

201423022B

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

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 島上哲朗

平成27 (2015) 年3月

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

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 島上 哲朗

平成27（2015）年 3月

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

研究組織

研究代表者		
島上 哲朗	金沢大学附属病院	助教
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

目 次

I. 総合研究報告

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

島上 哲朗 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 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

島上 哲朗 ----- 11

2. 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

白崎 尚芳 ----- 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

I. 総合研究報告

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）〕
総合研究報告書

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型肝炎ウイルス（HCV）感染におけるlncRNAの意義は不明であり、本研究では、新たな抗HCV療法の標的となりえるlncRNAの同定を行なうこと、さらにC型慢性肝疾患におけるインターフェロン治療反応性や肝発癌などの様々な病態におけるlncRNAの関与を明らかにすることを目的とした。まずHCV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明らかにした。またチンパンジー、キメラマウスにおいてもHCV感染により肝内の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C型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法前の肝組織中、および血清中のlncRNA-Hの発現量を測定し、インターフェロン治療感受性予測因子であるIL28Bゲノタイプ別に比較した。その結果IL28マイナー症例の肝内・血清中のlncRNA-Hの発現量は、IL28メジャー患者に比べ有意に高値であることを見いだした。これらの結果からHCV感染は、lncRNA-Hは抗ウイルス療法の新規治療標的となりえることが示唆された。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

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。C型肝炎ウイルス（HCV）とnon-coding RNAに関しては、短鎖型non-coding RNAであるmicroRNA-122（miR-122）が、HCV複製に促進的に働き、有力な治療標的であることが明らかとなったが、lncRNAとHCV

感染との関連は未解明である。本研究では、新たな抗HCV療法の標的となりえるlncRNAの同定を行なうこと、さらにC型慢性肝疾患におけるインターフェロン治療反応性や肝発癌などの様々な病態におけるlncRNAの関与を明らかにすることを目的とした。

この目的のため以下の検討を行った。

- 1) HCV感染培養細胞由来のRNAを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し

- HCV 感染特異的に発現が増減する lncRNA 群を探索する。
- 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。

これらの *in vitro* における解析から、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。さらに lncRNA-H に着目して、*in vivo* における意義を以下の点から解析した。

- 1) *In vitro* において認めた HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導が、マウス、チンパンジーなどの *in vivo* においても認められるかどうかを検討する。
- 2) C 型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法による HCV 排除前後の肝組織中の lncRNA-H の発現量を比較し、ヒトにおける HCV 感染による lncRNA-H の発現の変化を検討する。
- 3) C 型慢性肝疾患患者の抗ウイルス療法前の肝組織中及び血清中の lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法にて測定し、IL28B ゲノタイプと lncRNA-H 発現量の相関の有無を検討した。

B. 研究方法

- 1) RNA シークエンス法にて 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。
- 3) 上記で同定した lncRNA の中から lncRNA-H に着目し、HCV 培養細胞系を用いて、lncRNA-H による HCV 感染制御機構の解明を行った。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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、IL28B ゲノタイプ (major と minor) との相関の有無を検討した。
- 8) 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 にて測定して IL28B ゲノタイプに (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。

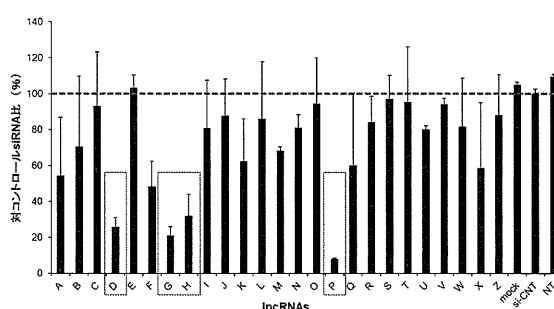
C. 研究結果

1) HCV 感染特異的に発現が変化する lncRNA 群の検索

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 (Huh-7.5 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。次にこれら lncRNA 26 個に対する siRNA を作成し、HCV 感染細胞に投与し、発現抑制の HCV 複製に与える影響を検討した。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)。

