HCV 感染により IncRNA-H の発現が誘導されることを明らかにした。
- 2) LncRNA-H は、肝発癌との関与が示唆されている。そのため HCV により IncRNA-H の発現誘導は C 型慢性肝疾患患者における肝発癌機序の解明の手がかりとなる可能性が考えられる。
- 3) HCV 排除後、IncRNA-H の発現が低下する患者と低下しない患者が存在した。今後 HCV 排除後の IncRNA-H の発現量の変化と、HCV 排除後の肝発癌との関連についても検討を行う。すなわち IncRNA-H は HCV 排除後の肝発癌に関するバイオマーカーとなり得る可能性が

#### E. 結論

In vivo においても in vitro と同様に HCV 感染による IncRNA-H の発現誘導を認めた。

また IL28B ゲノタイプマイナー患者の肝内、血清中 IncRNA-H 発現量はメジャー患者に比べて有意に高値であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 論文発表

- 1) 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. Sci Rep. 2015 Jan 8;5:7675.
- 2) 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- $\beta$  signaling pathway. *Hepatology*. 2014 Nov;60(5):1519-30.

- 3) 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*. 2014 Aug;20(8):927-35.
- 4) 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. *J Virol*. 2014 Jul 1;88(13):7199-7209.
- 5) **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. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4:4688.

#### 書籍発表

- 1) **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 日本臨床 2015年1月 73巻増刊号1、788-92

#### 2. 学会発表

##### 国内学会

- 1) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 IL28B Genotype, ISGs発現量, 前治療反応を用

いたテラプレビル併用抗HCV 療法における治療効果予測と至適治療期間に関する検討 第50回日本肝臓学会総会 シンポジウム1-8 (2014年5月東京)

- 2) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一 前治療無効例に対するテラプレビル併用3剤併用療法48週間延長投与に関する検討 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム6-9 (2014年4月東京)

##### 国際学会

- 1) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. The Liver Meeting 2014(65<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease)(2014年11月ボストン)Poster 1776
- 2) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Liu F, Funaki M, Murai K, Shiimoto T, Murakami S, and Kaneko S. Regulation of Hepatitis C Virus Infection by Long Non-Coding RNAs. 21<sup>st</sup> International Symposium on Hepatitis C Viruses (2014年9月バンフ) Poster P3.66
- 3) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Murakami S, and Kaneko S. ACYCLIC RETINOID, PERETINOIN, INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION AND INFECTIOUS VIRUS RELEASE IN CELL CULTURE. The 49th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (2014年4月ロンドン) Poster 1701

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

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 IncRNA-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 IncRNA-H 特異的な遺伝子切断を行った。細胞はプラスタ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) IncRNA-H ノックアウト細胞に HCV 感染クローンである HJ3-5G1uc2A 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 IncRNA-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 IncRNA-H の発現を検討した。
- 5) IncRNA-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 IncRNA-H の発現をモニターした。

#### (倫理面への配慮)

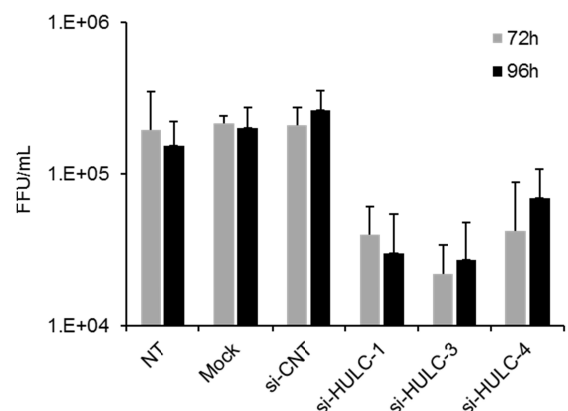
本研究では感染性粒子を産生しうる HCV 細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ず P2 ルームで施行するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既に P2 ルームを有しており、HCV 感染実験での P2 ルームの使用に関しては、平成 24 年 6 月 12 日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より機関承認を得ている(金大 6 第 1316 号)。

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) IncRNA-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。IncRNA-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 IncRNA であることを示唆する(図 1)。

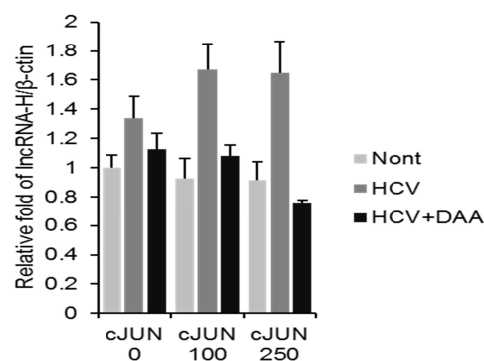
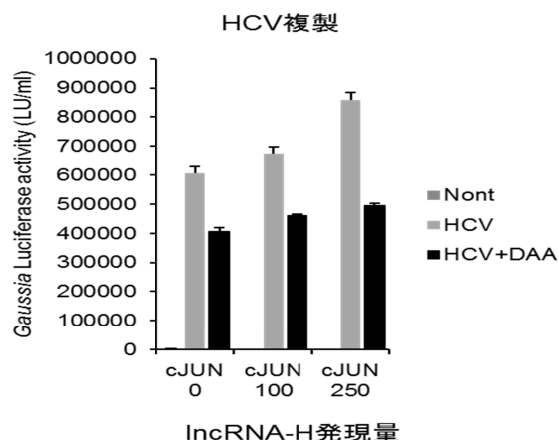
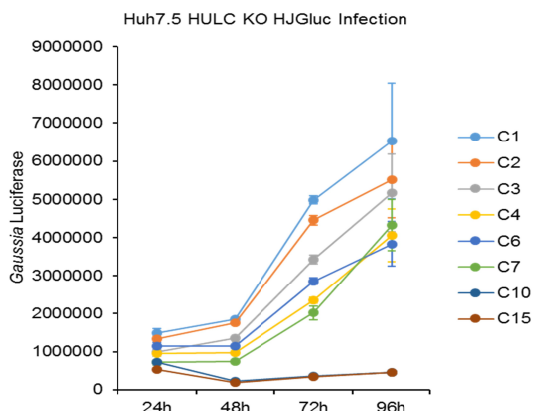
**図 1 IncRNA-H の発現抑制の感染性粒子産生に与える影響**



- 2) Huh7.5 細胞の IncRNA-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-IncRNA-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 IncRNA-H ノックアウト細胞における HCV 複製**

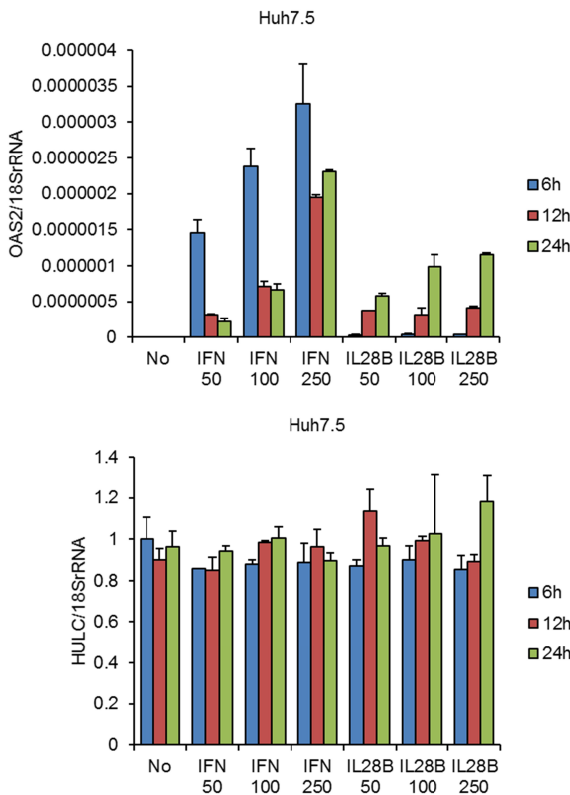


3) IncRNA-H のプロモータ領域の解析から c-Jun(AP1) 結合領域が存在することをみいだした。そのため c-Jun に着目し、HCV 感染による IncRNA-H 発現抑制機序の解明を行った。c-Jun の過剰発現により用量依存性の HCV 複製の増強を認めた。また HCV 感染なしの細胞では c-Jun の過剰発現を行っても IncRNA-H の発現誘導は認めなかったが、HCV 感染を伴った場合は著明な IncRNA-H の誘導を認めた (図 3)。

**図 3 c-Jun を介した IncRNA-H の発現誘導**

4) IncRNA-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 IncRNA-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、IncRNA-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 IncRNA-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- $\beta$  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, Murao 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 (65<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease)(2014年11月ポスター) 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. 21<sup>st</sup> 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