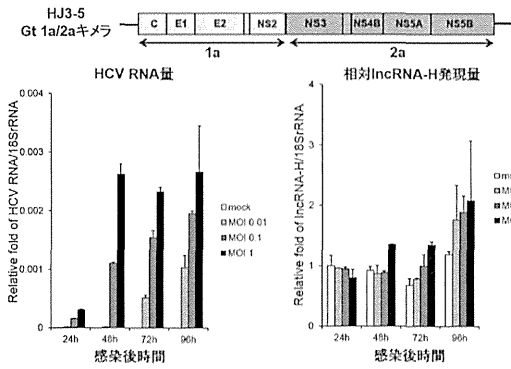
図 1 lncRNA に対する siRNA 投与による HCV 複製に対する影響



2) HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導

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。Huh-7.5 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)。

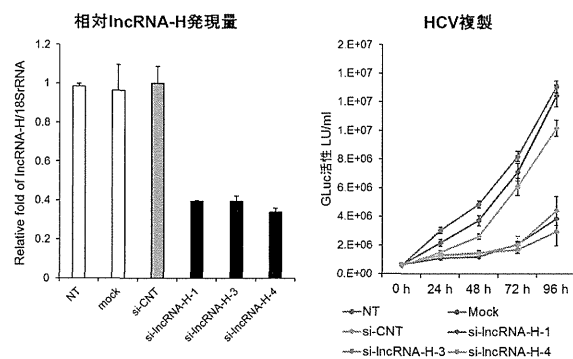
図 2 HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導



3) lncRNA-H 発現抑制による HCV 抑制

lncRNA-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 lncRNA-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 lncRNA-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-lncRNA-H-3 によって最も強い効果を認めた (図 3)。また、lncRNA-H 発現抑制による HCV 複製の抑制は、遺伝子型 1a、1b、2a、1a/2a キメラいずれの HCV に対しても認めた。さらに複製抑制のみでなく、感染粒子産生の抑制も認めた。

図 3 lncRNA-H 発現抑制による HCV 複製抑制

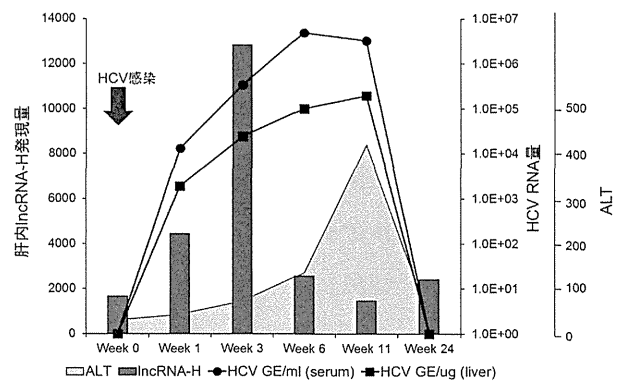


4) HCV 感染チンパンジーにおける

lncRNA-H の発現誘導解析

HCV の感染により HCV RNA は 1 週後から 11 週後まで持続的に肝内、血清で持続的に検出されたが、24 週後には肝内、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 週後まで増加傾向を示したが、HCV RNA が陰性化した 24 週後には正常化した。これらの結果から HCV は少なくとも 11 週後まで持続感染し、急性肝炎を惹起したが、24 週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 4)。

図 4 HCV 感染チンパンジーにおける肝内 lncRNA-H 発現量

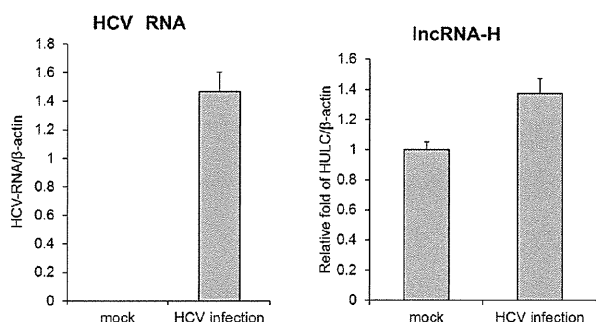


5) HCV 感染マウスにおける lncRNA-H の発現誘導解析

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 4.2×10^7 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 lncRNA-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 lncRNA-H の発現量は非感染マウスに比べて高値であった (図 5)。

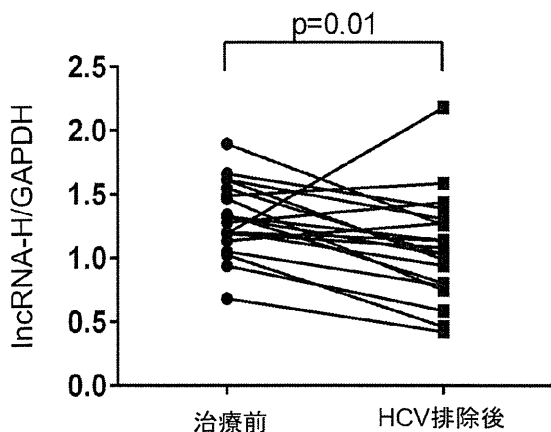
図 5 HCV 感染キメラマウスにおける肝内 HCV RNA、lncRNA-H 発現量



6) C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の肝内 lncRNA-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 lncRNA-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 lncRNA-H の発現量の低下を認めた (図 6)。

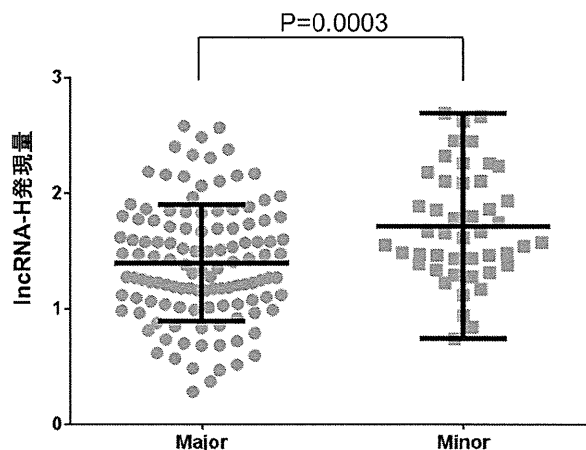
図 6 HCV 排除前後における lncRNA-H の発現量の比較



7) IL28B ゲノタイプ別肝組織中 lncRNA-H 発現量の比較

peg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 lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法により測定した。lncRNA-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 7)。

図 7 IL28B ゲノタイプ別肝組織中 lncRNA-H 発現量

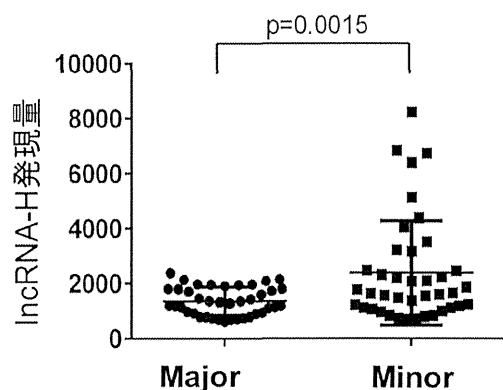


8) IL28B ゲノタイプ別血清中 lncRNA-H 発現量の比較

テラプレビル併用 peg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 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。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 (図 8)。

図 8 IL28B ゲノタイプ別血清中 lncRNA-H 発現量



D. 考察

- 1) In vitro において lncRNA-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) 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 lncRNA-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 lncRNA-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 lncRNA-H の発現が誘導されることを明らかにした。
- 3) lncRNA-H は、既報から肝発癌との関与が示唆されている。そのため HCV により lncRNA-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。
- 4) HCV 排除後、lncRNA-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 lncRNA-H の発現量の

変化と、HCV 排除後の肝発癌との関連に関しても検討を行う。すなわち lncRNA-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。

- 5) 肝内、および血清の 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

In vitro における解析から HCV の感染により発現が誘導される lncRNA-H を同定した。In vivo においても in vitro と同様に HCV 感染による lncRNA-H の発現誘導を認めたため、lncRNA-H は抗 HCV 療法の新規治療標的と考えられた。

また IL28B ゲノタイプマイナー患者の肝内、血清中 lncRNA-H 発現量はメジャー患者に比べて有意に高値であり、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、あるいは新規のインターフェロン治療の効果予測のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究代表者 島上哲朗

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- β 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.
- 6) 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*. 2014 Mar;59(3):828-38.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) Welsch C, **Shimakami T**, Hartmann C, Yang Y, Domingues FS, Lengauer T, Zeuzem S, Lemon SM. Peptidomimetic escape mechanisms arise via genetic diversity in the ligand-binding site of the

hepatitis C virus NS3/4A serine protease. Gastroenterology. 2012. 142(3):654-63

- 10) Welsch C, Schweizer S, **Shimakami T**, Domingues FS, Kim S, Lemon SM, Antes I. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. Antimicrob Agents Chemother. 2012. 56(4):1907-15.
- 11) **Shimakami T**, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3'of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. J Virol. 2012. 86(13):7372-83.
- 12) **Shimakami T**, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 109(3):941-6.

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) **島上哲朗**、山根太典、Lemon S miR-122-Ago2複合体によるC型肝炎ウイルスRNAの安定化、2012年、実験医学、30:1444-8

研究分担者 白崎尚芳

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, 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.
- 5) **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.

- 6) Okada H, Honda M, Jean S. Campbell, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, **Shirasaki T**, Takabatake R, Nakamura M, Sunakozaka H, Tanaka T, Nelson Fausto, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Cancer Research. 2012 Sep;72(17):4459-71

学会発表

研究代表者 島上哲朗

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)
- 3) **島上哲朗**、本多政夫、金子周一. プロテアーゼ阻害剤耐性C型肝炎ウイルスのRNA複製能・感染性粒子産生能に関する検討、第48回日本肝臓学会総会、2012年6月

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(65th 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. 21st 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

- 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, The 64rd AASLD2013, Poster, 2013年11月(ワシントン)

- 5) **Shimakami T**, Yamane D, Honda M, Kaneko S, and Lemon SM. miR-122 stabilizes Hepatitis C Virus RNA by an Ago2-dependent mechanism, The 10th single topic conference, Poster, 2012年11月 (東京)

6) **Shimakami T**, Honda M, Shirasaki T, Funaki M, Takabatake R, Lemon SM, and Kaneko S. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Acyclic Retinoid, The 63rd AASLD2012, Poster, 2012年11月(サンフランシスコ)

研究分担者 白崎尚芳

国内学会

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, Okada H, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月

3) **白崎尚芳**, 本多政夫, 金子周一. 慢性C型肝炎におけるIFN治療抵抗性とTGF- β シグナル 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2012年6月

国際学会

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. 65th AASLD 2014, 2014年11月

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. HCV meeting 2014, 2014年10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, 2013年11月

4) **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

5) **Shirasaki T**, Honda M, Shimakami T, Okada H, Lemon S, Murakami S, Kaneko S. Gene expression profile of primary hepatocyte and differential innate antiviral response of IFN- α and IL28B. The 63rd AASLD 2012, 2012年11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

II. 分担研究報告

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 (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。研究分担者白崎は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。研究代表者島上は、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C型慢性肝疾患患者において抗ウイルス療法前の肝組織中、および血清中のlncRNA-Hの発現量を測定し、インターフェロン治療感受性予測因子であるIL28Bゲノタイプ別に比較した。その結果IL28マイナー症例の肝内・血清中のlncRNA-Hの発現量は、IL28Bメジャー患者に比べ有意に高値であることを見いだした。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

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 型慢性肝炎におけるインターフェロン治療効果やインターフェロン治療抵抗性、肝発癌などの様々な病態における lncRNA の関与を検討する。

研究分担者白崎は、HCV感染培養細胞のRNAを網羅的に解析して、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。さらにヒト肝臓組織、血清、肝臓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。

研究代表者島上は、研究代表者白崎がin vitroにおいて同定したlncRNA-Hに関してin vivoにおける意義を以下の点から解析した。

- 1) In vitroにおいて認められたHCV感染によるlncRNA-Hの発現誘導が、マウス、チンパンジーなどのin vivoにおいても認められるかどうかを検討した。
- 2) C型慢性肝疾患患者で抗ウイルス療法によるHCV排除前後の肝臓組織中のlncRNA-Hの発現量を比較し、ヒトにおけるHCV感染によるlncRNA-Hの発現の変化を検討した。
- 3) C型慢性肝疾患患者の抗ウイルス療法前の肝臓組織中及び血清中のlncRNA-H発現量を定量PCRにて測定し、IL28BゲノタイプとlncRNA-H発現量の相関の有無を検討した。

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、肝臓生検、血清の採取を行った。各タイムポイントで得られた肝臓組織由来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。また肝臓組織中・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、肝臓組織を採取した。その後肝臓組織中の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の排除前後で肝臓生検が施行された20例を対象として、HCV排除前後でのlncRNA-Hの肝臓組織中の発現量を定量PCR法で測定し、比較した。
- 4) ペグインターフェロン・リバビリン療法を施行された165例の治療前肝臓生検組織を用いて肝臓内のlncRNA-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。
- 5) 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にて測定してIL28Bゲノタイプに(majorとminor)との相関の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

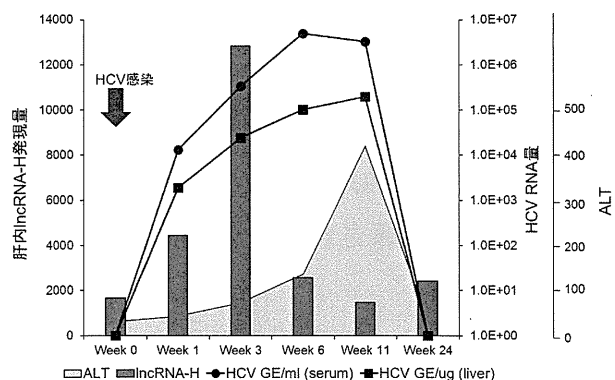
本研究では感染性粒子を産生しうるHCV細胞培養系も用いる。そのためウイルス粒子を形成する実験に関しては、必ずP2ルームで実施するとともに、汚染事故には十分注意して行う。なお申請者が所属する研究グループは既にP2ルームを有しており、HCV感染実験でのP2ルームの使用に関しては、平成24年6月12日付けで文部科学大臣より確認を受け、更に金沢大学長より

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 週後から 11 週後まで持続的に肝内、血清で持続的に検出されたが、24 週後には肝内、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 週後まで増加傾向を示したが、HCV RNA が陰性化した 24 週後には正常化した。これらの結果から HCV は少なくとも 11 週後まで持続感染し、急性肝炎を惹起したが、24 週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 lncRNA-H 発現量

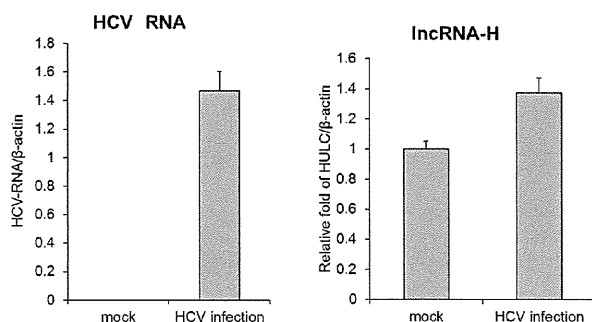


2) HCV 感染マウスにおける lncRNA-H の

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 4.2×10^7 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 lncRNA-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 lncRNA-H の発現量は非感染マウスに比べて高値であった(図 2)。

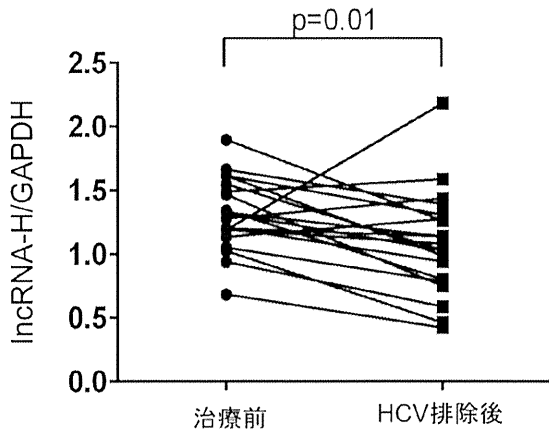
図 2 HCV 感染キメラマウスにおける肝内 HCV RNA、lncRNA-H 発現量



3) C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の肝内 lncRNA-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 lncRNA-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 lncRNA-H の発現量の低下を認めた(図 3)。

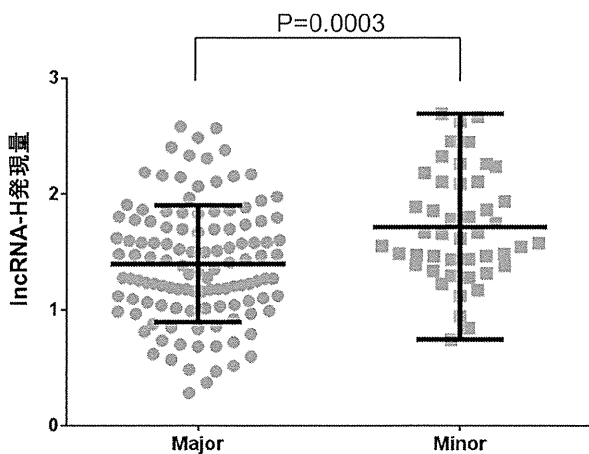
図 3 HCV 排除前後における lncRNA-H の発現量の比較



4) IL28B ゲノタイプ別肝組織中 lncRNA-H 発現量の比較

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 lncRNA-H 発現量を定量 PCR 法により測定した。lncRNA-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 ゲノタイプ別肝組織中 lncRNA-H 発現量

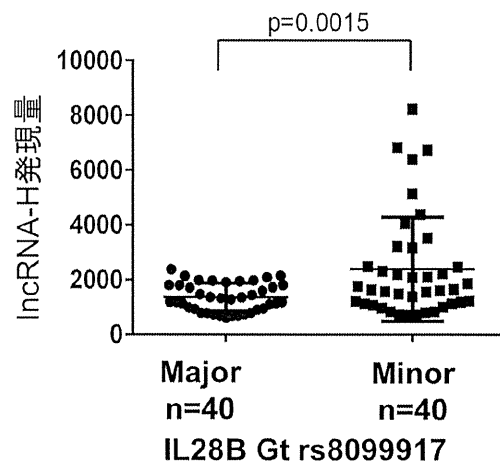


5) IL28B ゲノタイプ別血清中 lncRNA-H 発現量の比較

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 lncRNA-H 量を定量 PCR 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。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 (図 5)。

図 5 IL28B ゲノタイプ別血清中 lncRNA-H 発現量



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 lncRNA-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 lncRNA-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 lncRNA-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 lncRNA-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